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

Avaliação da redistribuição *postmortem* de opiáceos através de
determinação em humor vítreo e sangue cardíaco e periférico
humanos

Livia Rentas Sanches

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Mauricio Yonamine

São Paulo
2011

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

Avaliação da redistribuição *postmortem* de opiáceos através de
determinação em humor vítreo e sangue cardíaco e periférico
humanos

Livia Rentas Sanches

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Mauricio Yonamine

São Paulo
2011

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

S211a Sanches, Livia Rentas
Avaliação da redistribuição *postmortem* de opiáceos através de determinação em humor vítreo e sangue cardíaco e periférico humanos / Livia Rentas Sanches. -- São Paulo, 2011.
115p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Yonamine, Mauricio

1. Análise toxicológica 2. Espectrometria de massas : Análise : Toxicologia I. T. II. Yonamine, Mauricio, orientador.

615.907 CDD

Livia Rentas Sanches

Avaliação da redistribuição *postmortem* de opiáceos através de
determinação em humor vítreo e sangue cardíaco e periférico humanos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Mauricio Yonamine
Orientador/Presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

“Dedico esse trabalho aos meus pais, Everson e Roseli, pelo apoio, paciência e compreensão em todos os momentos da minha vida, e ao meu orientador, Professor Mauricio, pela oportunidade de aprendizado e crescimento.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar e guiar o meu caminho sempre.

À minha família pelo apoio e incentivo durante todo esse período, e por sempre acreditarem em mim.

Ao Professor Dr. Mauricio Yonamine pela oportunidade de aprendizado, e por toda paciência e amizade.

Aos professores colaboradores desse projeto Dra. Vilma Leyton e Dr. Michael David Osselton por nos darem auxílio técnico.

À equipe do Instituto Médico Legal de São Paulo, e do Serviço de Verificação de Óbitos da Capital, em especial ao Dr. Carlos Augusto Pasqualucci, por permitirem e colaborarem com as coletas das amostras.

À Saskia Seulin e a Ligia Endo por auxiliar em todas as coletas de casos, sempre com muito empenho, conhecimento e dedicação.

Aos meus amigos pós-graduandos, Lorena, Carolina, Rafael, Marli, Simone, André, Marcelo, Raphael e Livia pela colaboração e amizade.

Aos amigos do Laboratório e departamento de Análises Toxicológicas, Beatriz Bismara, Angelo, Arícia, Luma, David, Cinthia, Daniela, Deise, Paula, Luana, Susan, Beatriz, Luzia, Dalva, pelo auxílio e convívio.

À Leila Bonadio pela revisão das referências bibliográficas.

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1. Toxicologia <i>postmortem</i>	6
2.1.1. Redistribuição <i>postmortem</i>	9
2.2. Opiáceos.....	13
2.2.1. Incidência	14
2.2.2. Mecanismo de ação e efeitos farmacológicos.....	15
2.2.3. Tolerância e dependência	16
2.2.4. Morfina	16
2.2.5. Codeína.....	18
2.2.6. Heroína	19
2.2.7. Comportamento <i>postmortem</i> dos opiáceos.....	21
2.2.8. Métodos utilizados para detecção de opiáceos em matrizes biológicas ..	23
3. OBJETIVOS	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1. Material.....	29
4.1.1. Soluções-padrão	29
4.1.2. Reagentes e outros materiais	30
4.1.3. Equipamentos e acessórios	30
4.1.4. Amostras	30
4.2. Métodos	29
4.2.1. Coleta das amostras	29
4.2.2. Desenvolvimento do método para determinação de opiáceos em sangue total e em humor vítreo por SPE e GC/MS	32
4.2.2.1. Preparo das amostras	32
4.2.2.1.1. Determinação de morfina livre	33
4.2.2.1.2. Determinação de morfina total	33
4.2.2.2. Condições cromatográficas	34
4.2.2.3. Otimização do método.....	35
4.2.2.3.1. Estudo de pH ótimo para extração dos analitos.....	35
4.2.2.3.2. Estudo da hidrólise enzimática dos conjugados da morfina.....	35
4.2.3. Validação do método.....	36
4.2.3.1. Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).....	36
4.2.3.2. Estudo de efeito matriz - Seletividade	37
4.2.3.3. Linearidade	39
4.2.3.4. Precisão intra e interensaio	39
4.2.3.5. Recuperação	40
4.2.3.6. Estabilidade dos analitos na matriz	40
4.2.4. Análise toxicológica de casos <i>postmortem</i> com envolvimento de opiáceos	41
5. RESULTADOS	43
5.1. Cromatogramas e espectros de massas característicos da análise de opiáceos em sangue total e em humor vítreo	43
5.2. Resultados da otimização do método	44
5.2.1. Estudo do pH ótimo para extração dos analitos.....	44
5.2.2. Estudo da hidrólise enzimática dos conjugados da morfina.....	45
5.3. Resultados da validação do método para determinação de opiáceos em sangue total e em soro fisiológico.....	47

5.3.1. Limite de detecção e limite de quantificação	47
5.3.2. Estudo de efeito matriz	48
5.3.3. Linearidade	48
5.3.4. Precisão intra e interensaio	49
5.3.5. Recuperação	49
5.3.6. Estabilidade dos analitos na matriz	50
5.4. Resultados da análise toxicológica de casos <i>postmortem</i> com envolvimento de opiáceos.....	50
6. DISCUSSÃO.....	54
7. CONCLUSÃO	68
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
9. ANEXOS.....	84
ANEXO A	85
ANEXO B	87
ANEXO C	89
ANEXO D	93
ANEXO E	96
ANEXO F	99
ANEXO G	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Razões sangue cardíaco/femoral para diversas substâncias psicoativas (adaptado de DRUMMER, 2001)	8
Figura 2 – Esquema representativo das principais vias de biotransformação da heroína, morfina e codeína	21
Figura 3 – Esquema representativo do procedimento de extração dos opiáceos em amostras de sangue total realizado por extração em fase sólida, seguido de derivatização por sililação e detecção por GC-MS.....	34
Figura 4 – Cromatograma (GC/MS) característico da análise de amostra de sangue total adicionada de opiáceos: codeína (A), morfina e morfina-d ₃ (B) e 6-acetilmorfina (C).	43
Figura 5 – Cromatograma (GC/MS) característico da análise de amostra de soro fisiológico adicionada de opiáceos: codeína (A), morfina e morfina-d ₃ (B) e 6-acetilmorfina (C).	43
Figura 6 – Espectro de massas da morfina derivatizada (A) e da morfina-d ₃ derivatizada (B)	44
Figura 7 – Espectro de massas da 6-acetilmorfina derivatizada (A) e da codeína derivatizada (B)	44
Figura 8 – Estudo do pH ótimo para extração de morfina, 6-acetilmorfina e codeína	44
Figura 9 – Superfície de resposta da hidrólise enzimática dos conjugados da morfina em função da concentração enzimática (U/mL) e da temperatura de incubação (°C) com tempo de incubação de 4 horas.	45
Figura 10 – Superfície de resposta da hidrólise enzimática dos conjugados da morfina em função do tempo (h) e da temperatura de incubação (°C) com concentração enzimática de 20.000U/ml.	45
Figura 11 – Superfície de resposta da hidrólise enzimática dos conjugados da morfina em função da concentração enzimática (U/mL) e do tempo de incubação (h) com temperatura de incubação de 37°C.	46
Figura 12 – Superfície de resposta da hidrólise enzimática dos conjugados da morfina em função da concentração (U/mL) e da temperatura (°C) com tempo de incubação de 4 e de 24 horas respectivamente.....	46
Figura 13 - Superfície de resposta da hidrólise enzimática dos conjugados da morfina em função do tempo (horas) e da temperatura (°C) com concentração enzimática de 2500 e 20.000 U/mL respectivamente.....	46

Figura 14 - Superfície de resposta da hidrólise enzimática dos conjugados da morfina em função do tempo (horas) e da concentração (U/mL) com temperatura de 37 e 60°C respectivamente..... 47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantidades aproximadas de tecidos coletado.....	32
Tabela 2 – Valores de limite de detecção e de limite de quantificação para os opiáceos analisados.....	47
Tabela 3 – Estudo de efeito matriz da morfina, 6-acetilmorfina e codeína em amostras de sangue total e de soro fisiológico.....	48
Tabela 4 - Valores de precisão intra-ensaio e interensaio para os opiáceos analisados	49
Tabela 5 – Valores de recuperação (%) obtidos na análise de morfina, 6-acetilmorfina e codeína em sangue total e em soro fisiológico	50
Tabela 6 – Estudo de estabilidade da morfina, 6-acetilmorfina e codeína em sangue total em condições de temperatura ambiente (24 horas), após ciclos de congelamento e descongelamento, sob refrigeração (7 dias) e à - 20°C (90 dias)...	50
Tabela 7 – Estudo de estabilidade da morfina, 6-acetilmorfina e codeína em soro fisiológico em condições de temperatura ambiente (24 horas), após ciclos de congelamento e descongelamento, sob refrigeração (7 dias) e à – 20°C (90 dias) ..	51
Tabela 8 – Informações, histórico, e resultados das análises toxicológicas dos casos <i>postmortem</i> envolvendo opiáceos.....	52

RESUMO

Avaliação da redistribuição *postmortem* de opiáceos através de determinação em humor vítreo e em sangue cardíaco e periférico humanos

O uso abusivo de substâncias psicoativas cresce a cada dia em diferentes segmentos da sociedade mundialmente. Aumentos significativos no número de ocorrências de óbito com envolvimento de tais substâncias têm sido reportados nas últimas décadas. A classe dos opiáceos está figurada entre as substâncias de maior prevalência nesse contexto. Em toxicologia forense, análises toxicológicas conduzidas em amostras *postmortem* podem auxiliar se substâncias químicas tiveram influência no óbito. A realização dessas análises e interpretação dos resultados obtidos nesses casos é bastante complexa devido à deterioração sofrida pelos cadáveres, e também pela ocorrência de um fenômeno denominado redistribuição *postmortem*, responsável pela transferência de substâncias após a morte a favor de gradiente de concentração. Em geral, as substâncias são transferidas de órgãos como fígado, coração, pulmões, e trato gastrointestinal, para locais de menor concentração, afetando principalmente o sangue da região central e órgãos adjacentes. O humor vítreo, apesar de considerado um espécime não-convencional, pode ser bastante útil, principalmente em casos onde não há amostras sanguíneas disponíveis para coleta. Esse espécime se apresenta como uma matriz menos propensa à decomposição bacteriana, além de ser menos afetado pela redistribuição *postmortem* por sua localização mais afastada dos sítios centrais. Desta forma, um método para quantificação de opiáceos (morfina livre e total, codeína e 6-acetilmorfina) em sangue (cardíaco e periférico) e em humor vítreo humanos coletados *postmortem* foi desenvolvido e validado. O método mostrou ser preciso, eficiente e sensível, com limite de quantificação de 10 ng/ml. Amostras de 7 casos *postmortem* com envolvimento de opiáceos foram analisadas com o intuito de verificar correlação nas concentrações entre os sítios, e possível ocorrência do fenômeno de redistribuição.

ABSTRACT

Evaluation of the opiates *postmortem* redistribution through analysis in human cardiac and peripheral blood and vitreous humor samples

The abuse of psychoactive substances grows every day worldwide in different segments of the society. Significant increases in the number of drug-related deaths have been reported in recent decades. The class of opiates is one of the most prevalent substances in this context. In forensic toxicology, toxicological analyses are performed in *postmortem* samples to evaluate whether chemical substances were involved in the death. The completion of this analysis and interpretation of results are very complex due to the deterioration suffered by the corpses, and also by the occurrence of the phenomenon called *postmortem* redistribution, responsible for the transfer of substances along a concentration gradient after death. In general, the transference of the substances occurred from organs such as liver, heart, lungs and gastrointestinal tract to sites of low concentrations, mainly affecting the blood from central sites and adjacent organs. By this reason, the collection of blood from two different sites of the body for comparison is highly recommendable. Despite being considered a non-conventional specimen, vitreous humor can be quite useful, especially in cases where no blood samples are available for collection. This specimen is usually less prone to bacterial decomposition, and it's also less affected by *postmortem* redistribution due to its location further away from central sites. Thus, a method to quantify opiates (free and total morphine, codeine and 6-monoacetylmorphine) in *postmortem* blood (cardiac and peripheral) and in vitreous humor samples was developed and validated. The method showed good accuracy, efficiency and sensibility, with limit of quantification of the 10 ng/ml. Seven samples of postmortem cases with opiates involvement were analyzed to verify the correlation in the concentrations of the sites, and possible occurrence of the redistribution phenomenon.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A toxicologia *postmortem* se torna cada vez mais importante na investigação de óbitos no contexto atual, onde um crescente aumento da disponibilidade e do uso abusivo de fármacos e drogas ilícitas é relatado mundialmente. Os achados toxicológicos muito contribuem para determinação da causa e da maneira da morte. Em geral, a avaliação da intoxicação é feita através da análise da concentração sanguínea *postmortem* do possível agente tóxico envolvido. Valores de referência classificados como “terapêutico” ou “tóxico”, estabelecidos com base em situações clínicas, estão disponíveis na literatura para avaliação dos resultados obtidos. Porém, interpretar resultados utilizando valores clínicos é basear-se no conceito de que o corpo se manterá como um elemento estático após a morte, e que as concentrações dos toxicantes não sofrerão alterações nesse período, o que não é real. Mudanças ocorrem no período *postmortem* afetando as concentrações das substâncias, que por sua vez, não necessariamente refletem os valores existentes no momento anterior ao óbito. As variações nas concentrações são dependentes do local de amostragem e do tempo decorrido entre a morte e o momento da autópsia, consideradas resultado do chamado fenômeno de redistribuição *postmortem* (DRUID, 2007).

A redistribuição *postmortem* se refere à transferência de agentes tóxicos a favor de gradiente de concentração após a morte. Em geral, o sangue da região central é o mais afetado pela redistribuição proveniente de órgãos como fígado, coração e pulmões (JONES, 2008).

As principais alterações ocorrem nas primeiras horas, e o processo que resulta no rompimento das ligações existentes entre os xenobióticos e o seu sítio de ação promove a liberação dessas substâncias, com conseqüente redistribuição. Alguns fatores relacionados às propriedades das drogas, como a lipofilicidade, pKa e volume de distribuição podem influenciar nesse processo (YAREMA & BECKER, 2005).

Já que as concentrações das substâncias em determinadas amostras podem estar alteradas nesse período, falsas interpretações podem ser cometidas baseando-se em resultados obtidos de um único local de amostragem. É recomendado analisar sangue de duas regiões diferentes do corpo para

comparação. E ainda além, existem os casos onde o sangue já não está mais disponível para coleta, assim, espécimes não-convencionais devem ser analisados. Entretanto, a falta de valores de referência ou de informação referente à correlação com o sangue dificulta a interpretação de análises envolvendo esses espécimes biológicos (SCOTT & OLIVER, 1999).

É de extrema relevância levar em consideração a ocorrência do fenômeno de redistribuição, principalmente em casos onde se suspeita de homicídio ou suicídio causados por envenenamento, acidentes de trânsito com envolvimento de drogas, e casos de eutanásia ou imperícia médica, já que conclusões erradas podem levar a sérias consequências (COOK *et al.*, 2000).

Os primeiros relatos sobre a existência desse fenômeno datam de 1960, e retratam informações a respeito de barbitúricos, que na época eram os principais fármacos responsáveis por causar fatalidades. Um estudo retrata a descaracterização de uma relação existente entre concentrações de barbitúricos em sangue e fígado decorrente do passar do tempo entre a morte e o momento da amostragem, tornando-se mais fraca, indicativo de uma possível redistribuição (CURRY & SUNSHINE, 1960). Outro estudo, dessa vez utilizando um modelo animal, relata a difusão *postmortem* de barbitúricos quando presentes no estômago, acarretando aumentos contínuos nos níveis encontrados em fígado até 216 horas após a morte dos animais (PARKER *et al.*, 1971).

Em sequência, HOLT & BENSTEAD (1975) especularam que a digoxina poderia sofrer redistribuição após a morte após analisar sangue de três regiões diferentes do corpo (sangue cardíaco, femoral e das veias do pescoço) em casos de suspeita de intoxicação letal, onde diferenças significativas foram encontradas entre os locais de coleta, com maiores valores em sangue cardíaco quando comparados aos outros sítios estudados. O termo redistribuição *postmortem* foi usado por KOREN & MACLEOD (1985) após suas comprovações em um estudo conduzido em ratos, verificando alterações nas concentrações de digoxina após a morte dos animais.

Em 1980, BANDT também realizou estudo com cerca de dez casos de óbito envolvendo antidepressivos tricíclicos e detectou variações significativas nas concentrações encontradas nas diferentes amostras de acordo com o tempo decorrido e do local de amostragem (BANDT, 1980).

É possível especular que os opiáceos sejam passíveis a sofrer o fenômeno de redistribuição *postmortem*. Isso pode ser inferido pelo fato de que a morfina, representante da classe, é um fármaco que possui volume de distribuição moderado, e lipofilicidade em pH fisiológico, condições essas que se mostram favoráveis à ocorrência da redistribuição. Entretanto, ao observar os dados da literatura científica, percebe-se que esses se mostram conflitantes. Enquanto alguns estudos afirmam a ocorrência da redistribuição dessas substâncias, outros não observam variações significativas que indicam desse acontecimento (LOGAN & SMIRNOW, 1996; GEROSTAMOULOS & DRUMMER, 2000; BOGUSZ, 1997; SKOPP *et al.*, 1996).

Portanto, há necessidade de realização de maiores estudos para avaliação do comportamento dos opiáceos nesse aspecto toxicológico. Essas substâncias estão figuradas entre as maiores prevalências de óbito com envolvimento de substâncias psicoativas no mundo todo (UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME, 2009). De fato, no Brasil, o abuso dessa classe de substâncias não é tão fortemente observado como ocorre em países do hemisfério norte, porém o uso sob prescrição possui alta frequência. Casos de intoxicação acidental são observados, além de imperícia médica ou envenenamento de pacientes terminais, onde fica difícil fazer a distinção do uso terapêutico (CRANDALL *et al.*, 2006b). Sem contar a ocorrência de casos de suicídio cometidos principalmente por parte de profissionais da área da saúde, que possuem acesso a esses fármacos, possibilitando autoadministração (OLIVEIRA & CAMARGO, 2008).

É também importante estabelecer correlação entre as concentrações existentes em sangue e humor vítreo, já que a indisponibilidade de valores de referência na literatura científica impossibilita a inclusão mais ampla do humor vítreo em rotinas de análise toxicológica. Essa inclusão traria grandes benefícios para esse tipo de análise, já que essa matriz apresenta inúmeras vantagens frente a outros espécimes. Apresenta-se como uma matriz limpa, menos propensa a sofrer interferências da redistribuição *postmortem* devido à sua localização mais afastada dos sítios centrais, e possui um envoltório natural protegendo contra decomposição bacteriana (HEPLER & ISENSCHMID, 2007).

Tendo em vista o exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a redistribuição *postmortem* de opiáceos. Por escolha, foi de nosso interesse avaliar o comportamento de substâncias como a morfina e a codeína, por apresentarem as

maiores frequência de uso dessa classe de fármacos no Brasil. E também avaliar o comportamento da heroína (droga de abuso ilícita), através da análise do seu metabólito ativo a 6-acetilmorfina, para estudo de eventuais casos de intoxicação envolvendo a droga. A avaliação foi feita através da quantificação dessas drogas em sangue cardíaco e periférico e em humor vítreo humanos, através do uso de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Para isso um método foi desenvolvido e validado.

A presente pesquisa é parte integrante de um projeto maior intitulado “Redistribuição *postmortem* de substâncias psicoativas em tecidos biológicos humanos” que visa o estudo do fenômeno de redistribuição de substâncias psicoativas (opióceos, cocaína, barbitúricos e antidepressivos) através da análise de diversos espécimes biológicos de interesse forense (sangue periférico e cardíaco, humor vítreo, fígado, músculo, cérebro e medula óssea). É também um estudo colaborativo entre a Faculdade de Ciências Farmacêuticas e a Faculdade de Medicina da USP, Serviço de Verificação de Óbitos da Capital, Instituto Médico Legal de São Paulo e o Centro de Ciências Forenses da Universidade de Bournemouth, Reino Unido.

Revisão da Literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Toxicologia *postmortem*

A toxicologia *postmortem* investiga a possibilidade de agentes tóxicos terem contribuído para a morte ou serem a causa primária dessa. As dificuldades encontradas em avaliar a concentração de drogas presentes em amostras *postmortem* são consideravelmente maiores quando comparadas com as de situação clínica. Além da necessidade de avaliar condições pré-existentes da morte e trabalhar com espécimes de maior complexidade, existem diversos processos que ocorrem no período *postmortem* que dificultam as interpretações, podendo levar a conclusões equivocadas e sérias consequências (KENNEDY, 2010).

Para a toxicologia *postmortem* é de extrema importância o tipo de espécime a ser coletado, a forma de coleta, e a preservação desses espécimes. Em geral, existe uma grande disponibilidade de espécimes para análise, com algumas exceções, onde esse número se restringe por particularidades de cada caso, podendo haver disponibilidade para coleta apenas de um ou outro tipo de tecido (FORREST, 1993).

Os espécimes geralmente coletados em uma autópsia incluem sangue total cardíaco e periférico, urina, bile, humor vítreo, pelo menos um órgão (geralmente fígado) e conteúdo gástrico. Em casos mais específicos onde se suspeita, por exemplo, de overdose ou envenenamento, outros espécimes menos convencionais como cabelo, unhas, cérebro e ossos podem ser coletados para uma investigação mais aprofundada (SKOPP, 2004). Apesar dessa grande variedade de espécimes, esse número se limita a aqueles que possuem valores de referência disponíveis para interpretação dos resultados obtidos.

O sangue total é geralmente o espécime de escolha para avaliar intoxicações em casos *postmortem*. Normalmente essa matriz se apresenta de forma fluida, porém com a presença de alguns coágulos. É recomendado coletar sangue de dois locais diferentes, já que os valores podem variar de um local para outro. Sendo assim, usualmente coleta-se sangue cardíaco e periférico para comparação (DRUMMER, 2007).

O sangue cardíaco possui a vantagem de ser geralmente mais abundante, podendo ser coletado através de aspiração usando uma seringa. Entretanto, essa técnica pode carregar fluido do pericárdio ou até da cavidade pleural, contaminando a amostra coletada. Além disso, esse sangue parece ser mais afetado pela redistribuição *postmortem*, já que está localizado na região central, próximo a órgãos que costumam acumular grandes quantidades de substâncias psicoativas durante a vida, e que acabam por liberar tais substâncias após a morte. Devido a isso, o sangue cardíaco pode representar uma grande fonte de erros e falsas interpretações (MORIYA & HASHIMOTO, 1999).

O sangue periférico, obtido de veias femorais ou subclávias, é usualmente um sangue menos afetado por mudanças *postmortem*, pois se encontra mais afastado da região central do corpo. O sangue femoral é normalmente o sangue periférico de escolha, já que na perna existe a presença de um grande número de válvulas que bloqueiam o movimento do sangue proveniente de outros locais. É recomendado se ligar a veia anterior à amostragem para eliminar qualquer contribuição da veia ilíaca e veia cava, e também evitar o processo de massagear as veias (PROUTY & ANDERSON, 1990). Normalmente, coletando-se um volume aproximado de 5 a 10 mL, é pouco provável que haja contaminação proveniente da região central do corpo. Apesar de apresentar menor fonte de erros frente ao sangue cardíaco, o sangue femoral pode apresentar concentrações aumentadas no período *postmortem*, devido à proximidade ao músculo esquelético que envolve essas veias, e que costuma ter concentrações um pouco mais elevadas do que *antemortem* (DRUID, 2007).

A razão sangue cardíaco/periférico é utilizada para estimar a ocorrência da redistribuição *postmortem*. Razões maiores que um, ou seja, concentrações mais altas em sangue cardíaco em relação ao periférico indicam maior probabilidade da existência do fenômeno. Na Figura 1 são demonstradas as razões sangue cardíaco/periférico de alguns fármacos de importância forense.

Figura 1 – Razões sangue cardíaco/femoral para diversas substâncias psicoativas (adaptado de DRUMMER, 2001)

O humor vítreo é um espécime interessante nesse aspecto toxicológico. Esse fluido gelatinoso e incolor localiza-se na câmara posterior do olho, entre o cristalino e a retina. É uma matriz limpa, o que facilita sua análise, constituído de 99% de água, e 1% de colágeno, ácido hialurônico, creatinina, uréia, e sais inorgânicos como sódio e cloreto em concentrações similares ao do soro (COX *et al.*, 2007; ANTONIDES *et al.*, 2007). Por estar anatomicamente mais afastado da cavidade corpórea central, pode ser bastante útil nos casos de substâncias mais sujeitas à redistribuição.

Apesar do limitado volume disponível para coleta (cerca de 3 mL por olho), esse espécime é menos propenso à decomposição bacteriana por estar contido em um envoltório protetor natural, o olho, bastante útil em casos onde amostras sanguíneas já não estão mais disponíveis para coleta. Tem sido usado há anos para confirmação da ingestão de etanol, pois permite fazer distinção entre o uso e a formação *postmortem*, já que a fermentação não ocorre no olho (CHAO & LO, 1993). Devido à inexistência de enzimas como a esterase, que hidrolisa fármacos como a 6-acetilmorfina e a cocaína no sangue, o humor vítreo pode ser utilizado para análise dessas substâncias, que se mostram mais estáveis nesse fluido (JONES, 2008). A difusão é a forma de transporte das substâncias da circulação sistêmica para o humor vítreo. A barreira existente entre esses tecidos torna mais lento o estabelecimento do equilíbrio nas concentrações das drogas entre eles, por provocar um atraso tanto na entrada dessas substâncias no humor vítreo quanto no processo

de excreção. Esse fato justifica os casos onde não há presença de substâncias no sangue, mas ainda são encontradas concentrações no humor vítreo (SKOPP, 2004).

Uma desvantagem em relação a esse espécime é a indisponibilidade de informação na literatura a respeito da correlação com o sangue para variadas substâncias, o que dificulta a interpretação dos resultados obtidos. Entretanto, já foi comprovado que as concentrações de algumas substâncias presentes nesse espécime freqüentemente refletem as concentrações sanguíneas existentes algumas horas antes da morte. Uma possível fonte de erros para análise do humor vítreo pode ser a ocorrência de difusão de substâncias do cérebro em casos onde o cadáver permaneceu em posição favorável a esse movimento por tempo prolongado (DIMAIO & DIMAIO, 1993).

Para conservação desses espécimes fluidos é recomendada a adição de 2% de fluoreto de sódio para inibir o crescimento de microorganismos e diminuir conversões cinéticas. O armazenamento deve ser feito a baixas temperaturas, sendo - 20°C para longo prazo e 4°C para curto prazo (DRUID, 2007).

2.1.1. Redistribuição *postmortem*

Para interpretação dos resultados obtidos em análises *postmortem* é preciso levar em consideração as circunstâncias do óbito, a história médica, e os processos que ocorrem após a morte que podem afetar as concentrações das drogas nas amostras coletadas (MADEA & MUßHOFF, 2004).

Valores de referência baseados em informações clínicas podem ser erroneamente aplicados no período *postmortem*, pois além desses valores se referirem a plasma ou soro, e não sangue total como é o caso, as concentrações encontradas no período *postmortem* não necessariamente refletem as concentrações existentes no momento exato da morte (DRUID & HOLMGREN, 1998).

O fenômeno de redistribuição *postmortem* é um dos principais fatores interferente na interpretação dos resultados nessas análises. Esse processo ocorre através do movimento de agentes tóxicos a favor de gradiente de concentração, que

ocorre mais intensamente nas primeiras 24 horas após a morte (POUNDER & JONES, 1990).

Um dos mecanismos envolvidos consiste na liberação de substâncias presentes em órgãos conhecidos com reservatórios, como o fígado, coração e pulmões principalmente, assim chamados devido à capacidade em aprisionar substâncias durante a vida. Essa liberação se deve ao possível rompimento de ligações existentes entre as substâncias e esses tecidos após a morte, que se desfazem devido à interrupção de processos celulares, mudanças de pH sanguíneo e tecidual. Esses acontecimentos levam a alterações na conformação protéica, terminando por liberar as substâncias que ali estavam presentes na forma ligada a essas proteínas (JONES, 2008). Após a liberação, os agentes tóxicos sofrem difusão para o fluido intersticial, e em seguida se difundem para os vasos capilares, atingindo em seqüência os vasos de maior calibre. Além da difusão para a circulação sanguínea, pode também ocorrer difusão transparietal entre órgãos adjacentes (POUNDER, 1993).

A redistribuição proveniente dos pulmões afeta principalmente as cavidades cardíacas e as veias torácicas, sendo que os maiores aumentos nas concentrações de substâncias foram encontrados nas cavidades esquerdas, e na aorta. Já no caso do fígado, as drogas são redistribuídas através das veias hepáticas, atingindo principalmente a veia cava inferior, e conseqüentemente as cavidades cardíacas direita e as veias pulmonares, mas também pode ocorrer redistribuição direta para órgãos vizinhos, como o estômago, duodeno e vesícula biliar, devido à proximidade anatômica. Substâncias que apresentam seu sítio de ação no miocárdio e se concentram nesse órgão durante a vida, rapidamente se distribuem para o sangue cardíaco após a morte, aumentando drasticamente as concentrações nesse sítio, assim também como são observados aumentos em sangue das veias subclávias. Para afirmar que os aumentos observados no sangue cardíaco são resultantes de liberação proveniente do miocárdio e não dos outros órgãos, como já citado, deve-se observar aumentos em ambas as cavidades, direita e esquerda (PELISIER-ALICOT *et al.*, 2003).

Outro mecanismo de redistribuição envolve a presença de substâncias não absorvidas no estômago, podendo ocorrer difusão dessas substâncias através da circulação, atingindo a aorta abdominal e veia ilíaca, e também por difusão para

órgãos vizinhos, como o fígado, pulmão esquerdo e coração. Pode-se também observar aumentos nas veias pulmonares e sangue cardíaco, decorrente de movimento e conseqüente redistribuição dos conteúdos gástricos provocado por vômito ou manuseio dos cadáveres (FUKE *et al.*, 1996).

O processo de morte celular está diretamente envolvido na liberação e conseqüente redistribuição de agentes tóxicos. Com o estado de hipóxia, a produção de ATP cessa, induzindo a uma maior ativação do metabolismo anaeróbio que termina por aumentar as concentrações de ácido láctico e fosfatos inorgânicos, reduzindo o pH intracelular. A bomba de sódio-potássio cessa provocando aumento do sódio intracelular e conseqüente formação de edema. A partir disso, uma série de processos ocorre ocasionando dano nas membranas celulares, e extravasamento do líquido intracelular, liberando seus conteúdos inclusive xenobióticos (YAREMA & BECKER, 2005).

Alguns fatores relacionados às propriedades das substâncias também podem influenciar no processo de redistribuição *postmortem*. Substâncias altamente ligadas a proteínas plasmáticas costumam apresentar baixo volume de distribuição, enquanto o oposto ocorre com aquelas que se distribuem largamente nos tecidos. Valores de volume de distribuição maiores que 3 L/kg geralmente indicam maior probabilidade de redistribuição (KENNEDY, 2010).

O caráter lipofílico normalmente favorece a concentração em órgãos como fígado, pulmões e coração durante a vida, favorecendo a formação de gradiente de concentração que promove a ocorrência da redistribuição dessas substâncias após a morte (HILBERG *et al.*, 1999).

Ainda nesse aspecto, a influência dos valores de pKa das substâncias está relacionada ao decréscimo do pH sanguíneo após a morte. Substâncias básicas se ionizam nesse fluido sanguíneo ácido, e tendem a se encaminhar para o espaço extracelular, sendo redistribuídas pelo sangue (MORIYA & HASHIMOTO, 1999).

O processo de putrefação pode resultar em degradação ou produção de xenobióticos pela ação de bactérias, assim como ocorre a produção *postmortem* de etanol em tecidos que possuem altas quantidades de substrato (glicose), e a degradação bacteriana de drogas que se apresentam na forma conjugada, favorecendo o reaparecimento da forma livre. O movimento do sangue induzido pela

posição em que o cadáver se encontra e o processo de *rigor mortis* podem ser responsáveis pela redistribuição física de agentes tóxicos, já que a contração do músculo cardíaco e das artérias pode resultar em circulação *postmortem* (Zapata *et al.*, 1989).

Algumas substâncias já foram estudadas nesse aspecto. Assim é o caso da digoxina, que difunde do fígado, pulmões e coração após a morte causando aumentos significativos em sangue cardíaco principalmente (KOREN & MACLEOD, 1985; HOLT & BENSTEAD, 1975). VORPAHL & COE (1978) compararam valores de concentração *antemortem* e *postmortem* de digoxina em sangue de 27 pacientes, e concluíram que as concentrações encontradas em sangue cardíaco *postmortem* provocariam 89% de diagnósticos falsos de toxicidade, já que essas se encontravam bem mais elevadas do que *antemortem*. Esses autores também observaram que o humor vítreo foi o espécime que melhor indicou os níveis reais de toxicidade quando comparado às concentrações *antemortem* em sangue.

Os antidepressivos tricíclicos apresentam semelhante perfil de redistribuição. Por apresentarem caráter básico, alto volume de distribuição e lipofilicidade, essas substâncias difundem do coração e dos pulmões principalmente, já que esse último órgão recebe todo o fluxo do ventrículo direito proporcionando uma rápida concentração de drogas *in vivo*. É comum ocorrer o acúmulo de aminas básicas como a imipramina, metadona, clorpromazina e anfetaminas nos pulmões durante a vida (POUNDER *et al.*, 1994). Estudos realizados em animais (HILBERG *et al.*, 1998) e em humanos (BANDT, 1980) retratam mudanças nas concentrações dessas substâncias em diversos tecidos após a morte.

No caso da cocaína, a detecção *postmortem* é dificultada pela rápida metabolização sofrida, principalmente em condições de maior temperatura e meio alcalino. Estudos *in vitro* comprovaram que ela rapidamente sofre hidrólise por esterases à ecgonina metil-éster, e também é metabolizada por hidrólise química à benzoilecgonina (ISENSCHMID *et al.*, 1989; BASELT, 1983). Alguns autores tiveram frustradas suas tentativas em investigar a redistribuição *postmortem* dessa substância, não obtendo sucesso em seus resultados (LOGAN *et al.*, 1997). Porém BAILEY & SHAW (1982) demonstraram que ela se liga ao miocárdio e é liberada no sangue cardíaco após a morte, resultando em maiores concentrações às encontradas na veia femoral, sugerindo que ela apresenta redistribuição.

2.2. Opiáceos

O termo opiáceo se refere a substâncias naturais presentes no ópio, como a morfina e a codeína, também incluindo alguns derivados semi-sintéticos como a heroína e a oxicodona. Já o termo opióide se refere tanto aos opiáceos quanto aos derivados sintéticos relacionados, como a meperidina, metadona, propoxifeno (JULIEN, 1997).

O ópio é extraído da *Papaver somniferum*, uma planta nativa da Ásia menor, conhecida popularmente como papoula. O suco leitoso é obtido de cápsulas (frutos imaturos) ainda verdes da planta, e após seco e pulverizado origina um pó (pó de ópio) de cor marrom que possui alcalóides em sua composição, que pode ser dissolvido na boca ou ingerido na forma de chá. O hábito de fumar ópio vem ocorrendo a poucas centenas de anos, e para isso é utilizado um cachimbo especial, com uma haste de bambu e um forninho de barro (WILLS, 2005).

Os alcalóides encontrados no ópio estão divididos em dois grupos, os fenantrenos como a morfina, codeína e tebaína, e o grupo dos benzilisoquinolinas como a papaverina e a noscapina, sendo que a morfina é considerada o principal constituinte, representando cerca de 10% do peso do ópio seco (REISINE & PASTERNAK, 1996).

O ópio bruto é vendido muitas vezes no mercado negro, porém é mais freqüente o seu refinamento em laboratórios clandestinos antes da comercialização, originando morfina na forma de base por uma simples extração. A conversão de morfina à heroína também é feita muitas vezes em semelhantes laboratórios, por reação de acetilação com anidrido acético e grau de purificação variável (DRUMMER, 2001).

A maioria dos opióides conhecidos como “pain killers” são comercializados de forma controlada nas farmácias e drogarias. A morfina é comercializada principalmente na forma de ampolas e comprimidos com nome de Astramorph ou Dimorf, já a codeína é encontrada na forma de gotas, comprimidos e supositórios como no Belacodid, Tylex e Benzotiol. Alguns opióides sintéticos comercializados como Demerol, Algafan e Inoval, são compostos de petidina, propoxifeno e fentanil respectivamente.

2.2.1. Incidência

Os opiáceos estão figurados entre as drogas de abuso mais usadas no mundo todo. Foi estimado entre 15 e 21 milhões o número de pessoas que fizeram uso de opiáceos no ano de 2007 a nível global. Esse uso é bastante comum no hemisfério norte, sendo responsável por grande parte dos óbitos causados pelo envolvimento de drogas, principalmente nos Estados Unidos, Europa e Ásia, sendo que nesse último está concentrada mais da metade da população mundial usuária de ópio. Isso se deve ao fato de que os países que possuem maior cultivo e produção ilícita de ópio estão localizados na região asiática, sendo eles Afeganistão, Mianmar e Laos, ressaltando que o primeiro foi responsável pela produção de 7.700 toneladas de ópio no ano de 2008. Na América do Sul, o Brasil aparece como a maior população usuária de opióides (cerca de 0,5% da população), onde a heroína está representada por apenas 0,05% do total de uso (UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME, 2009).

É de conhecimento geral a importância dos opióides no tratamento de dor crônica, principalmente a dor do câncer, e segundo levantamento realizado pela OMS serão quase 10 milhões de novos casos da doença por ano no mundo (WORLD HEALTH ORGANISATION, 1990).

Na Austrália, as estatísticas mostram que no ano de 1998, 24.657 pacientes receberam tratamento terapêutico com opióides, já em 2008 esse número subiu para 41.347 pacientes (AUSTRALIAN INSTITUTE OF HEALTH AND WELFARE, 2008).

Entre os anos de 1999 a 2006 o número de mortes causadas por intoxicação relacionada ao uso de drogas nos Estados Unidos passou de 20.000 a 37.000, e isso ocorreu principalmente devido a um grande aumento no número de overdoses envolvendo o uso de opióides (WARNER *et al.*, 2009).

Na Europa, estatísticas divulgadas no ano de 2009 mostram que do total de trinta países estudados, os opiáceos representam cerca de 85% do número de mortes relacionadas ao uso de drogas em onze deles, seguido de 70% de óbitos em outros seis países (EUROPEAN MONITORING CENTRE FOR DRUGS AND DRUG ADDICTION, 2009).

No Brasil, os opiáceos não estão figurados entre as substâncias de maior prevalência de uso abusivo. Em pesquisa realizada no ano de 2005 pelo CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÕES SOBRE DROGAS PSICOTRÓPICAS envolvendo as 108 maiores cidades do país, foi constatado o uso de opiáceos por cerca de 1,3% da população brasileira, sendo que dentre esses o analgésico opiáceo com maior frequência de uso foi codeína (Tylex[®]) com cerca de 88% do total. Em levantamento realizado pelo Ministério da Saúde, alguns dados se mostraram em elevação, constatando que o número de procedimentos envolvendo morfina no ano de 2002 se encontrava abaixo de 100.000, e no ano de 2004 chegou à casa dos 700.000, atingindo níveis que exigem maior atenção por parte dos especialistas (NETO, 2006).

2.2.2. Mecanismo de ação e efeitos farmacológicos

Os receptores opióides são ativados tanto por substâncias endógenas chamadas de peptídios opióides endógenos, como as encefalinas, endorfinas e dinorfinas, quanto pelas drogas opióides. Esses receptores são de três tipos, μ (mu), κ (kappa) e δ (delta), e estão distribuídos principalmente pelo Sistema Nervoso Central, estando presentes no cérebro e medula espinhal, mas também há receptores localizados em tecidos periféricos como no sistema gastrointestinal (REISINE & PASTERNAK, 1996).

A ativação dos receptores opióides por agonistas resulta em inibição da liberação de neurotransmissores excitatórios, como a substância P e o glutamato. O mecanismo ocorre por acoplamento à proteína G, que por sua vez inibe a ação da enzima adenilato ciclase, o que causa uma diminuição de AMPc e da fosforilação protéica dependente, levando à supressão de canais de cálcio voltagem-dependente, e conseqüente hiperpolarização da membrana sináptica através de ativação de canais de potássio (JULIEN, 1997). O mecanismo de recompensa exercido pelos opióides provavelmente ocorre por inibição dos neurônios gabaérgicos através de ativação de receptores opióides, levando a um aumento de dopamina livre (SIMONATO, 1996).

Os principais efeitos farmacológicos exercidos pela morfina, tomando esse fármaco como protótipo da classe, são: analgesia e sedação, euforia (bem-estar), depressão respiratória, supressão da tosse, miose, náuseas e vômitos, constipação, retenção urinária e reações alérgicas resultantes da liberação de histamina (WILLS, 2005).

A depressão respiratória é o efeito adverso mais importante, e a morte ocasionada por overdose aguda de opióides geralmente é resultado desse efeito, levando a hipóxia e edema pulmonar (WHITE & IRVINE, 1999).

2.2.3. Tolerância e dependência

O uso crônico de drogas opióides leva a tolerância e dependência acentuadas. Não se tem conhecimento exato do mecanismo de tolerância desenvolvido, mas supõe-se que envolva uma alteração do estágio de fosforilação dos receptores opióides, que modifica a interação com seus ligantes ou com a proteína G. O grau de tolerância é tão elevado que usuários crônicos podem suportar doses diárias de morfina de 2 g, enquanto doses clínicas ficam em torno de 20 a 50 mg/dia. Além disso, tolerância cruzada também é desenvolvida por usuários (DRUMMER, 2001).

A tolerância é acompanhada pelo desenvolvimento da dependência, caracterizada por compulsão pela droga e necessidade de aumento da dose. Em exposições crônicas, aumentos dos níveis de proteína G, adenilato-ciclase e proteína quinase AMPc dependente, são possíveis fatores envolvidos no desenvolvimento de dependência à opiáceos. A retirada brusca leva à diminuição da liberação de dopamina, redução dos níveis de endorfinas e aumento na liberação de norepinefrina em vários locais, ocasionando a chamada síndrome de abstinência caracterizada por ansiedade, transpiração, vômitos, febre, calafrios, diarreia, respiração ofegante, dores, insônia (OLIVEIRA & CAMARGO, 2008).

2.2.4. Morfina

A morfina é um potente narcótico analgésico usado extensivamente na clínica médica para alívio da dor moderada a severa e como pré-anestésico em cirurgias. Esse fármaco é mais comumente administrado por via oral, retal, intramuscular, intravenosa e subcutânea. A absorção oral é lenta e incompleta, o que se deve principalmente ao elevado efeito de primeira passagem, resultando em biodisponibilidade de apenas 40%. Já no caso de ser administrada subcutaneamente, em menos de meia hora mais da metade da quantidade injetada da droga já está disponível na circulação (REISINE & PASTERNAK, 1996).

Sua distribuição para tecidos e órgãos ocorre prontamente após absorção, apresentando um tempo de meia-vida de 2 a 3 horas. Possui especial dificuldade em atravessar a barreira hemato-encefálica, sendo que apenas cerca de 20% da dose consegue atingir o cérebro (LOTSCH, 2004).

Biotransformada no fígado principalmente por reação de fase II, através de conjugação com ácido glicurônico pela enzima UGT2B7, origina dois principais produtos de biotransformação, a morfina-3-glicuronídeo (M3G) e a morfina-6-glicuronídeo (M6G). Esses produtos são muitas vezes reabsorvidos através da circulação entero-hepática, e encontrados no plasma em altas concentrações. A metabolização converte 70% de morfina em M3G (55%) e em M6G (15%). Apesar de estar em menor concentração, o M6G é ativo e sua potência pode ser vinte ou mais vezes maior do que a da própria morfina livre. Por sua vez, o M3G parece não exercer atividade farmacológica em receptores opióides, chegando a exercer pequena atividade antagonista, diminuindo os efeitos analgésicos da morfina entre 15 e 20% (GARDMARK, 1998). Como via de regra, os glicuronídeos são substâncias extremamente polares, dificultando a travessia por barreiras biológicas. Entretanto, esses metabólitos foram detectados em fluido cérebro-espinhal (CHRISTRUP, 1997).

Após administração parenteral, cerca de 10% da dose administrada é excretada na bile. Os restantes 90% são excretados em urina, sendo 10% como morfina livre, 65 a 70% como glicuronatos de morfina, 10% como morfina-3-sulfato etéreo e 1% como nor-morfina (Figura 2) (JANICKI, 1997).

Concentrações terapêuticas em soro ficam em torno de 0,08 a 0,12 mg/L. A intoxicação aguda por morfina provoca uma tríade de sinais clínicos caracterizados

por depressão respiratória, miose e coma. Valores de concentração de morfina em soro entre 0,15 e 0,5 mg/L são considerados tóxicas (MOFFAT *et al*, 2004).

2.2.5. Codeína

A codeína é um opiáceo amplamente utilizado clinicamente apesar de apresentar apenas cerca de 10% da potência analgésica da morfina. É um alcalóide natural do ópio representando apenas 0,5% do seu conteúdo, por isso maior parte da codeína usada medicinalmente é sintetizada quimicamente por metilação da morfina (DRUMMER, 2001).

É utilizada como antitussígeno, auxilia no tratamento de diarreia e no alívio da dor fraca a moderada. Considerada um analgésico fraco, sua ação ocorre principalmente por metabolização à morfina no fígado, já que apresenta pouca afinidade por receptores opióides. Contudo, sua ação antitussígena provavelmente se deve a interação da própria codeína a receptores distintos. Possui baixo potencial de abuso justificado por sua fraca ação e por estar presente em formulações farmacêuticas que não favorecem o uso abusivo (TRESCOT *et al.*, 2008).

Possui boa biodisponibilidade oral e parenteral com índices de 60% de efetividade, com tempo de meia vida no plasma de 2 a 4 horas (REISINE & PASTERNAK, 1996). Sua excreção é realizada principalmente em urina totalizando aproximadamente 86% da dose administrada oralmente, desse total, 40 a 70% são na forma de codeína livre ou conjugada, 5 a 15% na forma de morfina livre ou conjugada e 10 a 20% na forma de nor-codeína, e parte da dose é também excretada na bile.

Concentrações terapêuticas em plasma ficam em torno de 0,05 a 0,250 mg/L, já as tóxicas ficam entre 0,3 a 0,5 mg/L. A dose mínima letal estimada é de 800 mg, mas intoxicações letais decorrentes do uso exclusivo de codeína são raras, portanto sempre há envolvimento de outras drogas ou de álcool (MOFFAT *et al.*, 2004). A intoxicação por codeína apresenta a mesma tríade de sintomas apresentada para a morfina.

2.2.6. Heroína

A heroína (3,6-diacetilmorfina) é largamente utilizada como droga ilícita, e por possuir alta capacidade em provocar dependência é considerada uma das drogas de abuso mais perigosas. É uma droga semi-sintética obtida através da esterificação dos grupamentos hidroxila da molécula de morfina através de reação com anidrido acético (PICHINI *et al.*, 1999).

A administração de heroína é feita geralmente por via intravenosa, intranasal (aspirada) e inalatória (fumada em cigarros ou através da inalação de vapores resultantes da queima direta do pó). A administração intravenosa é feita tanto na forma de base livre, que é usualmente misturada com ácidos orgânicos (suco de limão ou vinagre) pelo próprio usuário para aumentar a solubilidade em água, quanto na forma de cloridrato de heroína. Essa forma de administração promove um intenso “rush” com surgimento de pico de concentração plasmática após dois minutos de injeção. Apesar de apresentarem menor eficiência, recentemente, as vias de administração intranasal e inalatória têm substituído de forma gradual a forma de administração intravenosa. Provavelmente isso se deve a tentativa de evitar o uso por injeção pelo medo de possível contaminação pelo vírus do HIV e da hepatite, e também para evitar os danos venosos. Picos de concentração plasmática são atingidos entre um e cinco minutos depois de ser inalada ou aspirada (WILLS, 2005).

Devido à adição química dos grupamentos éster à molécula, a heroína possui alta lipofilicidade, ultrapassando a barreira hemato-encefálica e atingindo seu sítio de ação em apenas vinte segundos, muito mais facilmente do que sua precursora morfina (OLDENDORF *et al.*, 1972). Possui pouca afinidade pelos receptores opióides, exercendo sua ação através da biotransformação à seus principais produtos. Assim ela é rapidamente desacetilada por esterases em tecidos como fígado, cérebro e sangue, apresentando tempo de meia-vida plasmática de apenas 3 minutos, quando passa a originar 6-acetilmorfina ($t_{1/2}$ plasma = 6 a 25 minutos), um dos seus principais produtos de biotransformação, considerado responsável pelos efeitos agudos causados pela droga (ROOK *et al.*, 2006). A conseqüente metabolização à morfina é um pouco mais lenta, com posterior conjugação desta com ácido glicurônico originando M3G e M6G. Depois de inalada de 14 a 20% da

dose é excretada em urina, e assim como ocorre no metabolismo da morfina, os metabólitos M3G e M6G são também excretados na bile (MOFFAT *et al.*, 2004).

É possível detectar concentrações de morfina em urina entre um e dois dias após administração de heroína, já no caso de 6-acetilmorfina o tempo estimado de detecção cai para 2 a 8 horas. É possível também encontrar codeína em urina de usuários de heroína, já que muitas vezes essa está presente como adulterante da heroína, portanto a presença de baixas concentrações de codeína em relação à morfina, sugere uso de heroína, e quando ocorre o inverso, com a presença de grandes quantidades de codeína em relação à morfina, é sugerido o uso de codeína (CONE *et al.*, 1991).

Sinais clínicos de intoxicação aguda causada por heroína são semelhantes aos causados pela morfina ou outros opióides, apresentando miose, depressão respiratória e edema pulmonar. Concentrações de morfina livre em sangue nos casos de morte ocasionados por heroína variam na faixa de 0,1 a 1 mg/L, e a total pode chegar até 2 mg/L (DRUMMER, 2004).

A figura 2 mostra um esquema representativo das principais vias de biotransformação dos opiáceos citados.

Figura 2 – Esquema representativo das principais vias de biotransformação da heroína, morfina e codeína.

2.2.7. Comportamento *postmortem* dos opiáceos

A morfina e seus produtos de biotransformação, morfina-3-glicuronídeo (M3G) e morfina-6-glicuronídeo (M6G), são frequentemente encontrados em amostras *postmortem* de indivíduos que faziam uso da substância durante a vida. Porém, sua detecção e de seus conjugados não pode ser simplesmente interpretada como resultado do uso de morfina, já que a administração de codeína e de heroína também resulta em metabolização à morfina e seus produtos. A presença de 6-acetilmorfina, metabólito ativo da heroína, é marcador da exposição a essa droga,

confirmando a exposição, porém quando ausente dificulta a afirmação do uso (WYMAN & BULTMAN, 2004).

Além dessas complexidades, a instabilidade dos analitos em determinadas condições de exposição pode afetar os resultados. A 6-acetilmorfina sofre rápida hidrólise por esterases presentes no sangue. Os produtos de biotransformação da morfina (M3G e M6G) por sua vez, sofrem hidrólise em condições de maior temperatura e de contaminação bacteriana (fonte de enzima beta-glicuronidase), proporcionando ao reaparecimento da morfina na forma livre (MORIYA & HASHIMOTO, 1997).

As características apresentadas pela morfina, como sua lipofilicidade moderada em pH fisiológico, volume de distribuição entre 3 e 5 L/kg, e baixa taxa de ligação à proteínas plasmáticas (20–35%), tornam esse fármaco propenso à redistribuição *postmortem*. Além disso, esse composto se torna menos lipofílico com o decréscimo do pH sanguíneo decorrente do óbito, levando à possível transferência dessa substância dos tecidos para o sangue (SAWYER & FORNEY, 1988).

Estudos relatando a redistribuição *postmortem* da morfina e de seus produtos de biotransformação ainda são poucos em comparação com outras classes de drogas que vêm sendo vastamente estudadas, e adicionalmente os resultados obtidos se mostram muitas vezes conflitantes.

Modelos animais como os realizados em ratos por KOREN & KLEIN (1992) e SAWYER & FORNEY (1988), mostram significativo aumento na concentração de morfina livre em sangue cardíaco após 24 e 96 horas da morte dos animais em comparação com o período *antemortem*, sendo que no último estudo, aumentos também foram observados em fígado, coração e cérebro, com apenas cinco minutos passados do momento da eutanásia.

Estudos realizados em humanos mostram divergências nos resultados obtidos. LOGAN & SMIRNOW (1996) e GEROSTAMOULOS & DRUMMER (2000) não encontraram diferenças significativas entre diferentes locais de coleta das amostras (sangue cardíaco, ilíaco e femoral) e nem com relação ao momento da coleta.

Em contrapartida, BOGUSZ (1997) observou em dois casos de overdose aguda por heroína que as concentrações de morfina, M3G, M6G e codeína se

mostraram mais baixas em vasos periféricos do que em sítios centrais, enquanto as concentrações de 6-acetilmorfina permaneceram estáveis nesses sítios. Outro estudo encontrou diferenças não só entre as concentrações de morfina em sangue cardíaco e periférico como também entre diversos outros tecidos (MORIYA & HASHIMOTO, 1997). CRANDALL *et al.* (2006b) observaram diferentes valores de concentração entre diferentes sítios de coleta, porém não encontraram variações referentes a efeito do tempo passado entre a morte e a autópsia.

Foram observadas semelhanças entre as concentrações de 6-acetilmorfina, morfina e seus produtos de biotransformação em sangue e em fluido cérebro-espinhal de vítimas de overdose por heroína. Já em humor vítreo, as concentrações se mostraram mais baixas em comparação com os demais (BOGUSZ *et al.*, 1997).

As informações ainda são pouco esclarecedoras, pois os resultados se mostram complexos, muitas vezes divergem entre si, e acabam omitindo alguns detalhes referente à coleta das amostras por exemplo, dificultando o entendimento.

2.2.8. Métodos utilizados para detecção de opiáceos em matrizes biológicas

A utilização de técnicas de extração é necessária como procedimento preparatório para a análise instrumental em cromatografia líquida ou gasosa. Esses procedimentos permitem concentrar os analitos em volumes menores e remover possíveis interferentes. Existe uma grande variedade de métodos analíticos para detecção de opiáceos em matrizes biológicas disponíveis na literatura científica.

Em geral, é feita a determinação de morfina total (forma livre mais a forma conjugada) em amostras de urina, já que boa parte da droga é excretada na forma conjugada com ácido glicurônico (65 a 70%). Esse procedimento é também aplicado em amostras de sangue devido à importância farmacológica desses produtos de biotransformação. Assim, procedimentos de hidrólise ácida ou enzimática devem ser realizados para possibilitar a detecção da forma livre por cromatografia gasosa (GC).

Para análise de sangue total, alguns autores utilizaram a técnica de precipitação de proteínas com metanol ou acetonitrila antes da realização do procedimento de extração (ROPERO-MILLER *et al.*, 2002; MEATHERALL, 2005).

A extração líquido-líquido (LLE) tem sido largamente utilizada para isolamento de opiáceos de matrizes biológicas. Paul e colaboradores (1989) extraíram 6-acetilmorfina de urina utilizando LLE em meio alcalino, seguida por extração em fase sólida (SPE) e detecção por GC-MS. Outro estudo aplicou também LLE em meio alcalino para extração de morfina em amostras de plasma, utilizando derivatização com HBFA (anidrido heptafluorobutírico) e análise por GC-MS (LEIS *et al.*, 2000). GUILLOT e colaboradores (2007) isolaram morfina e 6-acetilmorfina de amostras de sangue, cérebro, medula espinhal e medula óssea de camundongos através de LLE realizada em duas etapas, e detecção por GC-MS através de derivatização com BSTFA/TMCS. MEATHERALL (2005) utilizou LLE em quatro etapas para extração de morfina, codeína, 6-acetilmorfina, hidrocodona, hidromorfina, oxicodona e oximorfina em sangue, usando beta-glicuronidase para determinação de morfina total, e quantificação por GC-MS.

Diversas técnicas de derivatização podem ser utilizadas para tornar possível a análise de opiáceos por cromatografia gasosa, tornando esses compostos mais voláteis e termicamente estáveis.

Recentes melhorias em técnicas de extração estão sendo focadas em extração em fase sólida (SPE). Essa técnica produz extratos mais limpos e melhores níveis de recuperação. A necessidade de co-extração de morfina e codeína é um processo problemático devido ao caráter anfótero da morfina, com isso, o desenvolvimento de cartuchos de extração em fase sólida do tipo trocador de íon melhorou muito a eficiência dos métodos.

Cartuchos de fase reversa C₁₈ foram utilizados para extração de morfina, codeína e seus metabólitos entre outros opiáceos em sangue *postmortem* com detecção por LC-MS (AL-ASMARI & ANDERSON, 2007). KERRIGAN *et al.* (2004) determinaram morfina livre e total em amostras de sangue, fígado, cérebro, humor vítreo, urina e conteúdos estomacais através de SPE-GC-MS, utilizando cartuchos de fase mista, e derivatização por siliilação. Vários opiáceos e benzodiazepínicos foram analisados em amostras de soro por SPE e GC-TOFMS (GUTHERY *et al.*, 2009). SHOU e colaboradores (2002) analisaram morfina, M3G e M6G em plasma através de um sistema automatizado de pipetagem e de SPE, com detecção por LC-MS.

A técnica de micro-extração em fase sólida (SPME) foi utilizada por SANTOS LUCAS e colaboradores (2000) para determinação de metadona e seus metabólitos em saliva por GC-MS.

A eletroforese capilar foi utilizada por TAYLOR *et al.* (1996) para quantificar 6-acetilmorfina, codeína, heroína e diidrocodeína em urina usando um tampão de corrida composto de hidrogenofosfato dissódico pH 6,0, após extração das amostras por SPE.

No presente trabalho um método foi desenvolvido para determinação de opiáceos em fluidos biológicos através de SPE e detecção por GC-MS.

Objetivos

3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

- Desenvolvimento (otimização e validação) e aplicação de um método para determinação de morfina total e livre, 6-acetilmorfina e codeína em amostras *postmortem* de humor vítreo e de sangue cardíaco e periférico humanos coletadas de vítimas com histórico de exposição a opiáceos.
- Avaliação dos resultados obtidos, verificando a existência de correlação das concentrações entre esses sítios, e possível ocorrência do fenômeno de redistribuição *postmortem*.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Soluções

4.1.1.1. Soluções-padrão

Soluções-padrão de morfina, morfina-d₃ (deutérios ligados ao grupamento metil ligado ao átomo de nitrogênio), codeína, morfina-3-glicuronídeo, morfina-6-glicuronídeo foram obtidas da Cerilliant Corporation (Round Rock, Texas, EUA) na concentração de 1 mg/mL em metanol. Soluções-padrão de 6-acetilmorfina foram também obtidas da Cerilliant Corporation na concentração de 1 mg/mL em acetonitrila.

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

4.1.1.2. Soluções Tampão

A solução tampão fosfato 0,1M foi preparada através da pesagem de 6,81g de fosfato de potássio monobásico diluído em cerca de 400 ml de água deionizada. O pH da solução foi ajustado para 6,0 utilizando uma solução de hidróxido de potássio 5M, e o volume final foi completado para 500 ml.

A solução tampão acetato 0,1M foi preparada através da pesagem de 1,64g de acetato de sódio diluído em cerca de 150 ml de água deionizada. O pH da solução foi ajustado para 4,0 utilizando ácido acético glacial., e o volume final foi completado para 200 ml.

A solução tampão acetato 1M foi preparada através da pesagem de 8,2g de acetato de sódio diluído em cerca de 80 ml de água deionizada. O pH da solução foi

ajustado para 4,0 utilizando ácido acético glacial, e o volume final foi completado para 100 ml.

4.1.2. Reagentes e outros materiais

Reagentes (solventes e sais) de uso comum em laboratório foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

N,O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) com 1% de TCMS e enzima β -Glicuronidase tipo H-1 obtida de *Helix pomatia* 500 KU foram obtidos da Sigma Aldrich (Missouri, EUA).

Cartuchos de extração em fase sólida (SPE) do tipo fase mista (C8 e benzenosulfônico) Bond Elut Certify™ foram obtidos da Varian Inc. (Califórnia, EUA).

4.1.3. Equipamentos e acessórios

- Equipamento de cromatografia gasosa modelo *Focus GC* acoplado a espectrômetro de massas do tipo *Ion Trap* modelo *Focus Polaris Q* ambos da marca Thermo Fischer Scientific (Bremen, Alemanha). O cromatógrafo gasoso foi equipado com coluna capilar de sílica fundida HP-5MS com as seguintes dimensões 30m x 0,25mm x 0,25 μ m.

- Centrífuga para tubos Eppendorf modelo 5702.

- Agitador tipo vórtex para tubos de centrifugação modelo VM3000 da CE.

4.1.4. Amostras

Amostras de sangue de referência negativa foram obtidas de bolsas de sangue total com marcadores negativos (HIV, HBV, HCV, Sífilis, HTLV I e II) classificadas como "baixo volume", doadas pelo Hospital Sírio-Libanês. Temos um contrato com o banco de sangue desse hospital (Anexo A) para recebimento e utilização dessas bolsas.

Por razões de indisponibilidade prática, utilizamos soro fisiológico como amostra de referência negativa para humor vítreo, já que essa matriz possui 99% de água em sua composição.

Amostras de referência positiva foram obtidas através de adição de padrões das drogas em estudos às amostras de referência negativas para realização de validação do método e outros estudos de extração.

Amostras *postmortem* de humor vítreo e de sangue foram obtidas de vítimas com histórico de exposição à opiáceos atendidas pelo Instituto Médico Legal de São Paulo e pelo Serviço de Verificação de Óbitos da Capital-USP. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (Anexo B) e pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP (Anexo C).

4.2. Métodos

4.2.1. Coleta das amostras

Amostras de sangue de referência negativa obtidas de bolsas de sangue total (450mL) estavam adicionadas de anticoagulante do tipo CPD (citrato de sódio diidratado, ácido cítrico monoidratado, fosfato de sódio monobásico monoidratado e glicose monoidratada) na concentração de 14%. As amostras foram retiradas das bolsas, aliquotadas em tubos tipo falcon de 15 mL e armazenadas a -20°C.

Amostras de sangue *postmortem* e de humor vítreo foram coletadas de sete cadáveres em que se suspeitava do uso de opiáceos. Essa coleta foi realizada somente após autorização por parte da família da vítima, feita através de assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO D). A coleta desses espécimes biológicos foi conduzida por médicos patologistas do Instituto Médico Legal de São Paulo e do Serviço de Verificação de óbitos da Capital-USP envolvidos no projeto. As quantidades de tecido retiradas dos cadáveres se limitaram a pequenas porções apenas suficientes para realização dos procedimentos analíticos. A Tabela 1 sumariza as quantidades aproximadas de cada amostra coletada.

Tabela 1 - Quantidades aproximadas de amostras coletadas

Tecido	Quantidade
Sangue (Ventrículo direito)	10 - 20 ml
Sangue (Veia femoral)	5 - 10 ml por perna
Humor vítreo	2 - 3 ml por olho

As amostras foram acondicionadas em tubos de coleta com fluoreto de sódio a 2%, identificados apenas por números, para que a identidade do cadáver se mantivesse preservada.

Antes de iniciar a coleta das amostras, um teste de triagem qualitativo realizado por imunoensaio (Triage® Biosite) rápido para a presença de drogas foi realizado quando havia urina disponível no cadáver em questão. Quando resultados positivos para opiáceos foram obtidos nos testes de triagem, prosseguiu-se coletando as amostras estabelecidas. Após acondicionamento, as amostras foram enviadas ao Laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, para realização das análises quantitativas e estudo da redistribuição nos tecidos citados.

4.2.2. Desenvolvimento do método para determinação de opiáceos em sangue total e em humor vítreo por SPE e GC/MS

Um método foi desenvolvido para quantificação de morfina, 6-acetilmorfina e codeína em sangue total e em humor vítreo utilizando a técnica de extração em fase sólida (SPE) seguida de identificação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

4.2.2.1. Preparo das amostras

4.2.2.1.1. Determinação de morfina livre

Alíquotas de 1 mL das amostras em estudo foram transferidas para tubos de centrífuga de 15 mL, e adicionadas de 100 ng de padrão interno (morfina-d3) e 5 mL de solução tampão fosfato pH 6,0 0,1M. Em seguida, as amostras foram agitadas em vórtex e centrifugadas por 12 minutos a 2500 rpm. Os sobrenadantes foram aplicados a cartuchos de extração em fase sólida, previamente condicionados pela adição seqüencial de 2 mL de metanol e 2 mL de solução tampão fosfato pH 6,0 0,1M. Terminada a passagem das amostras pelos cartuchos, a etapa de limpeza foi realizada pela adição de 2 mL de água deionizada, 1 mL de solução tampão acetato pH 4,0 0,1M e 2 mL de metanol, e então os cartuchos foram secos sob vácuo por 2 minutos. Os analitos foram eluídos com 2 mL de solução recém-preparada de diclorometano/isopropanol/hidróxido de amônio (20:5:0,5) em tubos para derivatização previamente silanizados. Os extratos foram evaporados sob fluxo de nitrogênio à temperatura de 40°C. Os resíduos foram reconstituídos com 50 µL de BSTFA com 1% de TCMS e derivatizados por 20 minutos a 70°C. Terminado esse procedimento, 1 µL de cada extrato foram injetados automaticamente em sistema de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (Figura 3).

4.2.2.1.2. Determinação de morfina total

Para determinação de morfina total (morfina livre mais morfina conjugada com ácido glicurônico), uma segunda alíquota de 1 mL de cada amostra foram transferidas para tubos de centrífuga de 15 mL, adicionadas de padrão interno, além de 1 mL de tampão acetato 1M pH 5,0, e de 200 µL da enzima β -glicuronidase obtida de *H. pomatia* tipo H-1. Em seguida, as amostras foram incubadas por 4 horas a 37°C. Após desconjugação e resfriamento, as amostras foram processadas como descrito no item 4.2.2.1.1, a partir da etapa de adição de 5 mL de solução tampão fosfato pH 6,0 0,1M.

Figura 3 – Esquema representativo do procedimento de extração dos opiáceos em amostras de sangue total realizado por extração em fase sólida, seguido de derivatização por sililação e detecção por GC-MS.

4.2.2.2. Condições cromatográficas

Um equipamento de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) foi utilizado para análise dos opiáceos. O método cromatográfico desenvolvido teve as seguintes condições selecionadas:

- Modo de injeção: *splitless*
- Gás de arraste: Hélio a um fluxo constante de 0,7 mL/min
- Temperatura do injetor: 270°C
- Temperatura do detector: 280°C
- Programação da temperatura do forno: 150°C (1 min) , 10°C/min até 250°C (8 min). Tempo total de corrida: 19 minutos.

O espectrômetro de massas foi operado nas seguintes condições:

- Modo de ionização: ionização eletrônica (EI)
- Modo de operação: *full scan*, com seleção de massas de 200 a 500
- Temperatura da fonte de ionização: 220°C
- Íons utilizados para identificação dos analitos: morfina-d3 (432, 417, 404); morfina (429, 414, 401); 6-acetilmorfina (399, 340, 287); codeína (371, 343, 234). Os íons

sublinhados foram utilizados para quantificação das substâncias. Esses íons são correspondentes às formas derivatizadas dos analitos, ou seja, derivados trimetilsilil (TMS).

4.2.2.3. Otimização do método

Estudos anteriores à validação do método foram realizados com o intuito de verificar as melhores condições para extração dos analitos de interesse. Os parâmetros avaliados foram estudados em amostras de sangue, devido à maior complexidade desta matriz em comparação com o humor vítreo, observando a abundância absoluta em GC/MS.

4.2.2.3.1. Estudo de pH ótimo para extração dos analitos

Alíquotas de 1 mL de amostra de referência negativa foram adicionadas de 100 ng de cada um dos analitos (morfina, 6-acetilmorfina e codeína) e analisadas em triplicatas conforme método descrito nos itens **4.2.2.1.1** e **4.2.2.2**, com variação nos valores de pH através da adição de diferentes soluções tampão. Os valores de pH testados foram: 4,0; 5,0 e 6,0.

4.2.2.3.2. Estudo da hidrólise enzimática dos conjugados da morfina

Para tornar possível a determinação de morfina total (forma livre mais forma conjugada com ácido glicurônico) por cromatografia gasosa, é necessário realizar a etapa de hidrólise dos conjugados, liberando morfina.

Para verificar as melhores condições de hidrólise enzimática fizemos uso do planejamento fatorial. Os experimentos foram estatisticamente planejados através de um desenho experimental (Experimental Design – DOE), e analisados através da metodologia de modelamento de superfície de resposta (RSM), que faz previsões estatísticas baseadas em técnicas matemáticas descrevendo o comportamento de um conjunto de dados. Dentre os tipos de desenhos experimentais, optamos por um

modelo de segunda ordem, chamado de *Box-Behnken*, onde apenas 17 experimentos são necessários.

Dessa forma, foi feita a seleção de três fatores, e dois níveis de cada fator para serem avaliados (um baixo e um alto). Foram eles: temperatura (37 e 60°C), tempo de incubação (4 e 24 horas) e concentração da enzima β -Glicuronidase tipo H-1 obtida de *H. pomatia* (2500 e 20000 U/mL).

Os experimentos foram conduzidos em alíquotas de 1 mL de amostras de sangue total adicionadas de 500ng de padrão morfina-3-glicuronídeo juntamente com 500ng de padrão morfina-6-glicuronídeo, e analisadas conforme método descrito nos itens **4.2.2.1.2** e **4.2.2.2**, variando-se as condições de hidrólise conforme planejamento experimental. A área do pico da morfina foi usada como resposta. Terminado os procedimentos, a melhor resposta obtida (melhores condições) foi comparada com a resposta tomada como 100% de hidrólise (amostras de sangue total adicionadas de 1000ng de padrão morfina).

Um software estatístico chamado Design-Expert[®] foi usado para elaborar o desenho experimental e analisar os resultados pela técnica de RSM.

4.2.3. Validação do método

A validação do método desenvolvido foi realizada nas matrizes sangue total e soro fisiológico. Os parâmetros determinados foram limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão intra e interensaio, recuperação, estabilidade dos analitos na matriz, e estudo de efeito matriz. A determinação desses parâmetros assegura que o método produz resultados reprodutíveis e confiáveis.

Para realização desses ensaios, amostras de referência negativa adicionadas dos padrões em estudo foram utilizadas. Os ensaios foram realizados baseados principalmente nos guias de validação de método analítico da UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME (2009) e da SOFT/AAFS (2006).

4.2.3.1. Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

Esses parâmetros foram determinados pelo método empírico, através de análise de uma série de amostras de sangue e de soro fisiológico adicionadas de padrões dos analitos em concentração decrescente. O limite de detecção (LOD) ficou estabelecido como a menor concentração detectável capaz de reproduzir seis replicatas com coeficiente de variação de até 20%. E o limite de quantificação (LOQ) foi estabelecido como a menor concentração capaz de reproduzir seis replicatas com coeficiente de variação de até 10% (AMBRUSTER, TILLMAN & HUBBS, 1994).

4.2.3.2. Estudo de efeito matriz - Seletividade

A matriz pode conter compostos que causem aumento ou diminuição da resposta do detector frente ao analito quando comparado ao mesmo analito na ausência da matriz (THOMPSON *et al.*, 2002; BRUCE *et al.*, 1998). Assim testes de efeito matriz são conduzidos verificando a seletividade dos métodos.

Esse estudo foi conduzido para verificar se a detecção dos analitos seria afetada de forma diferenciada pela interferência das matrizes sangue total e humor vítreo através do método desenvolvido.

Para avaliar esse efeito dois conjuntos de amostras foram analisados, um conjunto contendo amostras de sangue total e outro conjunto contendo amostras de soro fisiológico, ambos adicionados com a mesma concentração dos analitos de interesse em cada nível de concentração estipulado (30, 550 e 1100 ng/mL). Cada conjunto de amostras foi analisado em sextuplicatas. Os resultados foram avaliados estatisticamente, primeiro através de análise da variância dos dois grupos amostrais pelo cálculo do teste F , verificando se há igualdade ou desigualdade entre as variâncias, para em seguida aplicação do teste t -student mais apropriado, para verificar a significância da diferença das médias dos dois grupos. Se os desvios não forem significantes, pode-se considerar que o efeito matriz exercido pelas duas matrizes sobre a análise é semelhante (BRUCE *et al.*, 1998). O valor de intervalo de confiança estipulado foi de 95% para F e t .

$$F_{cal} = s_1^2/s_2^2 \quad (1)$$

Onde: F_{cal} representa o valor calculado de F , enquanto F_{tab} representa o valor tabelado; s_1 e s_2 representam os desvios padrão obtidos em cada grupo de amostras, e o desvio maior deve ser usado como nominador.

Se $F_{cal} < F_{tab}$, então o teste F não é significativo, podendo-se considerar que as variâncias são semelhantes, e aplicar o teste t de *Student* para verificar a diferença entre as médias dos dois grupos (Equações 2 e 3):

$$t_{cal} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{s^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} \quad (2)$$

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)} \quad (3)$$

Nessas equações: t_{cal} representa o valor calculado de t , x_1 e x_2 representam as médias das respostas obtidas em cada grupo de amostras, n_1 e n_2 representam o número de replicatas em cada grupo, e s^2 representa o desvio padrão conjugado.

Entretanto, se $F_{cal} > F_{tab}$, então o teste F é significativo, ou seja, as variâncias entre os dois grupos não se assemelham, assim, pode-se usar o teste t para variâncias desiguais (Equações 4 e 5):

$$t_{cal} = \frac{\bar{x}_d \sqrt{n}}{s_d} \quad (4)$$

$$\bar{x}_d = \sum_{i=1}^n \frac{(d_{i1} - d_{i2})}{n} \quad (5)$$

Onde: x_d representa a média das diferenças entre as respostas obtidas entre os grupos, s_d representa o desvio padrão das diferenças entre as respostas dos grupos, n representa o número de pares, e d_{i1} e d_{i2} representam as respostas obtidas para um par de amostras dos grupos.

Se t_{cal} (variâncias semelhantes ou desiguais) for menor que t_{tab} , então é possível que os analitos não sofram interferência diferente das matrizes.

Para complementar esse ensaio, fizemos a comparação entre os estudos de recuperação realizados com as duas matrizes conforme item 4.2.3.5.

4.2.3.3. Linearidade

Entende-se por linearidade a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra (UNODC, 2009). O parâmetro de linearidade foi determinado através da análise em triplicata de amostras de sangue e de soro fisiológico adicionadas dos padrões dos analitos (morfina, 6-acetilmorfina e codeína), resultando nas seguintes concentrações: 10; 50; 150; 350; 750; 1500 ng/mL. Curvas de calibração foram construídas e os coeficientes de determinação (r^2) foram calculados, admitindo-se como satisfatórios valores de $r^2 > 0,99$.

Após construção das curvas de calibração, o teste de homoscedasticidade/heteroscedasticidade foi aplicado. Esse teste avalia se as variâncias de cada ponto da curva se assemelham ou não, já que grandes desvios presentes nas maiores concentrações tendem a ter maior influência sobre a regressão linear do que os desvios menores, observados nos pontos de menores concentrações, prejudicando a exatidão nos pontos baixos da curva (ALMEIDA *et al.*, 2002). Para determinação desse parâmetro, as variâncias foram analisadas pelo cálculo do teste F , expresso pelo razão entre o valor da variância do ponto de maior concentração, e a variância do ponto de menor concentração da curva. Se o valor encontrado apresentar-se menor do que o valor tabelado de F , as variâncias são consideradas semelhantes, portanto considerado homoscedástico. Se considerado heteroscedástico, deve-se aplicar regressão linear ponderada, avaliando o melhor fator de ponderação para o caso.

4.2.3.4. Precisão intra e interensaio

A precisão intra e interensaio foi determinada com o objetivo de avaliar a repetibilidade do método. Esse parâmetro foi determinado indiretamente através de cálculo de imprecisão, estabelecendo o coeficiente de variação (CV) do método através de aplicação da ANOVA (análise das variâncias). O estudo foi conduzido através da análise de amostras de sangue e de soro fisiológico em três dias diferentes, realizadas em sextuplicata para três diferentes concentrações dos

opiáceos: 30, 550 e 1100 ng/mL, chamados de pontos baixo, médio e alto. A obtenção de valores de coeficiente de variação de até 10% para a precisão intra-ensaio, e de até 20% para a precisão interensaio foram considerados satisfatórios.

4.2.4.5. Recuperação

O estudo de recuperação foi conduzido verificando a eficiência do método de extração desenvolvido, levando em consideração que possíveis perdas podem ocorrer durante esse processo. O ensaio foi realizado através de análise de um conjunto de amostras de sangue total e de soro fisiológico contendo morfina, 6-acetilmorfina e codeína, conforme método descrito nos itens **4.2.2.1.1** e **4.2.2.2**, realizadas em sextuplicata para as concentrações baixa, média e alta (30, 550 e 1100 ng/mL). Simultaneamente, análise de outro conjunto de amostras das matrizes em estudo também foi conduzida em sextuplicata para cada concentração, mas a adição dos padrões dos analitos foi realizada somente após o término do procedimento de SPE, antes do início da derivatização das amostras.

Os resultados obtidos foram comparados através de cálculo da resposta média obtida no primeiro conjunto de análises (grupo extraído) em relação à resposta média obtida no segundo conjunto de análises (grupo não-extraído). Valores de recuperação acima de 70% foram considerados satisfatórios.

4.2.3.6. Estabilidade dos analitos na matriz

O estudo de estabilidade visou determinar se os analitos mantinham-se estáveis, ou seja, quimicamente inalterados nas matrizes em estudo em determinadas condições de armazenamento.

Amostras de sangue e de soro fisiológico contendo os analitos em estudo nas concentrações baixa e alta (30 e 1100 ng/mL) foram analisadas em triplicata avaliando a estabilidade dos analitos, após três ciclos de congelamento e descongelamento (– 20°C por 24 horas), após 24 horas em temperatura ambiente, após uma semana refrigerado (4°C) e após 90 dias à - 20°C.

A estabilidade foi determinada pelo cálculo da diferença obtida entre a média das respostas após as condições de armazenamento citadas acima e a média das respostas obtidas em amostras recém-preparadas. Amostras que apresentaram valores de respostas com diferença de até 20% em relação às recém-preparadas foram consideradas estáveis.

A estabilidade dos produtos de biotransformação da morfina, morfina-3-glicuronídeo e morfina-6-glicuronídeo, também foi avaliada nas mesmas condições citadas acima, porém somente na concentração alta (500 ng/mL) de cada um dos conjugados. A avaliação dessa estabilidade foi verificada indiretamente, através da formação da morfina resultante da possível degradação de seus conjugados. Amostras que apresentaram a presença de morfina em até 20% quando comparadas a amostras contendo 500 ng/mL de morfina recém-preparada foram consideradas estáveis.

4.2.4. Análise toxicológica de casos *postmortem* com envolvimento de opiáceos

O método analítico desenvolvido e validado foi aplicado em amostras *postmortem* de sangue e de humor vítreo humanos, obtidos de vítimas atendidas pelo Instituto Médico Legal de São Paulo, pelo Serviço de Verificação de Óbitos da Capital-USP e pelo Departamento de Patologia-Autópsia HCFMUSP com suspeita de envolvimento com opiáceos.

A quantificação das substâncias foi feita baseada na área relativa, ou seja, na razão entre a área do pico do composto de interesse e a área do pico do padrão interno. Para determinar a concentração das substâncias encontradas nas amostras, curvas analíticas construídas em cada matriz foram aplicadas, utilizando $1/x^2$ como fator de ponderação para amostras de sangue e $1/y^2$ para amostras de humor vítreo.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Cromatogramas e espectros de massas característicos da análise de opiáceos em sangue total e em humor vítreo

Na Figura 4 é apresentado um cromatograma obtido com a análise de uma amostra de sangue total adicionada dos padrões de morfina, 6-acetilmorfina e codeína na concentração de 550 ng/mL pelo método proposto. Na Figura 5 o cromatograma apresentado se refere a uma amostra de soro fisiológico nas mesmas condições citadas acima. Nas Figuras 6 e 7 estão apresentados os espectros de massas de cada analito, inclusive do padrão interno (morfina- d_3).

Figura 4 – Cromatograma (GC/MS) característico da análise de amostra de sangue total adicionada de opiáceos: codeína (A), morfina e morfina- d_3 (B) e 6-acetilmorfina (C).

Figura 5 – Cromatograma (GC/MS) característico da análise de amostra de soro fisiológico adicionada de opiáceos: codeína (A), morfina e morfina- d_3 (B) e 6-acetilmorfina (C).

Figura 6 – Espectro de massas da morfina derivatizada (A) e da morfina-d3 derivatizada (B)

Figura 7 – Espectro de massas da 6-acetilmorfina derivatizada (A) e da codeína derivatizada (B)

5.2. Resultados da otimização do método

5.2.1. Estudo do pH ótimo para extração dos analitos

Na Figura 8 estão apresentadas as áreas absolutas obtidas para cada analito em diferentes valores de pH.

Figura 8 – Estudo do pH ótimo para extração de morfina, 6-acetilmorfina e codeína

5.2.2. Estudo da hidrólise enzimática dos conjugados da morfina

Nas Figuras 9, 10 e 11 estão representados os gráficos em três dimensões da melhor resposta obtida nas condições estudadas para otimização da hidrólise enzimática dos conjugados da morfina. As áreas que aparecem em vermelho representam as melhores respostas (maior valor de área da morfina livre), seguidas da cor amarela, verde e azul.

Figura 9 – Superfície de resposta da hidrólise enzimática dos conjugados da morfina em função da concentração enzimática (U/mL) e da temperatura de incubação (°C) com tempo de incubação de 4 horas.

Figura 10 – Superfície de resposta da hidrólise enzimática dos conjugados da morfina em função do tempo (h) e da temperatura de incubação (°C) com concentração enzimática de 20.000U/ml.

Figura 11 – Superfície de resposta da hidrólise enzimática dos conjugados da morfina em função da concentração enzimática (U/mL) e do tempo de incubação (h) com temperatura de incubação de 37°C.

Figura 12 – Superfície de resposta da hidrólise enzimática dos conjugados da morfina em função da concentração (U/mL) e da temperatura (°C) com tempo de incubação de 4 e de 24 horas respectivamente.

Na figura 12 podemos observar o efeito do tempo sobre a hidrólise dos conjugados, onde se verifica uma maior área em vermelho e menor em azul no tempo de 4 horas do que o apresentado no tempo de 24 horas.

Figura 13 - Superfície de resposta da hidrólise enzimática dos conjugados da morfina em função do tempo (horas) e da temperatura (°C) com concentração enzimática de 2500 e 20.000 U/mL respectivamente.

Já na figura 13 é possível verificar o efeito da concentração enzimática sobre a hidrólise dos conjugados da morfina, com aparecimento de zonas em vermelho

(maior resposta) somente na concentração de 20.000 U/mL de enzima quando comparado ao gráfico de concentração de 2500 U/mL.

Figura 14 - Superfície de resposta da hidrólise enzimática dos conjugados da morfina em função do tempo (horas) e da concentração (U/mL) com temperatura de 37 e 60°C respectivamente.

Na Figura 14 o efeito da temperatura é percebido de maneira nítida, mostrando área praticamente completa em vermelho no gráfico de temperatura 37°C, indicando boa resposta, e área praticamente inteira em azul no gráfico de temperatura de 60°C.

5.3. Resultados da validação do método para determinação de opiáceos em sangue total e em soro fisiológico

5.3.1. Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) da morfina, 6-acetilmorfina e codeína obtidos para o método desenvolvido, estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Valores de limite de detecção e de limite de quantificação para os opiáceos analisados

	SANGUE TOTAL		SORO FISIOLÓGICO	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ
Morfina	5,0 ng/mL	10,0 ng/mL	2,0 ng/mL	10,0 ng/mL
6-Acetilmorfina	5,0 ng/mL	10,0 ng/mL	2,0 ng/mL	10,0 ng/mL
Codeína	5,0 ng/mL	10,0 ng/mL	2,0 ng/mL	10,0 ng/mL

LOD = limite de detecção, LOQ = limite de quantificação

5.3.2. Estudo de efeito matriz

A possível diferente interferência exercida pelas duas matrizes em estudo sobre o método desenvolvido foi analisada estatisticamente através das respostas obtidas nas análises. A Tabela 3 apresenta os resultados dos cálculos estatísticos.

Tabela 3 – Estudo de efeito matriz da morfina, 6-acetilmorfina e codeína em amostras de sangue total e de soro fisiológico

	Amostras	Teste F	Teste t	Desvio
Morfina	CQ1	$F_{cal} < F_{tab}$	$T_{cal} < T_{tab}$	Não significativo
	CQ2	$F_{cal} < F_{tab}$	$T_{cal} > T_{tab}$	Significativo
	CQ3	$F_{cal} < F_{tab}$	$T_{cal} > T_{tab}$	Significativo
6-ACM	CQ1	$F_{cal} < F_{tab}$	$T_{cal} > T_{tab}$	Significativo
	CQ2	$F_{cal} < F_{tab}$	$T_{cal} > T_{tab}$	Significativo
	CQ3	$F_{cal} < F_{tab}$	$T_{cal} > T_{tab}$	Significativo
Codeína	CQ1	$F_{cal} > F_{tab}$	$T_{cal} > T_{tab}$	Significativo
	CQ2	$F_{cal} < F_{tab}$	$T_{cal} > T_{tab}$	Significativo
	CQ3	$F_{cal} > F_{tab}$	$T_{cal} > T_{tab}$	Significativo

CQ = amostras de controle de qualidade, CQ1 = 30 ng/mL; CQ2 = 550 ng/mL; CQ3 = 1100 ng/mL, 6-ACM = 6-acetilmorfina, F_{cal} = F calculado, F_{tab} = F tabelado, T_{cal} = T calculado, T_{tab} = T tabelado

5.3.3. Linearidade

O método apresentou-se linear na faixa de concentração estudada (10 a 1500 ng/mL) para as três substâncias em estudo. Observamos também que o método é heteroscedástico em ambas matrizes, já que os valores de F calculados para as 3 curvas de calibração (morfina, codeína e 6-acetilmorfina) se mostraram maiores do que o valor de F tabelado (intervalo de confiança de 95%).

Após avaliação de diversos fatores de ponderação ($1/x$; $1/x^2$; $1/x^{1/2}$; $1/y$; $1/y^2$; $1/y^{1/2}$), o fator que apresentou menor somatória de porcentagem de erro relativo em relação à concentração nominal para o sangue foi o fator $1/x^2$, e para o soro fisiológico foi o $1/y^2$. As equações de regressão linear ponderada e os coeficientes de correlação obtidos foram os seguintes para o sangue: morfina: $y = 0,0062x + 0,0019$; $r^2 = 0,9962$; 6-acetilmorfina: $y = 0,0039x + 0,0004$; $r^2 = 0,9976$; codeína: $y = 0,0025x - 0,0011$, $r^2 = 0,9951$, e para o soro fisiológico: morfina: $y = 0,003459x -$

0,00134; $r^2 = 0,9998$; 6-acetilmorfina: $y = 0,00415x - 0,00654$; $r^2 = 0,9993$; codeína: $y = 0,002558x - 0,00364$, $r^2 = 0,9994$.

5.3.4. Precisão intra e interensaio

Os valores de precisão intra e interensaio obtidos pela análise de morfina, 6-acetilmorfina e codeína em sangue total e em soro fisiológico estão descritos na Tabela 4, através do coeficiente de variação (CV) do método proposto.

Tabela 4 - Valores de precisão intra-ensaio e interensaio para os opiáceos analisados

Analito	Amostra	SANGUE TOTAL		SORO FISIOLÓGICO	
		Precisão Intra-ensaio (CV)	Precisão Interensaio (CV)	Precisão Intra-ensaio (CV)	Precisão Interensaio (CV)
Morfina	CQ1	9,1%	11,3%	5,7%	5,9%
	CQ2	4,3%	4,6%	3,4%	0,1%
	CQ3	3,5%	4,6%	3,1%	2,9%
6-ACM	CQ1	9,1%	8,0%	6,3%	7,3%
	CQ2	4,5%	2,8%	5,7%	7,7%
	CQ3	8,4%	2,1%	4,3%	3,0%
Codeína	CQ1	10,0%	9,4%	6,3%	2,4%
	CQ2	8,6%	4,9%	4,2%	4,9%
	CQ3	9,4%	11,4%	3,7%	1,2%

6-ACM = 6-acetilmorfina; CQ = amostras de controle de qualidade; CQ1 = 30 ng/mL; CQ2 = 550 ng/mL; CQ3 = 1100 ng/mL

5.3.5. Recuperação

A Tabela 5 apresenta os valores de recuperação obtidos pela análise de morfina, 6-acetilmorfina e codeína em sangue total e em soro fisiológico através do método proposto.

Tabela 5 – Valores de recuperação (%) obtidos na análise de morfina, 6-acetilmorfina e codeína em sangue total e em soro fisiológico

Recuperação (%)			
	Amostras	Sangue	Soro Fisiológico
Morfina	CQ1	81,7	96,6
	CQ2	84,4	99,2
	CQ3	77,4	99,1
6-ACM	CQ1	77,4	93,6
	CQ2	74,0	102,3
	CQ3	77,8	100,1
Codeína	CQ1	85,4	99,8
	CQ2	95,2	105,3
	CQ3	85,2	104,8

6-ACM = 6-acetilmorfina; CQ = amostras de controle de qualidade; CQ1 = 30 ng/mL; CQ2 = 550 ng/mL; CQ3 = 1100 ng/mL

5.3.6. Estabilidade dos analitos na matriz

Os resultados obtidos no estudo de estabilidade foram avaliados através da comparação entre as respostas de amostras submetidas a diferentes condições de armazenamento e as respostas de amostras recém-preparadas. A diferença (%) entre essas respostas estão descritas nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6 – Estudo de estabilidade da morfina, 6-acetilmorfina e codeína em sangue total em condições de temperatura ambiente (24 horas), após ciclos de congelamento e descongelamento, sob refrigeração (7 dias) e à - 20°C (90 dias)

Estabilidade (Diferença %) em sangue total				
	Amostras	Morfina	6-ACM	Codeína
Temperatura ambiente (24h)	CQ1	11,1	2,7	6,8
	CQ2	15,0	32,1	13,2
Ciclos congelamento (-20°C)	CQ1	1,8	1,8	1,1
	CQ2	1,24	9,7	2,8
4°C por 7 dias	CQ1	14,3	9,6	7,8
	CQ2	7,3	13,8	6,9
-20°C por 90 dias	CQ1	13,7	56,0	18,4
	CQ2	15,3	27,4	15,5

CQ = amostras de controle de qualidade, CQ1 = 30 ng/mL; CQ2 = 1100 ng/mL

Tabela 7 – Estudo de estabilidade da morfina, 6-acetilmorfina e codeína em soro fisiológico em condições de temperatura ambiente (24 horas), após ciclos de congelamento e descongelamento, sob refrigeração (7 dias) e à – 20°C (90 dias)

Estabilidade (Diferença %) em soro fisiológico				
	Amostras	Morfina	6-ACM	Codeína
Temperatura ambiente (24h)	CQ1	1,9	10,7	9,2
	CQ2	9,6	5,2	5,3
Ciclos congelamento (-20°C)	CQ1	4,0	0,1	2,3
	CQ2	10,9	7,9	7,3
4°C por 7 dias	CQ1	8,5	14,0	12,9
	CQ2	13,6	1,0	16,1
-20°C por 90 dias	CQ1	8,3	8,0	1,2
	CQ2	18,6	53,8	22,4

CQ = amostras de controle de qualidade, CQ1 = 30 ng/mL; CQ2 = 1100 ng/mL

Com relação à estabilidade dos conjugados da morfina, morfina-3-glicuronídeo e morfina-6-glicuronídeo, esses analitos parecem se manter estáveis em todas condições estudadas, já que não houve aparecimento de morfina (pico cromatográfico) em nenhuma das condições de armazenamento estudadas.

5.4. Resultados da análise toxicológica de casos *postmortem* com envolvimento de opiáceos

Os resultados obtidos com a análise de casos *postmortem* envolvendo o uso clínico de opiáceos através do método proposto estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8 – Informações, histórico, e resultados das análises toxicológicas dos casos *postmortem* envolvendo opiáceos

Caso	Idade	Sexo	Tempo morte	Causa morte	Patologia relevante	Resultados (ng/ml)					
						Sangue cardíaco		Sangue femoral		Humor vitreo	
						Total	Livre	Total	Livre	Total	Livre
1096	62	M	10-12 h	edema agudo pulmões	metástase	amostra indisponível		Cod: 23	Cod: +	VI	Cod:19
4138	77	F	20 h	bronco-pneumonia	metástases disseminadas	Mor: 397 Cod: 1257	Mor: + Cod: 212	Mor: 270 Cod: 1280	Mor: ND Cod: 117	Mor: 162 Cod: 799	Mor: ND Cod: 342
4985	92	F	12 h	bronco-pneumonia	câncer pele/ hipertensão	Cod: 107	Cod: +	Cod: 115	Cod: ND	VI	Cod: 10
5277	70	F	16 h	edema pulmonar	miocardiopatia hipertensiva	Cod: 21	Cod: +	ND	ND	Cod: 21	Cod: +
7083	28	F	10 h	bronco-pneumonia	neoplasia uterina	Cod: 21	Mor: 46	Cod: 23	Mor: 44	Mor: 728 Cod: +	Mor: +
8546	89	F	17 h	tromboembolismo pulmonar	fêmur quebrado/bronco-pneumonia	Mor: 977	Mor: 19	Mor: 1071	Mor: +	Mor: 251	Mor: +
422	73	M	24 h	parada cardiorrespiratória	carcinoma epidermóide metastático	Mor: 868	Mor: 528	Mor: 726	Mor: 71	Mor: 277	Mor: 55

ND – não detectado; + concentração abaixo do limite de quantificação; VI – volume insuficiente; Mor – morfina; Cod – codeína

Discussão

6. DISCUSSÃO

Em toxicologia forense, dentre as suas diversas aplicações com propósitos legais, a identificação de substâncias tóxicas que possam estar envolvidas na causa de um óbito constitui uma das principais e mais complexas atividades da área.

A realização de análises toxicológicas em amostras *postmortem* não compõe tarefa das mais simples. Além das dificuldades enfrentadas na escolha dos espécimes mais apropriados, esses podem se encontrar em decomposição, tornando complicada a detecção de substâncias nessas amostras devido à maior interferência da matriz. A decomposição que afeta os cadáveres no intervalo *postmortem* também afeta as drogas presentes, que se tornam instáveis e acabam por se degradar, como acontece com a heroína e com os glicuronatos da morfina. Além do mais, há ainda a ocorrência do fenômeno de redistribuição *postmortem* que acaba por afetar as concentrações das drogas, principalmente daquelas mais propensas a esse acontecimento. A união de todos esses fatores pode levar a conclusões erradas, baseadas em resultados falsos ou mal interpretados.

Casos de óbito envolvendo opiáceos possuem algumas dificuldades particulares na sua investigação. O grau de tolerância desenvolvido por usuários de morfina ou heroína pode resultar em concentrações sanguíneas *postmortem* de morfina muito variadas. A presença de morfina em sangue e/ou urina pode indicar o consumo dessa substância pela vítima, ou por outro lado, pode ser interpretado como resultado do metabolismo sofrido pelo uso de heroína (WHITE & IRVINE, 1999).

A determinação da concentração dos conjugados da morfina (3 e 6 glicuronídeos) em fluidos biológicos pode auxiliar na interpretação de alguns casos. Altas concentrações de morfina livre e baixas concentrações dos conjugados em sangue, com ausência de morfina em urina, indicam que a morte ocorreu logo após o uso, e que a vítima não era dependente da droga, pois em casos de dependência a presença de morfina em urina é constante. Já no caso de obtenção de valor menor que 1 para a razão morfina livre/morfina conjugada em sangue, seguido de alta concentração de morfina total em urina, indicam provavelmente que a morte ocorreu de três horas a mais após uso da substância. Porém, a instabilidade dos conjugados da morfina em determinadas condições de temperatura e contaminação bacteriana

com conseqüente hidrólise, pode levar a um aumento da morfina livre nas amostras coletadas, descaracterizando a intoxicação ocorrida (DRUMMER, 2001).

O sangue *postmortem* apresenta pH e conteúdo líquido que diferem do sangue em vida, e a ocorrência de coagulação e hemólise tornam esse fluido uma mistura não homogênea. Assim, substâncias que se distribuem não uniformemente entre o plasma e o conteúdo celular do sangue podem ter sua análise comprometida nesse espécime. Em um estudo realizado por SKOPP *et al.* (1998) verificou-se que a razão sangue/plasma para as concentrações de morfina não foram afetadas por variações no hematócrito e nem no conteúdo líquido do sangue, enquanto as razões para M3G e M6G foram fortemente afetadas, mostrando acúmulo desses produtos de biotransformação no plasma.

Resultados conflitantes foram obtidos na investigação da ocorrência de redistribuição *postmortem* de opiáceos por diversos autores (LOGAN & SMIRNOW, 1996; GEROSTAMOULOS & DRUMMER, 2000; BOGUSZ, 1997; SKOPP *et al.*, 1996). Essas variações entre estudos podem ser decorrentes de escolha de locais diferentes para coleta das amostras, ou realização de coleta de forma inadequada, aspirando grandes volumes de sangue, por exemplo, com risco de contaminação do espécime por sangue adjacente, além das variações individuais de cada caso.

Estudos realizados em modelos animais mostram que os efeitos da redistribuição *postmortem* podem estar aumentados nesta situação, principalmente em animais pequenos, onde apenas restritos volumes estão disponíveis para coleta, aumentando o risco de drenagem proveniente de outros locais. Além disso, órgãos difusores de drogas se encontram muito próximos uns dos outros e do miocárdio (sangue cardíaco), afetando de forma mais rápida e em maior escala os espécimes mais freqüentemente estudados (CRANDALL *et al.*, 2006a).

Apesar de não apresentar volume de distribuição dos mais altos e possuir caráter hidrofílico ($\log P_{\text{octanol/água}} = -0,1$), a morfina apresenta-se moderadamente lipossolúvel em pH fisiológico, sendo amplamente distribuída para tecidos e órgãos após sua administração, o que pode favorecer a formação de um gradiente de concentração para posterior redistribuição. Já a heroína mostra todas as condições para essa ocorrência, com volume de distribuição de 25 L/kg e alta lipofilicidade. Com isso, verificamos a necessidade da realização de um estudo analisando o comportamento dessas substâncias em amostras *postmortem* para

possível elucidação de alguns questionamentos. Avaliando assim não só a possibilidade da ocorrência da redistribuição *postmortem*, mas também os demais fatores citados que podem alterar as concentrações dessas substâncias.

A utilização do humor vítreo para detecção de opiáceos também pode ser bastante interessante, visto que no olho não existe a presença de esterases que degradam a 6-acetilmorfina no sangue, possibilitando a detecção dessa substância em humor vítreo em casos onde já não há a presença em sangue, permitindo identificar o uso de heroína (PRAGST *et al.*, 1999). É provável que substâncias hidrossolúveis, como a morfina e a codeína, tenham afinidade por esse fluido, sofrendo difusão do sangue para o humor vítreo, já que esse é composto de cerca de 99% de água. Existe a necessidade de estabelecer correlação das concentrações das drogas entre sangue e humor vítreo, disponibilizando assim valores e dados suficientes para interpretação dos resultados obtidos na análise desse espécime, ampliando sua utilização.

Sendo assim, os espécimes escolhidos para estudo foram humor vítreo, e sangue cardíaco e periférico (femoral).

Foram analisadas diversas técnicas analíticas para quantificação de opiáceos em fluidos biológicos disponíveis na literatura, verificando as melhores condições, vantagens e desvantagens, de cada procedimento. Ao desenvolver nosso método, a praticidade, simplicidade, rapidez e sensibilidade, foram alguns aspectos levados em consideração, por se tratar de uma aplicação em rotinas laboratoriais que exigem a obtenção de resultados de forma rápida e precisa.

O procedimento de extração escolhido para desenvolvimento do método foi a técnica de extração em fase sólida. Analisando outras técnicas como a extração líquido-líquido (LLE), verificamos que baixos rendimentos são obtidos, o que se deve ao caráter anfótero (grupos funcionais ácidos e básicos) da morfina. Assim, quando o pH da fase aquosa é ajustado para extração da morfina e meios muito básicos são obtidos, o grupo funcional fenólico se ioniza e, conseqüentemente parte das moléculas fica retida na fase aquosa, não sendo extraída pelo solvente orgânico (LEIS *et al.*, 2000). Além disso, a técnica de LLE não produz extratos muito limpos, havendo a necessidade de conduzir múltiplas extrações para minimizar a presença de interferentes endógenos nos extratos, gerando trabalho intenso e consumindo muito tempo. A técnica de microextração em fase sólida (SPME) não tem sido muito

utilizada para a extração de opiáceos em fluidos biológicos, isso porque esses compostos possuem baixa volatilidade para serem extraídos por HS-SPME (*headspace*) necessitando de derivatização prévia para melhores resultados, e a extração dessas substâncias por direta imersão da fibra (DI-SPME) em amostras complexas como o sangue, leva à co-extração de vários compostos endógenos, já que as fibras utilizadas não são seletivas, diminuindo a especificidade e seletividade da técnica (STAERK & KULPMANN, 2000).

Tendo em vista o exposto, a técnica de extração em fase sólida (SPE) foi escolhida para extração dos analitos de interesse. Cartuchos de fase mista, compostos de uma fase de troca iônica (benzenossufonilpropilsilano) e uma fase apolar (C8), foram nossa opção de escolha. Assim, o pH da fase aquosa é ajustado, através da adição de tampão, para completa ionização de pelo menos um dos grupos funcionais das moléculas, ocorrendo a captura dos analitos ionizados pela fase sólida assim que a amostra passa através dos cartuchos. Desta forma, as perdas sofridas em LLE decorrentes do caráter anfótero da morfina não são observadas em SPE, já que a interação do analito com a fase extratora ocorre quando a molécula está na forma ionizada. Além disso, os extratos obtidos são bastante limpos, pois a utilização das duas fases em combinação permite remover interferentes endógenos de caráter apolar com etapas de lavagem bastante eficientes, sem risco de eluição prematura dos analitos de interesse.

Dificuldades encontradas na utilização da SPE foram relacionadas à matriz sangue *postmortem*, que, por não ser um fluido homogêneo, muitas vezes acaba por entupir os cartuchos. Com isso, optamos por diluir as amostras em tampão (proporção de 1:5), e em sequência utilizar centrifugação para remover resquícios de materiais sólidos.

Também para diminuir a interferência das diferentes composições da amostra que poderiam afetar a precisão do método, fizemos o uso de um padrão interno deuterado para quantificação dos analitos, já que a presença deste faz correção de erros aleatórios e sistemáticos. É recomendado que o padrão interno (PI) tenha características físico-químicas semelhantes às apresentadas pelos analitos de interesse, assim apresentará proximidade nas recuperações analíticas. O padrão deuterado que havia disponível no laboratório era o morfina-d3, que foi então escolhido como PI do método, que por sua vez não afetou a reprodutibilidade das

análises e não casou prejuízo nos resultados de precisão intra e interensaio da 6-acetilmorfina e da codeína (Tabelas 5 e 6).

Com o intuito de otimizar as condições do método proposto, verificamos qual valor de pH seria o mais adequado para aplicação da técnica de extração. Valores de pH de 4,0, 5,0 e 6,0 foram testados, pois nessas condições os analitos, ou pelo menos um dos seus grupos funcionais se encontram na forma ionizada (pKa morfina: 8,0/9,9; pKa 6-acetilmorfina: 8,0; pKa codeína: 8,2), interagindo com a fase sólida extratora. Foi possível observar que melhores resultados foram obtidos em valor de pH 6,0, visto também que em pH 4,0 maior dificuldade foi enfrentada na passagem das amostras pelos cartuchos, chegando a ocorrer bloqueio em alguns casos, o que se deve à coagulação de proteínas do sangue nesse valor de pH.

Para determinação de morfina total (fração livre mais fração conjugada) é necessário realizar a hidrólise dos conjugados da morfina, já que esses produtos de biotransformação são extremamente polares, não sendo possível sua detecção por GC-MS. Usualmente aplicam-se procedimentos de hidrólise ácida ou enzimática. A hidrólise ácida é um procedimento rápido e eficiente, porém alguns compostos em estudo não apresentam estabilidade em condições de extrema acidez, podendo ser degradados e originar morfina, superestimando sua concentração (FISH & HAYES, 1974). Dessa forma, optou-se por realizar hidrólise enzimática utilizando enzima β -glicuronidases. O metabólito M6G parece oferecer maior resistência à hidrólise do que o M3G, o que se deve a ligação do ácido glicurônico em uma posição alcoólica, diferentemente do M3G que possui essa ligação em uma posição fenólica rica em elétrons, facilitando sua hidrólise devido à maior estabilidade do ânion fenolato resultante (ROMBERG & LEE, 1995).

Entretanto, ao tentar reproduzir algumas condições de hidrólise enzimática dos produtos da morfina disponíveis na literatura, baixas taxas de hidrólise foram obtidas. Assim, optamos por fazer a otimização do procedimento, fazendo uso do planejamento fatorial, já que havia a necessidade de estudar o efeito de diversos fatores sobre essa análise.

O uso de experimentos estatisticamente planejados é uma alternativa mais econômica e produtiva do que os métodos de tentativa e erro ou experimentos com variações sequenciais das variáveis, onde se estima o efeito de uma variável, enquanto se mantém todas as outras variáveis em uma condição fixa. A metodologia

de modelamento de superfície de resposta (RSM) é uma das técnicas de estatística multivariada utilizada para realização de otimização de procedimentos analíticos, onde é possível observar a interdependência entre as variáveis. O RSM engloba técnicas matemáticas e estatísticas com base no ajuste de uma equação polinomial aos dados experimentais, descrevendo o comportamento de um conjunto de dados com o intuito de fazer previsões estatísticas (BEZERRA *et al.*, 2008).

O desenho experimental escolhido, para definir quais experimentos deveriam ser realizados, foi o modelo de *Box-Behnken*, que parece ser o mais eficiente e econômico, com realização de apenas 17 experimentos para obtenção dos resultados (FERREIRA *et al.*, 2007).

Primeiramente, estudamos a enzima β -glicuronidase de *E. coli*; porém apesar das condições otimizadas, baixas taxas ainda foram encontradas. Com isso, passamos a utilizar β -glicuronidase de *H. pomatia*. As condições estudadas para otimização da hidrólise foram: temperatura (entre 37 e 60°C), tempo de incubação (entre 4 e 24 horas) e concentração da enzima β -glicuronidase (entre 2500 e 20000 U/mL). Adotamos o valor de pH 5,0 para realização da incubação, já visto que o próprio fabricante indica esse valor para melhor atividade enzimática. Nas Figuras de 9 a 14 é possível observar os resultados obtidos. Verificamos que as melhores condições (cor vermelha) são as existentes na região dos 37°C, com 20.000 U/mL de enzima, e tempo de incubação de 4 horas, onde aparece uma elevação da curvatura da superfície. Com relação ao efeito do tempo de incubação, verifica-se que conforme aumento desse fator (número de horas), o processo se torna menos eficiente, com maior aparecimento de zonas de cor azul (menor eficiência) e menor em vermelho, que pode ser resultado de instabilidade e degradação dos analitos sob a condição de incubação. Assim, como é esperado, o aumento da concentração enzimática favorece a hidrólise, com aparecimento de zonas em vermelho na concentração de 20.000 U/mL como mostra a figura 11. E com relação à temperatura, os resultados são bem nítidos, com melhor resposta na temperatura de 37°C e pior na temperatura de 60°C, o que provavelmente se deve à degradação enzimática em altas temperaturas. Após a aplicação da melhor condição de hidrólise obtivemos taxas de 75% de rendimento.

Para realização da análise por cromatografia gasosa (GC) é necessário que os analitos se apresentem voláteis e termicamente estáveis. A presença de grupos

funcionais como hidroxilas (OH), aminas (NH₂), carboxilas (COOH) e sulfidrilas (SH) nas moléculas são os maiores causadores de problemas, pois tornam os compostos polares e reduzem suas volatilidades. Assim, esses grupamentos devem ser derivatizados para uma análise mais adequada. Os opiáceos em estudo foram derivatizados pelo método de sililação no extrato seco, utilizando como agente derivatizante o BSTFA com 1% de TCMS. Esse processo visa substituir os prótons lábeis pelo grupo trimetilsilil [-Si(CH₃)₃]. A aplicação dessa técnica possibilitou a detecção dos analitos por cromatografia gasosa, e os produtos foram formados com boa reprodutibilidade.

A corrida cromatográfica proposta possibilitou boa eficiência e resolução de picos, com tempo de análise de 19 minutos. Foi feita a utilização da espectrometria de massas em acoplamento com a cromatografia gasosa para quantificação dos analitos.

A espectrometria de massas permite identificar, e também quantificar, praticamente qualquer substância, já que a análise gera um espectro de massas característico de cada molécula em particular, permitindo a análise de misturas complexas, o que é de extrema importância em análises forenses devido à complexidade das matrizes que são analisadas.

O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização eletrônica (EI), que é a técnica mais comumente utilizada, onde as moléculas são bombardeadas por um feixe de elétrons e conseqüentemente perdem um elétron, originando os chamados íons moleculares (M⁺), que por sua vez ainda com excesso de energia são quebrados em uma série de fragmentos mais estáveis. As abundâncias dos fragmentos formados e o padrão de fragmentação são reprodutíveis de instrumento para instrumento e através do tempo. O íon molecular é geralmente o íon mais abundante no espectro de massas dos derivados TMS (trimetilsilil) dos opiáceos, e esses foram os selecionados como os íons para quantificação.

A análise foi feita em *full scan*, que gera um espectro completo de cada analito, possibilitando sua melhor identificação, já que boa sensibilidade foi também adquirida nesse modo de operação com possível detecção de valores de 10 ng/mL.

Inicialmente, a etapa de validação do método foi realizada em amostras de sangue total, e quando essa foi finalizada, o teste de efeito matriz foi conduzido para verificar se a detecção dos analitos em estudo seria afetada por uma possível

interferência de forma diferenciada das matrizes sangue total e humor vítreo. Assim, uma série de análises estatísticas foi feita verificando a diferença entre as variâncias e as médias obtidas com a análise em ambas matrizes. Os resultados mostram que as matrizes exercem uma interferência diferente sobre a detecção dos analitos, mostrando também uma maior redução da eficiência da extração exercida pela matriz sangue total quando se compara os resultados de recuperação. Conseqüentemente, definimos como necessária a realização da validação total do método em amostras de soro fisiológico, e também a construção de curvas de calibração em cada uma das matrizes para quantificação de amostras reais, minimizando erros.

Diversos parâmetros foram avaliados para validação do método analítico. Ao realizar os primeiros ensaios de recuperação, baixos níveis foram obtidos, em torno de 40%, com isso algumas modificações foram realizadas no procedimento de SPE. Na etapa de condicionamento dos cartuchos era feita a utilização de metanol e água, que foi substituído por metanol e solução tampão fosfato pH 6,0 0,1 M, mantendo o meio já mais propício para recebimento da amostra. Após realização dessa e de outras mudanças, foram obtidas taxas médias de recuperação em amostras de sangue de 81,2% para morfina, 76,4% para 6-acetilmorfina e 88,6% para codeína, e de 98,3% para morfina, 98,6% para 6-acetilmorfina e de 103,3% para codeína em amostras de soro fisiológico, consideradas satisfatórias.

Bons valores de LOQ e LOD foram obtidos, e esses valores são compatíveis com outros métodos analíticos disponíveis na literatura científica, sendo até mais baixos em comparação com alguns casos onde valores de LOQ de 50 ng/mL foram obtidos (ROPERO-MILLER *et al.*, 2002).

Avaliando os parâmetros de precisão intra-ensaio e interensaio, os resultados obtidos foram considerados satisfatórios, já que valores de coeficiente de variação menores ou iguais a 10% e 20% respectivamente foram obtidos.

Verificamos a linearidade do método proposto avaliando uma ampla faixa de trabalho (10 – 1500 ng/mL), que foi determinada baseada nas concentrações terapêuticas (codeína 50 – 250ng/mL; morfina 80 - 120 ng/mL), tóxicas (codeína 300 – 500 ng/mL; morfina 150 – 500 ng/mL) e alguns casos letais das substâncias em estudo (MOFFAT *et al.*, 2004). O método se mostrou linear, porém o fenômeno de heteroscedasticidade foi observado, provavelmente devido ao uso de uma faixa de

trabalho muito ampla (ordem de duas magnitudes). Esse fenômeno pode prejudicar a exatidão das concentrações menores da curva, já visto que os desvios maiores, presentes nas maiores concentrações, tendem a influenciar a regressão linear de forma mais acentuada do que os desvios menores. Equações de regressão linear ponderada foram calculadas para cada analito, utilizando como fator de ponderação $1/x^2$ para o sangue, e $1/y^2$ para o soro fisiológico. Esses fatores apresentaram a menor somatória de porcentagem de erro relativo frente à concentração nominal quando comparado aos demais fatores.

Os resultados do estudo de estabilidade demonstram que os analitos morfina e codeína se mantêm estáveis em amostras de sangue nas condições de armazenamento estudadas, porém o analito 6-acetilmorfina se apresentou instável em condições de temperatura ambiente e de armazenamento prolongado à -20°C (90 dias). A instabilidade da 6-acetilmorfina provavelmente se deve à hidrólise por esterases presentes no sangue, favorecendo ao aparecimento da morfina. Em amostras de soro fisiológico todos os analitos parecem se manter estáveis nas condições analisadas, exceto em armazenamento por tempo prolongado, onde a 6-acetilmorfina e a codeína apresentaram instabilidade. Com isso, recomenda-se analisar as amostras o quanto antes possível, já que analitos podem ser degradados após armazenamento por tempo prolongado. Com relação aos analitos morfina-3-glicuronídeo e morfina-6-glicuronídeo, esses mantiveram sua estabilidade em todas as condições de armazenamento estudadas e em ambas as matrizes, pois em nenhuma das situações ocorreu formação de morfina por uma possível hidrólise dessas substâncias. É possível que o armazenamento das amostras com adição do fluoreto de sódio impeça uma possível contaminação bacteriana e impossibilite assim a hidrólise desses metabólitos.

Finalizadas as etapas de desenvolvimento e validação do método, foi feita a aplicação em amostras *postmortem* de casos com suspeita de envolvimento de opiáceos.

No total, sete casos *postmortem* foram avaliados. Foi possível detectar codeína e morfina nas amostras analisadas, o que provavelmente resulta de uso terapêutico para tratamento de dor, já que o histórico dos casos indica esse fato, com presença de patologia associada à dor, como o câncer, e faixa etária elevada ($70,1 \pm 21,3$). Não observamos a presença de 6-acetilmorfina em nenhum dos

casos, o que já era de certo modo esperado, devido aos baixos índices de abuso de heroína em nosso país.

O uso de codeína apresentou maior frequência do que o de morfina nas amostras analisadas (57,1% e 28,6%, respectivamente), confirmando o dado já citado anteriormente de que a codeína apresenta as maiores frequências de uso dentre a classe dos opiáceos no Brasil. Talvez esse fato se deva a boa biodisponibilidade oral da codeína, possibilitando a administração por essa via com maior eficiência do que a morfina, ou também devido à aplicação mais ampla da codeína, indicada tanto para dores de grau mais leve quanto para estágios mais avançados de dor, quando comparado à morfina que possui potência bem mais elevada, indicada para dores severas. A presença de morfina em menor concentração do que a codeína em uma mesma amostra é geralmente resultado do metabolismo da codeína.

Ao hidrolisar enzimaticamente as amostras, observamos aumentos acentuados na concentração de morfina detectada, representando a sua forma total, sendo que em alguns casos só foi possível detectar essa forma, o que demonstra a importância da eficiência da técnica de hidrólise de seus conjugados. Uma maior concentração de codeína na forma total também foi observada, isso se deve à hidrólise de codeína-6-glicuronídeo (C6G), um produto de biotransformação da codeína.

Foi possível observar que, em geral, quando a forma total da substância é detectada em baixa concentração, dificilmente consegue-se detectar a forma livre, indicando que o uso da substância provavelmente ocorreu horas antes da morte, possibilitando sua metabolização e excreção. Na maioria dos casos analisados, a forma conjugada foi detectada em maior concentração do que a livre nos três espécimes (razão livre/conjugada variando de 0,003 a 0,747), indicando essa ocorrência tanto para morfina quanto para codeína. Uma exceção foi observada no caso 422 que mostrou uma razão de 1,56 em sangue cardíaco, indicando um consumo mais recente da substância. Contudo, esse dado é somente em relação a esse espécime, pois em sangue periférico a razão observada foi de 0,11, e em humor vítreo foi de 0,25, podendo então ser interpretado como resultado de uma possível redistribuição da morfina em sua forma livre para o sangue da região central.

Para avaliação da redistribuição *postmortem* é preciso comparar as concentrações das substâncias em sangue cardíaco e femoral, porém os analitos em sua forma livre não foram detectados na maioria dos casos dificultando a interpretação. Conseguimos detectar codeína livre em sangue em apenas um caso (4138), que mostrou razão sangue cardíaco/femoral (c/f) de 1,81, indicando probabilidade de redistribuição *postmortem*, porém não podemos afirmar com precisão esse fato baseando-se em apenas um único resultado. Em outros dois casos com presença de codeína (4985 e 5277), podemos observar que em sangue cardíaco foram detectados traços de codeína livre enquanto que em sangue femoral não houve aparecimento de pico cromatográfico característico da presença dessa substância, o que mostra a mesma tendência de razão c/f observada no caso 4138. Já a forma conjugada da codeína foi detectada em 71,4% dos casos, com média de razão c/f de $0,9 \pm 0,01$. É possível que a forma conjugada não sofra o fenômeno de redistribuição, já que essa forma apresenta características marcadamente polares.

No caso da morfina, sua forma livre foi detectada em três casos, entretanto a razão c/f apresentou muita variação de caso para caso, com valores acima de 3 para os casos 8546 e 422, e valor de 1,06 para o caso 7083, resultando em média c/f de $4,09 \pm 3,22$. Porém, o caso 7083 apresentou resultados confusos, com detecção de morfina livre e codeína conjugada, o que é estranho já que se a presença dos analitos resultasse de uso de morfina haveria detecção de morfina conjugada em maior concentração que a codeína conjugada, e no caso de uso de codeína poderíamos até observar esse perfil, porém as concentrações de morfina se apresentariam mais baixas em relação à codeína, assim não sabemos explicar o que se passou com esse caso. Portanto podemos observar uma tendência em obter resultados mais baixos de morfina livre em sangue femoral do que em cardíaco (razão c/f $> 3,7$), indicativo de redistribuição *postmortem*. Já com relação aos produtos de biotransformação da morfina, M3G e M6G, ou seja, a sua forma conjugada, esse fenômeno não parece exercer ação significativa, pois a média da razão c/f obtida nos casos foi de $0,96 \pm 0,47$, o que deve ser resultado do caráter polar dessas substâncias.

Além da facilidade em executar a análise em amostras de humor vítreo, resultados interessantes foram observados nesse espécime. A forma conjugada dos analitos foi detectada em menor concentração do que em sangue, o que provavelmente se deve a maior dificuldade em ultrapassar barreiras lipídicas que é

sofrida por essas moléculas mais polares, com exceção mais uma vez do caso 7083. E seguindo esse perfil, a morfina livre também foi detectada em menor concentração do que em sangue, o que também deve ser atribuído à característica hidrofílica da molécula, dificultando sua passagem por barreiras lipídicas, já exposto em diversos trabalhos principalmente com relação à barreira hemato-encefálica. Por outro lado, a codeína, em sua forma livre, foi detectada em maior concentração em humor vítreo tanto em relação ao sangue cardíaco quanto ao sangue femoral em três dos cinco casos nos quais foi detectada, sendo que nos outros dois casos restantes só foi possível detectar a forma conjugada dessa substância nos três espécimes analisados. A codeína deve apresentar maior facilidade em ultrapassar barreiras lipídicas, mostrando-se mais lipofílica do que a morfina. Podemos ainda enfatizar que nos casos 1096 e 4985 foi somente em amostra de humor vítreo que foi possível fazer a detecção de codeína livre. Esse fato deve ser atribuído ao aparente atraso sofrido no processo de excreção das substâncias desse fluido, permitindo ainda a detecção quando já não possível fazê-la em sangue. Esse dado mostra a importância em utilizar o humor vítreo em análises *postmortem*. Infelizmente não conseguimos estabelecer uma correlação precisa entre valores obtidos em humor vítreo e em sangue devido ao pequeno número de casos positivos para a presença de opiáceos, mas a faixa de valores da relação humor vítreo/sangue cardíaco e humor vítreo/sangue periférico encontrados para a morfina foi de 0,04 a 0,10 e de 0,05 a 0,78 e para a codeína foi de 1,61 a 2,02 e de 2,92 a 3,72, respectivamente.

Avaliando os resultados obtidos podemos considerar que a grande maioria dos casos apresentou valores de morfina e codeína na faixa considerada terapêutica, apenas com exceção do caso 422 que apresentou valor de 528,2 ng/ml de morfina livre em sangue cardíaco, que por sua vez poderia ser interpretado como um valor tóxico se não fosse feita a comparação com o valor obtido em sangue periférico que foi de 70,7 ng/ml, já que valores de 150 a 500 ng/ml são considerados tóxicos. Por isso podemos levar em consideração a possibilidade de redistribuição nesse caso. É interessante também ressaltar o caso 4138 que apresentou concentração de codeína total de 1257 e 1279,5 ng/ml em sangue cardíaco e periférico respectivamente. Esses valores se aproximam dos valores considerados fatais por alguns autores, que relatam casos de overdose envolvendo codeína com faixa de concentração da forma total de 1,4 mg/L a 5,6 mg/L (WRIGHT *et al.*, 1975), assim como outros autores também relatam que concentrações acima de 1,6 mg/ml

podem ser consideradas fatais (STEAD & MOFFAT, 1983). Porém a concentração de codeína livre nesse caso ficou abaixo de 215 ng/ml em sangue, que não atinge valor considerado tóxico (faixa de 300 a 500 ng/ml), assim como GEROSTAMOULOS e colaboradores (1996) observaram que concentração de codeína livre acima de 0,4 mg/L em sangue já pode ser responsável por causar óbito.

Com relação ao tempo estimado entre a hora da morte e o momento da realização da autópsia, parece que quanto maior o tempo passado, maior a razão c/f para a morfina livre, já que com tempo de morte de 10, 17 e 24 horas observamos razão c/f de 1,06, 3,74 e 7,47 respectivamente, indicando uma maior redistribuição da substância para o sangue da região central com o passar do tempo. Já com relação aos metabólitos M3G, M6G e C6G, não foram observadas diferenças significativas na razão c/f decorrentes de maior ou menor tempo passado da morte. E não foi possível fazer essa análise com relação à codeína livre, pois conseguimos detectá-la em somente um caso.

Foi possível observar que não houve uniformidade nos resultados obtidos, o que provavelmente se deve a grande complexidade exercida pelo fenômeno de redistribuição. E além disso, o fato desse fenômeno estar inserido em um contexto *postmortem*, onde diversos outros fatores exercem interferência sobre o resultado final da análise, torna ainda mais complexa a interpretação dos achados. É preciso sempre levar em consideração a ocorrência desse fenômeno. E para uma elucidação mais precisa desta ocorrência, mais casos precisam ser avaliados para uma melhor interpretação.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

De acordo com os dados obtidos pode-se concluir que:

- A técnica de extração em fase sólida (SPE) permite analisar amostras complexas, como o sangue *postmortem*, produzindo extratos com poucos interferentes.
- O método desenvolvido permite quantificar morfina e codeína total e livre, e 6-acetilmorfina em amostras de sangue total e de humor vítreo em faixas de concentração consideradas terapêuticas e tóxicas, além de possibilitar a extração simultânea de várias amostras por vez.
- Os parâmetros avaliados na validação do método permitem inferir que se trata de um método preciso, eficiente, seletivo e sensível.
- A otimização da técnica de hidrólise enzimática dos conjugados proporcionou um aumento na eficiência desse processo, e isso nos permitiu observar a presença das substâncias em estudo somente devido à detecção da forma total dos analitos em casos onde a forma livre não foi detectada.
- Existe uma tendência em se observar concentrações mais elevadas de morfina e de codeína, sendo mais acentuada na primeira, em sangue cardíaco quando comparado ao sangue periférico de escolha (femoral).
- O uso do humor vítreo em análises *postmortem* pode possibilitar um aumento na janela de detecção das substâncias, nos permitindo detectar codeína em casos onde não foi possível fazê-lo em sangue.

Referências

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. *Resolução RDC n.99, de 30 de dezembro de 2008*. Dispõe sobre controle de importações e exportações de substâncias e medicamentos sob regime especial. Disponível em: www.abdir.com.br/legislacao/legislacao_abdir_5_1_09_6.pdf Acesso em: 21 set. 2009.
- AL-ASMARI, A.I.; ANDERSON, R.A. Method for quantification of opioids and their metabolites in autopsy blood by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, v.31, p.394-408, 2007.
- ALMEIDA, A.M.; CASTEL-BRANCO, M.M.; FALCÃO, A.C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v.774, n.2, p.215–222, 2002.
- ALVES NETO, O. Acesso da população aos opioides: problema global? Soluções locais? In: CAVALCANTI, I.L.; CANTINHO, F.A.F.; ASSAD, A., eds. *Medicina perioperatoria*. Rio de Janeiro: SAERJ, 2006. p.1165-1171. Disponível em: http://www.saj.med.br/uploaded/File/novos_artigos/134.pdf. Acesso em: 08 mar. 2010.
- ANTONIDES, H.M.; KIELY, E.R.; MARINETTI, L.J. Vitreous fluid quantification of opiates, cocaine, and benzoylecgonine: comparison of calibration curves in both blood and vitreous matrices with corresponding concentrations in blood. *Journal of Analytical Toxicology*, v.31, p.469-476, 2007.
- ARMBRUSTER, D.A.; TILLMAN, M.D.; HUBBS, L.M. Limit of detection (LOD) /limit of quantitation (LOQ): comparison of the empirical and the statistical methods exemplified with GC-MS assays of abused drugs. *Clinical Chemistry*, v.40, n.7, pt.1, p.1233-1238, 1994.
- AUSTRALIAN INSTITUTE OF HEALTH AND WELFARE. Publications. Bulletin 72. National opioid pharmacotherapy statistics annual data collection: 2008 report:

- Snapshot day of clients receiving pharmacotherapy treatment*. 2009. 25p. Disponível em: <http://www.aihw.gov.au/drugs/nopsad/noc.cfm> Acesso em: 20 abr. 2010.
- BAILEY, D.N.; SHAW, R.F. Concentrations of basic drugs in postmortem human myocardium. *Journal of Toxicology, Clinical Toxicology*, v.19, p.197-202, 1982.
- BANDT, C.W. Postmortem changes in serum levels of the tricyclic antidepressants. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ACADEMY OF FORENSIC SCIENCES, Los Angeles, 1980.
- BASELT, R. Stability of cocaine in biological fluids. *Journal of Chromatography*, v.268, p.502-505, 1983.
- BEZERRA, M.A.; SANTELLI, R.E.; OLIVEIRA, E.P.; VILLAR, L.S.; ESCALEIRA, L.A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, v.76, p.965–977, 2008.
- BOGUSZ, M. Postmortem distribution pattern of morphine and morphine glucuronides in heroin overdose. *International Journal of Legal Medicine*, v.110, p.114–116, 1997. [Letter of the Editor].
- BOGUSZ, M.J.; MAIER, R.D.; DRIEBEN, S. Morphine, morphine-3-glucuronide, morphine-6-glucuronide and 6-monoacetylmorphine determined by means of atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry-liquid chromatography in body fluids of heroin victims. *Journal of Analytical Toxicology*, v.21, p.346-355, 1997.
- BROUSSARD, L.A.; PRESLEY, L.C.; PITTMAN, T.; CLOUETTE, R.; WIMBISH, G.H. Simultaneous identification and quantitation of codeine, morphine, hydrocodone, and hydromorphone in urine as trimethylsilyl and oxime derivatives by gas chromatography–mass spectrometry. *Clinical Chemistry*, v.43, p.1029–1032, 1997.
- BROWNSTEIN, M.J. A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.90, p.5391-5393, 1993.

- BRUCE, P.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M.L. Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. *Mikrochimica Acta*, v.128, p.93-106, 1998.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTATION. Overdose deaths involving prescription opioids among Medicaid enrollees - Washington, 2004-2007. *Morbidity and Mortality Weekly Report MMWR*, v.42, p.1171-1175, 2009.
- CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÕES SOBRE DROGAS. Publicações. Relatórios de Pesquisa. Nacionais. *II Levantamento Domiciliar sobre Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil 2005*. Disponível em: http://www.obid.senad.gov.br/portais/OBID/index.php#tab_pop_ger Acesso em: 10 abr. 2010.
- CHAN, S.C.; CHAN, E.M.; KALICIAK, H.A. Distribution of morphine in body fluids and tissues in fatal overdose. *Journal of Forensic Sciences*, v.31, p.1487-1491, 1986.
- CHAO, T.C.; LO, D.S. Relationship between postmortem blood and vitreous humor ethanol levels. *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, v.14, n.4, p.303-308, 1993.
- CHEN, X.H.; FRANKE, J.P.; WIJSBEEK, J.; ZEEUW, R.A. Study of lot-to-lot reproducibilities of Bond Elut Certify and Clean Screen DAU mixed mode solid-phase extraction columns in the extraction of drugs from whole blood. *Journal of Chromatography*, v.617, p.147-151, 1993.
- CHRISTRUP, L.L. Morphine metabolites. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, v.41, p.116-122, 1997.
- CONE, E.J.; WELCH, P.; PAUL, B.; MITCHELL, J.M.D. Forensic drug testing for opiates. III. Urinary excretion rates of morphine and codeine following codeine administration. *Journal of Analytical Toxicology*, v.15, n.4, p.161-166, 1991.
- COOK, D.S.; BRAITHWAITE, R.A.; HALE, K.A. Estimating antemortem drug concentration from postmortem blood samples: the influence of postmortem redistribution. *Journal of Clinical Pathology*, v.53, p.282-285, 2000.
- COSTA NETO, P.L.O. *Estatística*. 2.ed. São Paulo: Blucher, 2002. p.51-53.

- COUNBIS, R.J. Distribution of morphine and related compounds in human tissues and biological fluids using radioimmunoassay techniques. *Journal of Forensic Sciences*, v.19, p.307-312, 1974.
- COX, D.; PHIPPS, R.A.J.; LEVINE, B. Distribution of phencyclidine into vitreous humor. *Journal of Analytical Toxicology*, v.31, p.537-539, 2007.
- CRANDALL, C.S.; KERRIGAN, S.; AGUERO, R.L.; LAVALLEY, J.; MCKINNEY, P.E. The influence of collection site and methods on postmortem morphine concentrations in a porcine model. *Journal of Analytical Toxicology*, v.30, p.651-659, 2006a.
- CRANDALL, C.S.; KERRIGAN, S.; BLAU, R.L.A.; LAVALLEY, J.; ZUMWALT, R.; MCKINNEY, P.E. The influence of site of collection on postmortem morphine concentrations in heroin overdose victims. *Journal of Forensic Sciences*, v.51, p.413-420, 2006b.
- CURRY, A.; SUNSHINE, I. The liver: blood ratio in cases of barbiturate poisoning. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.2, p.602–606, 1960.
- DIMAIO, D.J.; DIMAIO, V.J.M. *Forensic pathology*. Boca Raton: CRC Press, 1993.
- DRUID, H. Postmortem toxicology. In KARCH, S.B., ed. *Drug abuse handbook*. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2007. p.961-1085.
- DRUID, H.; HOLMGREN, P. Compilations of therapeutic, toxic, and fatal concentrations of drugs. *Journal of Toxicology, Clinical Toxicology*, v.36, p.133-134, 1998.
- DRUMMER, O.F. Chromatographic screening techniques in systematic toxicological analysis. *Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications*, v.733, n.1/2, p.27–45, 1999.
- DRUMMER, O.H. *The forensic pharmacology of drugs of abuse*. Londres: Arnold-Hodder Headline Group, 2001. p.220-271.
- DRUMMER, O.H. Postmortem toxicology of drugs of abuse. *Forensic Science International*, v.142, p.101–113, 2004.

- DRUMMER, O.H.; GEROSTAMOULOS, J. Postmortem drug analysis: analytical and toxicological aspects. *Therapeutic Drug Monitoring*, v.24, p.199-209, 2002.
- EUROPEAN MONITORING CENTRE FOR DRUGS AND DRUG ADDICTION. Publications. Statistical Bulletin 2009. *Proportion of drug-induced deaths that show presence of opioids for the most recent year reported*. Disponível em: <http://www.emcdda.europa.eu/stats09/drdfig1> Acesso em: 22 abr. 2010.
- FERNER, R.E. Post-mortem clinical pharmacology. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v.66, p.430-443, 2008.
- FERREIRA, S.L.C.; BRUNS, R.E.; SILVA, E.G.P.; SANTOS, W.N.L.; QUINTELLA, C.M.; DAVID, J.M.; ANDRADE, J.B.; BREITKREITZ, M.C.; JARDIM, I.C.S.F.; BARROS NETO, B. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *Journal of Chromatography, A*, v.1158, n.1/2, p.2-14, 2007.
- FISH, F.; HAYES, T.S. Hydrolysis of morphine glucuronide. *Journal of Forensic Sciences*, v.19, p.676-683, 1974.
- FLANAGAN, R.J.; TAYLOR, A.; WATSON, I.D.; WHELPTON, R. *Fundamentals of analytical toxicology*. Chichester: John Wiley, 2007. 505p.
- FORREST, A.R.W. Obtaining samples at post mortem examination for toxicological and biochemical analyses. *Journal of Clinical Pathology*, v.46, p.292-296, 1993.
- FUKE, C.; BERRY, C.L.; POUNDER, D.J. Postmortem diffusion of ingested and aspirated paint thinner. *Forensic Science International*, v.78, p.199-207, 1996.
- GARDMARK, M.; KARLSSON, M.O.; JONSSON, F.; HAMMARLUND-UDENAES, M. Morphine-3-glucuronide has a minor effect on morphine antinociception: pharmacodynamic modeling. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.87, p.813-820, 1998.
- GEROSTAMOULOS, J.; DRUMMER, O.H. Postmortem redistribution of morphine and its metabolites. *Journal of Forensic Sciences*, v.45, p.843-845, 2000.

- GEROSTAMOULOS, J.; BURKE, M.P.; DRUMMER, O.H. Involvement of codeine in drug-related deaths. *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, v.17, p.327-335, 1996.
- GÓMEZ-ZAPATA, M.G.; ALCARAZ, M.; LUNA, A. Study of postmortem blood circulation. *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, v.103, n.1, p.27-32, 1989.
- GUILLOT, E.; MAZANCOURT, P.; DURIGON, M.; ALVAREZ, J. Morphine and 6-acetylmorphine concentrations in blood, brain, spinal cord, bone marrow and bone after lethal acute or chronic diacetylmorphine administration to mice. *Forensic Science International*, v.166, p.139–144, 2007.
- GUTHERY, B.; BASSINDALE, A.; PILLINGER, C.T.; MORGAN, G.H. The detection of various opiates and benzodiazepines by comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v.23, p.340–348, 2009.
- HACKETT, L.P.; DUSCI, L.J.; ILETT, K.F.; CHISWELL, G.M. Optimizing the hydrolysis of codeine and morphine glucuronides in urine. *Therapeutic Drug Monitoring*, v.24, p.652–657, 2002.
- HENNION, M. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography, A*, v.856, p.3–54, 1999.
- HEPLER, B.R.; ISENSCHMID, D.S. Specimen selection, collection, preservation, and security. In: KARCH, S.B., ed. *Drug abuse handbook*. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2007. p.975-991.
- HILBERG, T.; RIPEL, A.; SMITH, A.J.; SLORDAL, L.; MORLAND, J.; BJORNEBOE, A. Postmortem amitriptyline pharmacokinetics in pigs after oral and intravenous routes of administration. *Journal of Forensic Sciences*, v.43, p.380-387, 1998.
- HILBERG, T.; RIPEL, A.; SLORDAL, L.; BJORNEBOE, A.; MORLAND, J. The extent of postmortem drug redistribution in a rat model. *Journal of Forensic Sciences*, v.44, p.956–962, 1999.

- HOLT, D.W.; BENSTEAD, J.G. Postmortem assay of digoxin by radioimmunoassay. *Journal of Clinical Pathology*, v.28, p.483-486, 1975.
- HUANG, Z.P.; CHEN, X.H.; WIJSBEEK, J.; FRANKE, J.P.; ZEEUW, R.A. An enzymic digestion and solid-phase extraction procedure for the screening for acidic, neutral, and basic drugs in liver using gas chromatography for analysis. *Journal of Analytical Toxicology*, v.20, p.248-254, 1996.
- ISENSCHMID, D.; LEVINE, B.; CAPLAN, Y. A comprehensive study of the stability of cocaine and its metabolites. *Journal of Analytical Toxicology*, v.13, p.250–256, 1989.
- JANICKI, P.K. Pharmacology of morphine metabolites. *Current Pain and Headache Reports*, v.1, n.4, p.264-270, 1997.
- JENKINS, A.J.; KEENAN, R.M.; HENNINGFIELD, J.E.; CONE, E.J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of smoked heroin. *Journal of Analytical Toxicology*, v.18, n.6, p.317-330, 1994.
- JONES, G.R. Postmortem toxicology. In: JICKELLS, S.; NEGRUSZ, A., eds. *Clarke's analytical forensic toxicology*. London: Pharmaceutical Press, 2008. p.191-217.
- JUHASCIK, M.P.; JENKINS, A.J. Comparison of liquid/liquid and solid-phase extraction for alkaline drugs. *Journal of Chromatography Science*, v.47, p.553-557, 2009.
- JULIEN, R.M. *A primer of drug action: a concise, nontechnical guide to the actions, uses, and side effects of psychoactive drugs*. New York: W.H. Freeman, 1997. p.282-318.
- KENNEDY, M.C. Post-mortem drug concentrations. *Internal Medicine Journal*, v.40, n.3, p.183-187, 2010.
- KERRIGAN, S.; HONEY, D.; BAKER, G. Postmortem morphine concentrations following use of a continuous infusion pump. *Journal of Analytical Toxicology*, v.28, p.529-532, 2004.
- KOREN, G.; KLEIN, J. Postmortem redistribution of morphine in rats. *Therapeutic Drug Monitoring*, v.14, p.461-463, 1992.

- KOREN, G.; MACLEOD, S.M. Postmortem redistribution of digoxin in rats. *Journal of Forensic Sciences*, v.30, p.92-96, 1985.
- LEIS, H.J.; FAULER, G.; RASPOTNIG, G.; WINDISCHHOFER, W. Quantitative analysis of morphine in human plasma by gas chromatography–negative ion chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications*, v.744, n.1, p.113–119, 2000.
- LEWIS, R.J.; JOHNSON, R.D.; HATTRUP, R.A. Simultaneous analysis of Thebaine, 6-MAM and six abused opiates in postmortem fluids and tissues using Zymark® automated solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v.822, n.1/2, p.137–145, 2005.
- LINGEMAN, H.; HOEKSTRA-OUSSOREN, S.J.F. Particle-loaded membranes for sample concentration and/or clean-up in bioanalysis. *Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications*, v.689, n.1, p.221-237, 1997.
- LOGAN, B.K.; SMIRNOW, D. Postmortem distribution and redistribution of morphine in man. *Journal of Forensic Sciences*, v.41, p.221-229, 1996.
- LOGAN, B.; SMIRNOW, D.; GULLBERG, R. Lack of predictable site-dependent differences and time-dependent changes in postmortem concentrations of cocaine, benzoylecgonine, and cocaethylene in humans. *Journal of Analytical Toxicology*, v.21, p.23–31, 1997.
- LÖTSCH, J. Morphine metabolites as novel analgesic drugs? *Current Opinion in Anaesthesiology*, v.17, n.5, p.449-453, 2004.
- MADEA, B.; MUßHOFF, F. Postmortem toxicology. *Forensic Science International*, v.142, p.71-73, 2004.
- MEATHERALL, R. GC-MS quantitation of codeine, morphine, 6-acetylmorphine, hydrocodone, hydromorphone, oxycodone, and oxymorphone in blood. *Journal of Analytical Toxicology*, v.29, p.301-308, 2005.

- MOFFAT, A.C.; OSSELTON, M.D.; WIDDOP, B., eds. *Clarke's analysis of drugs and poisons: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material*. 3.ed. London: Pharmaceutical Press, 2004. v.2, 1935p.
- MORIYA, F.; HASHIMOTO, Y. Distribution of free and conjugated morphine in body fluids and tissues in a fatal heroin overdose: is conjugated morphine stable in postmortem specimens? *Journal of Forensic Sciences*, v.42, p.736–740, 1997.
- MORIYA, F.; HASHIMOTO, Y. Redistribution of basic drugs into cardiac blood from surrounding tissues during early-stages postmortem. *Journal of Forensic Sciences*, v.44, p.10-16, 1999.
- MULDER, G.J. Pharmacological effects of drug conjugates: is morphine-6-glucuronide an exception? *Trends in Pharmacological Science*, v.13, p.302-303, 1992.
- OBSERVATÓRIO BRASILEIRO DE INFORMAÇÕES SOBRE DROGAS. Estatísticas. *Estimativa de mortes associadas ao consumo de drogas - 2005*. Disponível em: http://www.obid.senad.gov.br/portais/OBID/biblioteca/documentos/Dados_Estatisticos/indicadores/327432.pdf Acesso em: 10 abr. 2010.
- OLDENDORF, W.M.; HYMAN, S.; BRAUN, L.; OLDENDORF, S.Z. Blood-brain barrier: penetration of morphine, codeine, heroin, and methadone after carotid injection. *Science*, v.178, p.984-986, 1972.
- OLIVEIRA, G.H.; CAMARGO, M.M.A. Opiáceos e opióides. In: OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A.O. *Fundamentos de toxicologia*. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p.337-341.
- OSBORNE, R.; JOEL, S.; TREW, D.; SLEVIN, M. Morphine and metabolite behavior after different routes of administration: demonstration of the importance of the active metabolite morphine-6-glucuronide. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v.47, p.12-19, 1990.
- PARKER, J.; WINEK, C.; SHANOR, S. Post-mortem changes in tissue levels of sodium secobarbital. *Clinical Toxicology*, v.4, p.265–272, 1971.

- PAUL, B.D.; MITCHELL, J.M.; MELL, L.D.; IRVING, J. Gas chromatography/electron impact mass fragmentometric determination of urinary 6-acetylmorphine, a metabolite of heroin. *Journal of Analytical Toxicology*, v.13, p.2-7, 1989.
- PELISSIER-ALICOT, A.L.; GAULIER, J.M.; CHAMPSAUR, P.; MARQUET, P. Mechanisms underlying postmortem redistribution of drugs: a review. *Journal of Analytical Toxicology*, v.27, p.533-544, 2003.
- PICHINI, S.; ALTIERI, I.; PELLEGRINI, M.; ZUCCARO, P.; PACIFICI, R. The role of liquid chromatography-mass spectrometry in the determination of heroin and related opioids in biological fluids. *Mass Spectrometry Reviews*, v.18, p.119-130, 1999.
- POUNDER, D.J. The nightmare of postmortem drug changes. *Legal Medicine*, p.163-191, 1993.
- POUNDER, D.J.; JONES, G.R. Post-mortem drug redistribution: a toxicological nightmare. *Forensic Science International*, v.45, p.253-263, 1990.
- POUNDER, D.J.; OWEN, V.; QUIGLEY, C. Postmortem changes in blood amitryptiline concentrations. *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, v.15, p.224-230, 1994.
- PRAGST, F.; SPIEGEL, K.; LEUSCHNER, U.; HAGER, A. Detection of 6-acetylmorphine in vitreous humor and cerebrospinal fluid: comparison with urinary analysis for proving heroin administration in opiate fatalities. *Journal of Analytical Toxicology*, v.23, n.3, p.168–172, 1999.
- PROUTY, R.; ANDERSON, W. The forensic science implications of site and temporal influences on postmortem blood-drug concentrations. *Journal of Forensic Sciences*, v.35, p.243–270, 1990.
- QUEIROZ, S.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Química Nova*, v.24, p.68-76, 2001.

- REISINE, T.; PASTERNAK, G. Opioid analgesics and antagonists. In: HARDMAN, J.G.; GILMAN, A.G.; LIMBIRD, L.E. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 9.ed. New York: McGraw-Hill, 1996. p.521-555.
- ROMBERG, L.W.; LEE, L. Comparison of the hydrolysis rates of morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide with acid and beta-glucuronidase. *Journal of Analytical Toxicology*, v.19, p.157-162, 1995.
- ROOK, E.J.; HUITEMA, A.D.R.; Van Den BRINK, W.; Van REE, J.M.; BEIJNEN, J.H. Pharmacokinetics and pharmacokinetic variability of heroin and its metabolites: review of the literature. *Current Clinical Pharmacology*, v.1, n.1, p.109-118, 2006.
- ROPERO-MILLER, J.D.; LAMBING, M.K.; WINECKER, R.E. Simultaneous quantitation of opioids in blood by GC-EI-MS analysis following deproteination, detautomerization of keto analytes, solid-phase extraction, and trimethylsilyl derivatization. *Journal of Analytical Toxicology*, v.26, p.524-528, 2002.
- SAWYER, W.; FORNEY, R. Postmortem disposition of morphine in rats. *Forensic Science International*, v.38, p.259-273, 1988.
- SANTOS, V.; LÓPEZ, K.J.V.; SANTOS, L.M.; YONAMINE, M.; CAMORNA, M.J.C.; SANTOS, S.R.C.J. Determining plasma morphine levels using GC-MS after solid phase extraction to monitor drug levels in the postoperative period. *Clinics*, v.63, p.307-314, 2008.
- SANTOS LUCAS, A.C.; BERMEJO, A.; FERNLINDEZ, P.; TABERNERO, M.J. Solid-phase microextraction in the determination of methadone in human saliva by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, v.24, p.93-96, 2000.
- SCHEURER, J.; MOORE, C.M. Solid-phase extraction of drugs from biologic tissues—a review. *Journal of Analytical Toxicology*, v.16, p.264-269, 1992.
- SCOTT, K.S.; OLIVER, J.S. Vitreous humor as an alternative for sample to blood for the supercritical fluid extraction of morphine and 6-monoacetylmorphine. *Medicine, Science and the Law*, v.39, p.77-81, 1999.

- SIMONATO, M. The neurochemistry of morphine addiction in the neocortex. *Trends in Pharmacological Science*, v.17, p.410-415, 1996.
- SHOU, W.Z.; PELZER, M.; ADDISON, T.; JIANG, X.; NAIDONG, W. An automatic 96-well solid phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the analysis of morphine, morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.27, n.1/2, p.143–152, 2002.
- SINGER, P.P.; JONES, G.R. Very unusual ethanol distribution in a fatality. *Journal of Analytical Toxicology*, v.21, p.506–508, 1997.
- SKOPP, G. Preanalytic aspects in postmortem toxicology. *Forensic Science International*, v.142, p.75-100, 2004.
- SKOPP, G.; PIJTSCH, L.; GANGMANN, B. A preliminary study on the distribution of morphine and its glucuronides in the subcompartments of blood. *Journal of Analytical Toxicology*, v.22, p.261-264, 1998.
- SKOPP, G.; LUTZ, R.; GANSSMANN, B.; MATTERN, R.; ADERJAN, R. Postmortem distribution pattern of morphine and morphine glucuronides in heroin overdose. *International Journal of Legal Medicine*, v.109, n.3, p.118-124, 1996.
- SOFT/AAFS. *Forensic Toxicology Laboratory Guidelines*. Seattle: Society of Forensic Toxicologists Inc. and American Academy of Forensic Sciences, 2006. 24p.
- STAERK, U.; KULPMANN, W.R. High-temperature solid-phase microextraction procedure for the detection of drugs by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications*, v.745, n.2, p.399–411, 2000.
- STEAD, A.H.; MOFFAT, A.C. A collection of therapeutic, toxic and fatal blood drug concentrations in man. *Human Toxicology*, v.3, p.437-464, 1983.
- TAYLOR, R.B.; LOW, A.S.; REID, R.G. Determination of opiates in urine by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*, v.675, p.213-223, 1996.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, v.74, p.835-855, 2002.

TRESCOT, A.M.; DATTA, S.; LEE, M.; HANSEN, H. Opioid pharmacology. *Pain Physician*, v.11, n.2, suppl., p.133-153, 2008. [Review].

UNITED KINGDOM NATIONAL STATISTICS. Statistics. *Number of deaths where selected substances were mentioned on the death certificate, England and Wales, 1993-2008*. Disponível em: <http://www.statistics.gov.uk/statbase/ssdataset.asp?vlnk=7892>. Acesso em: 13 maio 2009.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. *Guidance for the validation of analytical methodology and calibration of equipment used for testing of illicit drugs in seized materials and biological specimens*. New York: United Nations Publication, 2009. 67p. Disponível em: www.unodc.org/documents/scientific/validation_E.pdf Acesso em: 10 out. 2009.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. 2009 World Drug Report: analysis. Vienna: UNODC, 2009. 308p. Disponível em: http://www.unodc.org/documents/wdr/WDR_2009/WDR2009_eng_web.pdf Acesso em: 29 abr. 2010.

VORPAHL, T.; COE, J. Correlation of antemortem and postmortem digoxin levels. *Journal of Forensic Sciences*, v.23, p.329–334, 1978.

WARNER, M.; CHEN, L.H.; MAKUC, D.M. Increase in fatal poisonings involving opioid analgesics in the United States, 1999-2006. *NCHS Data Brief*, n.22, p.1-8, 2009.

WHITE, J.M.; IRVINE, R.J. Mechanisms of fatal opioid overdose. *Addiction*, v.94, n.7, p.961–972, 1999.

WILLS, S. *Drugs of abuse*. 2.ed. London: Pharmaceutical Press, 2005. p.35-63.

WRIGHT, J.A.; BASELT, R.C.; HINE, C.H. Blood codeine concentration in fatalities associated with codeine. *Clinical Toxicology*, v.8, p.457-463, 1975.

WORLD HEALTH ORGANISATION. *Cancer pain relief and palliative care*: report of a WHO Expert Committee. Geneva: WHO, 1990. 75p. (World Health Organization technical report series, v.804).

WYMAN, J.; BULTMAN, S. Postmortem distribution of heroin metabolites in femoral blood, liver, cerebrospinal fluid, and vitreous humor. *Journal of Analytical Toxicology*, v.28, p.260-263, 2004.

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

Anexos

ANEXO A

INSTITUTO DE HEMOTERAPIA SÍRIO-LIBANÊS LTDA.

Rua Dona Adma Jafet, 91 – 3º subsolo – CEP 01308-050 – São Paulo – Brasil

CNPJ: 053.172.417/0001-06 - Fone: 3556-6000 FAX: 3257-5206

CONTRATO PARA FORNECIMENTO DE HEMOCOMPONENTES

Pelo presente instrumento particular de convênio/cadastro para o fornecimento de Hemocomponentes entre as partes, de um lado **Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Laboratório de Análises Toxicológicas – CNPJ: 63.025.530/0015-00** com sede na avenida Professor Lineu Prestes, 580, na cidade de São Paulo - SP, caracterizado como **Solicitante**, e do outro lado, **Instituto de Hemoterapia Sírío Libanês Ltda.**, com sede nesta cidade, na Rua Dona Adma Jafet, 91 - 3º subsolo, inscrito no CNPJ/MF nº 53.172.417/0001-06, caracterizado com **Fornecedor**.

Cláusula Primeira - Fornecimento de Hemocomponente (s)

Este contrato tem por objeto a definição das bases para fornecimento de hemocomponentes para serem utilizados única e exclusivamente no projeto temático “**Redistribuição Postmortem de Substâncias Psicoativas em Tecidos Biológicos Humanos**”, de forma definida conforme registrado na FAPESP sob processo número 2009/08314-9 e no CNPq-Universal sob processo número 470643/2009-9 e tendo como coordenador o Prof. Dr. Maurício Yonamine.

Para o fornecimento de Hemocomponentes é necessário que o solicitante apresente o pedido do produto com os dados a seguir:

- a-) Nome dos Hemocomponentes;
- b-) Quantidade solicitada de Hemocomponentes;
- c-) O pedido a ser apresentado pela parte solicitante de produtos terá de ser em papel timbrado, constando endereço, telefone para contato, assinatura e carimbo do responsável pelo projeto de estudo, bem como os cuidados a serem tomados com o uso e descarte dos hemocomponentes.

Cláusula Segunda - Transporte dos Hemocomponentes

Os Hemocomponentes serão transportados de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada 153.

Parágrafo primeiro: Ao receber o(s) Hemocomponente(s) o serviço solicitante deverá verificar se as condições de transporte adequado foram respeitadas. Para isto junto ao fornecimento do(s) produto(s) irá acompanhar um termo de esclarecimento de transporte a ser assinado pelas partes, sendo que uma via deste termo voltará para o serviço que forneceu os produtos. Caso o serviço que recebeu os produtos tenha constatado que o transporte não foi adequado, deverá notificar o fornecedor dos produtos para verificação do fato ocorrido.

Parágrafo segundo: A responsabilidade do transporte será do serviço solicitante, sendo que caberá ao mesmo o envio da caixa adequada, bem como qualquer outro material que se fizer necessário ao transporte do(s) Hemocomponente(s), sempre seguindo as normas da Resolução da Diretoria Colegiada n. 153.

Cláusula Terceira – Da Rastreabilidade

Deverá permanecer com as partes envolvidas neste instrumento, cópias dos documentos de recebimento dos produtos com a finalidade de permitir a Rastreabilidade dos Hemocomponentes.

Cláusula Quarta - da Utilização

É de inteira responsabilidade do serviço solicitante que os hemocomponentes fornecidos serão utilizados única e exclusivamente para o projeto definido na cláusula primeira.

Cláusula Quinta – Responsabilidade Financeira

O fornecimento das unidades não acarretará em nenhum tipo de custo ao solicitante, pois entende o fornecedor estar única e exclusivamente contribuindo para a pesquisa científica de forma voluntária em atendimento à solicitação previamente recebida.

Cláusula Sexta - Das Penalidades

INSTITUTO DE HEMOTERAPIA SÍRIO-LIBANÊS LTDA.

Rua Dona Adma Jafet, 91 – 3º subsolo – CEP 01308-050 – São Paulo – Brasil

CNPJ: 053.172.417/0001-06 - Fone: 3556-6000 FAX: 3257-5206

O serviço solicitante quando desrespeitar qualquer cláusula deste contrato responderá:

- a-) Tecnicamente – Caso os hemocomponentes fornecidos para pesquisa sejam utilizados para fins transfusionais;
- b-) O serviço fornecedor dos Hemocomponentes compromete-se a fornecer produtos dentro dos padrões de qualidade exigidos pela legislação em vigor.

Cláusula Sétima – Início e Duração do contrato

- a-) Este contrato entrará em vigor quando todos os representantes das partes assinarem o mesmo.
- b-) Este contrato terá vigência de 12 meses, podendo ser renovado automaticamente caso não haja manifestação em contrário pelas partes.

Cláusula Oitava – da Rescisão do Contrato

Poderá este contrato ser rescindido, quando qualquer das partes infringir qualquer cláusula deste contrato, ou por não considerar mais conveniente a sua continuação, bastando para isto que a parte ofendida ou desinteressada comunique a outra por escrito com no mínimo 30 dias antes.

Cláusula Nona - do Foro

As partes elegem com exclusão de qualquer outro por mais privilegiado que seja, o Foro da Comarca desta Capital de São Paulo, para dirimir as questões oriundas das cláusulas e condições do presente instrumento Particular de fornecimento de Hemocomponentes.

E por estarem assim justos e contratos, assinam o presente Instrumento em 2 (duas) vias de igual teor e forma, para um só fim de direito na presença de duas testemunhas.

São Paulo, 05 de Novembro de 2010.

**Instituto de Hemoterapia
Sírio Libanês Ltda.
Fornecedor**

Antonio Bruno Sapienza
Gerente Administrativo

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Laboratório de Análises Toxicológicas
Solicitante**

Prof. Dr. Mauricio Yonamine
Diretor do Laboratório de Análises Toxicológicas - USP

Testemunha 1

Nome: REGINA APARECIDA CARDOSO
CPF: 160.594.208-18
RG: 19.408.825-X

Testemunha 2

Nome: MARCELO ALONZI DOS SANTOS
CPF: 185241-918-01
RG: 19.933-366-X

ANEXOB

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer CEP/FCF/134/2009

Protocolo CEP/FCF/526

CAAE: 0026.018.015-09

I – Identificação:**Projeto de Pesquisa:** Redistribuição *postmortem* de substâncias psicoativas em tecidos biológicos humanos**Pesquisador Responsável:** Prof. Dr. Maurício Yonamine**Instituição:** Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP**Área Temática Especial:** -**Patrocinadores:** FAPESP**II - Sumário Geral do Protocolo:**

A concentração de agentes tóxicos encontrada em amostras *postmortem* é complexa e afetada não só pela condição de deterioração do corpo, mas também por um processo conhecido como redistribuição *postmortem*, em que substâncias são transferidas, após a morte, de áreas de alta concentração para áreas de baixa concentração. Em geral, concentrações mais elevadas são encontradas no sangue situado nos sítios centrais (como o sangue coletado da cavidade cardíaca) em comparação aos níveis verificados nos vasos periféricos (como a veia femoral). Em outros casos, o tempo entre a morte e o exame *postmortem* é suficiente para que algumas substâncias que normalmente estariam presentes no sangue não estejam mais disponíveis neste fluido biológico. Exemplos incluem corpos exumados, casos de suicídio em que se levaram dias para encontrar o corpo e cadáveres já em processo de decomposição. Assim, quando amostras sanguíneas não estão disponíveis para coleta, os médicos legistas têm poucas alternativas além de coletar amostras de tecidos não convencionais, para análise toxicológica. Nesses casos, para interpretação dos resultados das análises, é fundamental que existam na literatura científica informações a respeito. Infelizmente, tais informações ainda são escassas e há necessidade de mais estudos sobre esse assunto. Desta forma, no presente projeto, será estudada a redistribuição *postmortem* de substâncias psicoativas (cocaína, opiáceos e barbitúricos) através da análise de espécimes biológicos (sangue, humor vítreo, encéfalo, músculo, fígado e medula óssea) coletados de vítimas atendidas pelo Instituto Médico Legal de São Paulo (IML-SP). Métodos analíticos serão desenvolvidos visando a detecção dessas substâncias nas diversas amostras citadas. Inicialmente, técnicas mais recentes de preparação de amostras como a extração acelerada por solvente (ASE) e a microextração em fase líquida (LPME) serão levadas em consideração. Os analitos serão identificados por cromatografia em fase-gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Os resultados serão avaliados quanto às concentrações encontradas, histórico da vítima e tempo decorrido entre a morte e autópsia (coleta de amostras).

Os objetivos do presente estudo são: o desenvolvimento e aplicação de métodos de identificação de substâncias psicoativas (cocaína, opiáceos e barbitúricos) em amostras *postmortem* (sangue, humor vítreo, encéfalo, fígado e medula óssea). Serão avaliadas as

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Comitê de Ética em Pesquisa

técnicas de microextração em fase líquida (LPME) e extração acelerada por solvente (ASE). Os analitos serão identificados e quantificados por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

Tipo de estudo: transversal

Descrição da Casuística:

Amostras biológicas *postmortem* serão coletadas de cerca de 50 cadáveres atendidos no Instituto Médico Legal de São Paulo com histórico de morte suspeita com envolvimento das substâncias psicoativas de interesse (cocaina, morfina e fenobarbital). Esse número foi baseado na quantidade de casos analisados em trabalhos semelhantes reportados na literatura, os quais utilizam cerca de 9 a 13 casos por substância (LUCKENBILL *et al.*, 2008; RODDA & DRUMMER, 2006).

Os critérios de inclusão dos participantes são: pessoas de ambos os sexos, idade acima de 18 anos, com suspeita de que houve uso das substâncias psicoativas de interesse ou que a morte tenha ocorrido devido ao uso dessas substâncias.

Os critérios de exclusão são: pessoas com idade inferior a 18 anos ou sem histórico de uso das substâncias mencionadas.

Projeto com participação estrangeira (Centro de Ciências Forenses da Universidade de Bournemouth, Reino Unido).

III – Situação do Protocolo: APROVADO em reunião de 28/10/2009.

O pesquisador deverá aguardar a aprovação do presente protocolo da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, antes de iniciar a pesquisa.

Cabe ao pesquisador:

- Comunicar ao CEP:
 - eventuais modificações no projeto aguardando a apreciação e aprovação do CEP;
 - a interrupção do projeto.
- Apresentar relatórios: parcial (após 50% da execução do projeto) e final.

São Paulo, 29 de outubro de 2009.

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/FCF/USP

ANEXO C

1

PARECER CONSUBSTANCIADO – CAPPESQ - HCFMUSP

Título: Distribuição *postmortem* de substâncias psicoativas em tecidos biológicos humanos

Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Vilma Leyton

Instituição onde será realizada: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – Departamento de Medicina Legal, Ética Médica, Medicina Social e do Trabalho

Área Temática: Pesquisa com Cooperação Estrangeira

PROTOCOLO CAPPESQ Nº 0352/09

Neste estudo será estudada a distribuição *postmortem* de drogas psicoativas em tecidos humanos obtidos nas situações em que foram utilizadas pela vítima ou houve suspeita de que contribuíram para a morte.

O presente estudo propõe a investigação de como as concentrações das substâncias psicoativas (opióceos, cocaína, barbitúricos e outras drogas de interesse médico legal, bem como seus produtos de biotransformação) em tecidos não convencionais (humor vítreo, músculo, encéfalo, fígado, cabelo e osso) estão relacionadas às concentrações das mesmas em amostra convencional (sangue). Para tal, será desenvolvida metodologia analítica utilizando a técnica de imunoensaio "Biochip Array".

As amostras biológicas serão coletadas de cadáveres examinados no Instituto de Medicina Legal de São Paulo, com autorização do responsável havendo autorização da Comissão Científica do Instituto Médico Legal.

A pesquisa contará com a colaboração de um pesquisador do Centro de Ciências Forenses da Universidade de Bournemouth do Reino Unido e de outro da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

O estudo é original e de grande relevância no nosso meio, pois poderá contribuir para o esclarecimento das causas duvidosas de morte e reduzir as causas classificadas pelo CID como mal definidas.

Foi apresentado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que se encontra adequado para a pesquisa.

Diante do exposto a CAPPesq de acordo com as atribuições definidas na Res. 196/96 manifesta-se pela aprovação do projeto.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa
03.06.09

COMISSÃO DE PESQUISA PARA ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA - FMUSP

PARECER DO RELATOR

Projeto: Distribuição postmortem de substâncias psicoativas em tecidos biológicos humanos
 Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Vilma Leyton
 Pesquisador Executante:
 Projeto 0352/09

Trata-se de projeto previamente aprovado pela CONEP (parecer no. 830/2009) que visa o estabelecimento da distribuição de drogas no organismo após a morte permitindo, assim, que os legistas possam valorar as concentrações que encontram nos diversos tecidos. Este projeto será desenvolvido em cooperação entre o Laboratório de Toxicologia do Departamento de Medicina Legal, Ética Médica, e Medicina Social da FMUSP, o Instituto Médico Legal, e o Centro de Ciências Forenses da Universidade de Boumemouth (Reino Unido).

Há, ainda, adendo datado de abril/2011, solicitando a inclusão da Profa. Thais Mauad, e sua declaração de concordância em participar como colaboradora, datada de 20 de abril de 2011, razão pela qual o projeto passa por esta Comissão de Pesquisa; inclusão de amostras a serem coletadas a partir de casos de óbitos provenientes do HC/FMUSP, que também ocorrerão, conforme a mesma declaração, sob responsabilidade da Profa. Mauad.

Considerando a relevância do projeto para o esclarecimento de mortes em que exista suspeita do uso de drogas, tendo-se em vista a análise favorável e anterior da CONEP, e que a solicitação para o adendo apenas inclui o acesso a novas fontes de material sob responsabilidade de docente efetivo deste departamento, recomenda-se a ratificação do presente pedido para o devido andamento do projeto.

SP. 27/05/2011

Ciência:

Profa. Dra. Marisa Dolhnikoff
 Presidente da Comissão de Pesquisa
 Departamento de Patologia - FMUSP

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0352/09

Título: DISTRIBUIÇÃO POSTMORTEM DE SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS EM TECIDOS BIOLÓGICOS HUMANOS

Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Vilma Leyton

Pesquisador Executante: Victor Alexandre Percinio Gianvecchio

Departamento: MEDICINA LEGAL, ÉTICA MÉDICA, SOCIAL E MEDICINA DO TRABALHO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 17/08/2011, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

•Carta datada de 12/06/11 - II Adendo ao Projeto de junho de 2011

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) s elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 19 de Agosto de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
SERVIÇO DE VERIFICAÇÃO DE ÓBITOS DA CAPITAL

**Manifestação prévia a respeito dos aspectos técnicos relacionados
à obtenção de material de estudo para pesquisa científica**

Título da Pesquisa: Distribuição postmortem de substâncias psicoativas em tecidos biológicos humanos

Pesquisador Executante: Saskia Carolina Seulin, Rafael Menck de Almeida, Marcelo Filonzi dos Santos, Livia Rentas Sanches e Victor Alexandre Percinio Gianvecchio

Pesquisador Responsável: Prof. Dra. Vilma Leyton, Prof. Dr. David Osselton e Prof. Dr. Mauricio Yonamine

Em relação aos aspectos técnicos relacionados à obtenção de material de estudo para pesquisa científica mencionada acima, informamos não haver impedimento do ponto de vista técnico e nem risco de mutilação.

São Paulo, 23 de março de 2011.

Prof. Dr. Carlos Augusto Pasqualucci
Diretor SVOC-USP

ANEXO D

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) Documento de Identidade:
..... Sexo: () M () F

Data de nascimento: ____/____/____

Endereço: Nº: Apt:

Bairro: Cidade:

CEP: Telefone: (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA **Distribuição *postmortem* de substâncias psicoativas em tecidos biológicos humanos**

PESQUISADORA: Profa. Dra. Vilma Leyton

CARGO/FUNÇÃO: Professora Doutora

INSCRIÇÃO NO CONSELHO REGIONAL CRF-8 Nº 6.108

UNIDADE DA FMUSP: Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e
Medicina Social e do Trabalho – Instituto Oscar Freire.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒RISCO MÉDIO ☐RISCO BAIXO ☐RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 12 meses

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

Essas informações estão sendo fornecidas para explicar ao Sr. (Sra) quais são os objetivos desta pesquisa e solicitar autorização para que sejam coletadas amostras de seu familiar falecido para uma pesquisa que está sendo feita por pesquisadores da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Existem substâncias que são chamadas psicoativas que fazem parte de remédios e de drogas que se forem usadas pelas pessoas em grandes quantidades, podem causar a morte. Os médicos legistas ainda não sabem como essas substâncias ficam em cada órgão e essa pesquisa vai ajudar os médicos a dar um atestado de óbito correto.

Essa pesquisa tem como objetivo estudar essas substâncias psicoativas em alguns órgãos do corpo. É muito importante, pois poderá ajudar o médico legista esclarecer as causas de mortes que são difíceis de diagnosticar, pois muitas vezes, só examinando o corpo não é suficiente e é necessário também fazer exames de laboratório.

Agora vamos explicar ao Sr. (Sra) como será feita a pesquisa:

Quando o médico estiver examinando os órgãos de dentro do corpo, ele vai separar pedacinhos de 1 centímetro de alguns órgãos (cérebro, osso e músculo) além de sangue e humor vítreo e colocar em frascos que vão ser identificados só por números e não com o nome. Esses materiais vão ser levados para o laboratório e colocados na geladeira para depois serem analisados.

Essa coleta de material não vai causar dano estético (marcas, cicatrizes) para o corpo do seu parente.

Espera-se que esta pesquisa possa beneficiar no futuro muitas famílias que poderão ter os laudos da autópsia com a causa da morte bem definida, não só no Brasil como também em outros países. Esses tipos de estudos ainda são muito raros no mundo inteiro.

Em qualquer etapa da pesquisa, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Vilma Leyton que pode ser encontrada na Av. Dr. Arnaldo, 455, Cerqueira Cesar - São Paulo – SP, CEP: 01246-903 Fone: (11) 3061-8414. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

Esclarecemos que você terá a liberdade de retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo.

Garantimos que o seu parente não será identificado em nenhum momento e que o Sr. (Sra.) poderá ter acesso aos resultados dos exames. Os pesquisadores se comprometem a utilizar os dados e os materiais coletados do teu parente somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "**Distribuição postmortem de substâncias psicoativas em tecidos biológicos humanos**". Eu discuti com a Dra. Vilma Leyton sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento.

Assinatura do representante legal

Data ____ / ____ / ____

ANEXO E - Curriculum lattes

Lívia Rentas Sanches

Possui graduação em Farmacia e Bioquímica - Faculdades Oswaldo Cruz (2007). Tem experiência na área de Farmácia, com ênfase em Análises Toxicológicas, atuando principalmente nos seguintes temas: gc-ms, sangue total, opiáceos, humor vítreo e experimental design.

(Texto informado pelo autor)

Última atualização em 17/10/2011

Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/3860018589812155>

Dados Pessoais

Nome	Lívia Rentas Sanches
Filiação	Everson Sanches e Roseli Rentas Sanches
Nascimento	29/10/1984 - São Paulo/SP - Brasil
Carteira de Identidade	349228541 SSP - SP - 29/05/1996
CPF	32518716840

Formação Acadêmica/Titulação

	Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas. Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
2009	Título: Avaliação da redistribuição postmortem de opiáceos através de determinação em humor vítreo e sangue cardíaco e periférico humanos Orientador: Mauricio Yonamine
2003 - 2007	Graduação em Farmacia e Bioquímica. Faculdades Oswaldo Cruz, FOC, São Paulo, Brasil

Atuação profissional

1. Hospital Israelita Albert Einstein - HIAE

Vínculo institucional

2011 - Atual	Vínculo: Funcionário CLT , Enquadramento funcional: Analista de Laboratório , Carga horária: 44, Regime: Dedicção Exclusiva
	2. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2009 - 2009 Vínculo: Prática Profissionalizante , Enquadramento funcional: Estágio ,
Carga horária: 30, Regime: Dedicação Exclusiva

Atividades

2009 - 2011 Projetos de pesquisa, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento
de Análises Clínicas e Toxicológicas

Participação em projetos:

*Avaliação da redistribuição postmortem de opiáceos através de
determinação em humor vítreo e sangue cardíaco e periférico humanos*

3. Abrigo da Velhice Desamparada Dr. Adolfo Bezerra de Menezes - ABM

Vínculo institucional

2008 - 2008 Vínculo: Farmaceutica responsável , Enquadramento funcional:
Farmaceutica responsável , Carga horária: 45, Regime: Dedicação
Exclusiva

4. Laboratório Clímax SA - LC

Vínculo institucional

2007 - 2007 Vínculo: Estagiaria , Enquadramento funcional: Estágio , Carga horária:
40, Regime: Integral

Projetos

2009 - 2011 Avaliação da redistribuição postmortem de opiáceos através de
determinação em humor vítreo e sangue cardíaco e periférico humanos

Descrição: O uso abusivo de substâncias psicoativas cresce a cada dia em diferentes segmentos da sociedade a nível mundial. Aumentos significativos no número de ocorrências de óbito com envolvimento de tais substâncias têm sido reportados nas últimas décadas. A classe dos opiáceos está figurada entre as substâncias de maior prevalência nesse contexto. Em toxicologia forense, análises toxicológicas são conduzidas em amostras postmortem verificando se agentes tóxicos foram responsáveis pelo óbito. A realização dessas análises e interpretação dos resultados obtidos nesses casos é bastante complexa devido à deterioração sofrida pelos cadáveres, e também pela ocorrência de um fenômeno denominado redistribuição postmortem, responsável pela transferência de substâncias após a morte a favor de gradiente de concentração. Em geral, as substâncias são transferidas de órgãos como fígado, coração, pulmões, e trato gastrointestinal, para locais de menores concentrações, afetando principalmente o sangue da região central e órgãos adjacentes. Para melhor interpretação dos resultados é recomendado coletar sangue de duas regiões diferentes do corpo para comparação. O humor vítreo, apesar de ser considerado um espécime não-convencional, pode ser bastante útil,

principalmente em casos onde não há mais amostras sanguíneas disponíveis para coleta. Esse espécime se apresenta como uma matriz menos propensa à decomposição bacteriana devido ao envoltório protetor natural em que está contido, além de ser menos afetado pela redistribuição postmortem por sua localização mais afastada dos sítios centrais. Desta forma, o presente estudo tem como objetivo desenvolver e validar um método para quantificação de opiáceos (morfina livre e total, codeína e 6-acetilmorfina) em sangue (cardíaco e periférico) e em humor vítreo humanos coletados postmortem, com o intuito de verificar a existência de correlação nas concentrações desses sítios, e possível ocorrência do fenômeno de redistribuição.

Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa
 Integrantes: Lívia Rentas Sanches; Mauricio Yonamine (Responsável)
 Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP

Produção em C, T&A

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

SANCHES, L. R., Yonamine M.

Determinação de morfina em sangue total por cromatografia em fase gasosa acoplada à

1. espectrometria de massas In: XVI Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2009, Belo Horizonte.

Revista Brasileira de Toxicologia. , 2009. v.22. p.300 - 300

Apresentação de Trabalho

SANCHES, L. R., Saskia Carolina Seulin, Vilma Leyton, Victor Gianvecchio, Yonamine M.

1. **Quantificação de opiáceos em sangue total e humor vítreo por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas**, 2011. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
 SANCHES, L. R., Saskia Carolina Seulin, Vilma Leyton, Victor Gianvecchio, Yonamine M.
2. **Determinação de opiáceos em sangue total e humor vítreo por GC-MS**, 2010. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
 SANCHES, L. R., Yonamine M.
3. **Determinação de morfina em sangue total por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.**, 2009. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

ANEXO F – Ficha do aluno**Janus** - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9141 - 6904260/1 - Lívia Rentas Sanches

Email: liviars@usp.br

Data de Nascimento: 29/10/1984

Cédula de Identidade: RG - 34.922.854-1 - SP

Local de Nascimento: Estado de São Paulo

Nacionalidade: Brasileira

Graduação: Farmacêutico - Faculdades Oswaldo Cruz - São Paulo - Brasil - 2008

Curso: Mestrado

Programa: Toxicologia e Análises Toxicológicas

Data de Matrícula: 15/07/2009

Início da Contagem de Prazo: 15/07/2009

Data Limite: 15/01/2012

Orientador: Prof(a). Dr(a). Maurício Yonamine - 15/07/2009 até o presente. E.Mail: yonamine@usp.br

Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 21/10/2010

Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 24/06/2010

Data do Depósito do Trabalho:

Título do Trabalho:

Data Máxima para Aprovação da Banca:

Data de Aprovação da Banca:

Data Máxima para Defesa:

Data da Defesa:

Resultado da Defesa:

Histórico de Ocorrências: Ingressou no Mestrado em 15/07/2009

Mudança de Regulamento em 06/08/2009

Matrícula de Acompanhamento em 18/07/2011

Aluno matriculado nas normas vigentes a partir de 01/07/2009

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 18/07/2011

Impresso em: 13/10/11 08:44:08

- Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9141 - 6904260/1 - Livia Rentas Sanches

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5728-2/2	Aspectos Toxicológicos da Dopagem no Esporte	19/10/2009	22/11/2009	45	3	100	A	N	Concluída
FBC5813-2/2	Aplicações de Cromatografia em Análises Toxicológicas	16/11/2009	20/12/2009	60	0	0	-	N	Turma cancelada
FBC5813-2/3	Aplicações de Cromatografia em Análises Toxicológicas	01/03/2010	04/04/2010	60	4	85	A	N	Concluída
FBC5729-5/2	Fundamentos Básicos da Avaliação da Toxicidade a Substâncias Químicas	02/03/2010	22/03/2010	75	0	0	-	N	Matrícula cancelada
FBC5802-2/3	Tópicos Avançados em Toxicologia I	08/03/2010	21/06/2010	30	2	100	A	N	Concluída
EDM5791-5/4	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de	17/03/2010	30/06/2010	120	8	83.3	A	N	Concluída

FBC5741-5/3	São Paulo)								
	Análise Toxicológica de								
FBC5741-5/3	Fármacos e Drogas que Causam Dependência	04/05/2010 07/06/2010	60	4	100	A	N	Concluída	
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBC0230								
	Toxicologia Forense, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (1)	01/07/2010 30/11/2010	-	3	0	-	-	-	
FBC5803-1/2	Sistemas da Garantia da Qualidade em Laboratórios Analíticos	03/08/2010 16/08/2010	30	2	100	A	N	Concluída	

Disciplinas:	10	25	26
Estágios:			
Total:	10	25	26

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

ANEXO G

Artigo aceito para publicação no Journal of Analytical Toxicology

Determination of opiates in whole blood and vitreous humor: a study of the matrix effect and an experimental design to optimise conditions for the enzymatic hydrolysis of glucuronides

Livia Rentas Sanches^a, Saskia Carolina Seulin^b, Vilma Leyton^b, Beatriz Aparecida Passos Bismara Paranhos^a, Carlos Augusto Pasqualucci^{b,c}, Daniel Romero Muñoz^b, Michael David Osselton^d and Mauricio Yonamine^{a*}

^aFaculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Brazil

^bFaculty of Medicine, University of São Paulo, Brazil

^cDeath Verification Service, University of São Paulo, Brazil

^d Department of Forensic & Biological Sciences, Bournemouth University, UK

*Corresponding author. Postal address: Av. Professor Lineu Prestes, 580 13B CEP: 05508-900, São Paulo, SP, Brazil.

Fax: +55 11 3031 9055. E-mail address: yonamine@usp.br

Abstract

Undoubtedly, whole blood and vitreous humor have been biological samples of great importance in forensic toxicology. The determination of opiates and their metabolites has been essential for better interpretation of toxicological findings. First, in this report, the application of experimental design and response surface methodology to optimise conditions for enzymatic hydrolysis of morphine-3-glucuronide (M3G) and morphine-6-glucuronide (M6G) was described. Afterwards, the analytes (free morphine, 6-acetylmorphine and codeine) were extracted from the samples using solid-phase extraction (SPE) on mixed-mode cartridges, followed by derivatisation to their trimethylsilyl derivatives. The extracts were analysed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) with electron ionisation and full scan mode. The method was validated for both specimens (whole blood and vitreous humor). A significant matrix effect was found by applying the *F*-test. Different recovery values were also found (82% on average for whole blood and 100% on average for vitreous humor). The calibration curves were linear for all analytes in the concentration range of 10-1,500 ng/mL. The limits of detection ranged from 2.0 to 5.0 ng/mL. The method was applied to a case in which a victim presented with a previous history of opiate use.

Keywords: opiates, whole blood, vitreous humor, experimental design, gas chromatography-mass spectrometry

Introduction

The term opiates refers to substances derived from the opium poppy (*Papaver somniferum*), such as morphine and codeine, and also includes some semi-synthetic substances like heroin or oxycodone. Mainly prescribed to treat acute and chronic pain, these drugs are available in a varied number of pharmaceutical formulations. Heroin has also medical applications in many European countries although it is classified as a Schedule I drug under U.S. law [1].

The opiates constitute a group of the most highly abused drugs in America, Europe and Asia. Fatalities involving opiate overdose have increased dramatically in the past few years. Heroin abuse is one of the major drug problems in society. In addition to the cases of overdose, incidental or negligent cases of death involving opiates, medical care and treatment have also been reported [2]. Postmortem blood with an elevated morphine concentration was detected in a reported and curious case involving children who were withdrawn from life support, which emphasised the need for toxicological analysis in an attempt to solve these cases [3]. The analysis and interpretation of opiates in postmortem specimens can represent special challenges to the forensic toxicologist.

Morphine is mainly metabolised by glucuronidation to morphine-3-glucuronide (M3G) and morphine-6-glucuronide (M6G), which may be found in large concentrations in the plasma due to the enterohepatic recycling. The pharmacological activity of M6G reaches levels that are even higher than morphine following oral administration, while M3G has little affinity for opioid receptors but may also contribute to excitatory effects [4]. If some time has passed after exposure, these metabolites can reach significant concentrations in biological specimens, and therefore, the concentrations of free and total morphine should be analysed. Acid and enzymatic hydrolysis procedures for measuring total morphine have been reported, although inaccurate results or incomplete hydrolysis have been demonstrated [5].

Codeine analgesic activity is displayed by its metabolism to morphine and its glucuronides [6]. Heroin is quickly metabolised to 6-acetylmorphine (6-AM), and the main metabolite detection allows the statement of heroin ingestion. However, 6-AM is also rapidly metabolised to morphine, which can make its detection difficult in many cases [7]. This metabolite is unstable in blood samples due to conversion to morphine by the action of esterases. The stability of these substances is also influenced by pH. Therefore, the analysis of vitreous humor can be of great importance to better interpret heroin-related deaths. In the eye compartment, there is a lack of enzymes, which preserves the integrity of 6-AM. This has been demonstrated in some cases in which 6-AM was present in the vitreous humor and absent in blood [8]. The addition of sodium fluoride preservative (2%) to the samples showed a significant increase in 6-AM stability due to the inhibition of bacterial action [9]. The main biotransformation pathways of opiates are shown in Fig 1.

Vitreous humor is composed of 99% water, with the remaining 1% made up of sugar, salts and proteins. It is also subjected to less contamination and bacterial degradation due to the protected environment inside the eye, which makes it available for analysis in cases where blood samples have already been degraded [10].

Figure 1. The main biotransformation pathways of opiates

The quantitative methods for the determination of opiates in postmortem specimens have been described in the scientific literature. The use of gas-chromatography/mass spectrometry (GC-MS) [11-14] and liquid-chromatography/mass spectrometry (LC-MS) [15-17] was reported by several authors. The most commonly used sample preparation techniques have included liquid-liquid extraction [13, 14] and solid-phase extraction [11, 12, 15-17] procedures.

Despite all the available methods for the determination of opiates in biological samples, the conditions for glucuronide hydrolysis (which can be enzymatic or by means of addition of strong acids) have varied widely among these methods, and there is still a lack of information concerning the efficiency of these procedures [12, 13, 18, 19]. Another point to be considered is the evaluation of the matrix effect for the quantification of substances in different biological specimens, a common situation in Forensic Toxicology. Therefore, the objective of this work was to optimize enzymatic hydrolysis conditions by means of experimental design and provide validation data to quantify opiates (total and free morphine, 6-AM and codeine) in whole blood and vitreous humor, also considering the possible matrix effect. The validated method was applied to a case in which the victim presented with a previous history of opiate use.

Experimental

Chemicals and Reagents

Morphine, codeine, 6-acetylmorphine, morphine-3βD-glucuronide, morphine-6βD-glucuronide and the deuterated internal standard morphine-d₃ were purchased from Cerilliant Corporation (Round Rock, TX, USA) as solutions in methanol or acetonitrile at a concentration of 1 mg/mL or 100 µg/mL. β-glucuronidase from *Helix Pomatia* (type H-1) 500 KU and *N,O*-bis-(*N,O*-trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) with 1% of TCMS were obtained from Sigma Aldrich (Missouri, USA). Bond Elut Certify solid-phase extraction cartridges (130 mg) were obtained from Varian Inc. (California, USA). All other solvents and reagents of analytical grade were supplied by Merck (Darmstadt, Germany).

Specimens

The drug-free blood samples were obtained from non-user volunteers (laboratory staff) and were collected in gray-top tubes containing 2% of sodium fluoride and stored at -20°C. Due to similarities in chemical composition, a saline solution (1% NaCl) was used as drug-free vitreous humor. The drug-free samples were used for the validation process of the analytical methods. The case samples (blood and humor vitreous) were obtained from a body attended by the Death Verification Service at the University of São Paulo, Brazil. These samples were also collected in gray-top tubes containing 2% of sodium fluoride. This study was approved by the Research Ethics Committee of the Clinics Hospital at the Faculty of Medicine of University of São Paulo – CAPPesq HC-FMUSP (Ethics Protocol Approval n. 0352/09).

Extraction and derivatisation

One milliliter of each sample (whole blood or vitreous humor) was mixed with 10 µL of a 10 µg/mL internal standard solution (morphine-d₃) and 5.0 mL of a 0.1 M phosphate buffer solution (pH 6.0) in a 15 mL cap tube. The mixture was vortexed and centrifuged for 12 min at 300 g, and the supernatant was placed on solid-phase extraction columns. The SPE cartridges were conditioned with 2 mL of methanol, followed by 2 mL of 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0). Following conditioning, the samples were added to the cartridges and were allowed to flow under gravity. Then, the columns were washed by the sequential addition of 2.0 mL of deionised water, 1.0 mL of 0.1 M acetate buffer (pH 4.0), and 2.0 mL of methanol; they were then dried under maximum vacuum for 2 min. The analytes were eluted with 2.0 mL of a fresh dichloromethane/isopropanol/ammonium hydroxide solution (20:5:0.5 v/v/v) and were collected in 3.0 mL conical-shaped vials. Each sample eluent was evaporated under a stream of nitrogen at 40°C. The residue was reconstituted in 50 µL of BSTFA + 1% of TCMS, capped, vortexed and heated for 20 min at 70°C. After cooling, the solution was transferred to autosampler vials, and 1 µL of the solution was injected into the GC-MS system.

For the determination of total morphine, the enzymatic hydrolysis was performed using β-glucuronidase from *Helix Pomatia* (type H-1). The lyophilised enzyme was reconstituted with 1.0 M acetate buffer (pH 5.0) to yield 100.000 units/mL β-glucuronidase activity. Then, a second aliquot of 1.0 mL of each sample (whole blood or vitreous humor) received 10 µL of a 10 µg/mL internal standard solution (morphine-d₃), 1.0 mL of 1.0 M acetate buffer (pH 5.0) and 200 µL of the *H. Pomatia* β-glucuronidase solution. The tubes were vortexed and incubated at 37°C for 4 h. After hydrolysis and cooling to room temperature, 5.0 mL of 0.1M phosphate buffer (pH 6) was added to each tube and samples were submitted to the same SPE procedure described above.

Instrumentation

The quantitative analysis was performed on a Focus GC gas chromatograph coupled to a Polaris Q ion trap mass spectrometer from Thermo Scientific (Waltham, MA, USA), which was operated in the electron ionization mode. The chromatographic separation was achieved using an HP-5MS fused-silica capillary column (30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness). Helium was the carrier gas, which was set at a flow rate of 0.7 mL/min. The injector was operated in the splitless mode at 270°C, and the transfer line temperature was set at 280°C. The GC oven was initially held at 150°C for 1 min, with a ramp of 10°C/min to 250°C (held 8 min). Full

scan analyses were performed in the mass range of 200-500 m/z . The acceptance criteria of qualification were: retention time within 2% compared with standards analyzed in the same batch and the mass spectrum should have a good visual match to that of the standards. The monitored ions for quantification of analytes were as follows: morphine, m/z (429); morphine- d_3 , m/z (432); codeine, m/z (371); 6-acetylmorphine, m/z (399).

The experimental design for the optimization of the enzymatic hydrolysis conditions for morphine glucuronides

The optimisation study was conducted using a multivariate statistical technique called response surface methodology (RSM), which made statistical previsions based on the fit of a polynomial equation to the experimental data [20]. The application of this methodology made it possible to optimise the levels of the variables simultaneously, which enabled us to observe the interactive effects among them.

An experimental design called Box-Behnken was chosen to define which experiments should be performed before the application of the RSM methodology. Box-Behnken is a three-level factorial design that requires only 17 experiments, in which 5 of them are replicates of the center point [21].

The enzymatic hydrolysis was performed using β -glucuronidase from *Helix Pomatia* (type H-1). The three factors that were analysed with significant relevance and with chosen levels (low and high) were as follows: incubation temperature (37 – 60°C), incubation time (4 – 24 hours) and enzyme concentration (2,500 – 20,000 units/mL). The experiments were conducted in a random order to provide an accurate estimation of the experimental error. The fortified blood samples (1.0 mL) with a total concentration of 1,000 ng/mL of the glucuronides were subjected to the selected conditions (temperature, time and enzyme concentration) and analysed according to the procedure described in the section “extraction and derivatisation”. Analysis of variance was applied to the regression results, which verified if a lack of fit was evident.

The ratio between the morphine and morphine- d_3 peak areas was used as the response. Design-Expert® (version 8) a statistical software, was used to select the experimental design and to perform the analysis through the application of response surface methodology.

Method validation

The method was validated by determining sensitivity, selectivity, linearity, extraction efficiency, precision (intra- and inter-assay) and stability. To obtain the validation data, quality control samples (QC) were prepared by spiking drug-free matrices, which resulted in the following concentrations of morphine, 6-AM and codeine: 30, 550 and 1100 ng/mL (QC1, QC2 and QC3). All the parameters were analysed in both the blood and saline solutions.

The limit of detection and the limit of quantitation

The limit of detection (LOD) was defined as the concentration giving a signal to noise ratio of >3 . The limit of quantitation (LOQ) was defined as the concentration giving a signal to noise ratio of >10 . LOD and LOQ should still satisfy the predetermined acceptance criteria of qualification (retention time within 2% compared with standards analyzed in the same batch and a good visual match of mass spectrum to that of the standards).

Selectivity (matrix effects)

The interfering compounds present in each matrix may strengthen or reduce the detection of the analytes of interest, which can lead to different results from the analysis of fortified samples with the same analyte concentration but in different matrices [22]. This assay was performed to identify the differences in analyte detection caused by different matrix effects of the blood and saline solutions. The test was performed by preparing two sets of samples ($n = 6$): one contained blood, and the other contained a saline solution, and both samples had the same concentration of analytes at each target concentration level (30, 550 and 1100 ng/mL). Data were analysed by the application of the F -test to test for differences among sample variance, followed by the application of the t -test to assess whether the means of the two groups were statistically different from each other (Eq. 1).

$$F_{cal} = s_1^2/s_2^2 \quad (1)$$

In this equation, s_1 and s_2 represent the standard deviations of the analyte response for each set of samples, and the larger variance should be used as the nominator. F_{cal} represents the calculated value of F , while F_{tab} represents the tabulated value.

If $F_{cal} < F_{tab}$, the F -test is not significant (5% significance level), and it can be considered that the variances are similar. Then, the difference of the means of the two groups can be tested with Student's t -test (Eqs. 2 and 3).

$$t_{cal} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{s^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} \quad (2)$$

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)} \quad (3)$$

In these equations, $\bar{x}_1$ and $\bar{x}_2$ represent the means of the analyte response for each set of samples and n_1 and n_2 represent the number of replicates in each set of samples. t_{cal} represents the calculated value of t , while t_{tab} represents the tabulated value from the Student's t -distribution.

On the other hand, if $F_{cal} > F_{tab}$, the F -test is significant, which means that the variances between the groups are different; then, the t -test of unequal variances can be used to test the means [23] (Eqs. 4 and 5)

$$t_{cal} = \frac{\bar{x}_d \sqrt{n}}{s_d} \quad (4)$$

$$\bar{x}_d = \sum_{i=1}^n \frac{(d_{i1} - d_{i2})}{n} \quad (5)$$

In these equations, d_{i1} and d_{i2} are the responses for a sample pair in each group, $\bar{x}_d$ represents the mean of differences between analyte response pairs, s_d represents the standard deviation of differences between them and n is the number of pairs.

If the calculated t value (for equal or unequal variances) is below the value that is expected in the t -test tables, it is possible that the analytes do not suffer a different interference from the matrices and *vice-versa*.

Linearity

The linearity study was performed by analysing the blood and saline solutions that were fortified with morphine, 6-AM and codeine standards to obtain the concentrations of 10, 50, 150, 350, 750 and 1500 ng/mL. A deuterated internal standard (morphine-d3) was added at a concentration of 100 ng/mL. Calibration curves were obtained by plotting the peak area ratios (analyte/internal standard) against the concentrations, and the linearity, which was expressed as the correlation coefficient (r^2), was obtained. The test for homoscedasticity was verified by applying the F -test, which was expressed as the ratio between the variances obtained at the lowest and the highest concentration level of the dynamic range. If F_{cal} was lower than $F_{\text{tab}}(f_1, f_2; 0.99)$, then the variance was constant over the entire calibration curve and was considered homoscedastic. Weighted least square linear regressions can be used when heteroscedasticity is detected [24].

Extraction efficiency – Recovery

The extraction efficiency was determined using the quality control samples (QC) at the target concentrations of 30, 550 and 1100 ng/mL for all analytes. The recovery study was performed by preparing one set of samples that were fortified with a control solution at the initial time of sample preparation before solid-phase extraction and by preparing another set of samples that were only fortified after extraction but prior to evaporation and derivatisation. The relative recovery was calculated by comparing the mean response in the first group (extracted) to the mean response of the second group (non-extracted) and then multiplying by 100.

Precision (intra- and inter-assay)

The precision assay was performed by the analysis of replicate blood and saline samples ($n = 6$) at the target analyte concentrations of 30, 550 and 1100 ng/mL. The intra-assay precision for the samples was determined on the same day and was performed within one analytical run, while the inter-assay precision for the samples was determined on three different days. Data were evaluated through the analysis of variance in each group (intra-and inter-assay), which was established by the relative standard deviation (RSD%).

Stability

The handling of the samples and different storage conditions can influence analyte stability. The stability assay was assessed using blood and saline solutions fortified with analytes of interest at low and high concentration (30 and 1100 ng/mL). The storage conditions studied were as follows: room temperature for 24 h,

4°C for 7 days, -20°C followed by thawing at room temperature (three freeze-thaw cycles) and -20°C for 3 months. Analyses were performed in triplicate for each condition and level of concentration. In this assay, the stability of morphine, 6-AM and codeine along with M3G and M6G was determined to verify the occurrence of the natural hydrolysis of these metabolites to morphine. The concentrations obtained in the QC samples after each storage condition were compared to those from freshly prepared QC samples. Acceptable results included a maximum concentration difference of 20% when comparing QC samples under storage and fresh QC samples.

Case study

To prove the applicability of this analytical method, a case that involved opiate consumption was analysed. The quantification was based on the ratios of the ion peak areas of the compounds to the internal standard ion peak areas. The calibration curves were used to determine the opiate concentrations, which used a weighting factor of $1/x^2$ for blood and $1/y^2$ for vitreous humor.

A woman who was approximately 80 years old and had traces of cancer in the liver was examined at the Death Verification Service, University of São Paulo, Brazil. A rapid immunoassay test for drugs (Triage™, Biosite) in the urine was used at the autopsy and was positive for opiates. No other details about the history of the case were accessed.

Results and Discussion

GC-MS analyses

Opiates have often been found in postmortem biological fluids in overdose cases or even in cases of treatment with legitimate prescriptions. Gas chromatographic analysis of these substances has been difficult due to their high polarity and low volatility. It has been necessary to apply derivatisation techniques to produce thermally and volatile stable derivatives [25]. In this study, the silylation derivatising technique was chosen because it is one of the most commonly applied techniques. It is easy to use and does not require additional solvent or clean-up steps. Good reproducibility was obtained using this technique.

All the analytes were successfully extracted and separated using this method. All ion peaks were Gaussian-shaped and demonstrated baseline resolution. The molecular ion was usually the most abundant in the mass spectra of opiate-TMS derivatives; therefore, it was selected as the quantification ion.

Optimisation of the enzymatic hydrolysis conditions of morphine glucuronides

The morphine glucuronides are very important analytes to be detected in toxicological analysis. Nevertheless, due to its extreme polarity, it is necessary to include a hydrolysis step, which enables the determination of total morphine by gas chromatography.

Good glucuronide hydrolysis rates in urine have been reported in the literature with acid hydrolysis [26, 27], which is even faster than the enzymatic process. However, this drastic condition can convert some opiates

such as 6-acetylmorphine or acetylcodeine into morphine or codeine, which overestimates the concentrations. Therefore, we opted for the enzymatic hydrolysis, which used β -glucuronidase.

In order to obtain optimal conditions for the hydrolysis of glucuronides, some parameters such as the incubation time, incubation temperature and enzyme concentration of β -glucuronidase from *Helix Pomatia* were evaluated. The response surface methodology was used to perform the optimisation. This technique simultaneously optimised the levels of variables, which enabled us to observe the interactive effects between the variables, to reduce the number of experiments necessary to conduct the research, and to decrease the time and expenses consumed when compared to the traditional one-variable-at-a-time optimisation technique. Box-Behnken was chosen as the experimental design because it seemed to be the most efficient and economical three-level factorial design, requiring only 17 experiments [21]. Costa et al. [28] have also applied the design of experiments technique to perform the optimisation of urinary morphine glucuronide hydrolysis; however, the procedure was performed with strong acids instead of enzymes, and only M3G hydrolysis was focused on in the study. M6G does not seem to be as readily hydrolyzed as M3G. In fact, M6G has glucuronide acid bound to an alcoholic position, whereas in M3G, glucuronide acid is bound to a phenolic position, which is electron rich. This position facilitates the hydrolysis due to the formation of a phenolate anion that can be stabilised through resonance [29].

There have been no reports that relate the optimisation methods of morphine glucuronide hydrolysis in blood samples. The vast majority of the studies have compared the difference between the acid and enzymatic hydrolysis conditions only in urine samples [27, 29, 30], almost always reporting better hydrolysis rates with the acid condition. Hackett et al. [27] reported that more than 90% of M3G is hydrolysed in urine samples, with an incubation time of 4 or 24 hours at 60°C with β -glucuronidase from *H. Pomatia* or at 45°C with β -glucuronidase from *E. coli*, whereas the use of acid hydrolysis resulted in the conversion of 95% of morphine glucuronide to morphine. The conditions for the hydrolysis of morphine glucuronides in blood, such as 1 hour of incubation at 60°C with 2 mL of β -glucuronidase [31] or 16 hours of incubation at 37°C with 5,000 U/mL of β -glucuronidase [13], were also reported in the scientific literature; however, the efficiency of these procedures was not mentioned.

Our results showed that the optimal condition for hydrolysis is 4 hours of incubation at 37°C with the addition of 20.000 U/mL of β -glucuronidase, which results in hydrolysis efficiency rate of 75% (Fig. 2). A progressive increase in efficiency was observed when the amount of enzyme was increased. A decrease in the hydrolysis rate occurred when the incubation temperature was increased, which was probably due to enzymatic degradation at high temperatures. The best efficiencies of hydrolysis were obtained using incubation times of 4 and 24 hours. From this, it was found that 4 hours is enough to complete the hydrolysis, and this time was selected to perform the enzyme incubation. The blood samples with and without sodium fluoride were tested to assess the enzymatic hydrolysis efficiency; no significant differences were found.

The analysis of variance showed that the regression model is significant ($p=0.016$), and no significant lack of fit was found ($p>0.05$).

Figure 2. The response surfaces of the conditions studied for the enzymatic hydrolysis of morphine glucuronides. (A) Response area as a function of incubation temperature (°C) and enzyme concentration (U/mL) at a time of 4 hours. (B) Response area as function of time (h) and incubation temperature with an enzyme concentration of 20,000U/mL.

Extraction procedure

The amphoteric nature of morphine has made it difficult to use some extraction procedures such as liquid-liquid extraction because it forms charged species at all pHs other than its isoelectric point, which makes it water soluble and difficult to extract, resulting in poor recovery. The use of solid phase extraction with cation exchange columns has improved the efficiency of extracting drugs such as morphine because it has allowed the drug to be extracted in the charged form.

Additionally, concerning SPE extraction, the difficulty encountered, also also reported in literature [32], is related to the passage of postmortem blood through the SPE columns; this specimen is often clotted and not homogenous, easily plugging the column. Hence, the samples were diluted fivefold in buffer and were centrifuged before extraction, which enabled a smooth passage through the cartridges and did not compromise the quantitative determination.

The employment of vitreous humor to analyse drugs can be of great importance because it is a clean matrix; it is composed by 99% of water and contains very little proteins and enzymes [10].

Method validation

The results obtained in the method validation for the determination of opiates in blood and saline solution samples are shown in Table I.

Table I. Confidence parameters for the opiates method validation

	Blood			Saline solution		
	Morphine	6-AM	Codeine	Morphine	6-AM	Codeine
LOD (ng/mL)	5,0	5,0	5,0	2,0	2,0	2,0
LOQ (ng/mL)	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Mean Intra-assay precision (RSD %)	5,6	7,3	9,3	4,1	5,4	4,7
Mean Interassay precision (RSD %)	6,8	4,3	8,6	3,0	6,0	2,8
Mean recovery (%)	81,2	76,4	88,6	98,3	98,6	103,3
Linearity	$r^2=0,9961$	$r^2=0,9976$	$r^2=0,9951$	$r^2=0,9998$	$r^2=0,9993$	$r^2=0,9994$

A matrix effect study (selectivity test) was performed to verify the necessity of validating the method in both matrices. Some laboratories have not tested the matrix effect and have only used blood calibration curves to quantify vitreous humor samples. In fact, Antonides et al. [33] have not observed any significant variability in vitreous humor concentration quantified using calibrators prepared in blood matrix, and the comparison between the measurement of vitreous values using a calibration curve in the blood matrix and in the vitreous matrix resulted in a difference of no more than 20% of their averages. In the present study, however, the analysis of the variances and the means obtained between the blood and saline solution sets of samples showed a significant difference in analyte responses at all concentration levels (30, 550 and 1100 ng/mL). Hence, all the confidence parameters were obtained in both matrices, and we recommend that the calibration curves for the analysis of case samples should be performed in each specific matrix, which minimises errors.

The LODs were 5.0 ng/mL in the blood samples and 2.0 ng/mL in the saline samples for all the analytes. The LOQ was 10.0 ng/mL in both the blood and saline samples for all the opiates. These limits were considered good values that compared well with previously published work.

The linear dynamic range was determined based on the opiates therapeutic and fatal concentrations and was also based on previous works; these values ranged from 10-1,500 ng/mL. The method showed that the data were heteroscedastic, which was probably due to the large concentration range (two orders of magnitude). In this case, the larger deviations that were present at higher concentrations tended to influence the linear regression more than the smaller deviations that were present at smaller concentrations, which can impair the accuracy in the lower part of the range [23]. Weighted least square linear regression was applied in this case, which decreased the sum of the relative error percentages over the entire range. The correlation coefficients for the calibration curves were all greater than 0.995 for the blood samples when a weighting factor of $1/x^2$ was used (morphine: $y = 0,0062x + 0,0019$; 6-AM: $y = 0,0039x + 0,0004$; codeine: $y = 0,0025x - 0,0011$), and were greater than 0.999 for the saline samples when a weighting factor of $1/y^2$ was used (morphine: $y = 0,003459x - 0,00134$; 6-AM: $y = 0,00415x - 0,00654$; codeine: $y = 0,002558x - 0,00364$).

The average extraction efficiencies ranged from 76-88% in the blood samples and from 98-103% in the saline samples. The recovery rates above 75% were considered good values when considering the analysis of biological fluids.

The inter-assay precision ranged from 4.3-8.5% (RSD) in the blood samples and from 2.8-6.0% in the saline samples. The intra-assay precision yielded coefficients of variance that ranged from 5.6-9.3% in the blood samples and from 4.1-5.4% in the saline samples. The use of morphine- d_3 as an internal standard did not affect the reproducibility of the analysis, with the RSDs not exceeding the predefined limit of 10% for the intra-assay precision and 20% for the inter-assay precision for all analytes.

The investigation of opiate stability in the blood samples did not indicate any degradation under all the conditions studied, with the exception of 6-acetylmorphine, which showed instability at room temperature and after being stored for a long period (3 months in freezer). With respect to analyte stability in the saline samples, only 6-acetylmorphine and codeine showed instability after being stored for a long period. The results indicated that case samples must be analysed as soon as possible because the analytes can degrade after being stored for a long period. In all storage conditions studied, both M3G and M6G did not show any degradation to morphine, even in the blood and saline samples; this could be a result of the sodium fluoride effect, which eliminates bacterial contamination and inhibits enzymatic activity.

Case study

Codeine and morphine was found in the case analysis. The drug concentrations found in samples are shown in Table II.

Table II. The free and total codeine and morphine concentrations found in the medicolegal case samples

	Morphine (ng/mL)		Codeine (ng/mL)	
	Total	Free	Total	Free
Femoral blood	269.9	n.d.	1279.4	116.9
Cardiac blood	397.3	n.d.	1256.9	211.8
Vitreous humor	162.1	n.d.	798.6	341.6

n.d.: not detected

A high total codeine concentration was observed in all the analysed samples, which was a result of the hydrolysis of a codeine metabolite, codeine-6-glucuronide. The deceased had suffered from cancer and had probably received codeine treatment for pain control. The free codeine concentration in the blood was in the therapeutic range, and the higher amount that was detected in the total form indicated chronic use.

The presence of morphine in the samples was a result of codeine metabolism, which was explained by the lower amounts of this drug in relation to codeine. The larger amount was in the total form, while the free concentration was detected only in trace amounts.

A higher concentration of free codeine was observed in the cardiac blood than in the femoral blood. This yielded a C/F ratio of 1.8 and indicated a possible postmortem redistribution of this drug, which was not observed in the total concentration, possibly because the conjugate form did not suffer this phenomenon.

With respect to the concentrations detected in the vitreous humor samples, the concentrations of the total form of both analytes, morphine and codeine, were lower compared to the blood samples. The metabolites might have had difficulty crossing the lipid barriers due to their polar character. Otherwise, the free codeine concentration was higher in this fluid, which could be a result of the apparent delay in the drug excretion process of the vitreous humor. The chromatographic profiles of a fortified blood sample, a drug-free blood sample and the case samples are shown in Figure 3.

Figure 3. (A) The chromatographic profile obtained with an SPE/GC-MS analysis of a fortified blood sample containing codeine (1), morphine and morphine- d_3 (2, 3) and 6-acetylmorphine (4) at a middle concentration (550 ng/mL). (B) Drug-free blood sample. (C) A hydrolysed sample of the postmortem cardiac blood from the related case. (D) A hydrolysed sample of the postmortem femoral blood from the related case. (E) A hydrolysed sample of the postmortem vitreous humor from the related case. The ions acquired to generate the chromatograms were as follows: 429+432+399+371.

Conclusions

The use of dilution followed by centrifugation and solid phase extraction enabled us to obtain clean extracts even when working with whole blood samples, which did not interfere with the drug quantitation and eliminated the deproteinization procedure steps.

The optimisation of the enzymatic hydrolysis of glucuronides facilitated more accurate and efficient results for the application of total analytes, which is of great importance to better interpret opiate cases and could help establish the time of death using the proportion of free and total analytes.

The method was validated for both specimens (whole blood and vitreous humor) and a significant matrix effect was found by applying the *F*-test. Therefore, it is recommendable that calibration curves should be performed in each specific matrix to minimise errors.

This method fit well for the purpose for which it was intended, which was obtaining precise and accurate results for laboratory routines.

Acknowledgments

This study was supported by the Faculty of Medicine – University of São Paulo (LIM 40/HC-FMUSP). Financial support received from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP grant no.

2009/08314-9 and 2010/11517-6) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq grant 470643/2009-9 and 554674/2009-0) is also gratefully acknowledged.

References

1. A.J. Jenkins. Pharmacokinetics: drug absorption, distribution, and elimination. In: *Drug abuse handbook*, S.B. Karch., 2nd ed., CRC Press, Boca Raton, 2007, pp 147-205.
2. C.S. Crandall, S. Kerrigan, R.L. Aguero, J.L. Valley, P.E. McKinney. The influence of collection site and methods on postmortem morphine concentrations in a porcine model. *J. Anal. Toxicol.* **30**: 651-658 (2006).
3. J. Watterson, A. Peaire, J. Hinman. Elevated morphine concentrations determined during infant death investigations: artifacts of withdrawal of care. *J. Forensic Sci.* **53**:1001-1004 (2008).
4. H.B. Gutstein, H. Akil. Opioids Analgesics. In *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, J.G. Hardman, L.E. Limbird, A.G. Gilman, Eds. 11th ed. McGraw-Hill, New York, 2006, pp 569-619.
5. M.E. Bosch, A.R. Sánchez, F.S. Rojas, C.B. Ojeda. Morphine and its metabolites: Analytical methodologies for its determination. *J. Pharm. Biom. Anal.* **43**:799–815 (2007).
6. A.M. Trescot, S. Datta, M. Lee, H. Hansen. Opioid pharmacology. *Pain Physician* **11**: 133-153 (2008)
7. J. Wyman, S. Bultman. Postmortem distribution of heroin metabolites in femoral blood, liver, cerebrospinal fluid, and vitreous humor. *J. Anal. Toxicol.* **28**: 260-263 (2004)
8. F. Pragst, K. Spiegel, U. Leuschner, A. Hager. Detection of 6-acetylmorphine in vitreous humor and cerebrospinal fluid comparison with urinary analysis for proving heroin administration in opiate fatalities. *J. Anal. Toxicol.* **23**: 168–172 (1999).
9. K.A. Rees, N.S. Jones, P.A. McLaughlin, M.D. Osselton. The effect of storage temperature and sodium fluoride preservative on the stability of 6-monoacetylmorphine in horse blood, vitreous humour and muscle tissue. *Forensic Sci. Internac.* – in press (2011).
10. D. Cox, R.A. Phipps, B. Levine. Distribution of phencyclidine into vitreous humor. *J. Anal. Toxicol.* **31**: 537-539 (2007).
11. R.J. Lewis, R.D. Johnson, R.A. Hattrup. Simultaneous analysis of Thebaine, 6-MAM and six abused opiates in postmortem fluids and tissues using Zymark® automated solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromat. B.* **822**: 137–145 (2005).
12. S. Kerrigan, D. Honey, G. Baker. Postmortem morphine concentrations following use of a continuous infusion pump. *J. Anal. Toxicol.* **28**: 529-32 (2004).
13. Meatherall R (2005) GC–MS Quantitation of codeine, morphine, 6-acetylmorphine, hydrocodone, hydromorphone, oxycodone, and oxymorphone in blood. *J Anal Toxicol* 29:301-308.
14. E. Guillot, P. Mazancourt, M. Durigon, J. Alvarez. Morphine and 6-acetylmorphine concentrations in blood, brain, spinal cord, bone marrow and bone after lethal acute or chronic diacetylmorphine administration to mice. *Forensic Sci. Internac.* **166**: 139–144 (2007).
15. A.I. Al-Asmari, R.A. Anderson. Method for quantification of opioids and their metabolites in autopsy blood by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* **31**: 394-408 (2007).
16. T. Dahn, J. Gunn, S. Kriger, A.R. Terrel. In *Clinical Applications of Mass Spectrometry, Methods in Molecular Biology*, U. Garg, C.A. Hammett-Stabler, Eds. Humana Press, a part of Springer Science+Business Media, LLC 2010.

17. R. Coles, M.M. Kushnir, G.J. Nelson, G.A. McMillin, F.M. Urry. Simultaneous determination of codeine, morphine, hydrocodone, hydromorphone, oxycodone, and 6-acetylmorphine in urine, serum, plasma, whole blood, and meconium by LC–MS–MS. *J. Anal. Toxicol.* **31**: 1-16 (2007).
18. F. Mushoff, T. Daldrup. Evaluation of a method for simultaneous quantification of codeine, dihydrocodeine, morphine, and 6-monoacetylmorphine in serum, blood, and postmortem blood. *Internac. J. Leg. Med.* **106**: 107-109 (1993).
19. C.S. Crandall, S. Kerrigan, R.L.A. Blau, J. LaValley, R. Zumwalt, P.E. McKinney. The influence of site of collection on postmortem morphine concentrations in heroin overdose victims. *J. Forensic Sci.* **51**: 413-420 (2006).
20. M.A. Bezerra, R.E. Santelli, E.P. Oliveira, L.S. Villar, L.A. Escaleira. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* **76**: 965–977 (2008).
21. S.L.C. Ferreira, R.E. Bruns, H.S. Ferreira, G.D. Matos, J.M. David, G.C. Brandão, E.G.P. Silva, L.A. Portugal, P.S. Reis, A.S. Souza, W.N.L. Santos. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Anal. Chim. Acta.* **597**: 179–186 (2007).
22. P. Bruce, P. Minkinen, M.L. Riekkola. Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. *Mikrochim Acta* **128**: 93-106 (1998).
23. W.T. Coombs, J. Algina, D. Oltman. Univariate and multivariate omnibus hypothesis tests selected to control type I error rates when population variances are not necessarily equal. *Rev. Educ. Res.* **66**: 137–179 (1996).
24. A.M. Almeida, M.M. Castelo-Branco, A.C. Falcão. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. *J. Chromat. B.* **774**: 215–222 (2002).
25. B.H. Chen, E.H. Taylor, A.A. Pappas. Comparison of derivatives for determination of codeine and morphine by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* **14**: 12-17 (1990).
26. P. Wang, J.A. Stone, K.H. Chen, S.F. Gross, C.A. Haller, A.H. Wu. Incomplete recovery of prescription opioids in urine using enzymatic hydrolysis of glucuronide metabolites. *J. Anal. Toxicol.* **30**: 570-575 (2006).
27. L.P. Hackett, L.J. Dusci, K.F. Ilett, G.M. Chiswell. Optimizing the hydrolysis of codeine and morphine glucuronides in urine. *Therap. Drug Monitoring* **24**: 652–657 (2002).
28. S. Costa, M. Barroso, A. Castañera, M. Dias. Design of experiments, a powerful tool for method development in forensic toxicology: application to the optimization of urinary morphine 3-glucuronide acid hydrolysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **396**: 2533–2542 (2010).
29. L.W. Romberg, L. Lee. Comparison of the hydrolysis rates of morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide with acid and beta-glucuronidase. *J. Anal. Toxicol.* **19**: 157-162 (1995).
30. Lin Z, Lafolie P, Beck O (1994) Evaluation of analytical procedures for urinary Codeine and Morphine Measurements. *J Anal Toxicol* **18**:129-133.
31. J.D. Roper-Miller, M.K. Lambing, R.E. Winecker. Simultaneous quantitation of opioids in blood by GC–EI-MS analysis following deproteinization, detautomerization of keto analytes, solid-phase extraction, and trimethylsilyl derivatization. *J. Anal. Toxicol.* **26**: 524-528 (2002).
32. O.H. Drummer. Requirements for bioanalytical procedures in postmortem toxicology. *Anal. Bioanal. Chem.* **388**: 1495–1503 (2007).
33. H.M. Antonides, E.R. Kiely, L.J. Marinetti. Vitreous fluid quantification of opiates, cocaine, and benzoylcegonine: comparison of calibration curves in both blood and vitreous matrices with corresponding concentrations in blood. *J. Anal. Toxicol.* **31**: 469-476 (2007).