UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO

Investigação de substâncias psicoativas em amostras de leite materno

Wilson José Ramos Santos Junior

Ribeirão Preto
2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

WILSON JOSÉ RAMOS SANTOS JUNIOR

Investigação de substâncias psicoativas em amostras de leite materno

Ribeirão Preto

2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Investigação de substâncias psicoativas em amostras de leite materno

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientado: Wilson José Ramos Santos Junior

Orientador: Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Toxicologia em 17/02/2022. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2022

SANTOS JUNIOR, W.J.R.	**Investigação de substâncias psicoativas em amostras de leite materno**	Espaço de **2,5 cm** reservado para etiqueta de localização da biblioteca	MESTRADO FCFRPUSP 2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Santos Junior, Wilson José Ramos

Investigação de substâncias psicoativas em amostras de leite materno. Ribeirão Preto, 2022.
143p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia
Orientador: De Martinis, Bruno Spinosa.

1. Leite materno. 2. Lactação. 3. Substâncias Psicoativas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Wilson José Ramos Santos Junior

Investigação de substâncias psicoativas em amostras de leite materno

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

“I may be crazy, but that don’t make me wrong.”

- Marsha P. Johnson

Agradecimentos

Primeiramente, sou eternamente grato pelo apoio e amor incondicional de meus pais, Maria Helena e Uilson, que sempre galgam comigo meus caminhos, não importa qual destino seja. À minha irmã, Paula, por sintetizar da maneira mais literal e sutil tudo que nossa família é. Minha família me construiu sob constante mudança, incertezas e turbulências, sem nunca deixar de acreditar no poder dos sonhos e na potência da educação em nossas vidas. Dedico este trabalho a vocês!

Agradeço ao meu orientador, Bruno Spinosa De Martinis, pela confiança depositada em mim durante uma das etapas mais importantes de minha construção profissional e pessoal, por me aceitar em seu laboratório e abraçar minhas ideias, pelas trocas de igual para igual, pelos ensinamentos e experiências compartilhadas, pela paciência, honestidade e, sobretudo, pela amizade.

Agradeço aos colaboradores deste projeto, Larissa Garcia Alves e toda a equipe do Banco de Leite Humano de Ribeirão Preto - Hospital das Clínicas FMRP USP, por dar suporte à esta pesquisa, aceitarem a execução deste projeto, auxiliarem no contato com as mães doadoras e na realização da coleta de amostras.

Agradeço muito aos amigos e colegas do Laboratório de Análises Toxicológicas Forenses do Departamento de Química FFCLRP USP, Fabiana, Vitor Caleffo, Lohanna, Bruno Toledo, Isabela M., Amanda, Laís, Ana Luiza, Flávia, Isabela C. e Eduardo, pela companhia, trabalho em equipe, descontração nos momentos estressantes de nossa rotina e aprendizados. Em especial, agradeço à Nayna e Bruno Brandão, que acompanharam de perto a execução deste trabalho, contribuindo em muitas das etapas e sempre atendendo a qualquer necessidade minha desde o estágio de graduação. Obrigado pela paciência, amizade e colaborações! Também agradeço à técnica Mércia, que sempre nos auxilia na gestão de atividades do laboratório e apoio à pesquisa.

Não posso deixar de agradecer aos diversos amigos que a vida me deu. Agradeço a Vinícius e Bárbara Kol, Mariana Aguetoni, Ana Luiza Heleno, Priscila Matoshima por crescerem comigo e fazerem parte da minha vida até hoje, e agradeço por ter cruzado caminhos com Lucas Urbano, Marcella Campos, Thales Romano, Sarah Morgana, Ananda Pires, Artur Beraldo, Caroline Zafra, Amanda Caldas, Guilherme Calça, Caio Pinke e tantos outros queridos. Essas amizades derivam de conexões instantâneas como um segundo, e que, quase inexplicavelmente, se estendem por anos. Espero que para sempre. Obrigado por serem minha família em Ribeirão Preto.

Agradeço à Atlética Filô USP RP pela incrível jornada de autoconhecimento ao longo dos anos de graduação, e a todos que conheci através dela: Forga, Caipora, Bengala, Teco, Majinboo, Tampa, Shiro, Pereira, Dedo, Indi, Forninho, Fer, Flango, Quarta, Ozada, Capivara, Mousse, B1 e todos os atletas que conseguimos dar suporte com muito esforço. Também agradeço à equipe de Atletismo Filô, em especial aos treinadores, Fogs e Dani, pelos ensinamentos e os valores de união, disciplina, esforço, equipe, além da boa amizade. Voa Filô!

Por fim, agradeço a todos os professores que me inspiraram durante minha trajetória, principalmente às mulheres, que contribuíram inestimavelmente em minha formação enquanto aluno, cidadão e ser humano - pensante e crítico. As vozes de vocês sempre ecoarão em mim sobre a importância da educação emancipatória e da bondade.

A ciência faz parte de mim, assim como todos os citados aqui. Se metade de mim é dúvida e indagação, a outra é certeza e gratidão por tê-los comigo. A harmonia entre tudo isso reflete na concretização deste trabalho. Sou grato por sempre tentar fazer a diferença e ser aquilo que quero para o mundo. Agradeço por nunca ter desistido de ser eu mesmo em nenhuma circunstância.

Obrigado por tudo, Universidade de São Paulo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“A educação é um ato de amor, por isso, um ato de coragem.”

- Paulo Freire

RESUMO

SANTOS JUNIOR, W.J.R. **Investigação de substâncias psicoativas em amostras de leite materno.** 2022. 140p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Devido às propriedades físico-químicas, uma gama de substâncias psicoativas (lícitas e ilícitas) consumidas por mulheres em período de lactação pode ser transferida da corrente sanguínea para o leite materno, podendo causar prejuízos/efeitos deletérios no desenvolvimento do recém-nascido a curto e longo prazo. Pesquisas revelam a presença de drogas de abuso, como a maconha e a cocaína, em amostras de voluntárias de estudos ou de bancos de leite humano. O leite humano pode ser utilizado como amostra biológica para análises toxicológicas, sendo coletado de forma simples e não invasiva, o que permite avaliar a exposição do lactente a essas substâncias durante a amamentação. Neste trabalho, a presença de substâncias psicoativas em amostras de leite humano foi investigada a partir de um método de precipitação proteica seguida de extração em fase sólida dispersiva para detecção e quantificação de anfetamina, metanfetamina, metilenodioximetanfetamina, nicotina, cotinina, metadona, morfina, cocaína, cocaetileno e benzoilecgonina com análise por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas. A validação do método foi considerada satisfatória nos parâmetros avaliados. Os limites de detecção dos analitos variaram entre 2-5 $ng.mL^{-1}$ e o limite de quantificação foi de 5 $ng.mL^{-1}$ para todos. As curvas de calibração foram lineares na faixa de trabalho de 5 a 500 $ng.mL^{-1}$ ($r > 0,99$), utilizando modelos de regressão linear ponderada. O preparo de amostra apresentou recuperação entre 15-86%, precisão intra-dia de 2-19% e inter-dia de 4-19% e exatidão de 96-114%. Após desenvolvimento e validação, o método foi aplicado a 67 amostras de leite materno coletadas no Banco de Leite Humano do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, as quais tiveram resultados negativos para todos os analitos investigados.

Palavras-chave: leite materno; lactação; drogas psicoativas; exposição infantil; análises toxicológicas; extração em ponteiras descartáveis; cromatografia em fase gasosa - espectrometria de massas.

ABSTRACT

SANTOS JUNIOR, W.J.R. **Investigation of psychoactive substances in human breast milk samples.** 2022. 140p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Due to physicochemical properties, several psychoactive licit and illicit compounds consumed by a lactating woman can be transferred from her bloodstream into breast milk, what can cause damage in newborn's short- and long-term development. Research shows the presence of drugs of abuse, such as *marijuana* and cocaine, in samples from surveys' volunteers or milk bank donations. Human breast milk can be used as a biological matrix for toxicological analysis, being collected in a simple and noninvasive way, what enables the assessment of newborn's exposure to those substances. In this study, the presence of psychoactive substances in breast milk samples was investigated with a method of protein precipitation followed by disposable pipette extraction for amphetamine, methamphetamine, methylenedioxymethamphetamine, nicotine, cotinine, methadone, morphine, cocaine, cocaethylene and benzoylecgonine detection and quantification with gas chromatography coupled to mass spectrometry. Method was considered satisfying on evaluated parameters. The limits of detection ranged from 2 to 5 $ng.mL^{-1}$ and the limit of quantification was 5 $ng.mL^{-1}$ for all investigated analytes. Calibration curves were linear over a range of 5 -500 $ng.mL^{-1}$ ($r > 0,99$), using weighted linear regression. The sample preparation procedure presented recovery between 15-86%, intra-day precision of 2-19% (CV%), inter-day precision of 4-19% (CV%) and accuracy of 94-113%. After its development and validation, this method was applied to 67 breast milk samples collected at the Milk Bank from Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, which all resulted negative for the investigated analytes.

Keywords: human breast milk; lactation; psychoactive drugs; child exposure; toxicological analysis; disposable pipette extraction; gas chromatography – mass spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Janela de detecção de amostras biológicas.....9

Figura 2 – Etapas da extração com ponteiras DPX.....19

Figura 3 – Procedimento de *clean-up*.....35

Figura 4 – Procedimento otimizado de extração e pré-concentração dos analitos.....36

Figura 5 – Aparato utilizado para DPX.....36

Figura 6 – Ensaios realizados para otimização do procedimento de preparo de amostra.....38

Figura 7 – Cromatograma obtido da análise de um pool dos analitos na concentração de 500 $ng.mL^{-1}$.....50

Figura 8 – Cromatograma obtido da análise de amostra branco de LM fortificada com analitos (500 $ng.mL^{-1}$) e padrões internos (200 $ng.mL^{-1}$).....51

Figura 9 – Cromatograma de íons utilizados para quantificação de substâncias psicoativas em leite materno. Analitos na concentração de 500 $ng.mL^{-1}$ e padrões internos 200 $ng.mL^{-1}$.....51

Figura 10 – Valores médios (triplicata) de área dos picos dos analitos utilizando acetonitrila (em verde) e solução de acetonitrila 30% (em azul) como solvente de condicionamento da ponteira DPX.....52

Figura 11 – Valores médios de área dos picos dos analitos ao utilizar metanol (em azul) e solução metanólica (em laranja) como solvente de lavagem da ponteira DPX.....53

Figura 12 – Diagrama de Pareto das variáveis avaliadas.....55

Figura 13 – Modelo estatístico do DCCR.....56

Figura 14 – Superfície de resposta bidimensional do DCCR.....57

Figura 15 – Desejabilidade do modelo estatístico criado para a metodologia de preparo de amostra utilizada no ensaio DCCR.....58

Figura 16 - Comparação entre a metodologia inicial de preparo de amostra e a metodologia otimizada avaliando a resposta analítica do método.....61

Figura 17 – Cromatograma de análise de amostra branco de leite materno após a injeção de amostra fortificada com analitos em concentração superior ao ponto mais alto da curva de calibração.....71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fatores que influenciam a transferência de substâncias para o leite materno.....8

Tabela 2 – Recomendação quanto ao tempo de interrupção do aleitamento materno após consumo de drogas de abuso.....17

Tabela 3 – Principais técnicas analíticas propostas para análise de drogas de abuso em leite humano.....24

Tabela 4 – Condições das variáveis avaliadas no *Plackett-Burmann*.....39

Tabela 5 – Matriz de experimentos do *Plackett-Burmann*.....39

Tabela 6 – Condições das variáveis exploradas no DCCR realizado.....40

Tabela 7 – Matriz de experimentos realizados no DCCR.....41

Tabela 8 – Condições cromatográficas do CG-EM.....41

Tabela 9 – Parâmetros do espectrômetro de massas *single quadrupole*.....42

Tabela 10 – Íons selecionados para identificação e quantificação dos analitos e padrões internos e seus respectivos tempos de retenção.....42

Tabela 11 – Comparação dos valores reais obtidos e valor predito pela equação para validação do modelo estatístico.....60

Tabela 12 – Limites de detecção e quantificação obtidos com a metodologia proposta.....62

Tabela 13 – Resultados de linearidade das curvas de calibração dos analitos entre 5 e 500 $ng.mL^{-1}$ de acordo com o método analítico proposto.....64

Tabela 14 – Resultados de precisão, exatidão e recuperação dos analitos no método analítico proposto.....68

Tabela 15 – Resultados dos ensaios de estabilidade dos analitos em leite materno de acordo com o método analítico proposto.....69

Tabela 16 – Resultados dos ensaios de estabilidade das soluções – padrão utilizadas no desenvolvimento e validação do método analítico proposto.....70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

11-OH-THC	11-hidroxi-tetrahidrocanabinol
Δ^9-THC	Delta-9-tetrahidrocanabinol
ANF	Anfetamina
ANF-D_{11}	Anfetamina Deuterada
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BZE	Benzoilecgonina
CBD	Canabinol
CE	Cocaetileno
CG-EM	Cromatografia em fase gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CL-EM	Cromatografia em fase líquida acoplada à Espectrometria de Massas
COC	Cocaína
COC-D_3	Cocaína Deuterada
COD-D_6	Codeína Deuterada
COT	Cotinina
CQ	Controle de Qualidade
CQA	Controle de Qualidade Alto
CQB	Controle de Qualidade Baixo
CQM	Controle de Qualidade Médio
CV%	Coeficiente de Variação
CX	Troca Catiônica (*Cation eXchange)*
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DoE	Design Experimental
DPX	Extração em Ponteiras Descartáveis (*Disposable Pipette Extraction)*
D-SPE	Extração em Fase Sólida Dispersiva (*Dispersive Solid Phase Extraction*)
ER%	Erro Relativo

HS-SPME	Microextração em fase sólida com *Headspace*
KET-D_4	Cetamina Deuterada
LD	Limite de Detecção
LIQ	Limite Inferior de Quantificação
LLE	Extração líquido-líquido
LM	Leite Materno
LPME	Microextração em fase líquida
LSD	Dietilamida de Ácido Lisérgico
LSQ	Limite Superior de Quantificação
MA	Metanfetamina
MDMA	Metilenodioximetanfetamina
MeOH	Metanol
MET	Metadona
MET-D_3	Metadona Deuterada
MSTFA	N-metill-N-(trimetillsilil)trifluoroacetamida
MORF	Morfina
NIC	Nicotina
PB	*Placket-Burmann*
PI	Padrão Interno
PP	Precipitação Proteica
RLP	Regressão Linear Ponderada
SIM	Monitoramento de Íon Selecionado
SPE	Extração em Fase Sólida
SWGTOX	Grupo de Trabalho Científico em Toxicologia Forense
THC-COOH	11-nor-9-carboxi-tetrahidrocanabinol
THC-D_3	Tetrahidrocanabinol Deuterado
UNODC	Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime

SUMÁRIO

Resumo i
Abstract ii
Lista de figuras iii
Lista de tabelas iv
Lista de abreviaturas e siglas v

1. INTRODUÇÃO.....1
1.1 Importância do aleitamento materno.....3
1.2 O leite materno.....5
1.3 Efeitos de substâncias psicoativas em lactentes por exposição via leite materno.....9
1.3.1 Tabaco.....10
1.3.2 Cocaína.....12
1.3.3 Anfetaminas.....13
1.3.4 Opiáceos.....15
1.4 Interrupção do aleitamento em casos de consumo de drogas de abuso.....16
1.5 Extração em fase sólida dispersiva: DPX.....18
1.6 Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.....20
1.7 Otimização da metodologia experimental.....25

2. OBJETIVOS.....28

3. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....30

4. MATERIAIS E MÉTODOS 32
4.1 Materiais.....32
4.2 Equipamentos e acessórios.....32
4.3 Preparo de soluções e reagentes.....33
4.3.1 Soluções – padrão.....33
4.3.2 Solução de ácido fosfórico.....33
4.3.3 Solução de acetonitrila.....34
4.3.4 Solução de metanol.....34

4.3.5 Solução extratora.....34
4.4 Métodos.....35
4.4.1 Desenvolvimento da metodologia de preparo de amostra.....35
4.4.1.1 Precipitação proteica (PP) – Clean-up.....35
4.4.1.2 Disposable Pipette Extraction (DPX).....35
4.4.1.3 Otimização univariada.....37
4.4.1.4 Otimização multivariada.....37
4.4.1.4.1 Plackett-Burmann (PB).....38
4.4.1.4.2 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).....40
4.4.2 Condições cromatográficas.....41
4.4.3 Validação de método bioanalítico.....43
4.4.3.1 Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ) e Controles de Qualidade (CQ).....43
.4.4.3.2 Linearidade.....44
4.4.3.3 Precisão.....45
4.4.3.4 Exatidão.....45
4.4.3.5 Recuperação.....46
4.4.3.6 Seletividade.....46
4.4.3.7 Estabilidade.....47
4.4.3.8 Efeito Residual (Carryover).....47
4.4.4 Coleta de amostras reais.....48

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....51
5.1 Desenvolvimento do método.....51
5.1.1 Otimização univariada.....53
5.1.2 Otimização multivariada.....55
5.1.2.1 Plackett-Burman.....55
5.1.2.2 Delineamento Composto Central Rotacional.....57
5.2 Validação do método.....61
5.2.1 Limites de detecção e quantificação.....61
5.2.2 Linearidade.....62
5.2.3 Precisão e exatidão.....64
5.2.4 Recuperação.....65
5.2.5 Estabilidade.....66

5.2.6 Seletividade.....70
5.2.7 Efeito Residual (Carryover).....70
5.3 Análise de amostras reais.....71

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....74

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....77

ANEXOS.....96

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

De acordo com os mais recentes Relatórios Mundiais sobre Drogas lançados pelo Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (UNODC), a quantidade de pessoas em todo o mundo que usaram drogas ao menos uma vez por ano é de cerca de 5,5% da população global entre 15 e 64 anos, cujo a prevalência do consumo se concentra entre adolescentes e adultos jovens de 18 a 25 anos. (UNODC, 2021). O relatório mais recente da UNODC aponta ainda que, após o ano da pandemia de COVID-19, cerca de 36,3 milhões de pessoas passaram a apresentar transtornos relacionados ao uso de drogas, com destaque na gravidade do consumo de opioides (incluindo opiáceos) também observada no relatório do ano anterior (UNODC, 2020, 2021). A *cannabis* é a droga mais amplamente consumida no mundo e o número global de usuários de *cannabis* expandiu em aproximadamente 16% na última década até 2016 (WORLD DRUG REPORT, 2018). Atualmente, o uso de *cannabis*, tanto medicinal quanto recreativo, continua a aumentar no mundo todo entre adultos e adultos jovens, principalmente nas Américas, Europa Central e Ocidental; o último relatório ressalta o aumento significativo da concentração de tetrahidrocanabinol (THC) nas espécies de *cannabis* dos Estados Unidos e Europa (UNODC, 2020, 2021).

O III Levantamento Nacional sobre o Uso de Drogas pela População Brasileira (o último levantamento realizado no Brasil) informou que 26,4 milhões de brasileiros entre 12 e 65 anos consumiram algum produto de tabaco no ano de 2015; dentre estes, 1,1 milhão consumiram tabaco e maconha em mistura no mesmo ano. Dos entrevistados, 8,8 milhões de mulheres relataram consumo cigarros industrializados no mês anterior à pesquisa (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2017).

Em relação aos medicamentos não prescritos, o uso de opiáceos foi mais prevalente do que de benzodiazepínicos, sendo mais frequentemente reportado entre as mulheres do que entre os homens. Mesmo em pequena parcela da população amostral (0,6%), é importante manter atenção em relação ao consumo de derivados de ópio, considerando a Crise dos Opioides enfrentada nos Estados Unidos nos últimos anos - o aumento do uso abusivo de analgésicos prescritos (à base de morfina e codeína, por exemplo), heroína e derivados de fentanil, além do aumento do número de casos de overdose e mortes relacionados ao consumo destas substâncias (NIDA, 2018).

O levantamento aponta ainda que o uso de alguma substância ilícita na vida foi reportado por aproximadamente 15 milhões de brasileiros. As maiores prevalências de consumo na vida foram da maconha, cocaína e crack, os solventes (inalantes), ecstasy, ayahuasca, LSD, cetamina e heroína. O uso de substância ilícita foi mais frequentemente reportado por homens do que por mulheres. Contudo, as mulheres apresentaram prevalência superior à dos homens no consumo de álcool com medicamentos não prescritos (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2017). Apesar de a maioria das pessoas que usam drogas serem homens, as mulheres têm padrões específicos de uso. Além disso, embora as mulheres possam tipicamente começar a usar substâncias mais tarde que os homens, uma vez que iniciam o uso, tendem a aumentar o consumo de álcool, *cannabis*, cocaína e opioides mais rapidamente que os homens, bem como desenvolver desordens decorrentes do uso dessas drogas (UNODC, 2018).

O abuso de substâncias tem sido motivo de preocupação mundial com relação à saúde da gestante e do seu filho em diferentes níveis socioeconômicos (ANGELUCCI, 2010; SCHAUBERGER et al., 2014). Pesquisas já alertavam o

aumento progressivo no consumo de álcool, tabaco, maconha e outras drogas no sexo feminino (ANGELUCCI, 2010). Os dados atuais apontam que enquanto a proporção de um a cada três usuários é mulher, apenas um entre cinco buscam tratamento (UNODC, 2020). Dados sobre o uso de substâncias ilícitas por mulheres durante o período pós-parto são inexistentes no Brasil (SILVEIRA, 2016). Já nos Estados Unidos, de acordo com o Levantamento Nacional em Uso de Drogas e Saúde lançado em 2013, 5,4% das mulheres grávidas com idade entre 15 e 44 anos eram usuárias de substâncias ilícitas (SAMHSA, 2013).

1.1 IMPORTÂNCIA DO ALEITAMENTO MATERNO

Desde o início dos anos 2000, o aleitamento materno exclusivo nos primeiros 6 meses de vida, com continuidade da amamentação de 1 a 2 anos ou mais, é reconhecido como padrão normativo para alimentação infantil (WARD *et al.*, 2001; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003). O leite humano é especialmente adequado para o bebê, tanto em sua composição nutricional quanto nos fatores bioativos não nutritivos que promovem a sobrevivência e o desenvolvimento saudável (OFTEDAL, 2012).

Se a técnica de aleitamento é satisfatória, o aleitamento exclusivo pelos primeiros seis meses de vida é compatível com as necessidades nutricionais e energéticas da maioria das crianças, tornando completamente desnecessários outros alimentos e líquidos, inclusive água, que constitui 88% do leite humano. Mesmo após o início da alimentação complementar, o leite materno continua a ser importante fonte energética para o bebê, contribuindo com cerca de metade das necessidades dessa natureza no primeiro ano de vida e um terço no segundo ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Além disso, diversos estudos já associaram a amamentação com potenciais benefícios médicos e sociais, que incluem diminuição da mortalidade e morbilidade de crianças por infecções e demais doenças, vantagens no desenvolvimento cognitivo e diminuição da incidência de câncer e osteoporose nas mães (ITO; LEE, 2003). Estimativas em relação a formas de ação para manutenção da saúde da criança mostraram que a promoção do aleitamento materno exclusivo é a intervenção isolada em saúde pública com o maior potencial para a diminuição da mortalidade na infância (TOMA; REA, 2008).

Toma e Rea (2008) justificaram como a amamentação precoce poderia diminuir o risco de morte no período neonatal: (1) as mães que amamentam logo após o parto têm maior chance de serem bem sucedidas na prática da amamentação; (2) os alimentos pré-lácteos, comumente oferecidos aos bebês antes da amamentação, podem ocasionar lesões no intestino imaturo; (3) o colostro acelera a maturação do epitélio intestinal e protege contra agentes patogênicos; (4) o contato pele a pele previne a ocorrência de hipotermia.

Há evidências de que, tanto em países em desenvolvimento quanto nos desenvolvidos, a amamentação protege as crianças contra infecções dos tratos gastrintestinal e respiratório, sendo maior a proteção quando a criança é amamentada de forma exclusiva e por tempo prolongado (KRAMER et al., 2001). Ainda, o contato pele a pele desencadeia uma série de eventos hormonais importantes para a relação mãe/bebê. O toque, o odor e o calor estimulam o nervo vago e isto, por sua vez, faz com que a mãe libere ocitocina, hormônio responsável, entre outras ações, pela saída e ejeção do leite. Esse hormônio faz com que a temperatura das mamas aumente e aqueça o bebê. Por outro lado, a ocitocina reduz

a ansiedade materna, aumenta sua tranquilidade e responsividade social (MERCER et al., 2007; UVNÄS-MOBERG, 1998).

Há vários argumentos em favor da prática do aleitamento, que incluem: (1) vantagens na saúde da criança – diminuição da ocorrência de síndrome de morte súbita no primeiro ano de vida, da ocorrência ou severidade de doenças infecciosas e do risco de asma, hipertensão, hipercolesterolemia, diabetes e sobrepeso; melhor nutrição e efeito positivo na cognição –, (2) vantagens para a saúde da mãe - diminuição do risco de desenvolvimento de câncer de mama e ovários e de osteoporose pós-menopausal; aumento do intervalo intergestacional; melhora da involução uterina no pós-parto - (3) e vantagens para a sociedade - menores custos financeiros e promoção do vínculo afetivo entre mãe e filho (GARTNER et al., 2005; UVNÄS-MOBERG, 1998).

1.2 O LEITE MATERNO

O conhecimento da composição do leite humano é importante para o manejo da alimentação infantil, particularmente de bebês frágeis e de alto risco, e para entender o potencial impacto do armazenamento e da pasteurização nos componentes do leite (BALLARD; MORROW, 2013). A composição do leite é extremamente variável, tanto entre as mulheres quanto entre grupos étnicos, em diferentes períodos de lactação ou durante a mesma mamada (TRENTO, 2012).

O primeiro fluido produzido pelas mães após o parto chama-se colostro, que difere em volume, aparência e composição. Produzido em pequenas quantidades nos primeiros dias pós-parto, é rico em componentes imunológicos, como a imunoglobulina A, lactoferrina, leucócitos, assim como em fatores de desenvolvimento, como fator de crescimento epidérmico (CASTELLOTE et al., 2011;

KULSKI; HARTMANN, 1981; PANG; HARTMANN, 2007). O colostro também contém relativamente baixas concentrações de lactose, indicando que suas primeiras funções sejam imunológicas e tróficas ao invés de nutricional. Níveis de sódio, cloreto e magnésio são mais altos, e níveis de potássio e cálcio são mais baixos no colostro do que no leite maduro (KULSKI; HARTMANN, 1981; PANG; HARTMANN, 2007). À medida que ocorre fechamento estreito da junção no epitélio mamário, a relação sódio-potássio diminui e a concentração de lactose aumenta, indicando ativação secretora e produção de leite de transição.

O leite de transição compartilha algumas das características do colostro, mas representa um período de produção de leite aumentada para atender às necessidades nutricionais e de desenvolvimento do bebê em rápido crescimento, e normalmente ocorre de cinco dias a duas semanas após o parto, após o qual o leite é considerado largamente maduro. Entre quatro e seis semanas após o parto, o leite humano é considerado totalmente maduro. Em contraste com a mudança dramática na composição observada no primeiro mês de vida, o leite humano permanece relativamente similar em composição no decorrer da lactação, ainda que mudanças sutis na composição ocorram (BALLARD; MORROW, 2013).

O leite humano é, portanto, um fluido complexo, contendo proteínas, carboidratos, vitaminas, minerais, substâncias imunocompetentes (IgA, enzimas, interféron), além de fatores tróficos ou moduladores de crescimento (COSTA, 2006). A IgA secretória é a imunoglobulina mais predominante no início da lactação seguida da IgG secretória; ambas protegem o recém-nascido enquanto seu próprio sistema imune amadurece. Além desses, o leite materno contém IgM, macrófagos, neutrófilos, linfócitos e outros (ANDREAS; KAMPMANN; MEHRING LE-DOARE, 2015).

A maioria dos compostos passa para o leite materno, mas em pequenas quantidades; e mesmo quando presentes no leite, essas substâncias poderão ou não ser absorvidas no trato gastrointestinal do lactente. A amamentação só deve ser interrompida excepcionalmente, quando a doença materna requerer tratamento com medicações incompatíveis. A passagem de substâncias psicoativas do sangue para o leite materno ocorre por mecanismos envolvendo membranas biológicas, as quais possuem em sua constituição proteínas e fosfolipídios. Após atravessar o endotélio capilar, a droga passa para o interstício e atravessa a membrana basal das células alveolares do tecido mamário. Proteínas e lipídeos da membrana exercem influência na velocidade da passagem e na concentração da droga no leite (D'AVILA; LIMBERGER; FRÖEHLICH, 2016; FRÍGULS *et al.*, 2010; ITO; LEE, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Os mecanismos mais prováveis de excreção de drogas para o leite materno são: difusão transcelular (moléculas pequenas não ionizadas e hidrossolúveis atravessam poros da membrana celular); difusão passiva (moléculas ionizadas e proteínas menores atravessam a membrana basal por canalículos de água – principal mecanismo de passagem de um fármaco para o leite); difusão intercelular (moléculas grandes, como as imunoglobulinas e interféron, são transferidas para o leite através da passagem entre as células); ligação com proteínas carreadoras (substâncias polares penetram nas membranas celulares ligadas a essas macromoléculas) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A excreção de drogas para o leite humano e sua absorção pelo lactente são influenciadas por fatores relacionados ao leite produzido, à lactante, ao lactente e às propriedades físico-químicas das substâncias, expressos na Tabela 1.

Tabela 1: Fatores que influenciam a transferência de substâncias para o leite materno.

Fatores relacionados ao leite	• Composição • pH
Fatores relacionados à lactante	• Eliminação hepática e renal • Dose e duração de uso da substância • Via de administração da substância • Fluxo sanguíneo para a mama
Fatores relacionados ao lactente	• Idade • Absorção da droga • Eliminação hepática e renal • Volume de leite ingerido
Fatores relacionados à substância	• Grau de ionização (pKa) • Peso molecular • Lipossolublidade e hidrossolubilidade • Ligação a proteínas plasmáticas • Tempo de ação

Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde (2014) e SILVEIRA, G. O. (2016).

Em geral, baixa ligação a proteínas plasmáticas, baixo peso molecular, alta lipofilicidade, o pH levemente ácido do leite e seu alto conteúdo lipídico contribuem para o fenômeno de excreção (FRÍGULS et al., 2010). O pH do leite humano (6,6 a 6,8) é um pouco menor do que o do plasma, ou seja, mais ácido, o que favorece a concentração de substâncias com características básicas, por mecanismo de ionização (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Lactentes com mais tempo de vida apresentam funções hepática e renal mais eficazes, de modo que os efeitos das substâncias serão menores do que em recém-nascidos. Além disso, em crianças prematuras, a meia-vida das drogas pode ser prolongada, causando acúmulo após exposição constante e repetida. Por outro lado, lactentes de menor tempo de vida consomem menor volume de leite, o que

diminuiria a magnitude da exposição a substâncias nocivas. (CHAVES, R.G., LAMOUNIER, 2004).

1.3 EFEITOS DE SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS EM LACTENTES POR EXPOSIÇÃO VIA LEITE MATERNO

O leite humano é uma matriz não convencional utilizada para avaliar a exposição aguda a drogas por exibir uma janela de detecção de horas (FIGURA 1), e sua principal vantagem é a coleta fácil e não invasiva (COTTEN, 2012). No entanto, a extração de drogas do leite materno é um desafio analítico, devido ao seu alto conteúdo lipoproteico e à alteração da composição durante o período pós-parto (FRÍGULS et al., 2010).

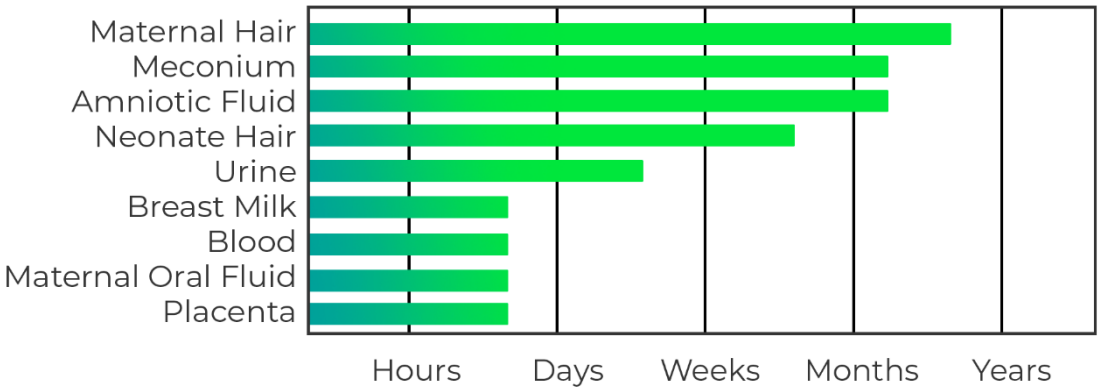


Figura 1: Janela de detecção de amostras biológicas. Fonte: autoria própria (2022).

Embora o conhecimento sobre os efeitos do uso de drogas durante o período da amamentação tenha sido muito ampliado, ainda não se conhecem todos efeitos (principalmente a longo prazo) nos recém-nascidos de muitas drogas utilizadas pela nutriz, principalmente de novos fármacos que estão constantemente entrando no mercado. Além disso, para muitas drogas de abuso ainda não há dados suficientes

sobre transferência para o leite materno e segurança para uso no período da lactação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A seguir, destaca-se as principais informações toxicocinéticas e toxicodinâmicas das substâncias escolhidas para análise quantitativa deste trabalho. Elas foram escolhidas por saber-se que causam dependência devido ao uso abusivo e efeitos tóxicos a médio e longo prazo, tanto para o usuário quanto para o lactente; ademais, todas já tiveram sua detecção em leite materno reportadas na literatura.

1.3.1 Tabaco

Apesar dos riscos divulgados associados ao uso do tabaco, mais de 25% da população mundial fuma cigarros. Embora existam amplas pesquisas que provem que é aconselhável parar de fumar ou pelo menos reduzir o fumo durante a gravidez e lactação, em muitos países as taxas de prevalência permanecem altas (PICHINI; GARCIA-ALGAR, 2006). No Brasil, a nicotina não é uma substância controlada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), assim como na maioria dos países do mundo, embora o tabagismo esteja atrelado a milhões de mortes por ano (ANVISA, 2014). Muita preocupação se mantém em relação ao tabagismo e danos pulmonares em adolescentes e adultos jovens principalmente devido ao consumo de cigarros eletrônicos, que têm sido uma tendência mundial crescente. No Brasil, a venda de cigarros eletrônicos é proibida, mas a importação e o consumo se mantêm sem regulamentação (CIGARRO ELETRÔNICO, 2020; MIECH *et al.*, 2019).

A nicotina é rápida e amplamente metabolizada em humanos para cotinina, trans-3-hidroxicotinina e cotinina-N-óxido, que passam através das células epiteliais das glândulas mamárias para o leite. A nicotina é uma base fraca (pKa_1 = 8,0) e é

concentrada no leite levemente ácido (pH 6,8) através de aprisionamento iônico. A meia-vida ($t_{1/2}$) da nicotina no leite excede ligeiramente o tempo de meia-vida no soro (aproximadamente 2h), enquanto a concentração de cotinina permanece constante durante um intervalo de 4h sem fumar. A nicotina está presente no leite em concentrações que são 1,5–3,0 vezes maior que a concentração plasmática materna simultânea, mas apenas 10% da dose materna de nicotina é excretada no leite materno (ATKINSON; BEGG; DARLOW, 1988; LUCK; NAU, 1987).

Durante o início da década de 1990, vários estudos de coortes acompanharam nutrizes fumantes, medindo simultaneamente nicotina e seu principal metabólito, cotinina, no leite materno e na urina de bebês, a fim de estimar a quantidade de metabólitos da nicotina incorporada pelo leite. Esses estudos concluíram que, em bebês, a amamentação é a principal fonte de exposição à nicotina, sendo o tabagismo passivo o segundo mais importante (BECKER et al., 1999). Também foi encontrada evidência de que nicotina e cotinina são excretados no leite materno em quantidades proporcionais ao número de cigarros fumados pela mãe diariamente (FRÍGULS et al., 2010).

Foi demonstrado que os bebês de mães fumantes têm aumento de cólicas infantis, são mais propensos a infecções respiratórias e diminuição das taxas respiratórias e de saturação de oxigênio após a amamentação. Além disso, a presença de nicotina na corrente sanguínea do bebê pode causar aumento da frequência cardíaca e está relacionada ao baixo ganho de peso infantil, alergia respiratória, baixo suprimento de leite e é o maior fator de risco para síndrome de morte súbita (SATTARI; SERWINT; LEVINE, 2019). A nicotina está presente no leite de mães fumantes em concentrações entre 2 e 240 $ng.mL^{-1}$, o equivalente a uma dose diária de 0,3 a 36 $\mu g.kg^{-1}.dia^{-1}$ (FRÍGULS et al., 2010). O metabólito cotinina

pode ser encontrado em concentrações entre 70 e 140 $ng.mL^{-1}$ no leite de mães fumantes ou em tratamento com adesivos de nicotina (KF et al., 2003; NICOTINE - DRUGS AND LACTATION DATABASE (LACTMED), 2020).

1.3.2 Cocaína

A cocaína faz parte da lista de substâncias entorpecentes de uso proscrito no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE; ANVISA, 2019). No leite materno, ela é excretada em concentrações razoavelmente altas. O tempo de meia-vida da cocaína em humanos é de aproximadamente 1h, portanto sua distribuição no leite materno deve ocorrer rapidamente. A cocaína é metabolizada no fígado por hidrólise espontânea e também pela colinesterase plasmática, originando cerca de uma dúzia de metabólitos farmacologicamente inativos, sendo os mais importantes a benzoilecgnonina e o éster de metilecgonina. A cocaína e seus metabólitos foram encontrados na urina de bebês amamentados 24-36 horas após o uso materno. A colinesterase sérica é baixa em recém-nascidos, de modo que as crianças são menos capazes que os adultos de metabolizar a cocaína, e podem acumular a droga (ANDERSON, 2002).

O primeiro caso de intoxicação por cocaína via leite materno foi relatado em uma criança de duas semanas que, após a amamentação, apresentava extrema irritabilidade, tremores, pupilas dilatadas, taquicardia e hipertensão, e cuja mãe havia usado cocaína via nasal (CHASNOFF; LEWIS; SQUIRES, 1987). A análise toxicológica por CG-EM indicou que o leite materno e a urina da criança continham cocaína e benzoilecgonina. Outros estudos já relataram também vômitos e convulsões (HOWARD; LAWRENCE, 1998). Em um caso apresentado por Dickson

et al. (1994), cocaína foi identificada no leite, mas não quantificada, e o lactente estava agitado e foi diagnosticado como intoxicado por cocaína. A presença de 12 $\mu g.mL^{-1}$ de leite de uma mãe no estudo apoia a afirmação de que o uso regular de cocaína pode resultar em exposição significativa do lactente. Uma refeição com 100 mL de leite materno forneceria 1,2 mg de cocaína à criança, e como a biodisponibilidade oral da cocaína é estimada em 60%, 0,7 mg da droga seriam absorvidos pela criança (WINECKER et al., 2001). Entretanto, os efeitos relatados ainda não foram diretamente relacionados à dose de exposição.

Estudos mais recentes relatam concentrações entre 8 e 138 $ng.mL^{-1}$ de cocaína e de 7,8 a 91,2 $ng.mL^{-1}$ de benzoilecgonina em amostras de leite (D'AVILA et al., 2015b; RR et al., 2017; SILVEIRA et al., 2016).

1.3.3 Anfetaminas

As anfetaminas estão entre os compostos mais amplamente utilizados por usuários recreativos de drogas, cerca de 27 milhões de pessoas no mundo todo, com números progressivos principalmente na América do Norte e Ásia (WORLD DRUG REPORT 2020). No Brasil, a anfetamina tem seu uso restrito apenas mediante liberação via notificação de receita, enquanto seus derivados metanfetamina e MDMA (ecstasy) são substâncias psicotrópicas de uso proscrito. Eles são principalmente administrados por via oral, ou uso intravenoso.

De uma perspectiva farmacocinética, os estimulantes do tipo anfetamina são bastante homogêneos. A anfetamina e seus compostos relacionados são bases fracas, com pesos moleculares relativamente baixos. Estas características permitem que se difundam facilmente através das membranas celulares e em tecidos ou

substratos biológicos com um pH mais ácido do que o sangue, tal como o leite. A anfetamina se concentra no leite materno, com relação leite/plasma variando de 2,8 a 7,5 (FREYER, 2009). As meias-vidas de eliminação dos derivados de anfetamina são de 6 a 12 horas, e tanto o *clearance* hepático quanto o renal contribuem para sua eliminação. A metanfetamina sofre desmetilação à anfetamina, catalisada pelo citocromo hepático humano P4502D6 (CYP2D6). Como o MDMA pode interferir em seu próprio metabolismo, níveis potencialmente perigosos podem ser alcançados pelo uso repetido de drogas em intervalos curtos (LIN et al., 1997). A literatura relata concentrações entre 55 e 138 $ng.mL^{-1}$ de anfetamina encontradas em amostras de leite de mães em tratamento para narcolepsia, que variam de acordo com o tempo de coleta após administração (AMPHETAMINE - DRUGS AND LACTATION DATABASE (LACTMED) - NCBI BOOKSHELF, [s.d.]; I et al., 2015; ÖHMAN et al., 2015). Em casos de uso recreativo de anfetamínicos, foram encontrados concentrações entre 111 e 610 $ng.mL^{-1}$ de metanfetamina durante as primeiras 48 horas após o uso (BARTU; DUSCI; ILETT, 2009; CHOMCHAI; CHOMCHAI; KITSOMMART, 2016).

Os bebês amamentados por usuários de anfetaminas parecem ter anormalidades comportamentais induzidas por drogas, como irritabilidade, padrão de sono pobre, agitação e choro (ANDERSON, 2002).

1.3.4 Opiáceos

A morfina e a metadona são substâncias entorpecentes controladas por notificação de receita no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE; ANVISA, 2019). A morfina é metabolizada pelo fígado e excretada como um glucuronídeo ou em sua forma livre pelos rins, tendo tempo de meia-vida de 2 a 3 horas. Em doses terapêuticas, a

maioria dos opioides, como a morfina, a meperidina, a metadona e a codeína, são excretados no leite em quantidades mínimas, compatíveis com a amamentação (WOJNAR-HORTON et al., 2003). A morfina (quando usada para controlar a dor) é considerada compatível com a amamentação se a dose de exposição do bebê for inferior a 10% da dose materna (KOREN et al., 2006).

A metadona é amplamente utilizada em programas de tratamento para dependência de narcóticos. Sua utilidade está relacionada ao seu longo tempo de meia-vida, que permite uma diminuição gradual da dose, um início lento de ação e uma menor taxa de efeitos eufóricos em comparação com outros opiáceos; é um composto lipofílico, fracamente básico (pKa 8,25) que é altamente ligado a proteínas e é excretado no leite materno. As concentrações plasmáticas máximas são atingidas entre 2 e 4 horas após doses terapêuticas. Normalmente, a meia-vida de eliminação varia entre 10 e 18 horas. O metabolismo e a taxa de *clearance* são altamente variáveis. A principal via de eliminação é através do metabolismo hepático pelas isoenzimas CYP3A4 e CYP2B6 do citocromo P450 (ROBINSON; WILLIAMS, 1971). Por fim, a metadona é metabolizada por desmetilação em dois metabólitos principais, EDDP e EMDP.

A síndrome de abstinência neonatal geralmente ocorre logo após o parto em cerca de 75% dos bebês expostos à opioides durante a gravidez (KOREN et al., 2006). A amamentação nesses bebês pode proteger contra a abstinência neonatal (ABDEL-LATIF et al., 2006), mas a interrupção abrupta da amamentação pode causar a abstinência do bebê. Recebendo doses mais baixas após o nascimento, sua retirada afeta o sono do bebê, nutrição e função autonômica (KOREN et al., 2006). Estudos reportam concentrações de metadona entre 27 e 570 $ng.mL^{-1}$ e de

morfina entre 20 e 500 $ng.mL^{-1}$ (G et al., 1975; I et al., 1990; RE et al., 1997; VL et al., 1989).

1.4 INTERRUPÇÃO DO ALEITAMENTO EM CASOS DE CONSUMO DE DROGAS DE ABUSO

É muito frequente o uso de medicamentos e outras substâncias por mulheres que estão amamentando (ITO; LEE, 2003). A maioria é compatível com a amamentação; poucos são os fármacos formalmente contraindicados e alguns requerem cautela ao serem prescritos durante a amamentação devido aos riscos de efeitos adversos nos lactentes e/ou na lactação. No entanto, com frequência os profissionais de saúde recomendam a interrupção do aleitamento materno quando as mães são medicadas, muitas vezes porque desconhecem o grau de segurança do uso das diversas drogas durante o período de lactação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Devido à imaturidade dos sistemas de eliminação de medicamentos, os valores de *clearance* em recém-nascidos e lactentes jovens são baixos. A excreção renal de medicamentos depende da filtração glomerular e da secreção tubular. A taxa de filtração glomerular em recém-nascidos prematuros é de apenas 25% do nível do adulto com base no peso corporal, e os valores do adulto são atingidos até a idade de 3 a 5 meses (LEAKE; TRYGSTAD; OH, 1976). A função tubular parece amadurecer mais lentamente que a taxa de filtração glomerular. Os outros principais sistemas de eliminação de drogas são as enzimas metabolizantes CYP450 e CYP3A7 no fígado. O CYP3A4 atinge 40% do nível do adulto um mês após o nascimento (LACROIX et al., 1997). A sobreposição de especificidades de substrato

e polimorfismos genéticos adicionam complexidade à biotransformação de drogas em bebês (FRÍGULS et al., 2010).

A orientação geral da Academia Americana de Pediatria contraindica o uso durante o período da lactação das drogas de abuso anfetaminas, cocaína, heroína, maconha e fenciclidina (WARD et al., 2001). A Organização Mundial da Saúde considera que o uso de anfetaminas, ecstasy, cocaína, maconha e opioides não são contraindicadas durante a amamentação. Contudo, alerta que as mães que usam essas substâncias por períodos curtos devem considerar a possibilidade de evitar temporariamente a amamentação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

O Ministério da Saúde indica a interrupção temporária do aleitamento materno durante o consumo de drogas de abuso, sendo que o tempo de interrupção da amamentação varia dependendo da droga, de acordo com a Tabela 2:

Tabela 2: Recomendação quanto ao tempo de interrupção do aleitamento materno após consumo de drogas de abuso***.***

Droga	Período recomendado de interrupção da amamentação
Anfetamínicos	24-36 horas
Barbitúricos	48 horas
Cocaína, crack	24 horas
Etanol	1 hora por dose ou até estar sóbria
Opiáceos	24 horas
LSD	48 horas
Maconha	24 horas

Fonte: Adaptado de SILVEIRA, G. O. (2016) e MINISTÉRIO DA SAÚDE. Departamento de Atenção Básica. **Saúde da criança – nutrição infantil:** aleitamento materno e alimentação complementar. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2009.

É importante destacar que o fenômeno do uso e abuso de drogas é complexo e influenciado por um conjunto de fatores de risco e proteção em diversos domínios, que se interligam de forma recursiva, englobando desde aspectos macroestruturais,

como questões socioeconômicas e culturais, passando por problemáticas históricas como as desigualdades raciais e das condições de classe social; chegando a aspectos territoriais, como os contextos comunitários e a relação com o comércio e tráfico de drogas local; até a dimensão microssocial, ao abarcar o contexto familiar e a história de vida dos sujeitos, incluindo aí efeitos biológicos decorrentes de questões genéticas (NIDA, 2003).

1.5 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA DISPERSIVA: DPX

A técnica de DPX (do inglês, "*Disposable Pipette Extraction*", ou extração em ponteira descartável, em português) é uma variação da SPE tradicional e da extração em fase sólida dispersiva (D-SPE), caracterizada por uso mínimo de solventes e rapidez na extração. A DPX consiste em uma fase sólida contida livremente em uma ponteira de 1,0 mL, onde os analitos ficam em contato constante com o sorvente durante a extração - com uma maior superfície de contato em relação às fibras clássicas de SPE. A extração de amostras em solução promove rápido equilíbrio entre a fase sólida e a amostra, permitindo a sorção e dessorção dos analitos por polímero ligado aos grupos catiônicos ou aniônicos, que consistem na extração por troca iônica. A técnica resulta em um procedimento rápido, com uso reduzido de solventes orgânicos e de amostra, dispensa a utilização de vácuo, pode ser semi-automatizada, com alta recuperação e eficiência de extração (BREWER et al., 2008; KOLE et al., 2011; PINTO; QUEIROZ, 2015b). Após extensa revisão literária, acredita-se que esta técnica ainda não foi utilizada para análises toxicológicas em leite humano, embora já tenha sido aplicada em leite animal para análise de contaminantes e pesticidas (BORDIN et al., 2016b; BRANDÃO DA

COSTA et al., 2020; OLIVEIRA; LANÇAS, 2018; PINTO; QUEIROZ, 2015a; SANTOS; DE MARTINIS, 2020).

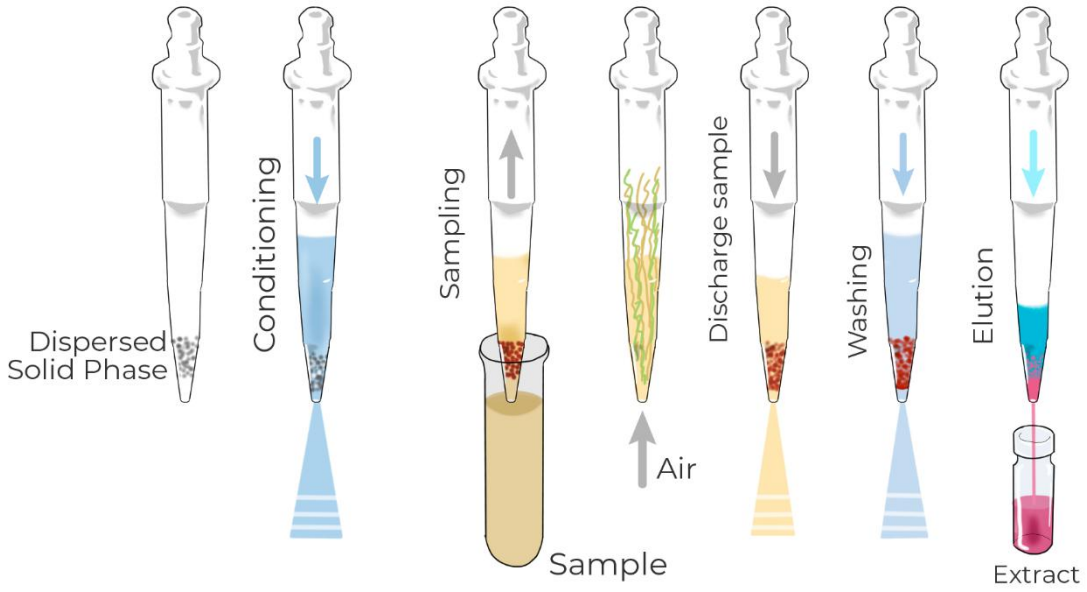


Figura 2: Etapas da extração com ponteiras DPX. Fonte: autoria própria (2022).

A técnica de DPX possui diversas variáveis nas etapas de seu procedimento experimental, tais como o volume de amostra utilizado, o volume de solventes e o próprio solvente empregado e o intervalo de tempo de cada etapa. A otimização dos parâmetros ajuda a adaptar a técnica para (neste caso, com a matriz de estudo e os analitos de interesse) para obter o máximo de benefício dela. A otimização de um procedimento pode ser realizada de forma univariada ou multivariada, isto é, avaliando um fator único em função da resposta ou diversos fatores simultaneamente (MARTINS FUKUDA et al., 2018; MOUSAVI; TAMIJI; KHOSHAYAND, 2018).

1.6 CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A Cromatografia em fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) é uma combinação de técnicas que provê sensibilidade e seletividade para identificação de drogas em amostras biológicas. A detecção por analisador de massas é uma técnica importante para a análise molecular, uma vez que apresenta não só potencial em fornecer informações de massa molar, mas também sobre a estrutura do analito (GALLARDO; QUEIROZ, 2008; GARERI; KLEIN; KOREN, 2006; OSTREA et al., 2001).

A cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas ocupa lugar de destaque entre os métodos de análise devido à facilidade com que efetua separação, identificação e quantificação das espécies químicas (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Para a determinação de compostos polares e hidrofílicos por CG-EM, é necessário garantir sua volatilidade e estabilidade térmica. A derivatização de compostos polares é um procedimento muito empregado para análise de drogas de abuso, como maconha, metanfetamina, morfina, dentre outros (SEGURA; VENTURA; JURADO, 1998). A derivatização permite a modificação da funcionalidade da molécula, aumentando sua volatilidade e estabilidade por adição de grupamentos químicos que garantirá a menor adsorção na coluna cromatográfica, íons do espectro em maiores faixas de massa e fragmentos característicos para as substâncias analisadas. As reações comumente realizadas são de alquilação, acetilação e sililação da molécula polar, ocorrendo a substituição de hidrogênio de ligações N-H, O-H, S-H por grupos alquil, acil ou silil. A sililação é a reação de derivatização mais amplamente empregada e substitui hidrogênios por grupamento

trimetilsilil (TMS); isto resulta na diminuição da força das interações intermoleculares, reduzindo o ponto de ebulição das moléculas de interesse, uma vez que os grupos hidroxila, amino e carbonila aumentam o ponto de ebulição de substâncias orgânicas (SEGURA; VENTURA; JURADO, 1998; SELLERS, 2010). A eficiência da reação dependerá do agente de sililação; os reagentes mais comuns são o trimetilclorosilano (TCMS), trimetilsililimidazol (TMSI), N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA), N,O-bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamina (BSTFA) e N-(t-butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida. Dessa forma, o produto da reação será uma nova molécula que apresenta propriedades físico-químicas mais adequadas para a detecção por um método analítico em fase gasosa (SELLERS, 2010).

A qualidade de um método analítico é determinada pela quantidade de suas etapas, com seus erros experimentais. Por um lado, esta qualidade depende da técnica de amostragem, com a qual se seleciona uma fração presumivelmente representativa da amostra primária. Nesta fração devem-se identificar e quantificar analitos, os quais são os componentes químicos, que, também presumivelmente, a definem. É comum não se analisar quimicamente matrizes na forma bruta, pois elas costumam ter e gerar interferências e incompatibilidades com equipamentos analíticos (CHEN; PAWLISZYN, 2006). Uma técnica de preparo de amostras deve apresentar facilidade no manuseio, rapidez, baixo custo, garantir boa recuperação, seletividade e, se possível, aplicabilidade para determinações simultâneas (CARASEK; PAWLISZYN, 2006).

No caso de análises cromatográficas, além de evitar a interferência de contaminantes da matriz que possam coeluir com o analito de interesse, a remoção de interferentes em geral é importante para garantir a longevidade das colunas

analíticas e evitar constantes limpezas no sistema de injeção (O'REILLY et al., 2005).

Ao longo dos anos, diversas técnicas de separação analíticas e métodos cromatográficos foram utilizados para investigação de compostos exógenos em leite, desde pesticidas a agrotóxicos, plastificantes, medicamentos, drogas de abuso e metais tóxicos (ACOSTA et al., 2018; FUJII et al., 2011; JOHNSON-RESTREPO et al., 2007; LÓPEZ-GARCÍA et al., 2018; SILVEIRA et al., 2017; VAHIDINIA et al., 2019). Os trabalhos envolvendo substâncias psicoativas mais recentes encontrados na literatura estão esquematizados na Tabela 3.

A partir de técnicas clássicas de preparo de amostra, como a extração líquido-líquido e a extração em fase sólida (SPE), novas técnicas miniaturizadas são empregadas e permitem que a limpeza ("*clean-up*") da amostra, extração, e concentração dos analitos sejam realizadas em uma única etapa. Além disso, muitas são passíveis de automatização e requerem pequena (ou nenhuma) quantidade de solventes poluentes durante toda a etapa de preparo da amostra (LUIZ et al, 2015).

SILVEIRA *et al.* (2017), através da microextração em fase sólida no modo *headspace* (HS-SPME) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), encontrou em 2 das 101 amostras de leite materno coletadas no Centro de Controle de Intoxicações de São Paulo concentrações de THC de 20 e 31 $ng.mL^{-1}$, estimando 2 e 3,1 µg, respectivamente, transferidos para um volume de 100mL de leite, e 0,24 e 0,37 µg de absorção pelo recém-nascido alimentado, considerando a biodisponibilidade oral de THC 12%. Também encontrou duas amostras positivas para cocaína das 52 amostras analisadas por microextração em fase líquida (LPME) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, uma na concentração de 138 $ng.mL^{-1}$ e a outra com concentração próxima ao limite

de detecção (6 $ng.mL^{-1}$), não podendo ser quantificada. Para a amostra quantificada, estimou-se a dose absoluta de 13,8 µg de cocaína entregue ao recém-nascido em um volume de 100mL de leite materno ingerido e a absorção pelo mesmo de 8,3 µg, considerando a biodisponibilidade oral de cocaína de aproximadamente 60%. D'AVILA *et al.* (2015) desenvolveu e validou um método analítico de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM) para determinação de biomarcadores de cocaína e crack em colostro, aplicando-o a duas amostras de leite de mães suspeitas de terem feito uso de tais substâncias e outras duas consideradas não usuárias. As análises confirmaram a presença de cocaína nas amostras das mães suspeitas em concentração de 8,0 e 10,3 $ng.mL^{-1}$, sendo nesta última também detectados benzoilecgnonina (7,8 $ng.mL^{-1}$), principal metabólito da cocaína, e éster metílico anidroecgonina (AEME) na concentração de 9,5 $ng.mL^{-1}$ e anidroecgonina (AEC) na concentração de 9,8 $ng.mL^{-1}$, biomarcadores do crack.

Tabela 3: Principais técnicas analíticas propostas para análise de drogas de abuso em leite humano.

Analitos	Amostra	Análise	Preparo de amostra	Recuperação	LD	LIQ	Referência
18 substâncias lícitas e ilícitas	Leite materno (500µL)	CL-EM/EM	LLE (500µL MeOH) + SPE (Eluição 2mL MeOH / 2 mL DCM: IPA 80:20 v/v)	71.1-86.5%	1.0 – 3.0 $ng.mL^{-1}$	5.0 - 10$ng.mL^{-1}$	Marchei *et al*, 2011.
BUP, NBUP	Leite materno (950µL)	CG-EM	PP (3mL acetonitrila) + SPE (Eluição 1.5 mL DCM: IPA: NH_4OH 85:15:2, v/v/v).	87.3%	0.07 $µg.mL^{-1}$	0.20 $µg.mL^{-1}$	Nikolaou *et al*, 2012.
COC, BZE, AME, AEG	Colostro (500µL)	CL-EM	PP (300µL acetonitrila com 0.1% ácido fórmico)	nr	2.5 -3.0 $ng.mL^{-1}$	5.0 $ng.mL^{-1}$	D'Avila et al, 2015.
THC, CBD, CBN	Leite materno (50µL)	CG-EM	HS-SPME (aquecimento a 70°C, 40min de exposição à fibra de PDMS)	nr	10$ng.mL^{-1}$	20 $ng.mL^{-1}$	Silveira *et al*, 2016.
10 substâncias psicoativas e seus metabólitos	Leite materno (500µL) e cabelo	CL-EM/EM	LLE (500µL MeOH) + SPE (Eluição 2mL MeOH / 2 mL DCM: IPA 80:20 v/v)	71.1-86.5%	1.0 – 3.0 $ng.mL^{-1}$	5.0 - 10$ng.mL^{-1}$	Escuder-Vieco *et al*, 2016.
COC, CE, NCOC	Leite materno (500µL)	CG-EM	LPME (fase doadora tampão borato pH 9.0, fase aceptora HCl 0.4M)	32-67.4%	6$ng.mL^{-1}$	12$ng.mL^{-1}$	Silveira *et al*, 2016.
40 substâncias psicoativas	Leite materno e bovino (500µL)	CL-EM/EM	PP (500µL MeOH)	80-120%	0.1 – 0.4 $ng.mL^{-1}$	3.8 – 6.8$ng.mL^{-1}$	López-Garcia *et al*, 2018.
ANF, MA, MDA, MDMA, MDEA	Leite materno, fluido oral, urina, sérum, suor (900µL) cabelo e unhas (50mg)	CL-EM/EM	SUPRAS-LLE (200µL hexanol + 900µL tetrahidrofurano)	88-113%	nr	5.0$ng.mL^{-1}$	Accioni *et al*, 2018.

nr – não reportado. Fonte: autoria própria (2022).

Abreviações: LD, limite de detecção; LIQ, limite inferior de quantificação; MeOH, methanol; DCM, dichloromethane; IPA, isopropanol; BUP, buprenorfina; NBUP, norbuprenorfina; PP, precipitação proteica; COC, cocaína; BZE, benzoilecgonina; AME (inglês), éster metil anidroecgogina; AEG (inglês), anidroecgonina; THC, Δ(9)-tetrahidrocanabinol; CBD, canabidiol; CBN, canabinol; HS-SPME (inglês), microextração em fase sólida acoplada com headspace; CE, cocaetileno; NCOC, norcocaína; LPME (inglês), microextração em fase líquida; ANF, anfetamina; MA, metanfetamina; MDA, 3,4-metilenodioxianfetamina; MDMA, 3,4-metilenodioxi-metanfetamina; MDEA, N-ethyl-3,4-methylenedioxyamphetamine; SUPRAS, solvente supramolecular;

1.7 OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA EXPERIMENTAL

O método de otimização univariado é classificado como um método sequencial, também conhecido como método do fator único ou estratégia “um-fator-de-cada-vez”. Neste método, os fatores avaliados são fixados em um certo nível, com exceção de um, que é, então, variado para obter a melhor resposta, passando então esta condição a ser fixada e um novo fator sofre variação (EIRAS; COSCIONE; ANDRADE, 2018). Esse método foi tradicionalmente empregado em otimização de processos, e sua maior desvantagem é que o efeito da interação das variáveis estudadas não é avaliado já que a resposta obtida é relacionada apenas ao único parâmetro variado, além do grande número de experimentos necessários para otimizar todos os fatores de um procedimento, envolvendo o consumo excessivo de reagentes e solventes (BEZERRA et al., 2008).

A otimização multivariada é uma tendência em química analítica, a qual utiliza uma abordagem sistemática para entender como os parâmetros envolvidos em um determinado processo estão relacionados às respostas estudadas. No planejamento experimental (em inglês “*Design of Experiments”, DoE*), são utilizados modelos matemáticos para definir a importância das variáveis de um processo e como controlá-las à fim de otimizar o desempenho do sistema e maximizar os resultados, utilizando um número reduzido de experimentos. Um planejamento “de triagem” geralmente corresponde a delineamentos fracionários, onde são realizadas combinações entre os níveis de dois ou mais fatores, usando um número menor de medidas (RODRIGUES; IEMMA, 2005). Este tipo de procedimento é utilizado para selecionar as variáveis mais importantes para o processo e, em seguida, essas variáveis são otimizadas, obtendo-se um modelo matemático (superfície de

resposta) que indica os valores ótimos para o experimento em questão (MARTINS FUKUDA et al., 2018).

Dentre as diferentes metodologias utilizadas para seleção de variáveis, o *Plackett-Burman* é indicado quando há mais de cinco parâmetros envolvidos no processo em desenvolvimento. Tais parâmetros (variáveis), são variados simultaneamente dentre os experimentos e avaliados em um nível de maior magnitude, simbolizado por +1, e um nível menor, -1. Para verificar a reprodutibilidade do método e calcular o erro experimental, é recomendado realizar no mínimo três experimentos no nível intermediário (ou central, indicado por 0) (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

E para a otimização de variáveis estatisticamente significativas de um processo, o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) é um planejamento experimental onde são realizados ensaios em 5 níveis, os quais são calculados para abranger toda a região de estudo (MARTINS FUKUDA et al., 2018). Este planejamento possibilita avaliar qual o efeito de cada variável envolvida e a relação entre elas. Além disso, também é possível elaborar um modelo matemático que gera uma superfície de resposta e, através de sua análise, determina-se as condições ótimas do processo (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Investigar a presença de drogas psicoativas e seus metabólitos em amostras de leite humano.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I. Desenvolver e validar um método analítico para a investigação de cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, nicotina, cotinina, morfina, metadona, anfetamina, metanfetamina, metilenodioximetanfetamina em amostras de leite humano utilizando cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas;

II. Aplicar o método desenvolvido e validado em amostras de leite materno coletadas do Banco de Leite do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HC-FMRP);

III. Avaliar a correlação entre as informações obtidas a partir do questionário aplicado às mães participantes do projeto e das análises das amostras de leite realizadas.

ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

3. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Com a devida aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), foram coletadas 67 amostras de leite humano provenientes de doações realizadas ao Banco de Leite do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.

Atendendo à Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, este projeto foi encaminhado e aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CAAE número: 10539719.0.0000.54), da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (CAAE número: 10539719.0.3001.5407) e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CAAE número: 10539719.0.3002.5440). Os pareceres de aprovação estão apresentados no Anexo III.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Os padrões analíticos certificados de cocaína (COC), benzoilecgonina (BEZ), cocaetileno (CE), nicotina (NIC), cotinina (COT), morfina (MORF), metadona (MET), 6-monoacetilmorfina (6-MAM), anfetamina (ANF), metanfetamina (MA), metilenodioximetanfetamina (MDMA) e os padrões internos deuterados de cocaína (COC-D_3), codeína (COD-D_6), ketamina (KET-D_4) anfetamina (ANF-D_{11}) foram obtidos da Cerilliant (EUA) na concentração de 1 $mg.mL^{-1}$.

Metanol, acetonitrila, diclorometano e acetato de etila foram obtidos da JT Baker, 2-propanol e hidróxido de amônio da Mallinkrodt, ácido orto-fosfórico da Merck e N-trimetil-N-metil trifluoroacetamida (MSTFA) da Sigma-Aldrich.

4.2 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

Para realização das etapas de preparo de amostra, foram utilizadas ponteiras de extração em fase sólida DPX de fase adsorvente do tipo CX-1 da Gerstel (EUA). Para realização das análises cromatográficas, foi utilizado cromatógrafo em fase gasosa série 7890A, com amostrador automático 7693, acoplado ao espectrômetro de massas 5975C da Agilent, com coluna capilar DB-5 (30 metros de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e 250µm de espessura de filme), cilindro de gás Hélio 5.0 e seringa de injeção líquida de 10 µL (Agilent, EUA). Além destes, evaporador de solvente a fluxo de N_2 Caliper LifeScience, bloco de aquecimento “dry block” TE-021 da Tecnal, Turbo Vap da LP, agitador TE-140 da Tecnal, vórtex AP-56 da Phoenix, centrífuga universal 32 (Hettich, Alemanha) e balança analítica BL 1500S da Sartorius (EUA).

4.3 PREPARO DE SOLUÇÕES E REAGENTES

4.3.1 Soluções padrão

As soluções padrão adquiridas de cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, nicotina, cotinina, morfina, metadona, anfetamina, metanfetamina, metilenodioximetanfetamina, cocaína deuterada, codeína deuterada, ketamina deuterada, metadona deuterada e anfetamina deuterada de 1 $mg.mL^{-1}$ foram diluídas para fazer soluções padrão de trabalho. As diluições foram realizadas utilizando 1000 µL do conteúdo das ampolas de 1 $mg.mL^{-1}$, que foram transferidos para balão volumétrico de 10 mL e o volume do balão completado com o solvente adequado, resultando na concentração final de 100 $µg.mL^{-1}$.

Em seguida, *pools* dos analitos cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, nicotina, cotinina, morfina, metadona, anfetamina, metanfetamina e metilenodioximetanfetamina foram preparado na concentração de 10 e 1 $µg.mL^{-1}$ utilizando um balão volumétrico de 10 mL. Um *pool* com os padrões internos deuterados de cocaína, anfetamina, metadona, codeína, cetamina na concentração de 1 $µg.mL^{-1}$ também foi preparado.

4.3.2 Solução de ácido fosfórico

Foram pipetados 57,3 µL de ácido fosfórico 85% (v/v) e adicionados em um béquer com 500 µL de água deionizada. A solução foi então transferida para um balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com água deionizada, resultando na concentração final de 0,1 $mol.L^{-1}$.

4.3.3 Solução de acetonitrila

A solução de acetonitrila é utilizada para condicionamento da fase sólida CX-1 das ponteiras DPX. Foram transferidos 30 mL de acetonitrila para um balão volumétrico de 100 mL e então o volume foi completado com água deionizada, resultando na concentração final de 30% (v/v).

4.3.4 Solução de metanol

A solução de metanol é utilizada para lavagem da fase sólida. Foram transferidos 70 mL de metanol para um balão volumétrico de 100 mL e então o volume foi completado com água deionizada, resultando na concentração final de 70% (v/v).

4.3.5 Solução extratora

Para a eluição dos analitos da fase sólida, foi utilizada uma solução extratora de diclorometano, isopropanol e hidróxido de amônio. Para isto, foram adicionados 390 mL de diclorometano em um balão volumétrico de 500 mL; em seguida, 100 mL de isopropanol e então o volume foi completado com 10 mL de hidróxido de amônio, resultando na proporção de 78:20:2 (v/v).

4.4 MÉTODOS

4.4.1 Desenvolvimento da metodologia de preparo de amostra

4.4.1.1 Precipitação proteica (PP) – *Clean-up*

Devido ao alto conteúdo lipoproteico do leite, foi adicionada a etapa de clean-up ao procedimento de preparo de amostra para reduzir a presença de interferentes durante a extração. Esta etapa consistiu na adição de 2,5mL de acetonitrila a 1mL de leite fortificado previamente com 100 µL de um *pool* de analitos na concentração de 1000 ng.mL^{-1} e com 200 µL de um *pool* dos padrões internos também na concentração de 1000 ng.mL^{-1}, conforme o fluxograma na Figura 3.

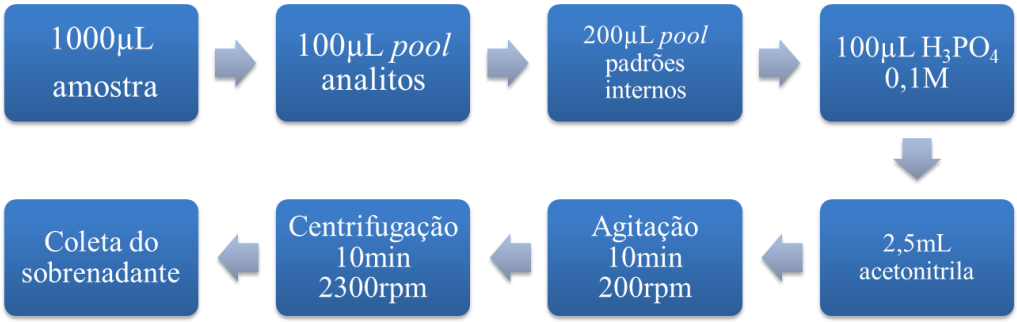


Figura 3: Procedimento de *clean-up.* Fonte: autoria própria (2022).

4.4.1.2 *Disposable Pipette Extraction* (DPX)

O método de extração e pré-concentração dos analitos foi desenvolvido e otimizado a partir do método proposto por BORDIN (2013). O procedimento está esquematizado no fluxograma abaixo (FIGURA 4).

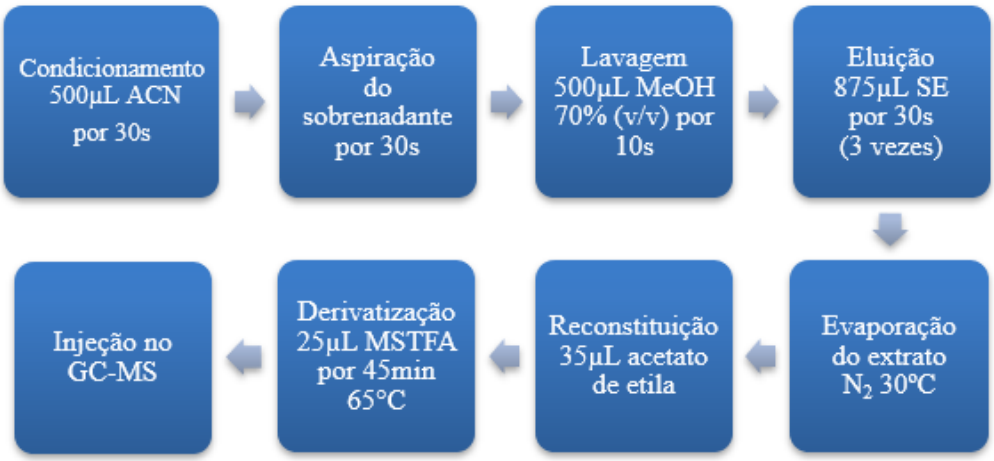


Figura 4: Procedimento de extração e pré-concentração dos analitos otimizado. Fonte: autoria própria (2022).

Abreviações: ACN, acetonitrila; MeOH, metanol; SE, solução extratora; MSTFA, N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida.

A etapa de DPX foi realizada no aparato da Figura 5, onde oito entradas são conectadas por mangueiras plásticas a seringas presas em uma alavanca manual. Ao posicionar as ponteiras nas entradas e movimentar a alavanca, o ar pode ser retirado do interior das ponteiras, movimentando a fase sólida dispersa e o conteúdo aspirado. Esse aparato possibilita que até oito extrações sejam realizadas simultaneamente.

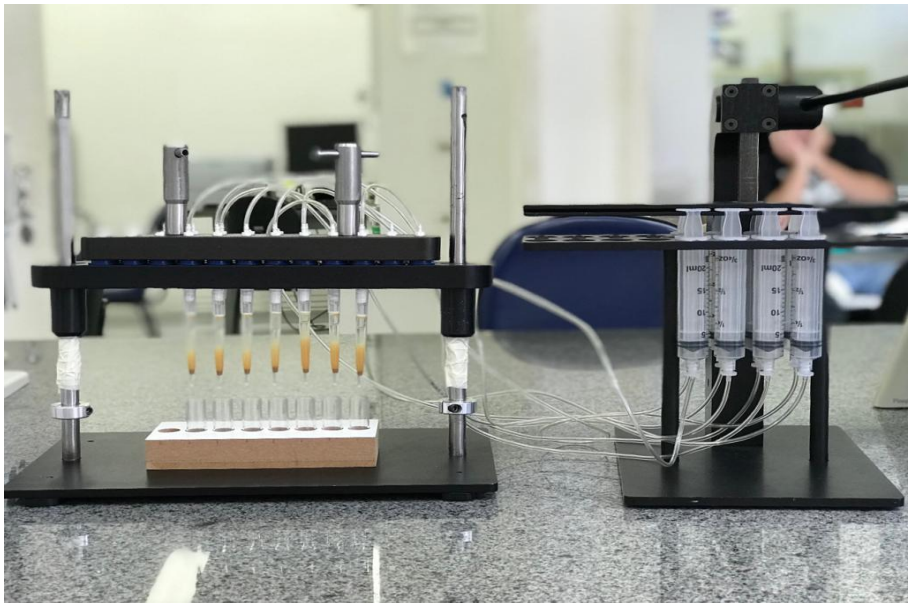


Figura 5: Aparato utilizado para DPX. Fonte: autoria própria (2022).

4.4.1.3 Otimização univariada

A escolha do solvente de condicionamento da ponteira DPX foi feita de forma univariada, para que o solvente escolhido pudesse ser otimizado em termos de volume nas etapas de otimização seguintes. Para isso, foram realizados dois ensaios em triplicada utilizando acetonitrila e solução aquosa de acetonitrila 30% (v/v). Foi feita a média dos valores de área de cada analito nas replicatas e então os valores foram somados para expressar área total, utilizada como parâmetro de avaliação para escolha do solvente mais adequado.

Posteriormente, a escolha do solvente de lavagem foi realizada da mesma maneira. Nesta otimização, foi avaliada a melhor detectabilidade dos analitos comparando a maior área total obtida entre metanol e solução aquosa de metanol 70% (v/v).

Outros solventes e soluções não foram avaliados para estas etapas pois BORDIN (2013) já havia realizado esta otimização em seu trabalho. O intuito de avaliar a eficiência das soluções dos solventes foi utilizar menores quantidades de

solventes orgânicos tóxicos por extração realizada, a fim de reduzir a quantidade descartada no meio ambiente.

4.4.1.4 Otimização multivariada

As condições de preparo de amostra de volume de amostra, volume de solvente para *clean-up*, tempo de equilíbrio de sorção (aspiração e despejo da amostra), volume de solvente de condicionamento, volume de solvente de lavagem, volume de solução extratora e número de ciclos de eluição foram otimizadas de forma multivariada. Desta forma, os resultados das condições de preparo são analisados simultaneamente através do DoE, que trata resultados através de modelos matemáticos estatísticos permitindo manipulação, interpretação e previsão de dados. Isto garante que o tratamento dos dados experimentais obtenha a maior quantidade de informação (PACK, 1991).

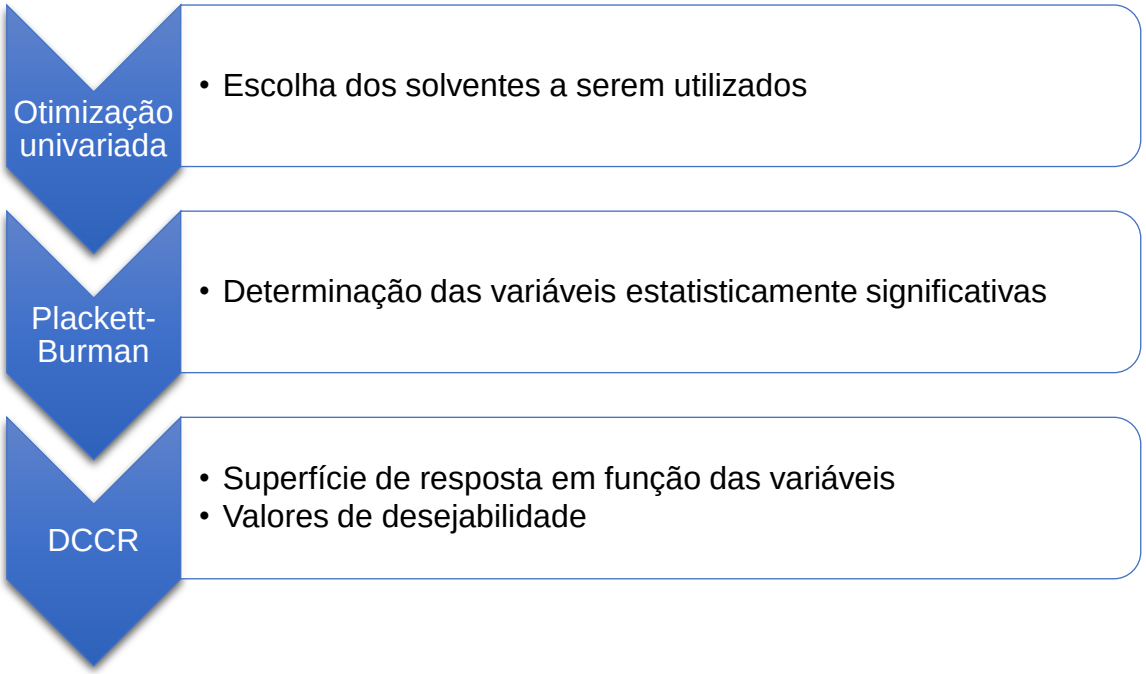


Figura 6: Ensaios realizados para otimização do procedimento de preparo de amostra.

Fonte: autoria própria (2022).

4.4.1.4.1 Plackett-Burmann (PB)

Um ensaio Plackett-Burman de 12 experimentos foi realizado para identificação das variáveis estatisticamente significativas no preparo da amostra (TABELA 5). As variáveis foram exploradas em três condições diferentes, codificadas como -1, 0 e 1 (TABELA 4). Para todos os experimentos a concentração dos analitos foi de 100 $ng.mL^{-1}$. O resultado de cada experimento foi expresso pela média geométrica dos valores de área de cada analito e o grau de confiança estabelecido foi de 90% (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

Tabela 4: Condições das variáveis avaliadas no PB12.

Variáveis	Codificação	-1	0	1
Volume de Amostra (µL)	x1	500	750	1000
Tempo de equilíbrio de sorção (s)	x2	10	30	50
Volume do solvente de condicionamento (µL)	x3	500	750	1000
Volume do solvente de lavagem (µL)	x4	500	750	1000
Volume do solvente de eluição (µL)	x5	500	750	1000
n° de ciclos de eluição (µL)	x6	1	3	5
Volume de ACN (µL)	x7	1000	2000	3000

Fonte: autoria própria (2022).

Tabela 5: Matriz de experimentos do PB12.

Experimento	x1	x2	x3	x4	x5	x6	x7
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1
4	1	-1	1	1	-1	1	-1
5	1	1	-1	1	1	-1	1
6	1	1	1	-1	1	1	-1

7	-1	1	1	1	-1	1	1
8	-1	-1	1	1	1	-1	1
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1
10	1	-1	-1	-1	1	1	1
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
13	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0

Fonte: autoria própria (2022).

4.4.1.4.2 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Para otimização das variáveis estatisticamente significativas através da obtenção de superfície de resposta e valores de desejabilidade, um DCCR de 10 experimentos foi realizado. Neste ensaio, as variáveis foram exploradas em cinco condições diferentes, presentes na Tabela 6. Os experimentos realizados são apresentados na Tabela 7. Neste ensaio, as concentrações dos analitos também foram mantidas em 100 $ng.mL^{-1}$ e o intervalo de confiança estabelecido foi de 95% (RODRIGUES; IEMMA, 2014). Os resultados também foram expressos pela média geométrica dos valores de área dos picos referentes a cada analito.

Tabela 6: Condições das variáveis exploradas no DCCR realizado.

Variável	**Código**	**-1,41**	**-1**	**0**	**1**	**1,41**
Tempo de equilíbrio de sorção (s)	x1	10	16	30	44	50
Volume de solvente de eluição (µL)	x2	500	575	750	925	1000

Fonte: autoria própria (2022).

Tabela 7: Matriz de experimentos realizados no DCCR.

Ensaio	T (seg)	VE (uL)
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	-1,41	0
6	1,41	0
7	0	-1,41
8	0	1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0

Fonte: autoria própria (2022).

4.4.2 Condições cromatográficas

As Tabelas 8 e 9 apresentam as condições do método desenvolvido e validado no CG-EM.

Tabela 8: Condições cromatográficas do CG-EM.

Parâmetro instrumental	
Modo de injeção	*Splitless*
Temperatura do injetor	280°C
Gás de arraste	Hélio (1mL/min)
Programação do forno	
Temperatura inicial	90 °C
Temperatura final	290 °C
Atraso do solvente	5 min
Taxa de aquecimento	10 °C/min até 180 °C

	15 °C/min até 290 °C
Tempo de permanência	1 min
Tempo total de análise	19,34 min

Fonte: autoria própria (2022).

Tabela 9: Parâmetros do espectrômetro de massas *single quadrupole*.

Parâmetro instrumental	
Modo de aquisição	*Single Ion Monitoring (SIM)* - 70eV
Temperatura de interface	280°C
Temperatura do quadrupolo	150°C
Temperatura de linha de transferência	230°C

Fonte: autoria própria (2022).

Para detecção e quantificação dos analitos, foram monitoradas 3 fragmentações características de cada um no modo SIM. Os íons qualificadores e quantificadores são especificados na Tabela 10.

Tabela 10: Íons selecionados para identificação e quantificação dos analitos e padrões internos e seus respectivos tempos de retenção.

Analitos	**Íons identificadores (m/z)***	**Tempo de retenção (min)**	**Padrão interno**
ANF-D_{11}	98, 104, **120**	6,93	-
ANF	91, **116**, 192	7,00	ANF-D_{11}
NIC	**84**, 133, 162	7,63	KET-D_4
MA	91, **130**, 206	8,02	ANF-D_{11}
COT	**98**, 118, 176	12,12	KET-D_4
MDMA	**130**, 135, 250	12,19	ANF-D_{11}
KET-D_4	156, **184**, 213	13,87	-
MET-D_3	**72**, 165, 179	16,20	-
MET	72, 165, **294**	16,20	MET-D_3

COC-D_3	**85**, 185, 306	16,62	-
COC	**82**, 182, 303	16,62	COC-D_3
CE	82, 105, **196**	17,13	COC-D_3
BZE	82, 105, **240**	17,13	COC-D_3
COD-D_6	**184**, 202, 377	18,18	-
MORF	**236**, 414, 429	18,43	COD-D_6

*Íons em negrito foram utilizados para quantificação.

Fonte: autoria própria (2022).

Abreviações: ANF – anfetamina; NIC – nicotina; MA – metanfetamina; COT – cotinina; MDMA – metilenodioximetanfetamina; MET – metadona; COC – cocaína; CE – cocaetileno; BZE – benzoilecgonina; MORF – morfina.

4.4.3 Validação de método bioanalítico

A validação do método foi realizada baseado nas preconizações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) apresentadas na Resolução de Diretoria Colegiada nº 27 de 17 de maio de 2012 para Validação de Métodos “Bioanalíticos” e no Guia de Práticas para Validação de Métodos em Toxicologia Forense do Grupo de Trabalho Científico para Toxicologia Forense (SWGTOX) (SWGTOX, 2013; ANVISA, 2012). Os parâmetros avaliados são apresentados a seguir.

4.4.3.1 Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ) e Controles de Qualidade (CQ)

Os limites do método foram determinados de forma empírica (ARMBRUSTER; TILLMAN; HUBBS, 1994). O Limite de Detecção (LD) é a menor concentração de analito presente na amostra que pode ser diferenciada do ruído instrumental e identificada pelo método analítico com coeficiente de variação (CV%) de no máximo 20%. O Limite Inferior de Quantificação (LIQ) é a menor concentração presente na

amostra fortificada que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, isto é, com coeficiente de variação (CV%) de no máximo 15%. O Limite Superior de Quantificação (LSQ) é a maior concentração do analito na curva de calibração preparada. O Controle de Qualidade de Baixa concentração (CQB) é a concentração do analito na curva de calibração até três vezes maior que o LIQ. O Controle de Qualidade de Média (CQM) concentração é a concentração do analito na curva de calibração próxima à média dos valores de LIQ e LSQ. O Controle de Qualidade de Alta concentração (CQA) é a concentração do analito na curva de calibração que represente entre 75 e 95% do LSQ (ANVISA, 2012).

4.4.3.2 Linearidade

É a capacidade do método em obter resultados de área diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra em uma determinada faixa de concentrações. É avaliada através da construção de curvas de calibração com, no mínimo, 6 concentrações diferentes e de 2 a 8 replicatas por concentração. Utilizando o método de padronização interna, a relação matemática entre a resposta analítica (área relativa) e a concentração do analito em um modelo linear é descrita pela equação da reta:

$$y = ax + b$$

Onde:

y = resposta medida (área do pico)

x = concentração

a = inclinação da reta (sensibilidade)

b = intersecção no eixo y (x = 0)

Neste estudo, a linearidade foi avaliada entre LIQ e LSQ com três CQs. Foram analisadas 8 concentrações diferentes ao longo da faixa (5, 15, 45, 100, 200, 250, 450, e 500 ng/mL) com 7 replicatas por concentração.

O coeficiente de correlação (R) das curvas foram avaliados, assim como a variação do desvio padrão em função da concentração pelo teste de homocedasticidade dos dados através do teste F. O Teste de Homocedasticidade é feito pelo cálculo da razão das variâncias obtidas nos níveis de concentração mais alto e mais baixo da faixa de trabalho; quando a variância é constante, os resíduos estão dispersos em torno do eixo x e $F_{calculado}$ é menor que $F_{tabelado}$ determinado pelo grau de liberdade do ensaio.

Em seguida, empregou-se o Método dos Mínimos Quadrados Ponderados para reduzir os desvios do modelo linear. Neste método, utiliza-se a Regressão Linear Ponderada (RLP), onde são testados coeficientes de ponderação (w) 1/x, $1/x^2$, $1/x^{1/2}$, 1/y, $1/y^2$, $1/y^{1/2}$ sobre os dados do modelo linear. O coeficiente de ponderação (w) é escolhido de acordo com a menor somatória de erros relativos (ER%).

4.4.3.3 Precisão

A precisão avalia a proximidade dos resultados obtidos quando o procedimento é aplicado diversas vezes em uma mesma amostra homogênea sob as mesmas condições de ensaio (ANVISA, 2012). A precisão representa o grau de dispersão dos resultados e, determina, assim, a repetibilidade do método. A precisão do método foi avaliada pela proximidade dos resultados obtidos de cinco replicatas de três pontos da curva (CQB, CQM e CQA) analisadas consecutivamente (precisão

intra-dia) e em três dias diferentes (precisão inter-dia). Foi expressa como coeficiente de variação (CV%), onde o CQB deve apresentar valores inferiores a 20% e os demais CQs até 15%.

4.4.3.4 Exatidão

A exatidão avalia a proximidade e o grau de concordância dos resultados obtidos da análise em relação ao valor verdadeiro. A exatidão do método foi avaliada pela proximidade dos resultados em quintuplicata dos pontos de CQB, CQM e CQA. Foi calculado o Erro Relativo (ER%) entre a concentração média, obtida pela conversão dos valores de área através da equação de regressão linear ponderada, e a concentração teórica. O valor de ER para CQB não deve exceder a faixa de ±20% (exatidão entre 80 e 120%), enquanto CQM e CQA não devem exceder ±15% (exatidão entre 85 e 115%).

4.4.3.5 Recuperação

A recuperação avalia a eficiência do preparo de amostra empregado para a extração e pré-concentração dos analitos pela comparação da resposta analítica dos pontos CQB, CQM e CQA com a resposta analítica dos analitos em solução padrão não extraída, que representa 100% de recuperação. Altas porcentagens de recuperação são desejáveis, porém não obrigatórias, desde que valores menores ainda sejam precisos e exatos.

4.4.3.6 Seletividade

A seletividade é a capacidade do método de identificar e quantificar os analitos com ou sem a presença de interferentes. A seletividade do método foi avaliada pela variação dos resultados obtidos para os analitos no LIQ quando na presença de interferentes exógenos em alta concentração (1000 $ng.mL^{-1}$). A resposta dos interferentes próximos ao tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% da resposta dos analitos no LIQ e 5% da resposta do PI quando próximos ao tempo de retenção dele. Os interferentes analisados foram: dipirona, cafeína, lidocaína, sertralina, fluoxetina, clonazepam alprazolam, lorazepam e femproporex.

4.4.3.7 Estabilidade

Esse parâmetro avalia o comportamento do analito nas condições exigidas durante todo processo analítico na matriz biológica e na solução de trabalho. Para a avaliação, foram empregadas “amostras branco” fortificadas nas concentrações de CQB e CQA (em triplicata). A estabilidade na matriz biológica é demonstrada quando não se observar desvio superior a 15% da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal, sendo estas determinadas por meio da curva de calibração preparada. As soluções serão consideradas estáveis quando não se observar desvio superior a 10% de suas respostas em comparação com as respostas das soluções recém-preparadas. Os ensaios de estabilidade realizados foram:

- Estabilidade de curta duração: as amostras foram mantidas à temperatura ambiente durante 9 horas, sendo analisadas em seguida;

- Estabilidade de longa duração: as amostras foram mantidas a -20 °C por três meses, sendo analisadas em seguida;
- Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento: as amostras foram congeladas e mantidas a -20 °C, sendo, então, descongeladas no dia seguinte e congeladas novamente; este ciclo foi feito três vezes, para simular o tratamento de uma amostra real desde à coleta até a análise;
- Estabilidade pós-processamento: as amostras foram mantidas à temperatura ambiente controlada (22 ± 2 ºC) durante o tempo de análise de toda a curva de calibração, sendo analisadas em seguida;
- Estabilidade das soluções–padrão: os resultados das análises de soluções de trabalho foram comparados entre o momento em que foram preparadas e três dias após o preparo.

4.4.3.8 Efeito Residual (*Carryover*)

O *carryover* é o efeito gerado pelo aparecimento ou aumento do sinal do analito ou PI causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente. Esse parâmetro foi avaliado injetando uma amostra branco antes e duas após a injeção de uma amostra no LSQ. As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras processadas do LIQ. As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do PI devem ser inferiores a 5 % da resposta do PI.

4.4.4 Coleta de amostras reais

O recebimento do leite coletado foi feito pelos profissionais do Banco de Leite, tendo 67 amostras provenientes de doadoras ativas no Banco de Leite, mães que já passaram por anamnese e exames sorológicos de forma a serem classificadas como aptas a doação. As mães doadoras realizam a retirada de leite a domicílio, sendo este então entregue aos profissionais do banco.

As amostras foram identificadas com código para não revelar a identidade da mãe ao pesquisador, porém, sendo possível correlacionar informações obtidas a partir do questionário que o Banco de Leite requer (como gênero, faixa etária, nível de escolaridade, histórico de uso de drogas, classe social, dentre outros fatores demográficos) com os resultados das análises, em casos positivos. Após a coleta, as amostras foram transferidas para frascos de polipropileno e armazenadas em refrigerador a -20ºC até o momento das análises.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO

Na Figura 7 está representada a separação e detecção dos analitos e padrões internos na coluna cromatográfica DB-5 nas condições citadas na *Seção 4.4.2* para realizar a validação do método.

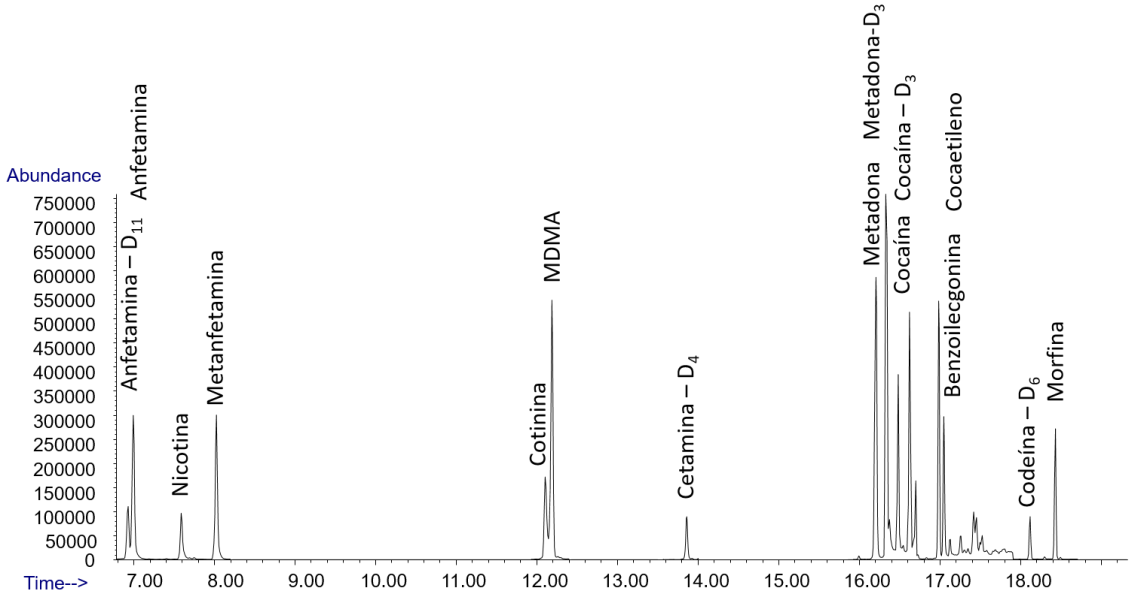


Figura 7: Cromatograma obtido da análise de *pool* de analitos e padrões internos na concentração de 500 ng.mL^{-1}. Fonte: autoria própria (2022).

Na Figura 8 está representado o resultado da análise do extrato de uma "amostra branco" de leite materno fortificada com os analitos na concentração de 500 ng.mL^{-1} e padrões internos em 200 ng.mL^{-1}. Na Figura 9 são mostrados os íons utilizados para quantificação. Os cromatogramas de íons identificadores de cada analito e padrão interno estão compilados no *Anexo I.*

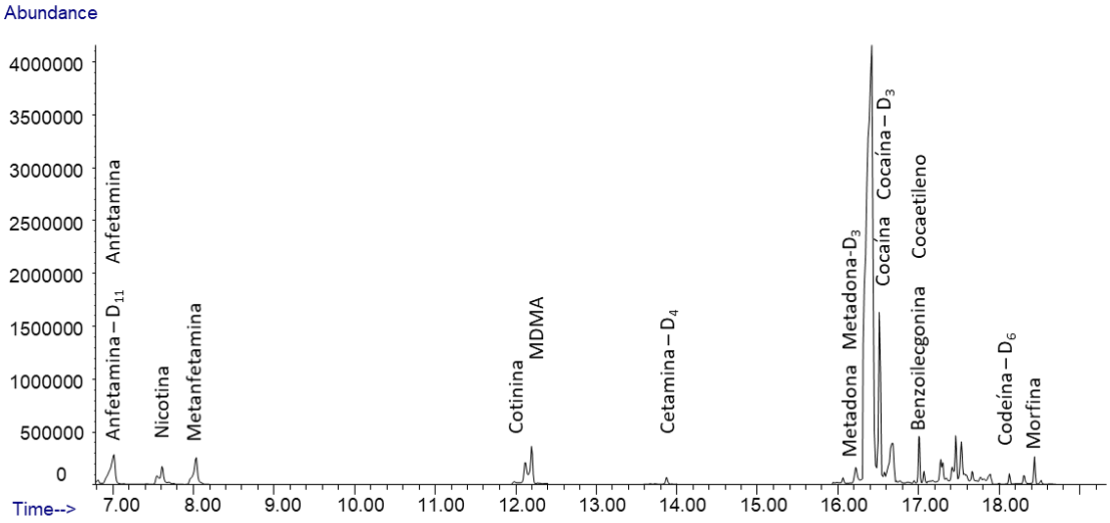


Figura 8: Cromatograma obtido da análise de “amostra branco” de leite materno fortificada com analitos (500 ng.mL^{-1}) e padrões internos (200 ng.mL^{-1}). Fonte: autoria própria (2022).

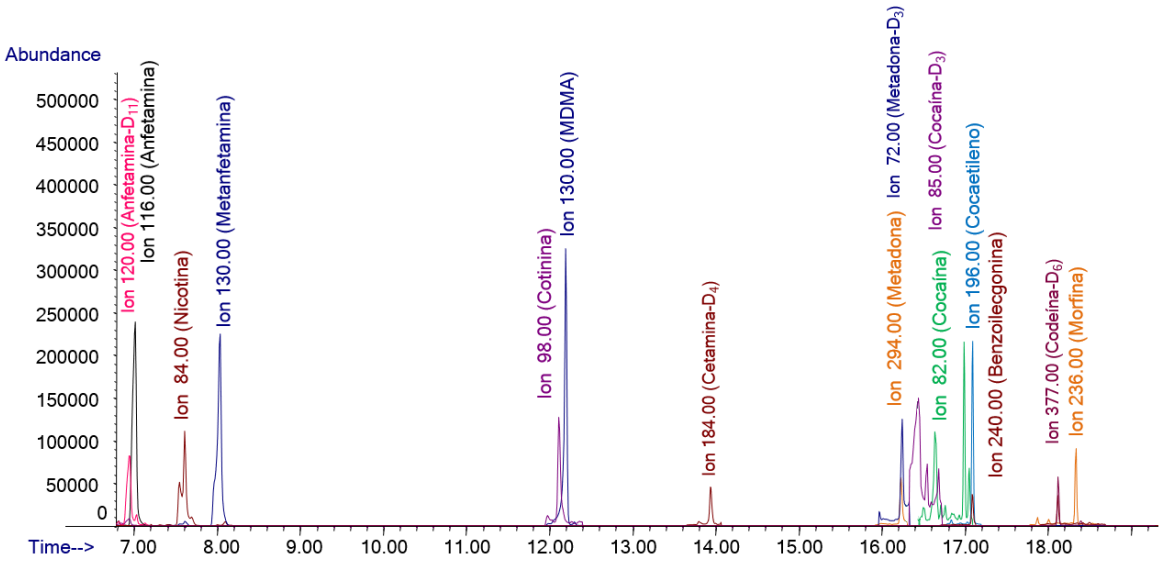


Figura 9: Cromatograma de íons utilizados para quantificação de substâncias psicoativas em leite materno. Analitos na concentração de 500 ng.mL^{-1} e padrões internos 200 ng.mL^{-1}. Fonte: autoria própria (2022).

5.1.1 Otimização Univariada

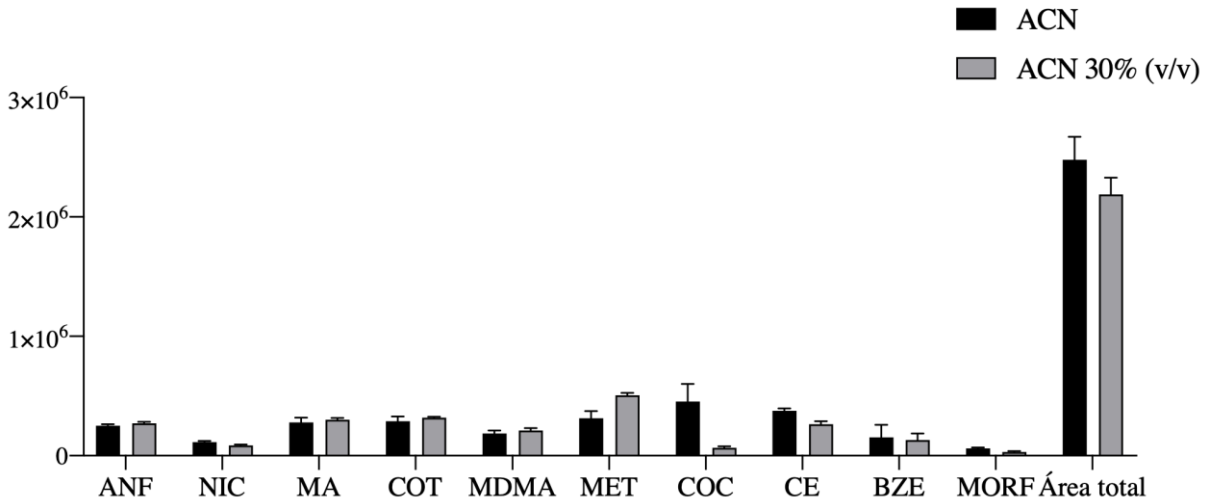


Figura 10: Valores médios (triplicata) de área dos picos dos analitos utilizando acetonitrila (em verde) e solução de acetonitrila 30% (em azul) como solvente de condicionamento da ponteira DPX.

Fonte: autoria própria (2022). *Abreviações: ACN – Acetonitrila; ANF – anfetamina; NIC – nicotina; MA – metanfetamina; COT – cotinina; MDMA – metilenodioximetanfetamina; MET – metadona; COC – cocaína; CE – cocaetileno; BZE – benzoilecgonina; MORF – morfina.*

Considerando os resultados apresentados na Figura 10, o solvente de condicionamento da ponteira escolhido foi a acetonitrila, que apresentou o maior valor de área média total. Observou-se que a acetonitrila apresentou valor médio de área do analito cocaína (na figura, COC) seis vezes maior em relação à solução de acetonitrila, sendo o analito com maior discrepância de valores, embora a solução de acetonitrila tenha gerado maiores valores para alguns analitos, como as anfetaminas, cotinina e metadona.

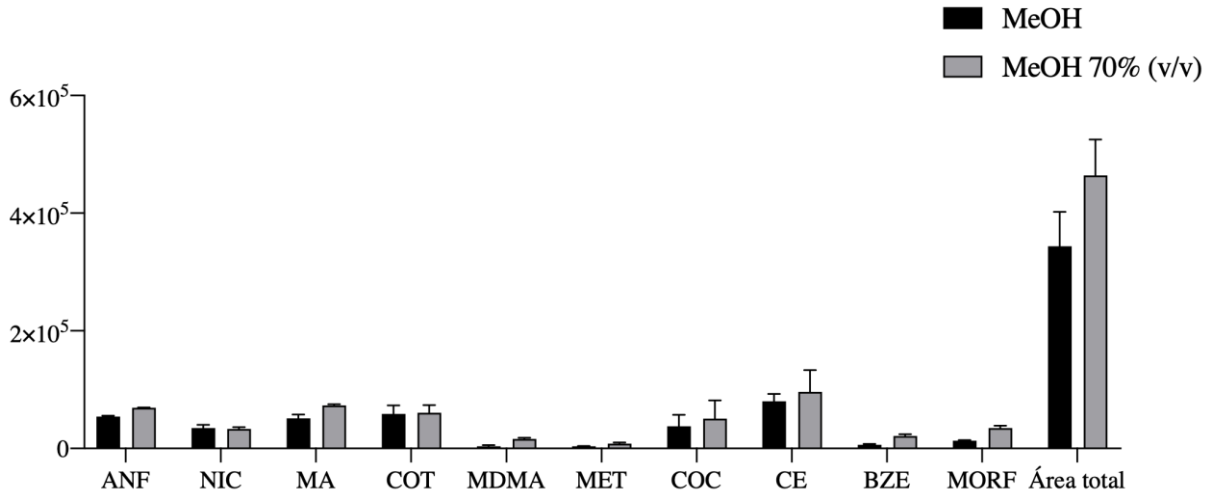


Figura 11: Valores médios de área dos picos dos analitos ao utilizar metanol (em azul) e solução metanólica (em laranja) como solvente de lavagem da ponteira DPX. Fonte: autoria própria (2022). *Abreviações: ANF – anfetamina; NIC – nicotina; MA – metanfetamina; COT – cotinina; MeOH – metanol; MDMA – metilenodioximetanfetamina; MET – metadona; COC – cocaína; CE – cocaetileno; BZE – benzoilecgonina; MORF – morfina.*

Os resultados expressos na Figura 11 indicam a maior detectabilidade dos analitos utilizando a solução metanólica para a etapa de lavagem da fase da ponteira. Neste caso, acredita-se que a presença de água não interfira na estabilidade da interação dos analitos carregados positivamente com os grupos carregados negativamente da fase sólida. A única exceção é a cotinina (no gráfico, COT), que possui valor médio de área relativamente maior com o metanol puro.

Soluções do solvente com diferentes porções de água além da citada na otimização foram testadas para a etapa de lavagem, porém estas apresentaram alguns erros, como floculação da fase dispersa durante a lavagem e elevação da linha de base no cromatograma. Para a etapa de condicionamento, apenas acetonitrila 30% (v/v) foi testada.

Os parâmetros aqui citados foram otimizados previamente de forma univariada pois os experimentos da seção seguinte são ensaios de otimização de

várias variáveis simultaneamente que exploram variações de uma condição singular, isto é, não são apropriados para escolher diferentes tipos de solventes, mas sim para apontar o volume do solvente utilizado que contribui para um valor “ótimo” de resposta.

5.1.2 Otimização Multivariada

5.1.2.1 Plackett-Burman

A Figura 12 apresenta o diagrama de Pareto das variáveis avaliadas estatisticamente. Duas variáveis foram estatisticamente significativas: o volume de amostra e o volume de solução de eluição. Isto é, a variação dos volumes produz uma variação superior ao grau de confiança estabelecido para este ensaio (90%). De fato, o volume de amostra interfere diretamente na detectabilidade dos analitos, e o volume de SE está ligado à capacidade de dessorção dos analitos da fase sólida, sendo estas etapas de grande importância no preparo de amostra. Observa-se também a significância do número de ciclos de eluição e do tempo de sorção dos analitos (amostragem), mas que não ultrapassa o grau de confiança do ensaio. Ainda, observa-se que o tempo (na figura, por “T”) apresentou valor negativo, o que indica que menores intervalos de tempo possivelmente gerariam maiores valores de área.

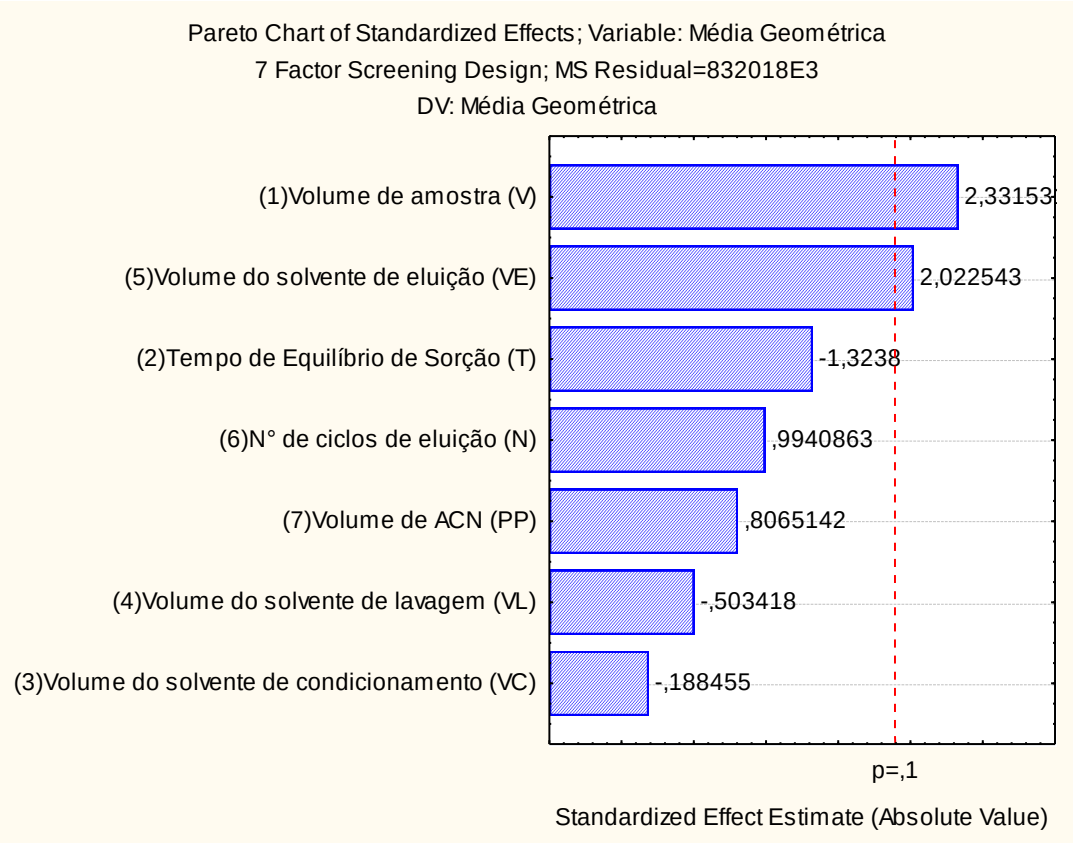


Figura 12: Diagrama de Pareto das variáveis avaliadas. Fonte: autoria própria (2022).

Dessa forma, optou-se por definir o volume de leite materno utilizado em cada extração como 1 mL - o volume máximo comportado pela ponteira DPX – para que a maior quantidade de analito estivesse disponível para ser extraída da amostra em um único ciclo de sorção, não prosseguindo com a otimização desta variável no ensaio seguinte. Decidiu-se otimizar o volume de solução de eluição e o tempo de equilíbrio de sorção, embora não tenha apresentado significância estatística, para observar a superfície de resposta conforme a variação do tempo e avaliar a prerrogativa apontada pelo diagrama de Pareto.

5.1.2.2 Delineamento Composto Central Rotacional

O DCCR aplicado gerou o modelo estatístico explicitado na Figura 13. O modelo tem bons valores de ajuste (0,774) e de regressão (R^2 = 0,887) e indica a significância estatística da ambas as variáveis tempo de equilíbrio de sorção (T) e volume de solução extratora (VE) com 95% de confiança.

Factor	Effect Estimates; Var.:Média geométrica; R-sqr=,8872; Adj:,77441 (Spreadsheet1) 2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Residual=924624E2 DV: Média geométrica									
	Effect	Std.Err.	t(5)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	99727,9	5550,894	17,96609	0,000010	85458,9	113996,9	99727,9	5550,894	85458,9	113996,9
(1)T(s)(L)	18161,9	6764,926	2,68471	0,043574	772,1	35551,7	9080,9	3382,463	386,0	17775,8
T(s)(Q)	-30755,9	7981,948	-3,85318	0,011962	-51274,2	-10237,7	-15378,0	3990,974	-25637,1	-5118,8
(2)VE (uL)(L)	25635,8	6764,926	3,78952	0,012765	8246,0	43025,6	12817,9	3382,463	4123,0	21512,8
VE (uL)(Q)	-22061,4	7981,948	-2,76392	0,039650	-42579,7	-1543,2	-11030,7	3990,974	-21289,8	-771,6
1L by 2L	-3154,8	9615,738	-0,32809	0,756138	-27872,9	21563,2	-1577,4	4807,869	-13936,4	10781,6

Figura 13: Modelo estatístico do DCCR. Fonte: autoria própria (2022).

A partir dos valores atribuídos aos efeitos de cada variável (localizados na coluna “Effect” na figura), é possível obter a equação quadrática do modelo estatístico gerado:

$$y = 99727{,}9 + 18161{,}9.x_1 - 30755{,}9.x_1^2 + 25635{,}8.x_2 - 22061{,}4.x_2^2$$

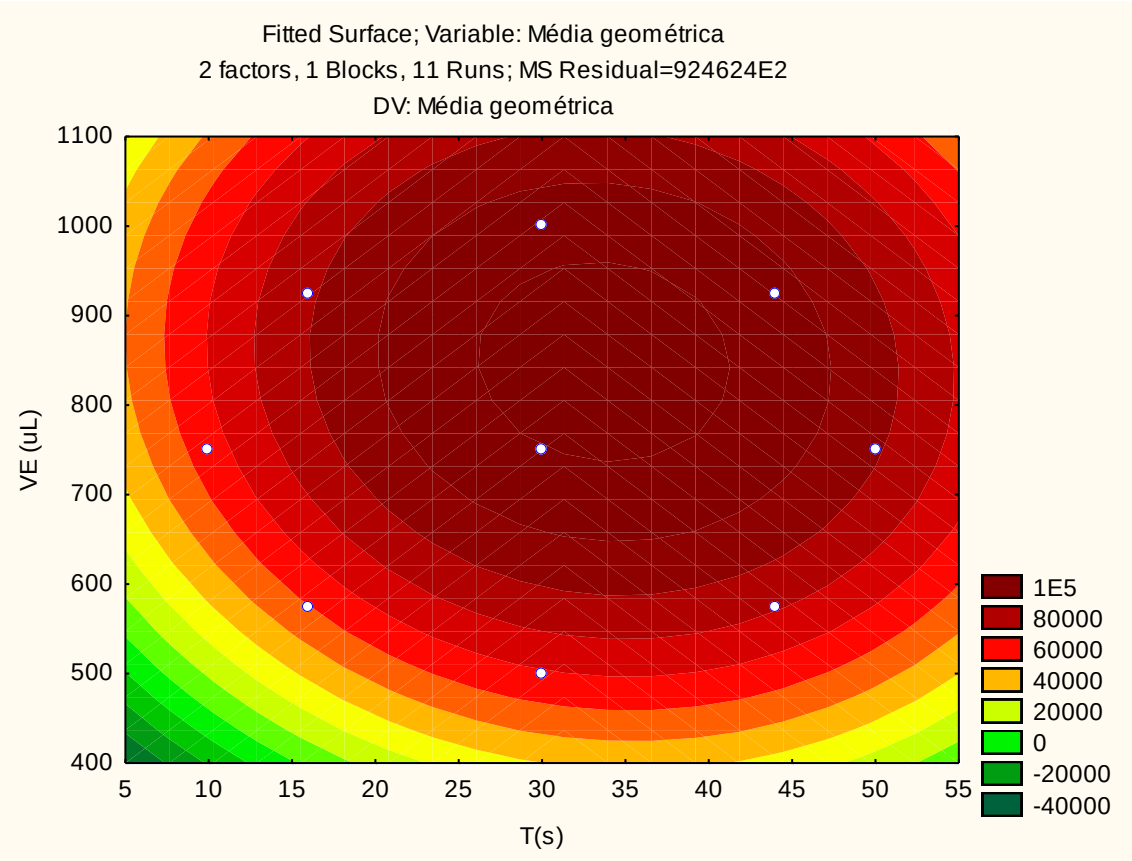


Figura 14: Superfície de resposta bidimensional do DCCR Fonte: autoria própria (2022).

O ensaio de DCCR gerou a superfície de resposta presente nas Figura 14. A partir delas, entende-se que maiores valores de área serão obtidos com intervalos de tempo de amostragem entre 25 e 40 segundos e volumes de solução extratora entre 700 e 950 microlitros, havendo decréscimo da resposta analítica em condições diferentes. Para obter valores mais específicos, o ensaio fornece a desejabilidade do modelo (FIGURA 15), isto é, os valores “ótimos” de cada variável que forneceriam, de acordo com a equação do modelo, os maiores valores de área possíveis, dadas as condições empregadas nesta metodologia.

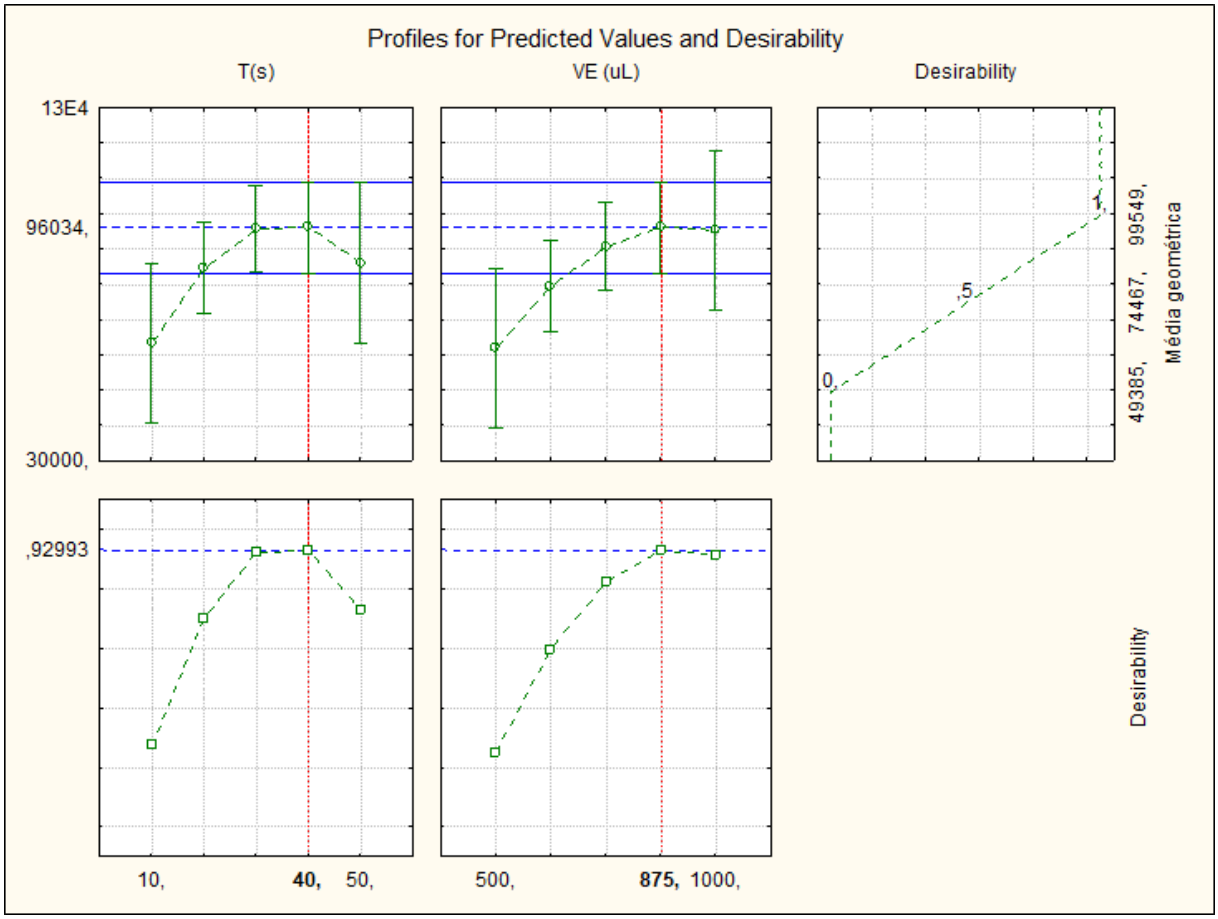


Figura 15: Desejabilidade do modelo estatístico criado para a metodologia de preparo de amostra utilizada no ensaio DCCR. Fonte: autoria própria (2022).

Os valores ótimos indicados são 40 segundos de equilíbrio de sorção na etapa de amostragem e 875 µL de solução extratora na etapa de eluição. Através das regressões mostradas, entende-se que, em relação ao tempo (T), há uma tendência de maiores resultados conforme aumento do tempo entre 10 e 30 segundos, até que o platô é atingido, e a partir de 40 segundos a resposta passa a diminuir. Isso justifica a prerrogativa pontuada no gráfico de Pareto do ensaio Plackett-Burman, que indicava valor negativo para significância desta variável, uma vez que a tendência crescente dos resultados se encontra na faixa de menores intervalos de tempo empregadas nos experimentos. Dessa forma, o intervalo de tempo escolhido foi de 30 segundos, intervalo que era empregado por BORDIN (2013) e que, segundo o modelo, fornece resposta analítica tão boa quanto o valor

de desejabilidade. Em relação ao volume de solução extratora, a regressão também indica tendência crescente até um ponto máximo, e volumes maiores gerariam decréscimos na resposta. Dessa forma, o volume de 875 mL foi escolhido como valor otimizado.

Para confirmar as predições interpretadas a partir do modelo estatístico, este foi validado com um experimento em triplicata utilizando a metodologia otimizada. Com a equação do modelo, foi possível obter um valor de área teórico (predito: 106836,07) utilizando os valores ótimos e compará-los com os valores reais obtidos:

Tabela 11: Comparação dos valores reais obtidos e valor predito pela equação para validação do modelo estatístico.

Replicata	Média geométrica	Erro relativo (%)
1	99613,20	-7,25
2	99724,80	-7,13
3	99999,65	-6,84

Fonte: autoria própria (2022).

A Tabela 11 apresenta os erros relativos em porcentagem dos valores reais obtidos, os quais foram menores do que 10%. Assim, o modelo estatístico foi considerado significativo e preditivo, e a metodologia de preparo de amostra otimizada satisfatoriamente. A otimização da metodologia proposta, em termos de área total, garantiu um aumento de 34% na detectabilidade dos analitos (FIGURA 16).

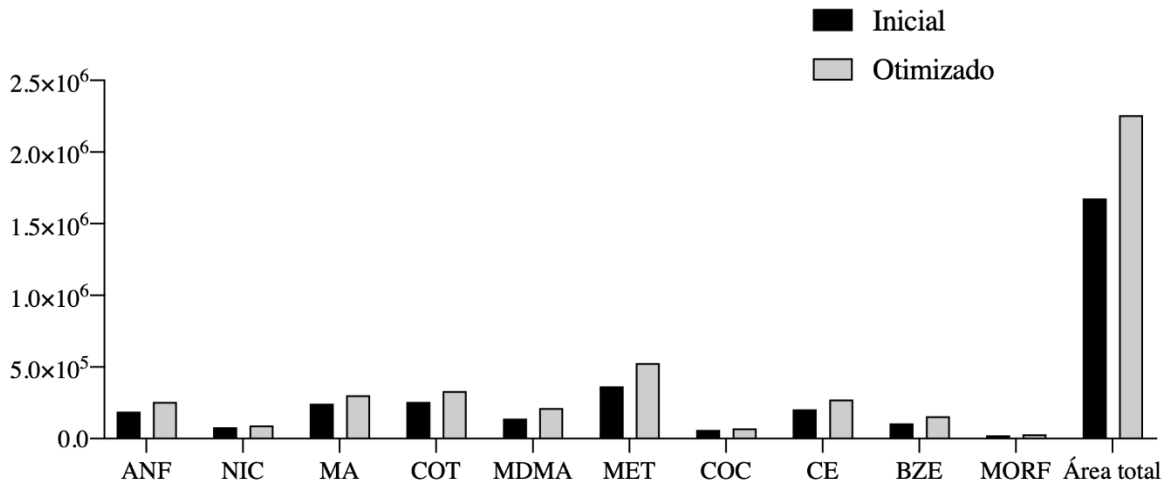


Figura 16. Comparação entre a metodologia inicial de preparo de amostra e a metodologia otimizada avaliando a resposta analítica do método. Fonte: autoria própria (2022).

5.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

5.2.1 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação atingidos com o método proposto estão apresentados na Tabela 12.

Neste trabalho, a metodologia empregada para determinação dos Limites de Detecção (LDs) e Limites Inferiores de Quantificação (LIQs) foi de avaliação empírica dos valores de coeficiente de variação entre as replicatas de cada baixa concentração testada. A determinação destes parâmetros baseada na reprodutibilidade do método confere confiabilidade ao resultado obtido por se basear em sua precisão (BROWN et al., 2011).

As concentrações baixas testadas foram 10, 5, 3 e 2 $ng.mL^{-1}$. Analitos como nicotina, metanfetamina e cocaína não tiveram coeficientes de variação inferiores a 20% em concentrações menores que a estabelecida como LIQ (5 $ng.mL^{-1}$), que teve CV inferior a 15%. Dessa forma, os LDs destes analitos ficaram estabelecidos na mesma concentração que o LIQ.

Em comparação com demais métodos reportados na literatura, os limites definidos para esta metodologia têm detectabilidade adequada para detecção das substâncias psicoativas e seus metabólitos em leite materno. Os métodos de Marchei *et al* (2011) e Escuder-Vieco *et al* (2016) alcançaram limites de detecção entre 1 e 3 $ng.mL^{-1}$ e de quantificação entre 5 e 10 $ng.mL^{-1}$ utilizando LC-MS/MS para 18 substâncias ilícitas em leite materno, incluindo os analitos do presente trabalho, ao combinar extração líquido-líquido e SPE (ESCUDER-VIECO et al., 2016; MARCHEI et al., 2011). D'Avila e colaboradores (2015) utilizaram precipitação proteica com acetonitrila e LC-MS para analisar cocaína e seus metabólitos em leite materno, obtendo LDs entre 2,5 e 3,0 $ng.mL^{-1}$ e o LIQs de 5 $ng.mL^{-1}$, semelhante aos valores obtidos para cocaína e benzoilecgonina neste trabalho (D'AVILA et al., 2015b). Silveira *et al* (2016) também analisou cocaína e seus metabólitos em leite materno, utilizando LPME e GC-MS, e alcançou LDs de 6 $ng.mL^{-1}$ e LIQs de 12 $ng.mL^{-1}$.

Tabela 12. Limites de detecção e quantificação obtidos com a metodologia proposta.

Analito	LD ($ng.mL^{-1}$)	LIQ ($ng.mL^{-1}$)
ANF	2,0	5,0
NIC	5,0	5,0
MA	5,0	5,0
COT	3,0	5,0
MDMA	2,0	5,0
MET	2,0	5,0
COC	5,0	5,0
CE	3,0	5,0
BZE	2,0	5,0
MORF	2,0	5,0

Fonte: autoria própria (2022). *Abreviações: ANF – anfetamina; NIC – nicotina; MA – metanfetamina; COT – cotinina; MDMA – metilenodioximetanfetamina; MET – metadona; COC – cocaína; CE – cocaetileno; BZE – benzoilecgonina; MORF – morfina.*

5.2.2 Linearidade

Para estudo da linearidade, uma ampla faixa de trabalho foi utilizada, com base nas concentrações geralmente encontradas em amostras de leite relatadas na literatura. Das oito concentrações avaliadas entre 5 e 500 $ng.mL^{-1}$, no mínimo seis foram utilizadas para a construção das curvas de calibração. Na calibração, foi empregada o método de padronização interna, com utilização dos padrões internos deuterados, e todas as curvas apresentaram coeficientes de correlação (R) maiores do que 0,99.

Considerando o intervalo de mais de uma ordem de grandeza entre os valores de concentração, a homocedasticidade dos dados foi avaliada e para todos os analitos foi verificado o aumento de variância conforme as concentrações crescentes da curva, isto é, os dados foram considerados heterocedásticos. A condição de heterocedasticidade apresenta-se pela forte dispersão de dados em torno da reta e pode levar à uma quantificação de baixa confiabilidade, o que compromete a avaliação da exposição do lactente. As curvas de calibração em modelo linear e os gráficos de dispersão de resíduos foram compilados no *Anexo II*.

Para o melhor ajuste dos dados, a Regressão Linear Ponderada foi empregada. A aplicação de pesos sobre os dados gerou modelos com erros relativos inferiores aos dos modelos de regressão linear, e os modelos com menor soma de erro relativo foram utilizados para tratamento de dados de estabilidade e quantificação das amostras reais. As curvas de calibração dos modelos lineares ponderados estão apresentadas na Tabela 13.

Tabela 13: Resultados de linearidade das curvas de calibração dos dez analitos entre 5 e 500 $ng.mL^{-1}$ no método proposto.

Analito	Equação da curva de calibração	Ponderação	Coeficiente de correlação (R)	Soma erro relativo (%)
ANF	y = 0,005216x + 0,08865116	$1/x^2$	0,9994	13,45
NIC	y = 0,007203x + 0,20039135	$1/x^2$	0,9992	13,85
MA	y = 0,004903x + 0,14184526	$1/x^2$	0,9956	32,79
COT	y = 0,006783x + 0,29398701	$1/x^2$	0,9994	11,22
MDMA	y = 0,005423x + 0,10551787	$1/x^2$	0,9991	20,00
MET	y = 0,002161x - 0,0044478	1/x	0,9975	32,78
COC	y = 0,004487x + 1,004119	1/y	0,9996	10,85
CE	y = 0,002678x + 0,04025491	$1/y^{1/2}$	0,9998	18,51
BZE	y = 0,001066x + 0,0068583	$1/x^2$	0,9983	23,23
MORF	y = 0,003076x + 0,07672318	$1/x^2$	0,9932	36,49

Fonte: autoria própria (2022). *Abreviações: ANF – anfetamina; NIC – nicotina; MA – metanfetamina; COT – cotinina; MDMA – metilenodioximetanfetamina; MET – metadona; COC – cocaína; CE – cocaetileno; BZE – benzoilecgonina; MORF – morfina.*

A ponderação $1/x^2$ gerou modelos de menor erro relativo para as curvas de calibração dos analitos, exceto para as curvas de metadona, cocaína e cocaetileno. Embora algumas curvas possuam ΣER% elevadas, as preconizações dos guias de validação não delimitam este parâmetro. Para alguns analitos, os valores de coeficiente de correlação dos modelos ponderados foram maiores em comparação com as curvas do modelo de regressão linear simples, o que se acredita garantir uma melhor adequação dos dados experimentais dos ensaios de linearidade e quantificações mais precisas e exatas. Com isso, a faixa de trabalho escolhida e as curvas de calibração obtidas foram consideradas adequadas para a quantificação dos analitos em leite materno.

5.2.3 Precisão e exatidão

A Tabela 14 apresenta os resultados obtidos nos ensaios de precisão intraensaio e interensaio e de exatidão. Todos os valores obtidos para precisão atenderam aos critérios de aceitação de 20% para CQB e 15% para CQM e CQA, ou seja, o método pode ser considerado preciso.

Quanto à exatidão, os resultados foram calculados pelo erro relativo e somados a 100. Observa-se que todos os valores obtidos estão dentro dos limites de variação preconizados de 80 a 120% para CQB e 85 a 115% para CQM e CQA, garantindo a exatidão do método.

5.2.4 Recuperação

A Tabela 14 também contém os valores de recuperação do preparo de amostra empregado para quantificação dos analitos em leite materno. A recuperação não é um parâmetro de validação preconizado pelos Guias de Validação cujos ensaios deste trabalho foram baseados. Ainda assim, a recuperação foi estudada para avaliar a eficiência do preparo de amostra; de acordo com o Guia para Validação da UNODC (2009), valores de recuperação próximos a 100% são desejáveis, mas não mandatórios, desde que o método seja preciso, exato e os limites de detecção e quantificação estejam apropriados para as análises (UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME (UNODC), 2009).

Dessa forma, a recuperação foi considerada satisfatória, considerando a precisão e exatidão do método (*Item 5.4.*3) e a adequabilidade dos limites LD e LIQ (*Item 5.4.*1) para a detecção e quantificação dos analitos nesta amostra, embora os valores de recuperação obtidos sejam relativamente baixos, variando entre 15 e 86%. Na literatura, a recuperação de técnicas que envolvem precipitação proteica

seguida de extração em fase sólida para análise em leite materno pode atingir 100% (SANTOS; DE MARTINIS, 2020). No que tange à técnica de DPX, os valores tendem a se concentrar entre 60 e 110% utilizando fase de troca catiônica em análises forenses, ambientais e de alimentos (BORDIN et al., 2016a). No método analítico de Bordin *et al* (2013) para análise de drogas de abuso em mecônio, no qual se baseia o procedimento deste trabalho, os valores de recuperação obtidos foram de 69 a 98%. Assim, acredita-se que a recuperação atingida se deve à complexidade da amostra e também às perdas decorrentes do processo de precipitação proteica que antecede à técnica de DPX.

5.2.5 Estabilidade

As Tabelas 15 e 16 apresentam os valores de erro relativo dos ensaios de estabilidade dos analitos em amostra biológica e das soluções-padrão, respectivamente. Todos os ensaios atenderam ao critério de garantia de estabilidade das amostras e soluções - padrão, com exceção do ensaio de estabilidade de curta duração. Nesta avaliação, nenhum analito manteve valores de concentração CQB e CQA com desvio inferior a 15%, não podendo ser considerados estáveis à temperatura ambiente durante o período de nove horas – período que as amostras fortificadas foram mantidas. Os demais analitos apresentaram valores inferiores que ultrapassaram o desvio preconizado, indicando provável degradação na amostra de leite materno em períodos prolongados fora do congelamento. Acredita-se que a exposição à luz e à temperatura ambiente por período prolongado tenha corroborado para uma provável degradação. Dessa forma, as amostras reais foram descongeladas, preparadas e analisadas em um período inferior a cinco horas para evitar uma condição de instabilidade e garantir a integridade das amostras.

Tabela 14: Resultados de precisão, exatidão e recuperação dos analitos no método analítico proposto.

Analito	Concentração ($ng.mL^{-1}$)	Precisão		Exatidão (%, n = 5)	Recuperação (%)
		Intraensaio (CV%, n = 5)	Interensaio (CV%, n = 5, dias = 3)		
ANF	15	10,51	11,78	103,20	39,17
	200	2,48	4,08	101,90	40,08
	450	4,08	6,75	103,37	35,32
NIC	15	11,21	17,55	97,86	42,31
	200	10,53	12,68	96,13	37,67
	450	14,79	13,41	105,63	68,96
MA	15	9,07	17,70	96,25	46,29
	200	6,26	11,37	107,11	34,73
	450	8,66	13,29	107,32	69,42
COT	15	3,22	15,87	99,41	75,20
	200	4,22	7,39	112,62	67,08
	450	9,60	9,06	97,58	77,28
MDMA	15	6,70	17,33	99,01	36,00
	200	6,43	12,72	113,69	35,39
	450	4,70	10,78	104,12	58,44
MET	15	6,01	19,79	113,94	15,73
	200	14,54	9,10	98,16	38,15
	450	8,59	11,49	96,16	19,96
COC	15	19,82	19,30	103,28	81,19
	200	9,34	12,92	107,84	63,17
	450	12,76	11,46	105,42	75,37
CE	15	14,98	13,04	98,16	41,84
	200	7,39	11,47	96,21	33,18
	450	12,99	10,74	94,09	47,18
BZE	15	9,78	15,15	97,65	55,52
	200	9,66	17,69	99,67	70,97
	450	13,35	10,73	98,28	86,17
MORF	15	7,93	19,46	96,60	46,62
	200	4,27	11,18	108,80	37,80
	450	5,34	13,52	111,38	39,42

Fonte: autoria própria (2022). *Abreviações: ANF – anfetamina; NIC – nicotina; MA – metanfetamina; COT – cotinina; MDMA – metilenodioximetanfetamina; MET – metadona; COC – cocaína; CE – cocaetileno; BZE – benzoilecgonina; MORF – morfina.*

Tabela 15: Resultados dos ensaios de estabilidade dos analitos em leite materno de acordo com o método analítico proposto.

Analito	Concentração ($ng.mL^{-1}$)	Estabilidade (ER%)			
		Curta duração (9h a 22 ± 2°C)	Longa duração (90 dias a -20 °C)	Congelamento e descongelamento (3 ciclos)	Pós – processamento (18h a 22 ± 2 °C)
ANF	15	-50,17	-8,93	-14,62	-1,35
	450	-11,10	-13,29	-14,93	-3,96
NIC	15	-78,34	-13,46	-13,35	-14,33
	450	-85,17	-13,58	-15,01	-14,60
MA	15	-17,31	-2,89	-6,86	-8,74
	450	-18,05	4,19	-8,95	-1,39
COT	15	-10,56	-7,35	1,42	-1,48
	450	-29,07	-12,40	-6,68	-2,86
MDMA	15	-65,55	-14,51	-10,76	-3,05
	450	-26,96	-3,93	-0,36	-8,03
MET	15	-16,02	-11,99	-9,26	-13,88
	450	-56,14	0,52	-11,26	-7,62
COC	15	-12,73	-12,07	-0,39	2,16
	450	-11,31	2,71	-6,29	7,80
CE	15	-84,80	-5,85	7,36	-11,07
	450	-45,55	-14,95	-12,10	-0,55
BZE	15	-78,20	-2,47	-7,81	-5,22
	450	-82,41	-5,28	-9,21	-11,07
MORF	15	-16,95	-10,81	-8,46	-8,49
	450	-17,21	-10,53	-5,76	-6,36

Fonte: autoria própria (2022).

Abreviações: ANF – anfetamina; NIC – nicotina; MA – metanfetamina; COT – cotinina; MDMA – metilenodioximetanfetamina; MET – metadona; COC – cocaína; CE – cocaetileno; BZE – benzoilecgonina; MORF – morfina.

Tabela 16: Resultados dos ensaios de estabilidade das soluções – padrão utilizadas no desenvolvimento e validação do método analítico proposto.

Analito	Concentração (ng.mL^{-1})	Estabilidade Solução – padrão (ER%)
ANF	15 450	0,69 -1,82
NIC	15 450	8,29 -2,30
MA	15 450	2,73 -5,67
COT	15 450	-7,27 0,85
MDMA	15 450	-6,23 9,11
MET	15 450	-6,10 6,15
COC	15 450	-8,17 8,98
CE	15 450	-4,39 5,85
BZE	15 450	7,77 -9,72
MORF	15 450	1,59 -2,56
ANF-D_{11}	200	0,48
KET-D_4	200	8,14
MET-D_3	200	-0,46
COC-D_3	200	-3,87
COD-D_6	200	0,12

Fonte: autoria própria (2022).

Abreviações: ANF – anfetamina; NIC – nicotina; MA – metanfetamina; COT – cotinina; MDMA – metilenodioximetanfetamina; MET – metadona; COC – cocaína; CE – cocaetileno; BZE – benzoilecgonina; MORF – morfina; ANF-D_{11} - anfetamina deuterada; KET-D_4 – cetamina detuterada; MET-D_3 – metadona deuterada; COC-D_3 – cocaína deuterada; COD-D_6 – codeína deuterada.

5.2.6 Seletividade

Na avaliação da seletividade do método, algumas substâncias que possivelmente poderiam ser consumidas pela mãe no período de amamentação foram analisadas. Nenhum interferente foi detectado nos tempos de retenção dos compostos de interesse. Dessa forma, o método pode ser considerado seletivo para análise das substâncias as quais se propõe.

Além disso, durante o desenvolvimento do método, as “amostras branco” de leite foram fornecidas por diferentes mães e foram coletadas em períodos de lactação diferentes. Não foram observados interferentes endógenos nas análises, o que possibilitou garantir que o método seja seletivo para amostras de indivíduos diferentes e que o tipo de leite também não afetasse a qualidade da análise.

5.2.7 Efeito Residual (*Carryover*)

A Figura 17 apresenta um cromatograma de amostra branco analisada após a injeção de uma amostra fortificada com os analitos na concentração de 1000 $ng.mL^{-1}$. A amostra apresentou perfil cromatográfico semelhante quando injetada anteriormente à curva de calibração, com picos de relativa abundância em alguns tempos de retenção de interesse que, contudo, não correspondem à nenhuma substância endógena ou exógena do leite, como tioureia e hidrocarbonetos de cadeia longa, e não impedem que a quantificação seja realizada. Dessa forma, o método foi considerado isento de efeito residual entre as análises.

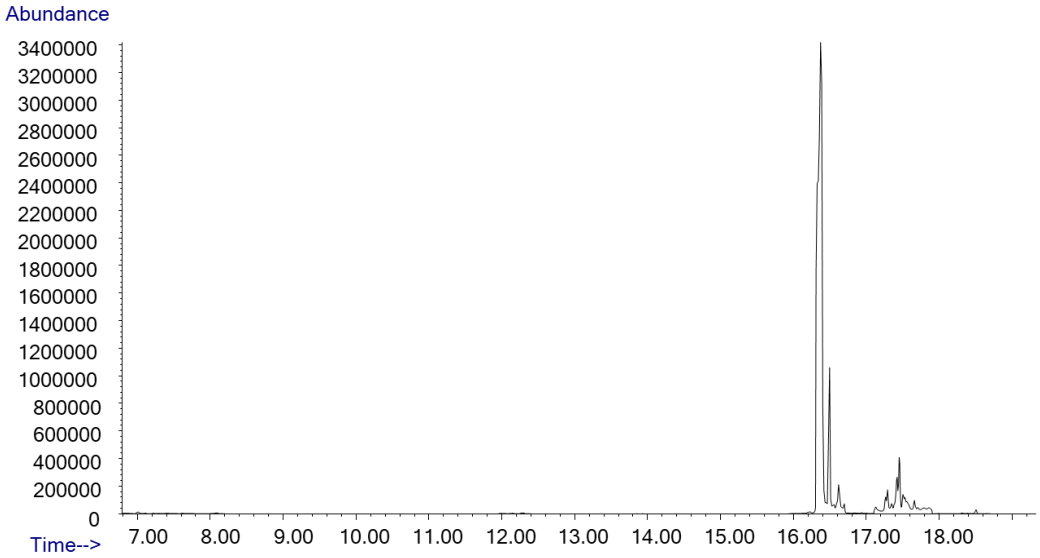


Figura 17. Cromatograma de análise de amostra branco de leite materno após a injeção de amostra fortificada com analitos em concentração superior ao ponto mais alto da curva de calibração.

Fonte: autoria própria (2022).

5.3 ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS

Este é o primeiro trabalho que utiliza a técnica de DPX para análise de drogas de abuso em leite materno. Das 67 amostras coletadas no Banco de Leite do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, não foi detectada a presença de nenhum dos analitos deste projeto em nenhuma das amostras. Os resultados obtidos podem ser oriundos da real ausência das substâncias investigadas, mas não se descarta a possibilidade de que outras amostras possam conter alguma substância psicoativa ou que outras substâncias além das investigadas tenham sido consumidas e pudessem estar presentes no leite materno, uma vez que outros estudos reportados na literatura mundial relatam casos de amostras positivas e até mesmo casos de intoxicação aguda do recém-nascido via leite materno (D'AVILA et al., 2015a; DRUGS AND LACTATION DATABASE (LACTMED) - NCBI BOOKSHELF, [s.d.]; SILVEIRA et al., 2017). Para responder estes

questionamentos, é necessário maior incentivo às pesquisas relacionadas à saúde pública e consumo de drogas para que, assim, mais projetos como o deste escopo sejam realizados em todo o país e possa haver um maior entendimento sobre o consumo de substâncias psicoativas pela população (neste caso, de mulheres em período de amamentação) e melhores estratégias de garantia à saúde possam ser traçadas.

Acredita-se que o resultado das análises realizadas evidencie a efetividade do cadastro de mães doadoras em selecionar lactantes para realizar doação de leite ao Banco de Leite do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. O cadastro procura identificar o cenário a qual as mães que desejam ser doadoras se encontram, no que tange qualidade de vida e boas condições de saúde, incluindo o possível histórico de consumo de drogas. Dessa forma, busca-se garantir a qualidade do leite materno a ser fornecido para outros recém-nascidos.

Nesse sentido, foi possível fazer um levantamento das informações das doadoras que aceitaram participar deste projeto, sem revelar sua identificação, e saber que: a faixa etária das doadoras se concentra entre 21 e 43 anos; 80,9% moram na cidade de Ribeirão Preto e as demais em cidades próximas, onde sabe-se que há acesso a saneamento básico, e as condições de moradia relatadas por todas foram consideradas ótimas; 55,2% estudaram até o ensino médio e 44,8% tem ensino superior completo; além disso, nenhuma delas relatou histórico pregresso de consumo de drogas. Sabe-se que o conjunto amostral deste estudo é pequeno para tentar estabelecer uma relação dos resultados das análises com dados demográficos, contudo, sabendo que o referido cenário não corresponde à realidade da maioria de mulheres em amamentação no Brasil e que eventualmente possam ser doadoras, faz-se necessário a continuidade de estudos de

levantamento para que haja um maior entendimento da relação entre o consumo de substâncias psicoativas e a exposição infantil via leite materno.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A metodologia desenvolvida e validada neste trabalho empregando extração em fase sólida dispersiva com ponteiras DPX e cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas mostra satisfatória detectabilidade, eficiência e reprodutibilidade para detecção e quantificação de anfetamina, metanfetamina, metilenodioximetanfetamina, nicotina, cotinina, cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, metadona e morfina em amostras de leite materno, sendo o primeiro trabalho descrito na literatura que faz uso de DPX-CG-EM para análise de drogas de abuso em amostras de leite materno. Desta forma, o método é uma alternativa em relação aos demais reportados na literatura para análises toxicológicas de rotina visando a qualidade do leite a ser fornecido para um recém-nascido. O equipamento de CG-EM é um dos mais consolidados e acessíveis para análises quantitativas de drogas de abuso, enquanto a técnica de DPX é uma técnica eficiente, rápida e de baixo consumo de solvente. Neste trabalho, o aumento do volume de amostra possibilitou atingir menores limites de detecção e quantificação, embora tenha levado a um maior volume de solvente necessário para precipitação de proteínas. Ainda assim, a técnica de DPX é uma opção interessante para análise de leite, permitindo a quantificação de diversos analitos simultaneamente dentro da adequação exigida. Não foi possível superar a complexidade da amostra sem um tratamento prévio de precipitação de proteínas utilizando solvente, o que eleva o tempo e o custo da análise, mas a redução de intervalos de tempo de cada etapa e a utilização de maiores porções de água em relação a solventes tóxicos mostraram-se como possibilidades. Dessa forma, recomenda-se que novos trabalhos explorem mais a versatilidade da técnica de DPX, podendo reduzir o consumo de solventes e

até eliminar algumas etapas do processo, como a de condicionamento da fase sólida, como já reportado em alguns trabalhos da literatura.

Neste trabalho, não houve exposição infantil às substâncias psicoativas analisadas, uma vez que não houve detecção em nenhuma das 67 amostras. Estes resultados refletem a integridade do leite doado ao Banco de Leite HC-FMRP, embora não haja garantia em relação a outras amostras e outras substâncias psicoativas não investigadas neste estudo. Dessa forma, faz-se necessário que mais estudos de análises toxicológicas sejam realizados e implementados nas rotinas de trabalho com leite materno, considerando pela literatura científica que o uso de substâncias psicoativas durante o período de gestação e amamentação é uma realidade, e que pode comprometer o desenvolvimento humano em maior ou menor grau. Além disso, que mais políticas públicas informem à população sobre os riscos associados ao uso de drogas e à dependência química com maior intuito e melhores estratégias de redução de danos à saúde antemão à criminalização, uma vez que a ampla disseminação de drogas na população é uma realidade cada vez mais evidente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-LATIF, Mohamed E.; PINNER, Jason; CLEWS, Sara; COOKE, Fiona; LUI, Kei; OEI, Julee. Effects of breast milk on the severity and outcome of neonatal abstinence syndrome among infants of drug-dependent mothers. **Pediatrics**, *[S. l.]*, v. 117, n. 6, 2006. DOI: 10.1542/peds.2005-1561.

ACOSTA, Mariano; TORRES, Sabier; MARIÑO-REPIZO, Leonardo; MARTINEZ, Luis D.; GIL, Raúl A. Novel method for metalloproteins determination in human breast milk by size exclusion chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, *[S. l.]*, v. 158, p. 209–213, 2018. DOI: 10.1016/j.jpba.2018.06.003.

Amphetamine - Drugs and Lactation Database (LactMed) - NCBI Bookshelf. [s.d.]. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK501307/. Acesso em: 10 out. 2021.

ANDERSON, Philip O. **Clinical Drug Data handbook**. [s.l: s.n.].

ANDREAS, Nicholas J.; KAMPMANN, Beate; MEHRING LE-DOARE, Kirsty. **Human breast milk: A review on its composition and bioactivityEarly Human Development**Elsevier Ireland Ltd, , 2015. DOI: 10.1016/j.earlhumdev.2015.08.013.

ANGELUCCI, Mateus Andrea. **Exposição ao álcool na gestação e sintomas psiquiátricos na idade escolar (Dissertação de Mestrado). Universidade de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto**. 2010. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60134/tde-27112013-111939/publico/dissertacao_original.pdf. Acesso em: 18 jun. 2020.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resoluçao da

Diretoria Colegiada - RDC nº 27, de 17 de Maio de 2012. *[S. l.]*, v. 75, p. 1–7, 2012.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **A Anvisa e o Controle dos Produtos Derivados do Tabaco Agência Nacional de Vigilância Sanitária Anvisa**. [s.l: s.n.].

ARMBRUSTER, D. A.; TILLMAN, M. D.; HUBBS, L. M. Limit of detection (LQD)/limit of quantitation (LOQ): comparison of the empirical and the statistical methods exemplified with GC-MS assays of abused drugs. **Clinical Chemistry**, *[S. l.]*, v. 40, n. 7, p. 1233–1238, 1994. DOI: 10.1093/CLINCHEM/40.7.1233. Disponível em: https://academic.oup.com/clinchem/article/40/7/1233/5647851. Acesso em: 11 ago. 2021.

ATKINSON, H. C.; BEGG, E. J.; DARLOW, B. A. **Drugs in Human Milk: Clinical Pharmacokinetic ConsiderationsClinical Pharmacokinetics**Clin Pharmacokinet, , 1988. DOI: 10.2165/00003088-198814040-00003.

BALLARD, Olivia; MORROW, Ardythe L. **Human Milk Composition. Nutrients and Bioactive FactorsPediatric Clinics of North America**NIH Public Access, , 2013. DOI: 10.1016/j.pcl.2012.10.002.

BARTU, Anne; DUSCI, Leon J.; ILETT, Kenneth F. Transfer of methylamphetamine and amphetamine into breast milk following recreational use of methylamphetamine. **British Journal of Clinical Pharmacology**, *[S. l.]*, v. 67, n. 4, p. 455–459, 2009. DOI: 10.1111/j.1365-2125.2009.03366.x. Disponível em: /pmc/articles/PMC2679109/?report=abstract. Acesso em: 6 jul. 2020.

BECKER, Allan B.; MANFREDA, Jure; FERGUSON, Alexander C.; DIMICH-WARD, Helen; WATSON, Wade T. A.; CHAN-YEUNG, Moira. Breast-feeding and environmental tobacco smoke exposure. **Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine**, *[S. l.]*, v. 153, n. 7, p. 689–691, 1999. DOI: 10.1001/archpedi.153.7.689.

BEZERRA, Marcos Almeida; SANTELLI, Ricardo Erthal; OLIVEIRA, Eliane Padua; VILLAR, Leonardo Silveira; ESCALEIRA, Luciane Amélia. **Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistryTalanta**Elsevier, , 2008. DOI: 10.1016/j.talanta.2008.05.019.

BORDIN, Dayanne Cristiane Mozaner. **Exposição fetal: determinação de drogas de abuso em mecônio empregando a técnica de extração em fase sólida modificada e cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas**. 2013. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013. DOI: 10.11606/D.60.2013.tde-05092013-111513. Disponível em: http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60134/tde-05092013-111513/. Acesso em: 18 jun. 2020.

BORDIN, Dayanne Cristiane Mozaner; ALVES, Marcela Nogueira Rabelo; CAMPOS, Eduardo Geraldo De; MARTINIS, Bruno Spinosa De. Disposable pipette tips extraction: Fundamentals, applications and state of the art. **Journal of Separation Science**, *[S. l.]*, v. 39, n. 6, p. 1168–1172, 2016. a. DOI: 10.1002/JSSC.201500932. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jssc.201500932. Acesso em: 24 out. 2021.

BORDIN, Dayanne Cristiane Mozaner; ALVES, Marcela Nogueira Rabelo; DE CAMPOS, Eduardo Geraldo; DE MARTINIS, Bruno Spinosa. Disposable pipette tips extraction: Fundamentals, applications and state of the art. **Journal of Separation Science**, *[S. l.]*, v. 39, n. 6, p. 1168–1172, 2016. b. DOI: 10.1002/jssc.201500932. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201500932. Acesso em: 13 ago. 2020.

BRANDÃO DA COSTA, Bruno Ruiz; RAMOS SANTOS JÚNIOR, Wilson José;

MAXIMIANO, Isabela Fernanda; GOMES, Nayna Cândida; FREITAS, Bruno Toledo; DE MARTINIS, Bruno Spinosa. Application of microextraction techniques in alternative biological matrices with focus on forensic toxicology: a review. **Bioanalysis**, *[S. l.]*, p. bio-2020-0241, 2020. DOI: 10.4155/bio-2020-0241. Disponível em: https://www.future-science.com/doi/10.4155/bio-2020-0241. Acesso em: 16 dez. 2020.

BREWER, William E.; GUAN, Hongxia; MORGAN, Stephen L.; FOSTER, Fred; PFANNKOCH, Edward; SINGER, David. **Automated Disposable Pipette Extraction of Pesticides from Fruits and Vegetables**. [s.l: s.n.].

BROWN, Richard J. C.; YARDLEY, Rachel E.; BROWN, Andrew S.; EDWARDS, Peter R.; RIVIER, Cédric; YARDIN, Catherine. Analytical Methodologies with Very Low Blank Levels: Implications for Practical and Empirical Evaluations of the Limit of Detection. **http://dx.doi.org/10.1080/00032710600622563**, *[S. l.]*, v. 39, n. 6, p. 1229–1241, 2011. DOI: 10.1080/00032710600622563. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00032710600622563. Acesso em: 13 ago. 2021.

CARASEK, Eduardo; PAWLISZYN, Janusz. Screening of tropical fruit volatile compounds using solid-phase microextraction (SPME) fibers and internally cooled SPME fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, *[S. l.]*, v. 54, n. 23, p. 8688–8696, 2006. DOI: 10.1021/jf0613942.

CASTELLOTE, Cristina; CASILLAS, Rosario; RAMÍREZ-SANTANA, Carolina; PÉREZ-CANO, Francisco J.; CASTELL, Margarida; MORETONES, M. Glòria; LÓPEZ-SABATER, M. Carmen; FRANCH, Àngels. Premature Delivery Influences the Immunological Composition of Colostrum and Transitional and Mature Human Milk. **The Journal of Nutrition**, *[S. l.]*, v. 141, n. 6, p. 1181–1187, 2011. DOI:

10.3945/jn.110.133652. Disponível em: https://academic.oup.com/jn/article/141/6/1181/4600300. Acesso em: 18 jun. 2020.

CHASNOFF, Ira J.; LEWIS, Douglas E.; SQUIRES, Liza. Cocaine Intoxication in a Breast-Fed Infant. **Pediatrics**, *[S. l.]*, v. 80, n. 6, 1987.

CHAVES, R.G., LAMOUNIER, J. A. **Uso de medicamentos durante a lactação**. 2004. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0021-75572004000700011&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 18 jun. 2020.

CHEN, Yong; PAWLISZYN, Janusz. Miniaturization and automation of an internally cooled coated fiber device. **Analytical Chemistry**, *[S. l.]*, v. 78, n. 14, p. 5222–5226, 2006. DOI: 10.1021/ac060542k.

CHOMCHAI, Chulathida; CHOMCHAI, Summon; KITSOMMART, Ratchada. Transfer of Methamphetamine (MA) into Breast Milk and Urine of Postpartum Women who Smoked MA Tablets during Pregnancy: Implications for Initiation of Breastfeeding. **Journal of Human Lactation**, *[S. l.]*, v. 32, n. 2, p. 333–339, 2016. DOI: 10.1177/0890334415610080.

Cigarro eletrônico — Português (Brasil). [s.d.]. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/tabaco/cigarro-eletronico-1. Acesso em: 21 jan. 2021.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia.** [s.l.] : Editorada Unicamp, 2006.

COSTA, A. G. V. **Composição nutricional do leite humano e sua correlação com variáveis maternas: estudo prospectivo. Dissertação (Ciência da Nutrição), Universidade Federal de Viçosa, 2006.** 2006. Disponível em: https://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/2713/texto completo.pdf?sequence=1. Acesso em: 19 jun. 2020.

COTTEN, Steven W. **Drug testing in the neonateClinics in Laboratory Medicine**Elsevier, , 2012. DOI: 10.1016/j.cll.2012.06.008.

D'AVILA, Felipe Bianchini; LIMBERGER, Renata Pereira; FRÖEHLICH, Pedro Eduardo. Cocaine and crack cocaine abuse by pregnant or lactating mothers and analysis of its biomarkers in meconium and breast milk by LC–MS—A review. **Clinical Biochemistry**, *[S. l.]*, v. 49, n. 13–14, p. 1096–1103, 2016. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2016.01.019. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.01.019.

D'AVILA, Felipe Bianchini; PEREIRA, Andrea Garcia; SALAZAR, Fernanda Rodrigues; FERREIRA, Pâmela Lukasewicz; SALAZAR, Cledinara Rodrigues; LIMBERGER, Renata Pereira; FRÖEHLICH, Pedro Eduardo. Determination of cocaine/crack biomarkers in colostrum by LC-MS following protein precipitation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, *[S. l.]*, v. 103, p. 67–72, 2015. a. DOI: 10.1016/j.jpba.2014.10.026. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2014.10.026.

D'AVILA, Felipe Bianchini; PEREIRA, Andrea Garcia; SALAZAR, Fernanda Rodrigues; FERREIRA, Pâmela Lukasewicz; SALAZAR, Cledinara Rodrigues; LIMBERGER, Renata Pereira; FRÖEHLICH, Pedro Eduardo. Determination of cocaine/crack biomarkers in colostrum by LC-MS following protein precipitation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, *[S. l.]*, v. 103, p. 67–72, 2015. b. DOI: 10.1016/j.jpba.2014.10.026.

Drugs and Lactation Database (LactMed) - NCBI Bookshelf. [s.d.]. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK501922/. Acesso em: 29 dez. 2021.

EIRAS, Sebastião de Paula; COSCIONE, Aline Renée; ANDRADE, João

Carlos De. Métodos de otimização em química. **Revista Chemkeys**, *[S. l.]*, n. 3, p. 1–18, 2018. DOI: 10.20396/chemkeys.v0i3.9626. Disponível em: https://econtents.bc.unicamp.br/inpec/index.php/chemkeys/article/view/9626. Acesso em: 25 jan. 2021.

ESCUDER-VIECO, Diana; GARCIA-ALGAR, Óscar; JOYA, Xavier; MARCHEI, Emilia; PICHINI, Simona; PACIFICI, Roberta; PALLÁS-ALONSO, Carmen Rosa. Breast Milk and Hair Testing to Detect Illegal Drugs, Nicotine, and Caffeine in Donors to a Human Milk Bank. **Journal of Human Lactation**, *[S. l.]*, v. 32, n. 3, p. 542–545, 2016. DOI: 10.1177/0890334416648110. Disponível em: https://doi.org/10.1177/0890334416648110.

FREYER, A. M. Drugs in Pregnancy and Lactation 8th Edition: A Reference Guide to Fetal and Neonatal Risk. **Obstetric Medicine**, *[S. l.]*, v. 2, n. 2, p. 89–89, 2009. DOI: 10.1258/om.2009.090002.

FRÍGULS, Bibiana; JOYA, Xavier; GARCÍA-ALGAR, Oscar; PALLÁS, C. R.; VALL, Oriol; PICHINI, Simona. **A comprehensive review of assay methods to determine drugs in breast milk and the safety of breastfeeding when taking drugsAnalytical and Bioanalytical Chemistry**Anal Bioanal Chem, , 2010. DOI: 10.1007/s00216-010-3681-0.

FUJII, Yukiko et al. Detection of dicofol and related pesticides in human breast milk from China, Korea and Japan. **Chemosphere**, *[S. l.]*, v. 82, n. 1, p. 25–31, 2011. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2010.10.036.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, Instituto de Comunicação e Informação Científica e Técnológica. III Levantamento Nacional sobre o uso de drogas pela população brasileira. *[S. l.]*, 2017.

G, Blinick; CE, Inturrisi; E, Jerez; RC, Wallach. Methadone assays in pregnant

women and progeny. **American journal of obstetrics and gynecology**, *[S. l.]*, v. 121, n. 5, p. 617–621, 1975. DOI: 10.1016/0002-9378(75)90461-5. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1115163/. Acesso em: 10 out. 2021.

GALLARDO, E.; QUEIROZ, J. A. **The role of alternative specimens in toxicological analysisBiomedical Chromatography**John Wiley & Sons, Ltd, , 2008. DOI: 10.1002/bmc.1009.

GARERI, Joey; KLEIN, Julia; KOREN, Gideon. **Drugs of abuse testing in meconiumClinica Chimica Acta**Clin Chim Acta, , 2006. DOI: 10.1016/j.cca.2005.10.028.

GARTNER, L. M.; J, Morton; RA, Lawrence; AJ, Naylor; D, O'Hare; RJ, Schanler; AI, Eidelman. **Breastfeeding and the use of human milkPediatrics**Pediatrics, , 2005. DOI: 10.1542/peds.2004-2491.

HOWARD, C. R.; LAWRENCE, R. A. Breast-feeding and drug exposure. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, *[S. l.]*, v. 25, n. 1, p. 195–217, 1998. DOI: 10.1016/S0889-8545(05)70365-X.

I, Öhman; BN, Wikner; O, Beck; I, Sarman. Narcolepsy Treated with Racemic Amphetamine during Pregnancy and Breastfeeding. **Journal of human lactation : official journal of International Lactation Consultant Association**, *[S. l.]*, v. 31, n. 3, p. 374–376, 2015. DOI: 10.1177/0890334415585067. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25948577/. Acesso em: 10 out. 2021.

I, Robieux; G, Koren; H, Vandenbergh; J, Schneiderman. Morphine excretion in breast milk and resultant exposure of a nursing infant. **Journal of toxicology. Clinical toxicology**, *[S. l.]*, v. 28, n. 3, p. 365–370, 1990. DOI: 10.3109/15563659008994437. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2231835/. Acesso em: 10 out. 2021.

ITO, Shinya; LEE, Amy. **Drug excretion into breast milk - OverviewAdvanced Drug Delivery Reviews**Elsevier, , 2003. DOI: 10.1016/S0169-409X(03)00034-6.

JOHNSON-RESTREPO, Boris; ADDINK, Rudolf; WONG, Chung; ARCARO, Kathleen; KANNAN, Kurunthachalam. Polybrominated diphenyl ethers and organochlorine pesticides in human breast milk from Massachusetts, USA. **Journal of Environmental Monitoring**, *[S. l.]*, v. 9, n. 11, p. 1205–1212, 2007. DOI: 10.1039/b711409p. Disponível em: https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2007/em/b711409p. Acesso em: 7 jan. 2021.

KF, Ilett; TW, Hale; M, Page-Sharp; JH, Kristensen; R, Kohan; LP, Hackett. Use of nicotine patches in breast-feeding mothers: transfer of nicotine and cotinine into human milk. **Clinical pharmacology and therapeutics**, *[S. l.]*, v. 74, n. 6, p. 516–524, 2003. DOI: 10.1016/J.CLPT.2003.08.003. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14663454/. Acesso em: 10 out. 2021.

KOLE, Prashant Laxman; VENKATESH, Gantala; KOTECHA, Jignesh; SHESHALA, Ravi. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. **Biomedical Chromatography**, *[S. l.]*, v. 25, n. 1–2, p. 199–217, 2011. DOI: 10.1002/bmc.1560. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1002/bmc.1560. Acesso em: 23 nov. 2019.

KOREN, Gideon; CAIRNS, James; CHITAYAT, David; GAEDIGK, Andrea; LEEDER, Steven J. Pharmacogenetics of morphine poisoning in a breastfed neonate of a codeine-prescribed mother. **Lancet**, *[S. l.]*, v. 368, n. 9536, p. 704, 2006. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)69255-6. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16920476/. Acesso em: 24 jun. 2020.

KRAMER, Michael S. et al. Promotion of breastfeeding intervention trial (PROBIT): A randomized trial in the Republic of Belarus. **Journal of the American Medical Association**, *[S. l.]*, v. 285, n. 4, p. 413–420, 2001. DOI: 10.1001/jama.285.4.413.

KULSKI, J. K.; HARTMANN, P. E. Changes in human milk composition during the initiation of lactation. **Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, *[S. l.]*, v. 59, n. 1, p. 101–114, 1981. DOI: 10.1038/icb.1981.6.

LACROIX, Dan; SONNIER, Michelle; MONCION, Ariette; CHERON, Gérard; CRESTEIL, Thierry. Expression of CYP3A in the human liver - Evidence that the shift between CYP3A7 and CYP3A4 occurs immediately after birth. **European Journal of Biochemistry**, *[S. l.]*, v. 247, n. 2, p. 625–634, 1997. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1997.00625.x.

LEAKE, Rosemary D.; TRYGSTAD, Carl W.; OH, William. Inulin clearance in the newborn infant: Relationship to gestational and postnatal age. **Pediatric Research**, *[S. l.]*, v. 10, n. 8, p. 759–762, 1976. DOI: 10.1203/00006450-197608000-00013.

LIN, L. Y.; DI STEFANO, E. W.; SCHMITZ, D. A.; HSU, L.; ELLIS, S. W.; LENNARD, M. S.; TUCKER, G. T.; CHO, A. K. Oxidation of methamphetamine and methylenedioxymethamphetamine by CYP2D6. **Drug Metabolism & Disposition**, *[S. l.]*, v. 25, n. 9, p. 1059–1064, 1997. Disponível em: http://dmd.aspetjournals.org/content/25/9/1059.short. Acesso em: 19 jun. 2020.

LÓPEZ-GARCÍA, Ester; MASTROIANNI, Nicola; POSTIGO, Cristina; VALCÁRCEL, Yolanda; GONZÁLEZ-ALONSO, Silvia; BARCELÓ, Damia; LÓPEZ DE ALDA, Miren. Simultaneous LC–MS/MS determination of 40 legal and illegal psychoactive drugs in breast and bovine milk. **Food Chemistry**, *[S. l.]*, v. 245, p.

159–167, 2018. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.10.005.

LUCK, W.; NAU, H. Nicotine and cotinine concentrations in the milk of smoking mothers: influence of cigarette consumption and diurnal variation. **European Journal of Pediatrics**, *[S. l.]*, v. 146, n. 1, p. 21–26, 1987. DOI: 10.1007/BF00647276.

MARCHEI, Emilia; ESCUDER, Diana; PALLAS, Carmen Rosa; GARCIA-ALGAR, Oscar; GÓMEZ, Arelis; FRIGULS, Bibiana; PELLEGRINI, Manuela; PICHINI, Simona. Simultaneous analysis of frequently used licit and illicit psychoactive drugs in breast milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, *[S. l.]*, v. 55, n. 2, p. 309–316, 2011. DOI: 10.1016/j.jpba.2011.01.028.

MARTINS FUKUDA, Isa; FRANCINI, Camila; PINTO, Fidelis; DOS, Camila; MOREIRA, Santos; MORAIS SAVIANO, Alessandro; LOURENÇO, Felipe Rebello. Design of Experiments (DoE) applied to Pharmaceutical and Analytical Quality by Design (QbD). **J. Pharm. Sci**, *[S. l.]*, v. 54, 2018. DOI: 10.1590/s2175-97902018000001006. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1590/s2175-97902018000001006. Acesso em: 8 out. 2020.

MERCER, Judith S.; ERICKSON-OWENS, Debra A.; GRAVES, Barbara; HALEY, Mary Mumford. Evidence-Based Practices for the Fetal to Newborn Transition. **Journal of Midwifery and Women's Health**, *[S. l.]*, v. 52, n. 3, p. 262–272, 2007. DOI: 10.1016/j.jmwh.2007.01.005.

MIECH, Richard; JOHNSTON, Lloyd; O'MALLEY, Patrick M.; BACHMAN, Jerald G.; PATRICK, Megan E. Trends in Adolescent Vaping, 2017–2019. **New England Journal of Medicine**, *[S. l.]*, v. 381, n. 15, p. 1490–1491, 2019. DOI: 10.1056/nejmc1910739. Disponível em:

https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMc1910739. Acesso em: 21 jan. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA RDC Nº 277, 16/04/2019**. [s.l: s.n.].

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas. **Nutrição Infantil - Aleitamento Materno e Alimentação Complementar**. 2009. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude_crianca_nutricao_aleitamento_alimentacao.pdf. Acesso em: 19 jun. 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas. **Amamentação e uso de medicamentos e outras substâncias. 2ed.** 2010. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/amamentacao_uso_medicamentos_outras_substancias_2edicao.pdf. Acesso em: 19 jun. 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas. **Amamentação e uso de medicamentos e outras substâncias. 2ed.** 2014. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/amamentacao_uso_medicamentos_outras_substancias_2edicao.pdf. Acesso em: 19 jun. 2020.

MOUSAVI, Leila; TAMIJI, Zahra; KHOSHAYAND, Mohammad Reza. **Applications and opportunities of experimental design for the dispersive liquid–liquid microextraction method – A reviewTalanta**Elsevier B.V., , 2018. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.08.002.

Nicotine - Drugs and Lactation Database (LactMed). **Drugs and Lactation Database (LactMed)**, *[S. l.]*, 2020. Disponível em:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK501586/. Acesso em: 10 out. 2021.

NIDA. **Opioid Overdose Crisis**. 2018. Disponível em: https://www.drugabuse.gov/drug-topics/opioids/opioid-overdose-crisis. Acesso em: 19 jun. 2020.

NIDA, National Institute on Drug Abuse. **Preventing Drug Use among Children and Adolescents Acknowledgments**. [s.l: s.n.]. Disponível em: https://www.drugabuse.gov/sites/default/files/preventingdruguse_2.pdf. Acesso em: 19 jun. 2020.

O'REILLY, John; WANG, Qing; SETKOVA, Lucie; HUTCHINSON, Joseph P.; CHEN, Yong; LORD, Heather L.; LINTON, Christopher M.; PAWLISZYN, Janusz. Automation of solid-phase microextraction. **Journal of Separation Science**, *[S. l.]*, v. 28, n. 15, p. 2010–2022, 2005. DOI: 10.1002/jssc.200500244. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200500244. Acesso em: 20 jun. 2020.

OFTEDAL, O. T. The evolution of milk secretion and its ancient origins. *In*: ANIMAL 2012, **Anais** [...]. : Animal, 2012. p. 355–368. DOI: 10.1017/S1751731111001935.

ÖHMAN, Inger; WIKNER, Birgitta Norstedt; BECK, Olof; SARMAN, Ihsan. Narcolepsy treated with racemic amphetamine during pregnancy and breastfeeding. **Journal of Human Lactation**, *[S. l.]*, v. 31, n. 3, p. 374–376, 2015. DOI: 10.1177/0890334415585067.

OLIVEIRA, Thaís Camarotto; LANÇAS, Fernando Mauro. Extração de pesticidas em amostras de alimentos através de sorção em ponteiras descartáveis. **Scientia Chromatographica**, *[S. l.]*, p. 243–255, 2018. Disponível em: https://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v10n4_a03.pdf. Acesso em: 25 jan. 2021.

OSTREA, Enrique M.; KNAPP, D. Kirk; TANNENBAUM, Libby; OSTREA, Anthony R.; ROMERO, Al; SALARI, Valiollah; AGER, Joel. Estimates of illicit drug use during pregnancy by maternal interview, hair analysis, and meconium analysis. **Journal of Pediatrics**, *[S. l.]*, v. 138, n. 3, p. 344–348, 2001. DOI: 10.1067/mpd.2001.111429.

PACK, Simon. Factor analysis in chemistry, (2nd edition), E. R. Malinowski, Wiley-Interscience, 1991. ISBN 0-471-53009-3. Price £43.70. **Journal of Chemometrics**, *[S. l.]*, v. 5, n. 6, p. 545–545, 1991. DOI: 10.1002/cem.1180050607.

PANG, Wei Wei; HARTMANN, Peter E. **Initiation of human lactation: Secretory differentiation and secretory activationJournal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**J Mammary Gland Biol Neoplasia, , 2007. DOI: 10.1007/s10911-007-9054-4.

PICHINI, Simona; GARCIA-ALGAR, Oscar. In Utero Exposure to Smoking and Newborn Neurobehavior. **Therapeutic Drug Monitoring**, *[S. l.]*, v. 28, n. 3, p. 288–290, 2006. DOI: 10.1097/01.ftd.0000211809.81816.1b. Disponível em: http://journals.lww.com/00007691-200606000-00002. Acesso em: 19 jun. 2020.

PINTO, M. A. L. ..; QUEIROZ, M. E. C. Extração em ponteiras descartáveis: fundamentos teóricos e aplicações. . **Scientia Chromatographica**, *[S. l.]*, p. 101–108, 2015. a. Disponível em: http://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v7n2a01.pdf. Acesso em: 19 jun. 2020.

PINTO, Mônica Aparecida Lemos; QUEIROZ, Maria Eugênia Costa. Extração em ponteiras descartáveis: fundamentos teóricos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, *[S. l.]*, p. 101–108, 2015. b. Disponível em: http://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v7n2a01.pdf. Acesso em:

23 nov. 2019.

RE, Wojnar-Horton; JH, Kristensen; P, Yapp; KF, Ilett; LJ, Dusci; LP, Hackett. Methadone distribution and excretion into breast milk of clients in a methadone maintenance programme. **British journal of clinical pharmacology**, *[S. l.]*, v. 44, n. 6, p. 543–547, 1997. DOI: 10.1046/J.1365-2125.1997.T01-1-00624.X. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9431829/. Acesso em: 10 out. 2021.

ROBINSON, ANN E.; WILLIAMS, FAITH M. The distribution of methadone in man. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, *[S. l.]*, v. 23, n. 5, p. 353–358, 1971. DOI: 10.1111/j.2042-7158.1971.tb09926.x.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Estratégia experimental para fatoriais fracionados e Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). *In*: **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. [s.l.] : Cárita, 2014. p. 135–232.

RODRIGUES, Maria Isabel; IEMMA, Antônio Francisco. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**, 2005.

RR, Dos Santos; MJ, Nunes Paiva; JC, Veloso; P, Serp; Z, Lourdes Cardeal; HC, Menezes. Efficient extraction method using magnetic carbon nanotubes to analyze cocaine and benzoylecgonine in breast milk by GC/MS. **Bioanalysis**, *[S. l.]*, v. 9, n. 21, p. 1655–1666, 2017. DOI: 10.4155/BIO-2017-0140. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29095043/. Acesso em: 10 out. 2021.

SAMHSA, Center for Behavioral Health Statistics. **National Survey on Drug Use and Health: Summary of National Findings**. [s.l: s.n.]. Disponível em: http://store.samhsa.gov/home. Acesso em: 19 jun. 2020.

SANTOS, Wilson José Ramos; DE MARTINIS, Bruno Spinosa. **Psychoactive**

substances in human breast milk: A review of analytical strategies for their investigationBioanalysis Future Medicine Ltd., , 2020. DOI: 10.4155/bio-2020-0155. Disponível em: https://www.future-science.com/doi/abs/10.4155/bio-2020-0155. Acesso em: 19 nov. 2020.

SATTARI, Maryam; SERWINT, Janet R.; LEVINE, David M. **Maternal Implications of Breastfeeding: A Review for the InternistAmerican Journal of Medicine**Elsevier Inc., , 2019. DOI: 10.1016/j.amjmed.2019.02.021.

SCHAUBERGER, Charles W.; NEWBURY, Emily J.; COLBURN, Jean M.; AL-HAMADANI, Mohammed. Prevalence of illicit drug use in pregnant women in a Wisconsin private practice setting. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, *[S. l.]*, v. 211, n. 3, p. 255.e1-255.e4, 2014. DOI: 10.1016/j.ajog.2014.03.023.

SILVEIRA, G. .. **Avaliação da exposição de crianças a substâncias psicoativas durante a lactação através da análise toxicológica em leite materno. Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre (Toxicologia e Análises Toxicológicas). Universidade de São Paulo.** 2016. *[S. l.]*, 2016. Disponível em: https://teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9141/tde-12082016-091919/pt-br.php. Acesso em: 19 jun. 2020.

SILVEIRA, Gabriela de Oliveira; BELITSKY, Íris Tikkanen; LODDI, Silvana; RODRIGUES DE OLIVEIRA, Carolina Dizioli; ZUCOLOTO, Alexandre Dias; FRUCHTENGARTEN, Ligia Veras Gimenez; YONAMINE, Mauricio. Development of a method for the determination of cocaine, cocaethylene and norcocaine in human breast milk using liquid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Forensic Science International**, *[S. l.]*, v. 265, p. 22–28, 2016. DOI: 10.1016/j.forsciint.2016.01.007.

SILVEIRA, Gabriela de Oliveira; LODDI, Silvana; DE OLIVEIRA, Carolina Dizioli Rodrigues; ZUCOLOTO, Alexandre Dias; FRUCHTENGARTEN, Ligia Veras Gimenez; YONAMINE, Mauricio. Headspace solid-phase microextraction and gas chromatography−mass spectrometry for determination of cannabinoids in human breast milk. **Forensic Toxicology**, *[S. l.]*, v. 35, n. 1, p. 125–132, 2017. DOI: 10.1007/s11419-016-0346-5.

SWGTOX, Scientific Working Group for Forensic Toxicology. Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. **Journal of Analytical Toxicology**, *[S. l.]*, v. 37, n. 7, p. 452–474, 2013. DOI: 10.1093/jat/bkt054. Disponível em: https://academic.oup.com/jat/article-lookup/doi/10.1093/jat/bkt054. Acesso em: 16 dez. 2020.

TOMA, T. S.; REA, M. F. **Benefícios da amamentação para a saúde da mulher e da criança: um ensaio sobre as evidências**. 2008. Disponível em: https://www.scielo.br/pdf/csp/v24s2/09.pdf. Acesso em: 19 jun. 2020.

TRENTO, F. K. H. S. **Leite humano como fonte de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas e com potencial probiótico. Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre (Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade de São Paulo (Piracicaba), 2012.** 2012. *[S. l.]*, 2012. Disponível em: https://teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-22102012-164816/pt-br.php. Acesso em: 19 jun. 2020.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME (UNODC). Guidance for the validation of analytical methodology and calibration of equipment used for testing of illicit drugs in seized materials and biological specimens : a commitment to quality and continuous improvement. **United Nations Office on Drugs and Crime**, *[S. l.]*, 2009. Disponível em: www.unodc.org. Acesso em: 24 out. 2021.

UNODC, United Nations Office on Drugs and Crime. **World Drug Report**. 2018. Disponível em: https://www.unodc.org/wdr2018/. Acesso em: 19 jun. 2020.

UNODC, United Nations Office on Drugs and Crime. **World Drug Report**. 2020. Disponível em: https://wdr.unodc.org/wdr2020/. Acesso em: 7 jan. 2021.

UNODC, United Nations Office on Drugs and Crime. **World Drug Report 2021**. 2021. Disponível em: https://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/wdr2021.html. Acesso em: 5 out. 2021.

UVNÄS-MOBERG, Kerstin. Oxytocin may mediate the benefits of positive social interaction and emotions. *In*: PSYCHONEUROENDOCRINOLOGY 1998, **Anais** [...]. : Psychoneuroendocrinology, 1998. p. 819–835. DOI: 10.1016/S0306-4530(98)00056-0.

VAHIDINIA, Aliasghar; SAMIEE, Fateme; FARADMAL, Javad; RAHMANI, Alireza; TARAVATI JAVAD, Masoumeh; LEILI, Mostafa. Mercury, Lead, Cadmium, and Barium Levels in Human Breast Milk and Factors Affecting Their Concentrations in Hamadan, Iran. **Biological Trace Element Research**, *[S. l.]*, v. 187, n. 1, p. 32–40, 2019. DOI: 10.1007/s12011-018-1355-5. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s12011-018-1355-5. Acesso em: 7 jan. 2021.

VL, Feilberg; D, Rosenborg; C, Broen Christensen; JV, Mogensen. Excretion of morphine in human breast milk. **Acta anaesthesiologica Scandinavica**, *[S. l.]*, v. 33, n. 5, p. 426–428, 1989. DOI: 10.1111/J.1399-6576.1989.TB02938.X. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2800981/. Acesso em: 10 out. 2021.

WARD, R. M.; BATES, B. A.; BENITZ, W. E.; BURCHFIELD, D. J.; RING, J. C.; WALLS, R. P.; WALSON, P. D. **The transfer of drugs and other chemicals into human milkPediatrics**American Academy of Pediatrics, , 2001. DOI: 10.1542/peds.108.3.776.

WHO, World Health Organization. **Infant and young child nutrition. Geneva.** 2003. Disponível em: https://www.who.int/nutrition/publications/inf_assess_nnpp_eng.pdf. Acesso em: 19 jun. 2020.

WINECKER, Ruth E. et al. Detection of Cocaine and Its Metabolites in Breast Milk. **Journal of Forensic Sciences**, *[S. l.]*, v. 46, n. 5, p. 15124J, 2001. DOI: 10.1520/jfs15124j.

WOJNAR-HORTON, R. E.; KRISTENSEN, J. H.; YAPP, P.; ILETT, K. F.; DUSCI, L. J.; HACKETT, L. P. Methadone distribution and excretion into breast milk of clients in a methadone maintenance programme. **British Journal of Clinical Pharmacology**, *[S. l.]*, v. 44, n. 6, p. 543–547, 2003. DOI: 10.1046/j.1365-2125.1997.t01-1-00624.x.

ANEXO I

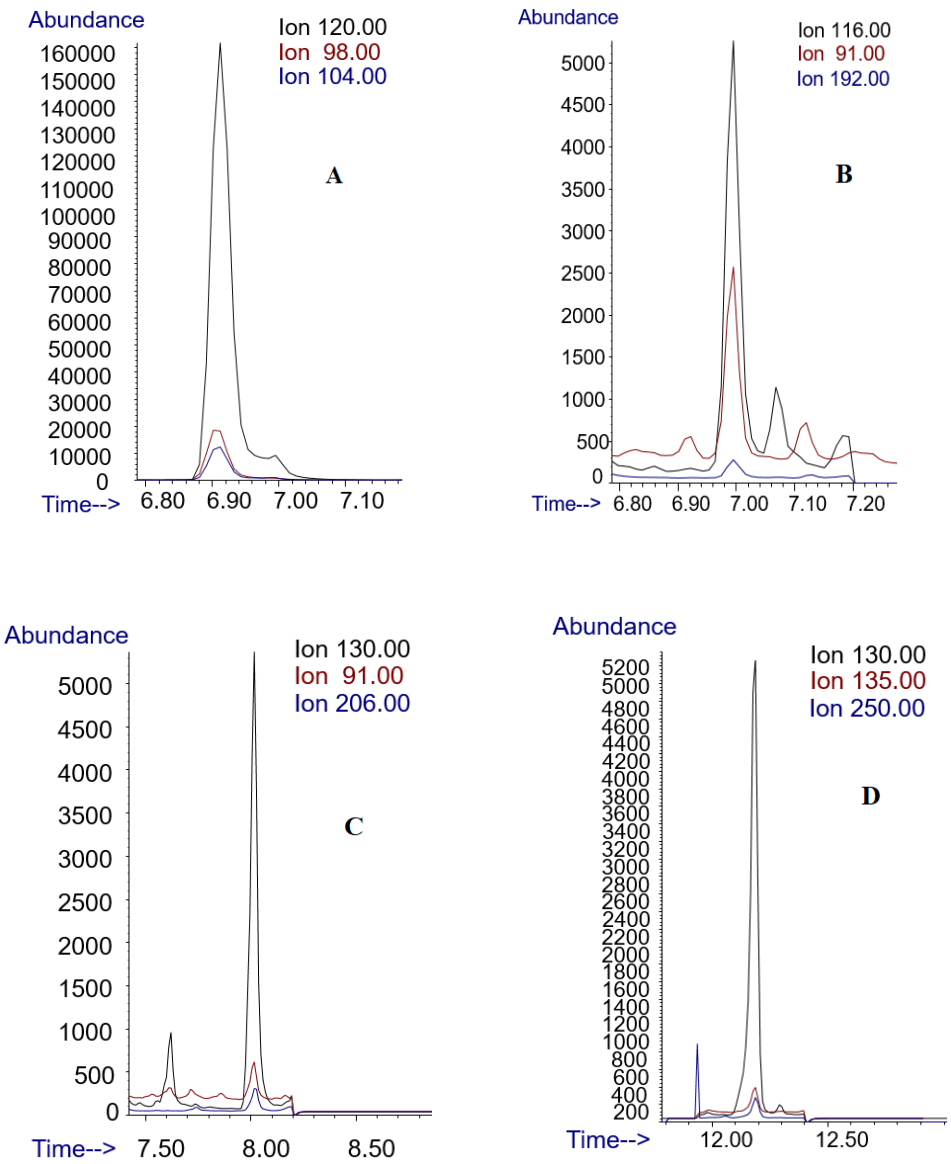


Figura 1. Cromatograma de íons do padrão interno Anfetamina-D_{11} (A) na concentração de 200 $ng.mL^{-1}$ e dos analitos Anfetamina (B), Metanfetamina (C) e Metilenodioximetanfetamina (D) no limite de quantificação do método (5 $ng.mL^{-1}$). Fonte: autoria própria (2022).

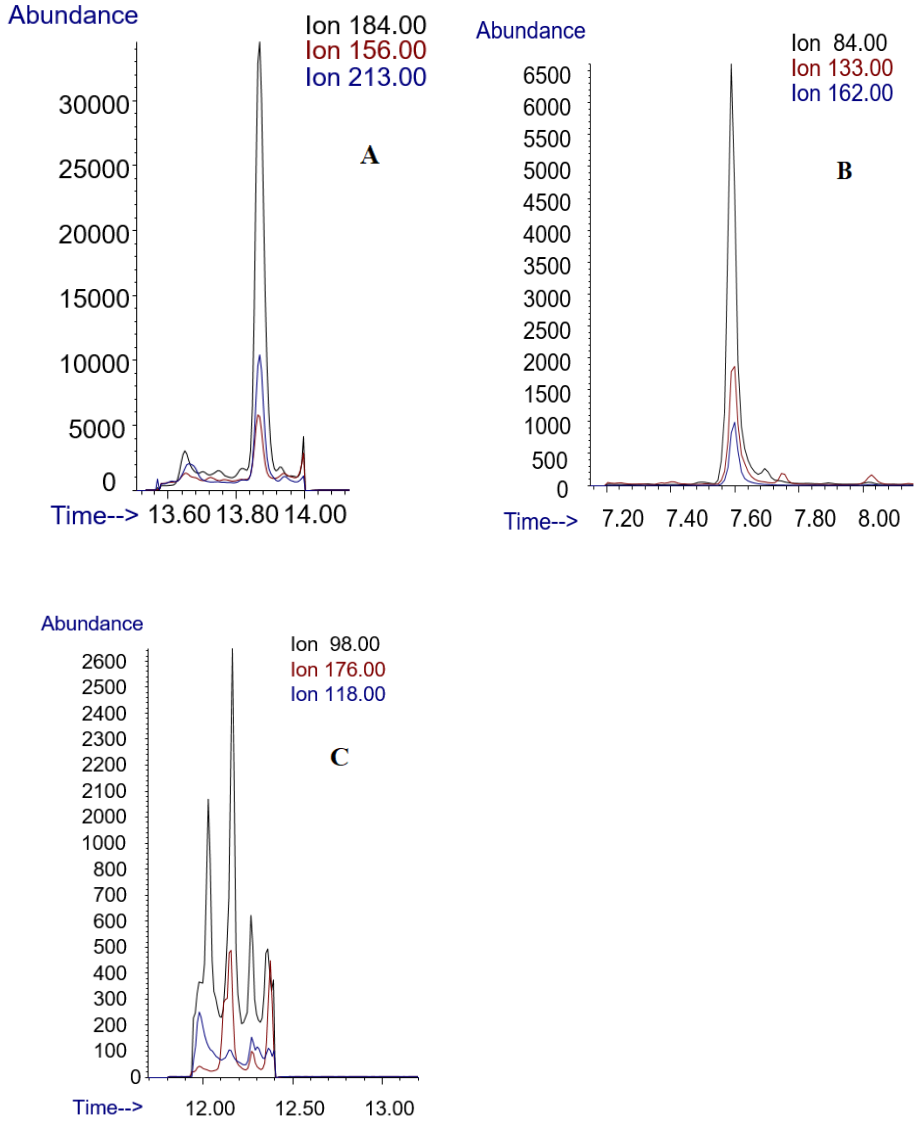


Figura 2. Cromatograma de íons do padrão interno Cetamina-D_4 (A) na concentração de 200 $ng.mL^{-1}$ e dos analitos Nicotina (B) e Cotinina (C) no limite de quantificação do método (5 $ng.mL^{-1}$). Fonte: autoria própria (2022).

K

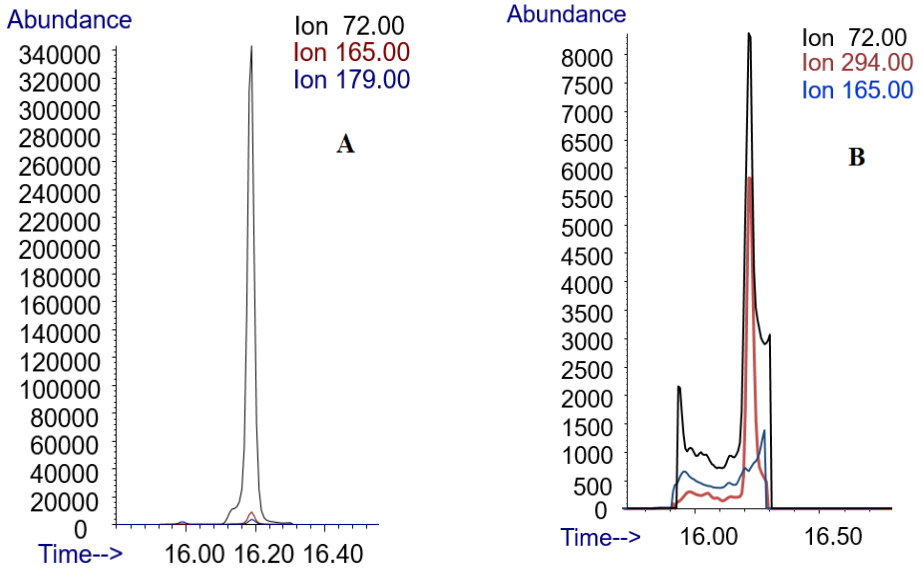


Figura 3. Cromatograma de íons do padrão interno Metadona-D_3 (A) na concentração de 200 $ng.mL^{-1}$ e do analito Metadona (B) no limite de quantificação do método (5 $ng.mL^{-1}$).

Fonte: autoria própria (2022).

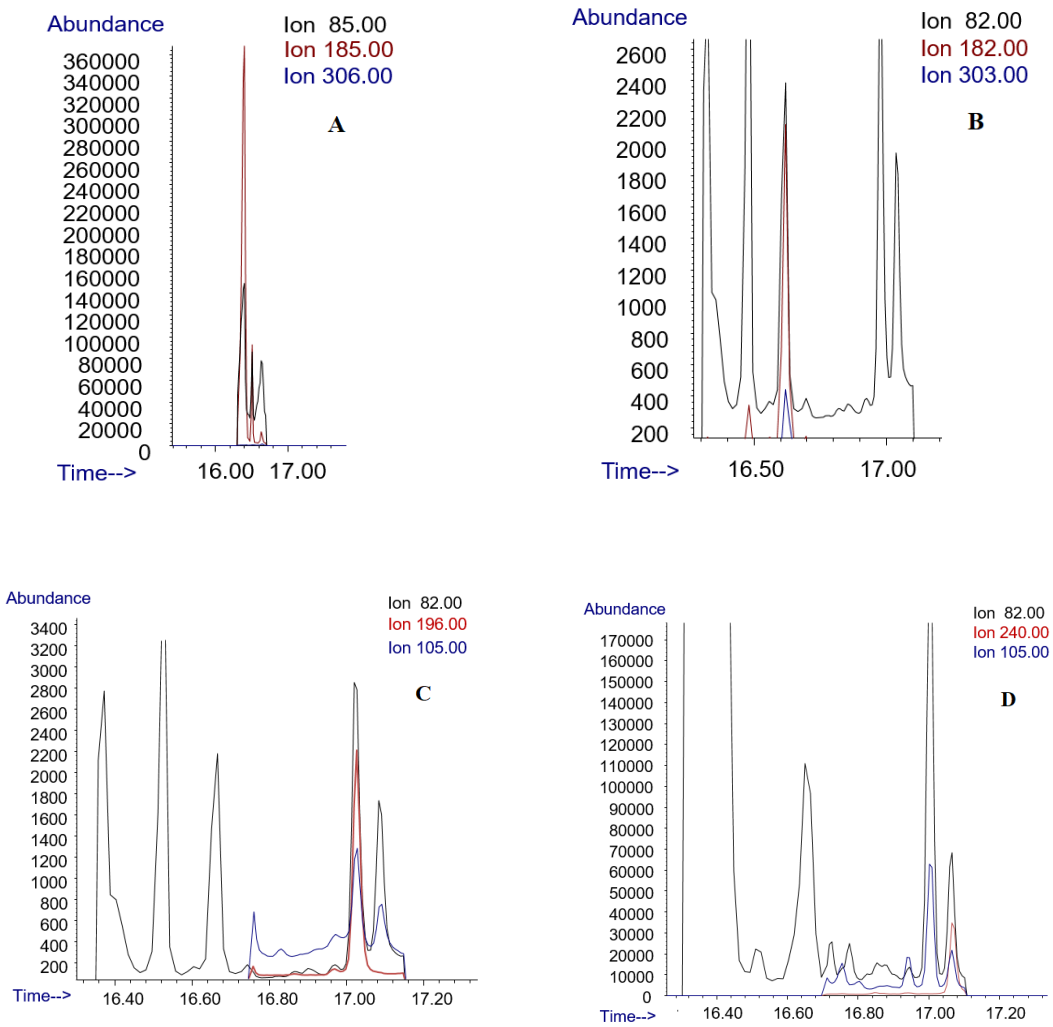


Figura 4. Cromatograma de íons do padrão interno Cocaína-D_3 (A) na concentração de 200 $ng.mL^{-1}$ e dos analitos Cocaína (B), Cocaetileno (C) e Benzoilecgonina (D) no limite de quantificação do método (5 $ng.mL^{-1}$). Fonte: autoria própria (2022).

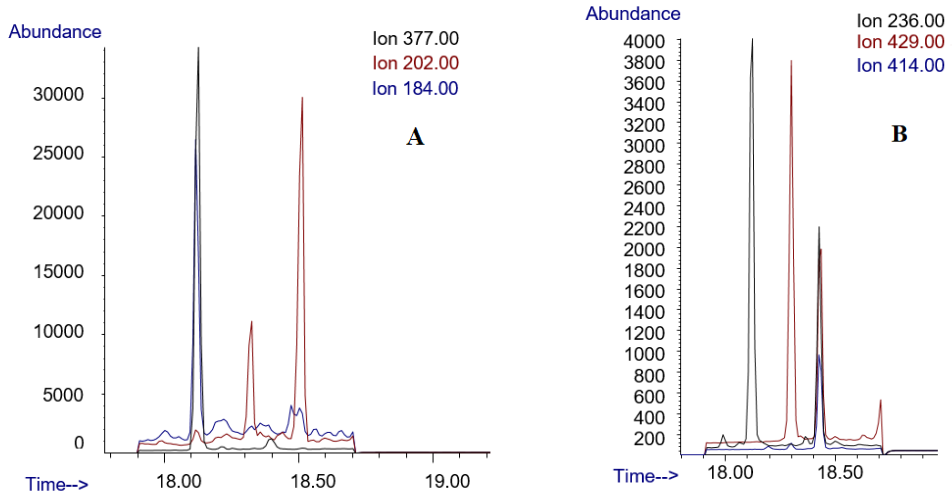
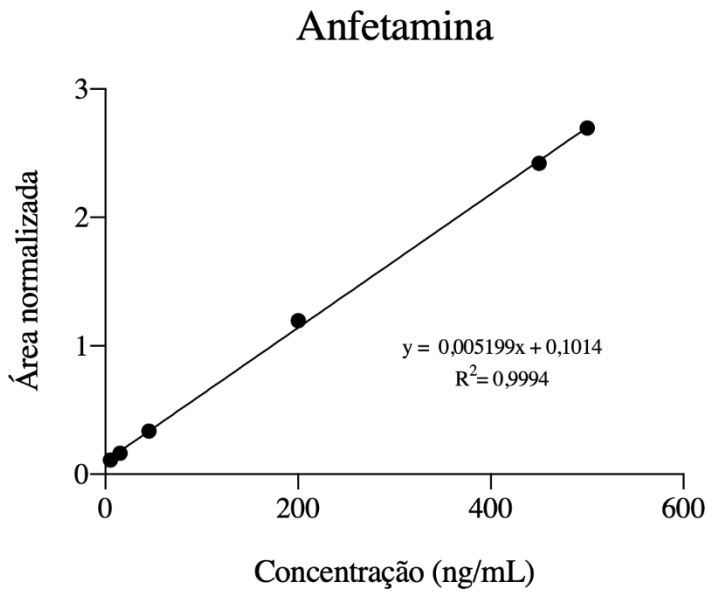


Figura 5. Cromatograma de íons do padrão interno Codeína-D_6 (A) na concentração de 200 $ng.mL^{-1}$ e do analito Morfina (B) no limite de quantificação do método (5 $ng.mL^{-1}$).

Fonte: autoria própria (2022).

ANEXO II



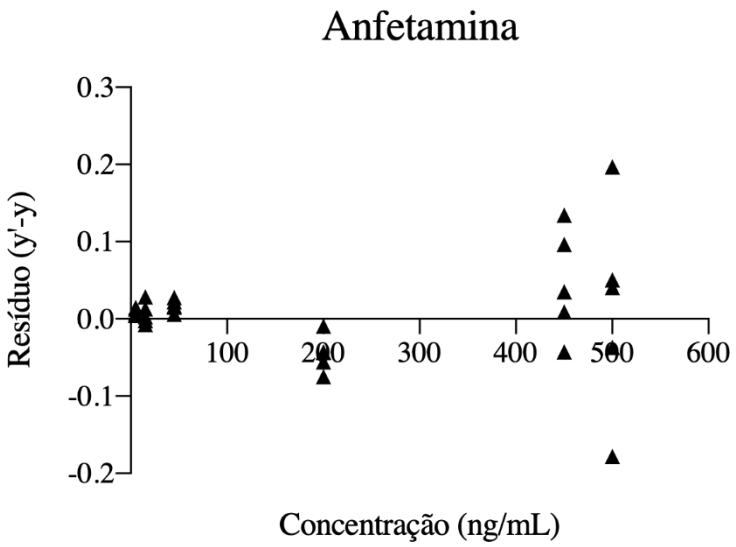


Figura 1: Curva de calibração para Anfetamina e gráfico de dispersão dos resíduos.

Fonte: autoria própria (2022).

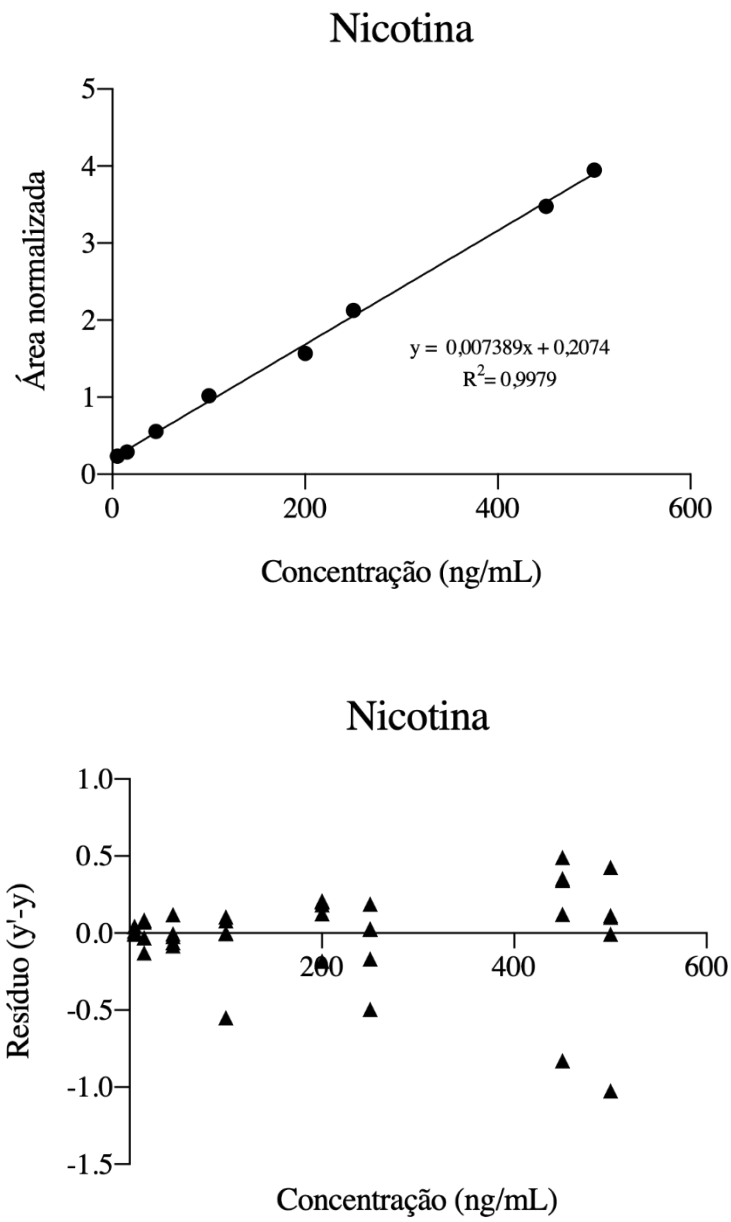


Figura 2: Curva de calibração para Nicotina e gráfico de dispersão dos resíduos.

Fonte: autoria própria (2022).

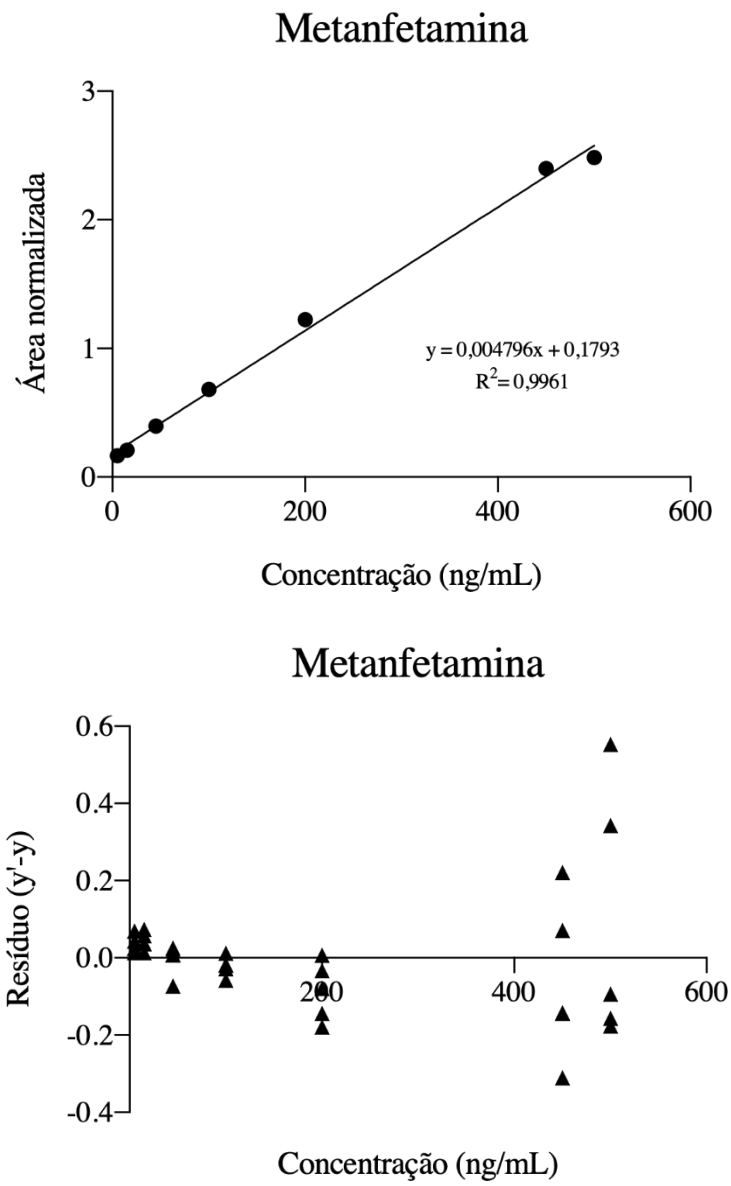


Figura 3: Curva de calibração para Metanfetamina e gráfico de dispersão dos resíduos.

Fonte: autoria própria (2022).

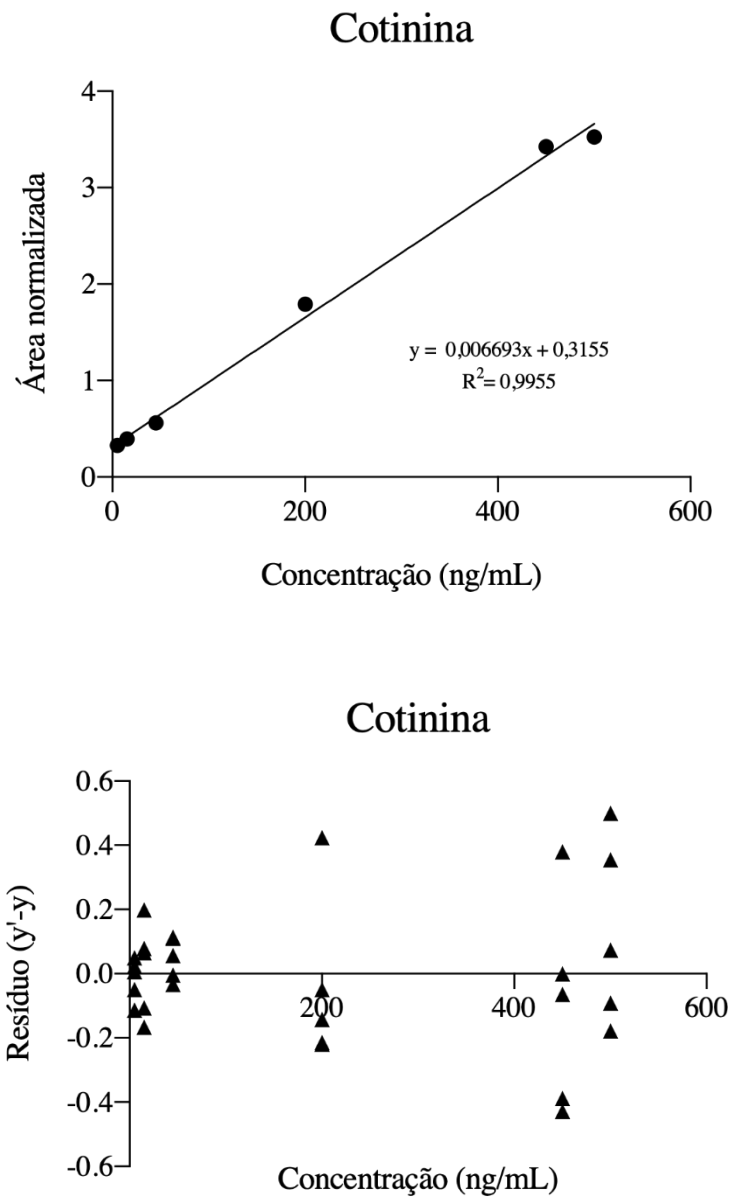


Figura 4: Curva de calibração para Cotinina e gráfico de dispersão dos resíduos.

Fonte: autoria própria (2022).

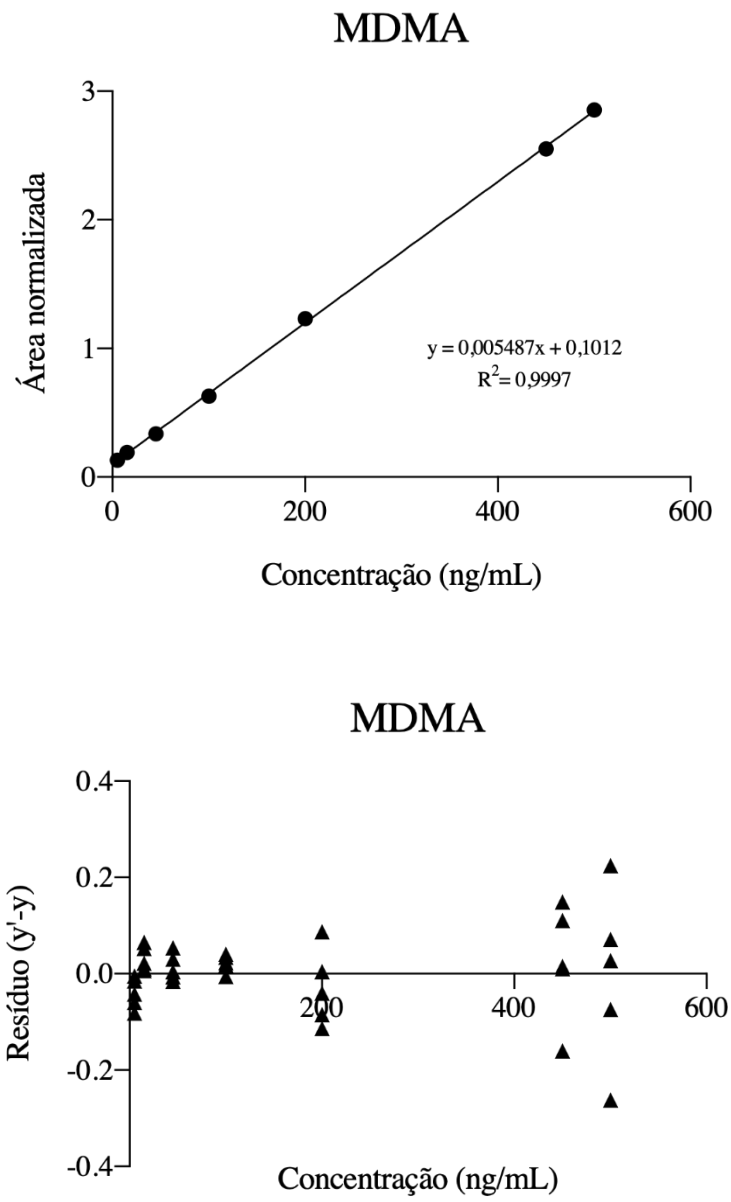


Figura 5: Curva de calibração para MDMA e gráfico de dispersão dos resíduos.

Fonte: autoria própria (2022).

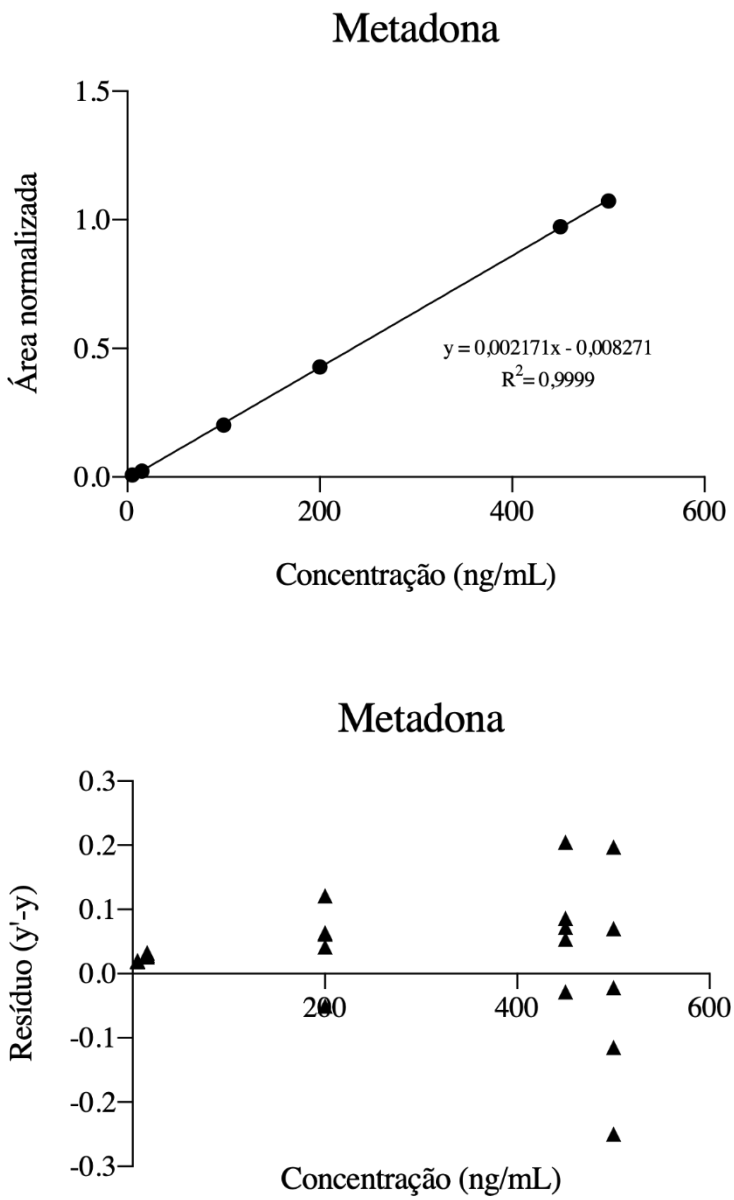


Figura 6: Curva de calibração para Metadona e gráfico de dispersão dos resíduos.

Fonte: autoria própria (2022).

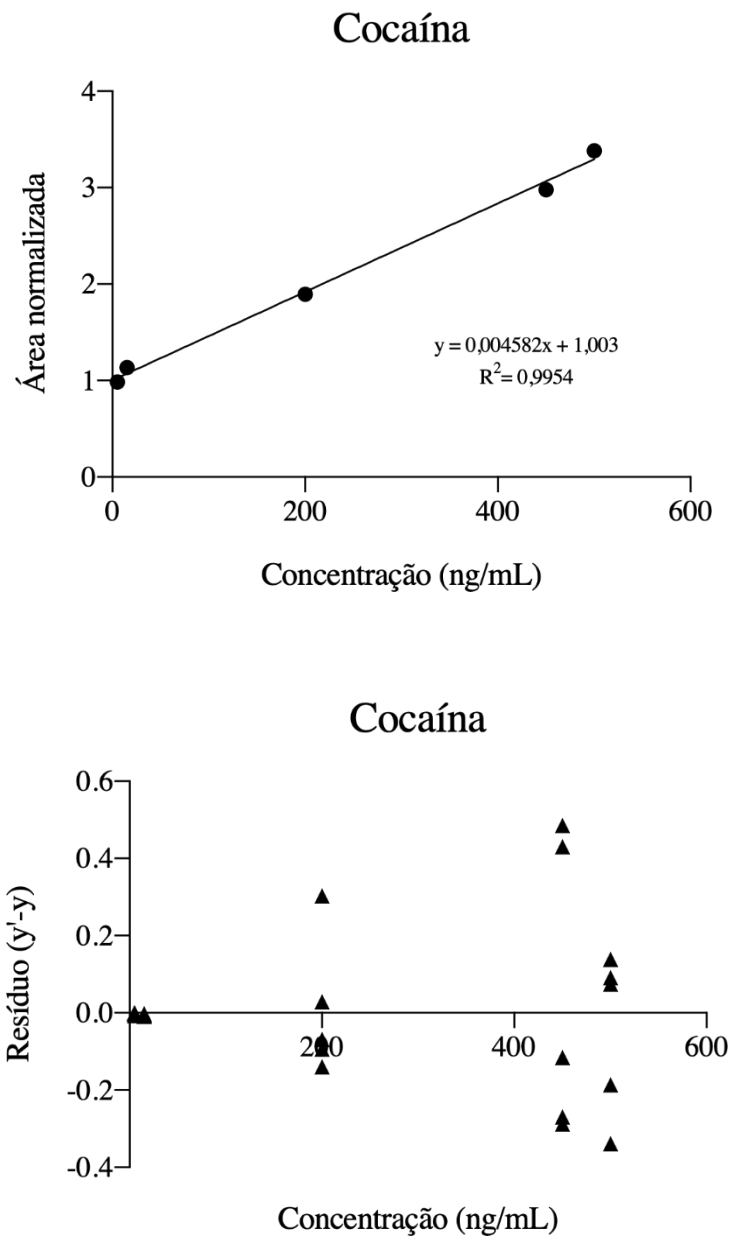


Figura 7: Curva de calibração para Cocaína e gráfico de dispersão dos resíduos.

Fonte: autoria própria (2022).

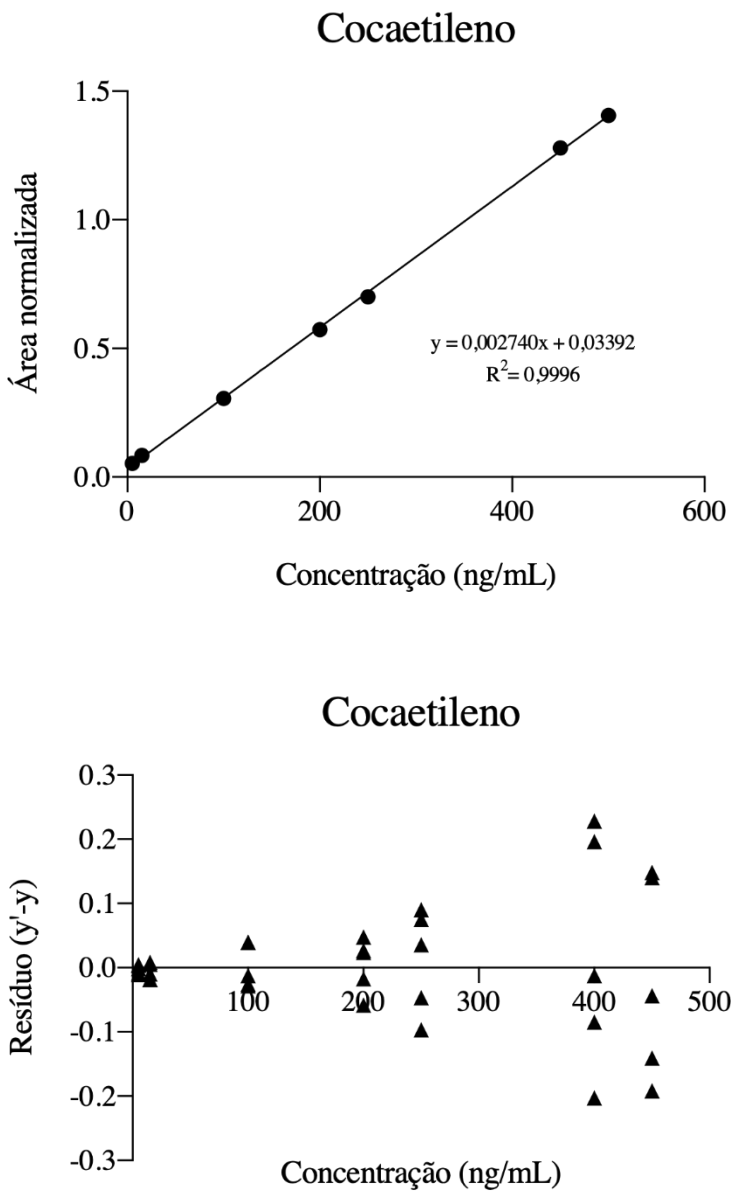


Figura 8: Curva de calibração para Cocaetileno e gráfico de dispersão dos resíduos.

Fonte: autoria própria (2022).

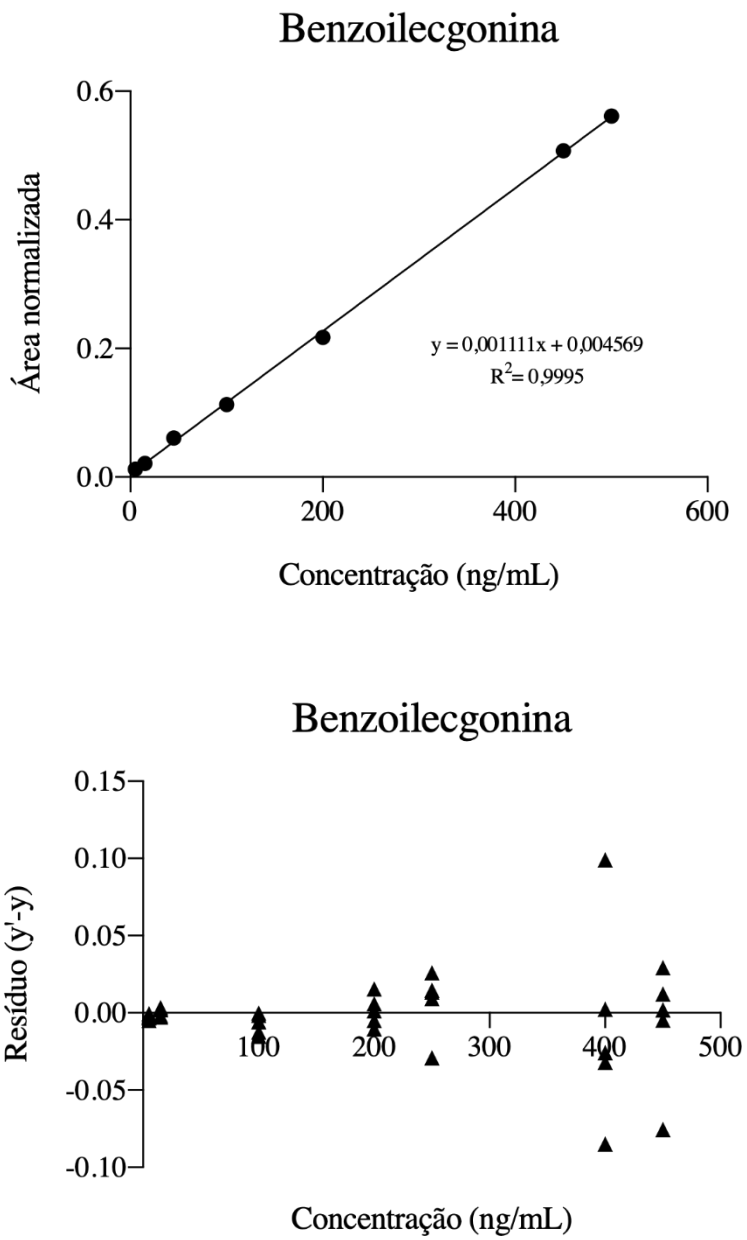


Figura 9: Curva de calibração para Benzoilecgonina e gráfico de dispersão dos resíduos.
Fonte: autoria própria (2022).

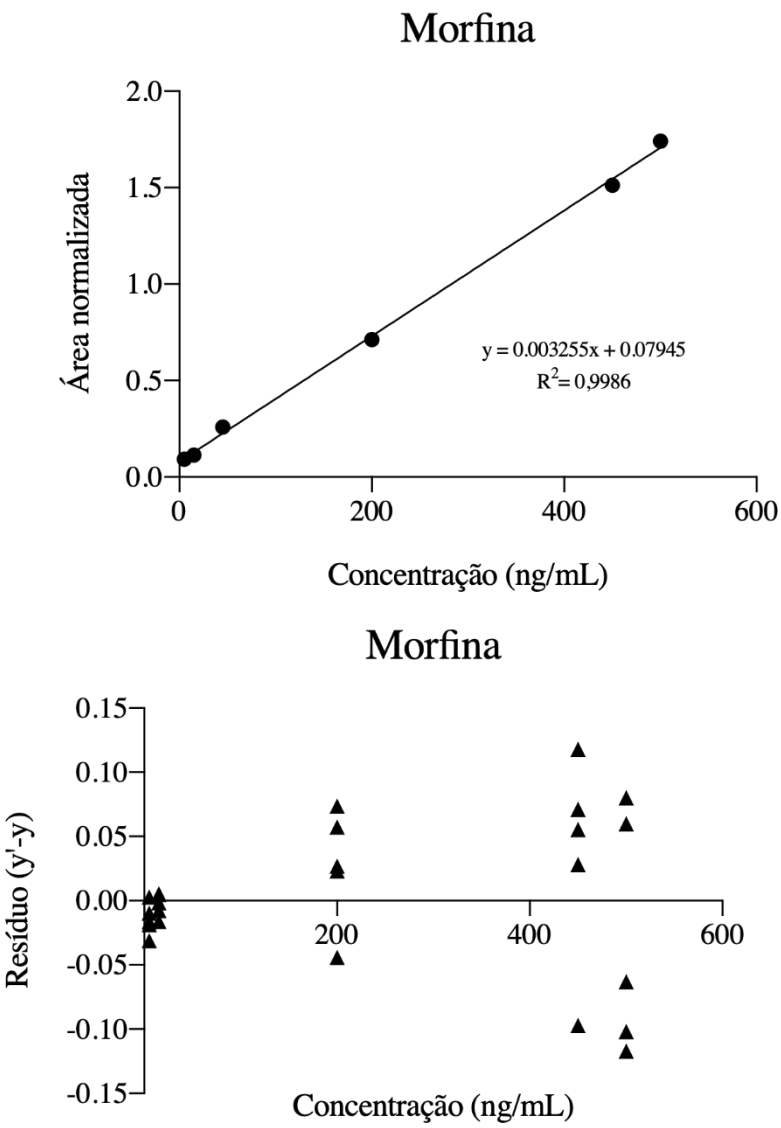


Figura 10: Curva de calibração para Morfina e gráfico de dispersão dos resíduos.

Fonte: autoria própria (2022).

ANEXO III

FMRP-USP
RIBEIRÃO PRETO

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DA PESQUISA

Eu, Larissa Garcia Alves, Diretora Técnica de Saúde I, RG: 43454226-X CPF nº 325277448-85, autorizo o aluno Wilson José Ramos Santos Junior, RG nº 49.783.423-6, CPF 444.927.718-08, matriculado no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), sob a orientação do Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis, a receber alíquotas amostrais provenientes da coleta de leite materno recebida pelo Banco de Leite do Hospital das Clínicas de Ribeirão por mães doadoras ativas do mesmo, para a realização do Projeto de Pesquisa "Desenvolvimento e validação de método analítico para investigação de substâncias psicoativas em amostras de leite materno através da cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas".

O pesquisador acima qualificado se compromete a:

1- Iniciar a coleta de dados somente após o Projeto de Pesquisa ser aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos.
2- Obedecer às disposições éticas de proteger os participantes da pesquisa, garantindo-lhes o máximo de benefícios e o mínimo de riscos.
3- Assegurar a privacidade das pessoas citadas nos documentos institucionais e/ou contatadas diretamente, de modo a proteger suas imagens, bem como garante que não utilizarão as informações coletadas em prejuízo dessas pessoas e/ou da instituição, respeitando deste modo as Diretrizes Éticas da Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, nos termos estabelecidos na Resolução CNS Nº 466/2012, e obedecendo as disposições legais estabelecidas na Constituição Federal Brasileira, artigo 5º, incisos X e XIV e no Novo Código Civil, artigo 20.

Ribeirão Preto, 27 de março de 2019.

Prof. Dr. José Simon Carnelo Jr.
Pediatria e Neonatologia
CRM 51911 FMRP/USP

Larissa Garcia Alves
Diretora Técnica de Saúde I
Banco de Leite Humano HCFMRP-USP

Larissa Garcia Alves
Diretora Técnica de Saúde I
HCRP
CRBM 11635

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP
Nome da Unidade
Telefone: 16 3602-xxxx
e-mail: xxxxxxxx@hcrp.usp.br
www.hcrp.usp.br

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP/FCFRP nº. 013/2019
kms

Ribeirão Preto, 20 de agosto de 2019.

Ao pós-graduando
Wilson José Ramos Santos Junior
Orientador: Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis
FCFRP/USP

Prezado Pesquisador,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado "**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA INVESTIGAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS EM AMOSTRAS DE LEITE MATERNO ATRAVÉS DA CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS**", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo **CEP/FCFRP nº. 504 - CAAE: 10539719.0.0000.5403**, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP em sua 189ª reunião, realizada em 16/08/2019, conforme Parecer Consubstanciado do CEP nº 3.519.806.

Lembramos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá "ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local".

Informamos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de emenda na Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

PROFª. DRª. CLENI MARA MARZOCCHI MACHADO
Coordenadora do CEP/FCFRP

Comitê de Ética em Pesquisa FCFRP/USP
Avenida do Café s/nº - Monte Alegre – CEP 14040-903 – Ribeirão Preto – SP
Fone: (16) 3315-4213 – Fax: (16) 3315-4892 - cep@fcfrp.usp.br

USP - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP -

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento e validação de método analítico para investigação de substâncias psicoativas em amostras de leite materno através da cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas

Pesquisador: WILSON JOSE RAMOS SANTOS JUNIOR

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 10539719.0.3002.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.562.376

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa da instituição proponente USP - FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO DA USPFCFRP/USP. O HCFMRP_USP será uma coparticipante da pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

Neste projeto pretende-se investigar a presença de drogas psicoativas e seus metabólitos em amostras de leite humano através do desenvolvimento e validação de um método analítico capaz de analisar diferentes analíticos nas amostras coletadas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com o parecer da instituição proponente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

De acordo com o parecer da instituição proponente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram anexados na Plataforma Brasil e estão de acordo com as normas éticas vigentes. Apresentou carta de anuência do responsável pelo local de coleta no HCFMRP-USP.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O CEP tomou ciência e concorda com o parecer da instituição proponente, e aprova o HCFMRP-USP como coparticipante da pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

"O CEP do HC e da FMRP-USP concorda com o parecer ético emitido pelo CEP da Instituição Proponente, que cumpre as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 466/12. Diante disso, o HCFMRP-USP, como instituição co-participante do referido projeto de pesquisa, está ciente de suas co-responsabilidades e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos desta pesquisa, dispondo de infra-estrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar".

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1418740.pdf	30/08/2019 12:42:46		Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	termo_autorizacao.pdf	30/08/2019 12:41:23	WILSON JOSE RAMOS SANTOS JUNIOR	Aceito
Outros	Segunda_Carta_Resposta_CEP_FCFRP.pdf	28/06/2019 10:24:48	WILSON JOSE RAMOS SANTOS JUNIOR	Aceito
Outros	Primeira_Carta_Resposta_CEP_FCFRP.pdf	28/06/2019 10:24:31	WILSON JOSE RAMOS SANTOS JUNIOR	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Versao_2.pdf	28/06/2019 10:21:44	WILSON JOSE RAMOS SANTOS JUNIOR	Aceito
Outros	Ficha_de_matricula_e_controle_clinico_da_doadora.pdf	31/05/2019 16:23:13	WILSON JOSE RAMOS SANTOS JUNIOR	Aceito
Outros	Versao_2_Termo_de_Autorizacao.pdf	31/05/2019 16:19:14	WILSON JOSE RAMOS SANTOS	Aceito

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

Outros	Versao_2_Termo_de_Autorizacao.pdf	31/05/2019 16:19:14	JUNIOR	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Versao_2_Projeto_de_Pesquisa.pdf	31/05/2019 16:16:47	WILSON JOSE RAMOS SANTOS JUNIOR	Aceito
Outros	carta_encaminhamento.pdf	27/03/2019 18:06:11	WILSON JOSE RAMOS SANTOS JUNIOR	Aceito
Outros	Lattes_Wilson.pdf	27/03/2019 17:47:12	WILSON JOSE RAMOS SANTOS JUNIOR	Aceito
Outros	Lattes_Bruno_Spinosa.pdf	27/03/2019 17:46:26	WILSON JOSE RAMOS SANTOS JUNIOR	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

RIBEIRAO PRETO, 09 de Setembro de 2019

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador(a))

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

FFCLRP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Campus de Ribeirão Preto

Of.CEtP/FFCLRP-USP/141-dgfs.

Ribeirão Preto, 04 de dezembro de 2019.

Prezado(a) Pesquisador(a),

Comunicamos a V. Sa. que o projeto de pesquisa intitulado **"Desenvolvimento e validação de método analítico para investigação de substâncias psicoativas em amostras de leite materno através da cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas"** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FFCLRP-USP, em sua 198ª Reunião Ordinária, realizada em 28.11.2019, e enquadrado na categoria: **APROVADO** (CAAE nº10539719.0.3001.5407).

Solicitamos que eventuais modificações ou emendas ao projeto de pesquisa sejam apresentadas ao CEP, de forma sucinta, identificando a parte do projeto a ser modificada e suas justificativas. De acordo com a Resolução nº466 de 12/12/2012, devem ser entregues **relatórios semestrais** e, ao término do estudo, um **relatório final** sempre via Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Prof.ª Dr.ª Sylvia Domingos Barrera
Vice- coordenadora, em exercício

Ao(À) Senhor(a)
Wilson Jose Ramos Santos Junior
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da FCFRP-USP

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa da FFCLRP USP
Fone: (16) 3315-4811 Avenida Bandeirantes, 3900 - bloco 01 da Administração - sala 07
14040-901 - Ribeirão Preto - SP - Brasil
Homepage: http://www.ffclrp.usp.br - e-mail: coetp@listas.ffclrp.usp.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidada a participar da pesquisa **"Desenvolvimento e validação de método analítico para investigação de substâncias psicoativas em amostras de leite materno através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas"**, de responsabilidade do pesquisador Wilson José Ramos Santos Junior sob orientação do Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis.

O presente projeto tem como objetivos desenvolver um método de análise química de leite materno para verificar a presença de substâncias que agem no Sistema Nervoso Central, como as presentes no cigarro, maconha e cocaína, e aplicá-lo em amostras coletadas pelo Banco de Leite do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto para comprovar sua eficiência e garantir a qualidade do leite a ser fornecido para recém-nascidos.

Para que haja sua participação, você como mãe doadora de leite humano, deverá autorizar que um volume de 5mL (uma colher das de chá) do volume total fornecido ao Banco de Leite seja separado e entregue ao pesquisador responsável para que seja feita a análise. Esse pequeno volume a ser fornecido não fará falta para o Banco de Leite. Essa amostra será registrada com código pelos funcionários do Banco de Leite, de forma que sua identidade não seja revelada ao pesquisador. Porém, outras informações obtidas através da "Ficha de matrícula e controle clínico da doadora", como a sua idade, número de gestações anteriores (se houver), número de filhos, condições de saneamento básico de sua residência e histórico de doenças serão fornecidas para fins estatísticos em relação ao uso de substâncias ativas no Sistema Nervoso Central.

Como benefícios da pesquisa, não há um benefício direto para você, mas a amostra fornecida será útil para confirmação da possibilidade de ausência ou presença das substâncias psicoativas no leite recebido e para validar o método de análise criado.

Sua participação na pesquisa não oferece riscos ou desconfortos previsíveis, uma vez que o leite é uma amostra biológica alternativa de coleta não invasiva a ser realizada como de costume para doação ao banco de leite; os riscos de danos à saúde são mínimos, considerando que a coleta das amostras é, muitas vezes, realizada a domicílio pelas próprias doadoras e depois direcionada ao Banco de Leite, que fará a divisão da amostra a ser fornecida ao pesquisador. **Esse procedimento não será alterado para a realização desta pesquisa.**

Não haverá contato direto entre você o pesquisador inicialmente, sendo este termo entregue por funcionários do Banco de Leite antes da coleta ser direcionada ao mesmo. Dado o consentimento, as amostras serão separadas e direcionadas ao Laboratório de Análises Toxicológicas Forenses, do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, onde serão armazenadas em congelador até o momento da análise.

Entretanto, você pode entrar em contato com o pesquisador responsável para maiores esclarecimentos ou mesmo para manifestar o desejo de sua retirada do projeto. **Você pode se recusar a participar ou se retirar do projeto a qualquer momento sem nenhum prejuízo.**

Uma via deste termo será entregue a você, caso decida participar como voluntário.

Em casos de dúvidas em relação à pesquisa, você pode entrar em contato com o Laboratório de Análises Toxicológicas Forenses - Avenida Bandeirantes, 3900 FFCLRP/USP - Departamento de Química, Bloco 8, sala 47-D andar superior, Fone (16) 3315-0471, Cel (16) 99214-8546 – E-mail: wilson.jose.santos@usp.br e martinis@usp.br.

Para esclarecimentos dos aspectos éticos da pesquisa, você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP - Avenida do Café, sem número, bairro Monte Alegre, Campus USP Ribeirão Preto - Bloco H - Sala 116 - CEP 14040-903 - Ribeirão Preto – SP. Fone (16) 3315-4213. Fax (16) 3315-4892. Horário de funcionamento: dias úteis, das 8 às 12 horas. E-mail: cep@fcfrp.usp.br

Pesquisador responsável

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

BANCO DE LEITE

Matrícula nº : _____
Data Inscrição: _____

FICHA DE MATRÍCULA E CONTROLE CLÍNICO DA DOADORA

DADOS PESSOAIS

Registro: _____

Nome: _____
Data Nasc.: _____ / _____ / _____ Naturalidade: _____
Endereço: _____ Nº: _____
Bairro: _____ Cidade: _____
Estado: _____ CEP.: _____ Telefone: _____
Ponto de residência: _____
Profissão: _____
Tipo: (R) Rotina (E) Eventual (S) Exclusivo

CONDIÇÕES DE MORADA

Saneamento: ( ) Esgoto ( ) Fossa
Água: ( ) Encanada ( ) Poço ( ) Bica
Frio: ( ) Freezer ( ) Geladeira
Potabilidade: ( ) Filtro ( ) Torneira
Animal (S/N): _____ Qual? _____

ANTROPOMETRIA

Peso: atual: _____ Teórico: _____ Circ. Punho: _____ Altura: _____

RECÉM – NASCIDO

Parto: ( ) Normal ( ) Cesária
Gemelar: ( ) Sim ( ) Não
Acompanhamento (P/C): _____
Qual: _____
Data do parto: ____ / ____ / ____ Peso Nasc.: _____ Teórico: _____ Atual: _____
Altura: Nasc.: _____ Atual: _____ Sexo: (M/F) _____

PERÍODO DE GESTAÇÃO

Número de gestação: _____ Número de filhos: _____ Amam. Anterior (S/N): ____ Tempo: _____
Pré-natal (S/N): _____ Tempo: _____ Uso medic. (S/N): _____ Qual: _____
Suplem. Ferro (S/N): _____ Tempo: _____ _____ Ganho de peso: _____ _____
Doença (S/N): _____ Qual: _____

- 10071015 -

HISTÓRIA PATOLÓGICA PREGRESSA

(1) Sarampo	(6) Sífilis	(11) Toxoplasmose	(16) Álcool
(2) Rubéola	(7) Hepatite	(12) Febre + 1 semana	(17) Coqueluche
(3) Catapora	(8) Tuberculose	(13) Chagas	(18) Drogas
(4) Asma	(9) Pneumonia	(14) Anemia	(19) Caxumba
(5) Alergia	(10) Diabetes	(15) Fumo	

Já recebeu transfusão sanguínea (S/N): _____ Tempo: _____

Número de parceiros sexuais: _____ Contato: (1) Tuberculose
(2) Hepatite
(3) Aids

HISTÓRIA CLÍNICA ATUAL

Hipert. Arterial (S/N): _____ Doença (S/N): Renal: _____ Cardíaca: _____

Medicação em uso (S/N): _____ Qual: _____

DADOS COMPLEMENTARES

Estado civil: _____ Escolaridade: _____ grau Cor: _____

Renda familiar: ( ) SM ( ) 2 – 5 SM ( ) 5 – 10 SM ( ) + 10 SM

Procedência: _____

SOROLOGIA

( ) Chagas ( ) Sífilis ( ) Hepatite ( ) HIV

Observações:

_____

Responsável

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

SCIENTIA VINCES