

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento e validação de metodologia para análise de
cocaína, derivados e metabólitos em amostras de meconio
utilizando a Cromatografia em fase Gasosa acoplada à
Espectrometria de Massas**

Marcela Nogueira Rabelo Alves

RIBEIRÃO PRETO
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento e validação de metodologia para análise de cocaína, derivados e metabólitos em amostras de mecônio utilizando a Cromatografia em fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para a obtenção de título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Toxicologia

Orientada: Marcela Nogueira Rabelo Alves
Orientador: Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis

RIBEIRÃO PRETO

2010

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

Nogueira Rabelo Alves, Marcela

Desenvolvimento e validação de metodologia para a análise de cocaína, derivados e metabólitos em amostras de mecônio, utilizando a cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas. Ribeirão Preto, 2010.

76 p. : Il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia

Orientador: Bruno Spinosa De Martinis

1. Cocaína, 2. Mecônio, 3. Cromatografia em fase gasosa, 4. Espectrometria de massas

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Marcela Nogueira Rabelo Alves

Título do trabalho: Desenvolvimento e validação de metodologia para análise de cocaína, derivados e metabólitos em amostras de mecônio utilizando a Cromatografia em fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

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

Área de Concentração: Toxicologia

Orientador(a): Prof.Dr. Bruno Spinosa De Martinis

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis, pela orientação e por todos os ensinamentos durante esses anos;

Aos colegas do laboratório, Aline, Luiza, Mariana, Rafael Bazzarella e Rafael (do álcool), por toda a ajuda, paciência e convívio;

A Ângela, por todos os ensinamentos dentro do laboratório, e pelas inestimáveis conversas fora dele;

Ao meu noivo, Rodrigo, pela paciência nos momentos de angústia e *stress*, por todo carinho, pelo imensurável apoio na conclusão deste trabalho e por me fazer cada dia mais feliz, obrigada meu amor!

A minha mãe, Verônica, minha fonte de inspiração, por me apoiar a cada passo que eu trilho, por ser minha amiga, obrigada por tudo mãe!

Aos meus irmãos, José Neto e Hugo, e ao meu pai, José Rabelo, que mesmo de longe, torcem muito pelo meu sucesso e pelas minhas conquistas;

Aos meus avós, Irony e José Nogueira, pelo carinho e apoio, pelas orações e por todo amor;

A toda minha família, que está sempre torcendo por mim;

A Andréa, minha amiga, por toda a ajuda durante o desenvolvimento desse trabalho, e ao seu marido Sílvio, pela paciência quando as conversas sobre cromatografia pareciam nunca terminar;

A minha amiga Ana Paula e ao seu futuro marido Fábio, pelo carinho e apoio prestados diariamente;

Aos meus amigos da faculdade, Rafael, Flávia, Mariana, Marina e Luís Miguel, obrigada pela convivência e ensinamentos de todos esses anos;

A todos os amigos que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

RESUMO

ALVES, M. N. R. **Desenvolvimento e validação de metodologia para análise de cocaína, derivados e metabólitos em amostras de mecônio utilizando a Cromatografia em fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas**. 2010. 76f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

O consumo de cocaína e crack no Brasil é um problema de saúde pública, ainda mais grave quando realizado por gestantes, que colocam em risco a sua vida e a do feto. A identificação dessas substâncias através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e utilizando como matriz biológica o mecônio, é uma técnica eficiente para detecção da exposição fetal à cocaína. O mecônio apresenta algumas vantagens em relação às outras matrizes biológicas como uma ampla janela de detecção dos analitos e de fácil coleta por ser não-invasiva. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi desenvolver e validar uma metodologia de preparo do mecônio para identificação de cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno e o éster metilanidroecgonina em seus extratos, usando a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Os analitos foram inicialmente extraídos com metanol, sendo posteriormente, purificados usando cartuchos de extração em fase sólida do tipo Bond Elut Certify I. A determinação desses analitos foi realizada usando um CG-EM do tipo *ion trap*, no modo *full scan* de detecção. O método foi validado, segundo critérios estabelecidos pela ANVISA, na faixa de linearidade de 20 a 1000 ng/g para a cocaína e o cocaetileno; 40 a 1500 ng/g para a benzoilecgonina e 60 a 1500 ng/g para o éster metilanidroecgonina, usando 0,5 g de mecônio por análise. A resposta do detector apresentou-se linear na faixa estudada e o limite de detecção encontrado foi de 10ng/g para a cocaína; 20ng/g para o cocaetileno; 30ng/g para a benzoilecgonina e 40 ng/g para o éster metilanidroecgonina. O coeficiente de variação intra-ensaio variou de 3,01% a 10,15% e o inter-ensaio variou entre 5,31% a 11,12%; a exatidão variou entre 91,47% e 105,31%. A recuperação encontrada foi superior a 56,30%. A especificidade foi determinada para os seguintes interferentes: AAS (ácido acetilsalicílico), alprazolam, anfetamina, cafeína, dipirona, efedrina, fenilefrina, fluoxetina, metoclopramida, nicotina, sulfato ferroso e THC (tetraidrocannabinol). Após o término da validação, o método foi aplicado em amostras de mecônio coletadas de recém-nascidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP – USP). A coleta destas amostras foi realizada após a autorização das mães em participarem da pesquisa, através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e após preencherem um questionário sobre consumo de drogas. O método desenvolvido e validado mostrou ser eficiente na identificação de cocaína, metabólitos e derivados em mecônio.

Palavras-chave: Desenvolvimento, validação, cocaína, *crack*, gestantes, mecônio, CG-EM

ABSTRACT

ALVES, M. N. R. **Development and validation of a method for analysis of cocaine, metabolites and products in meconium samples using gas chromatography-mass spectrometry.** 2010. 76f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Cocaine and crack use is an important public health problem in Brazil, even though when this is made by pregnant, risking the babies lives besides their own. The identification of such substances through gas chromatograph-mass spectrometry using meconium as biological matrix is highly efficient on detecting fetal exposure to cocaine. The meconium presents some advantages in comparison with other matrices such as analite wide window detection and collection facilities by non-invasive methods. The purpose of this study was to develop and validate a method for meconium sample preparation for a gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) confirmation of meconium extracts for cocaine, benzoylecgonine, cocaethylene and anhydroecgonine methyl ester. The analytes were initially extracted from the matrix by methanol. Then, a solid-phase extraction with Bond Elut Certify I cartridges was applied. Analytes were determined in a GC-MS *ion trap, full scan* mode. The method was validated in the range of 20 -1000 ng/g for cocaine and cocaethylene; 40 -1500 ng/g for benzoylecgonine and 60 -1500 ng/g for anhydroecgonine methyl ester, using 0.5 g of meconium per assay. The detector response was linear in the studied range and limit of detection were found to be 10ng/g to cocaine; 20ng/g to cocaethylene; 30ng/g to benzoylecgonine and 40 ng/g to anhydroecgonine methyl ester. Intra-batch coefficients of variation oscillated between 3.01% and 10.15% and inter-batch oscillated between 5.31% and 11.12%; accuracy were in range 91.47% - 105.31%. The recoveries were higher than 56.30%. Selectivity was determined for these interferents: AAS (acetylsalicylic acid), alprazolam, amphetamine, caffeine, dipyrone, ephedrine, phenylephrine, fluoxetine, metoclopramide, nicotine, iron sulfate and THC (tetrahydrocannabinol). Finally, the method was applied to analysis of meconium collected from newborns in the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP – USP). The sample collections were made after mothers's authorization, and after they signed a term and answered a self-report about use of drugs. The developed and validated method was efficient on identification of cocaine, metabolites and derivatives in meconium.

Keywords: Development, validation, cocaine, *crack*, pregnant women, meconium, GC-MS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura da cocaína	3
Figura 2.	Produtos de biotransformação da cocaína	5
Figura 3.	Foto de uma amostra de mecônio	8
Figura 4.	<i>Manifold</i> utilizado na extração em fase sólida	20
Figura 5.	Cromatograma de uma amostra de mecônio extraída por SPME e espectro de massas do único analito obtido, cocaetileno	27
Figura 6.	Foto das ponteiros DPX.....	29
Figura 7.	Coloração do extrato em metanol das amostras de mecônio.....	31
Figura 8.	Cromatograma de uma amostra de mecônio fortificada com 100ng de padrão (EMA, COC, CE e BE) e 250/370ng de padrão interno (COC-d3 e BE-d3)	33
Figura 9.	Cromatograma de uma amostra de mecônio branco	34
Figura 10.	Cromatograma dos íons selecionados para o EMA, seguido do respectivo espectro de massas	35
Figura 11.	Cromatograma dos íons selecionados para o COC, seguido do respectivo espectro de massas	36
Figura 12.	Cromatograma dos íons selecionados para o COC-d3, seguido do respectivo espectro de massas	37
Figura 13.	Cromatograma dos íons selecionados para o CE, seguido do respectivo espectro de massas	38
Figura 14.	Cromatograma dos íons selecionados para o BE, seguido do respectivo espectro de massas	39
Figura 15.	Cromatograma dos íons selecionados para o BE-d3, seguido do respectivo espectro de massas	40
Figura 16.	Linearidade do EMA	42
Figura 17.	Linearidade da COC	43
Figura 18.	Linearidade do CE	43
Figura 19.	Linearidade da BE	44
Figura 20.	Cromatograma da amostra de mecônio nº 32, seguido do espectro de massas dos analitos identificados (EMA, COC e BE)	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Programação da temperatura da coluna	32
Tabela 2.	Íons de identificação, quantificação e tempo de retenção dos analitos ..	32
Tabela 3.	Limites de detecção, inferior e superior de quantificação dos analitos ...	41
Tabela 4.	Valores de precisão intra-ensaio (%).....	44
Tabela 5.	Valores de precisão inter-ensaio (%).....	45
Tabela 6.	Valores de exatidão (%)	45
Tabela 7.	Valores de recuperação (%)	46
Tabela 8.	Valores de especificidade (ng/g)	47
Tabela 9.	Estabilidade pós-processamento.....	48
Tabela 10.	Respostas do questionário aplicado às pacientes que relataram uso de cocaína alguma vez na vida	49

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Cocaína, derivados e metabólitos.....	2
1.2. População de risco: Gestantes.....	6
1.3. Amostra biológica alternativa: Mecônio.....	8
2. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	12
3. OBJETIVOS	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1. Materiais.....	16
4.2. Equipamentos e Acessórios.....	16
4.3. Preparação de soluções e reagentes.....	16
4.3.1. Preparação das soluções padrão de calibradores, controle de qualidade e padrão interno.....	16
4.3.2. Preparação dos reagentes.....	17
4.3.2.1. Preparação do tampão fosfato pH 6,0.....	17
4.3.2.2. Preparação da solução 5% trimetilclorosilano.....	17
4.4. Metodologia.....	17
4.5. Curva de Calibração.....	20
4.6. Parâmetros utilizados na validação da metodologia.....	21
4.6.1. Linearidade.....	21
4.6.2. Precisão.....	21
4.6.3. Exatidão.....	22
4.6.4. Limite de detecção.....	23
4.6.5. Limite de quantificação.....	23
4.6.6. Recuperação.....	23
4.6.7. Especificidade.....	24
4.6.8. <i>Carry over</i>	24

4.6.9. Estabilidade.....	24
4.6.10. Casuística.....	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1. Desenvolvimento da metodologia	27
5.1.1. Escolha do tipo de extração	27
5.1.2. Otimização da metodologia.....	29
5.1.3 Determinação de cocaína, cocaetileno, benzoilecgonina e do éster metilanidroecgonina em amostras de mecônio	31
5.2. Validação da metodologia	41
5.2.1. Limites de detecção e quantificação	41
5.2.2. Linearidade.....	41
5.2.3. Precisão	44
5.2.4. Exatidão	45
5.2.5. Recuperação.....	46
5.2.6. Especificidade	46
5.2.7. <i>Carry over</i>	47
5.2.8. Estabilidade.....	47
5.2.9. Aplicação da metodologia desenvolvida na análise das amostras de mecônio.....	48
6. CONCLUSÕES.....	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
ANEXOS	62
Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética do HCFMRP – USP	62
Anexo 2 – Questionário da pesquisa.....	63
Anexo 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	65

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O Relatório Mundial sobre Drogas 2009, divulgado pelas Nações Unidas (UNODC) estima que entre 172 e 250 milhões de pessoas usaram drogas ilícitas pelo menos uma vez em 2007. Esse número inclui usuários casuais, que fizeram uso de drogas uma única vez durante o ano todo. Já o número de usuários dependentes de drogas estimado em 2007, está entre 18 e 38 milhões, com idade de 15-64 anos (UNODC, 2009).

O consumo dos diferentes tipos de drogas está associado a problemas social, econômicos e de saúde pública, em todas as regiões no mundo. Na África e na Oceania, por exemplo, esses problemas estão mais relacionados ao uso de *canabis* do que a outras drogas; na Ásia e na Europa, ao uso de opiáceos; na América do Norte e do Sul, ao uso de cocaína, que tem uma prevalência anual de consumo estimada em 20,8 milhões de pessoas ou 0,5% da população mundial entre 15-64 anos de idade. O consumo de cocaína na América do Sul vem aumentando, principalmente na Venezuela, Equador, Bolívia, Brasil, Argentina e Uruguai (UNODC, 2009).

Segundo dados do Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID), a prevalência sobre o uso de cocaína nas 108 maiores cidades do Brasil, em 2005, foi de 2,9% (equivale a 1.459.000 pessoas) e de 0,7% para o *crack*. (CARLINI et al., 2006).

1.1. Cocaína, derivados e metabólitos

A cocaína (Figura 1) é um dos alcalóides presentes nas folhas de duas espécies do gênero *Erythroxylum*, vulgarmente denominado Coca: 1) a *E. novogranatense*, variedade trujillo, cultivada legalmente e cuja produção destina-se à indústria farmacêutica, na qual é utilizada como anestésico local, ou à indústria alimentícia, como constituinte de chás, e 2) a *E. coca*, que é a principal fonte da produção ilícita. As folhas são convertidas em pasta de coca após a maceração, que constitui a forma traficada e que é utilizada para produzir o cloridrato de cocaína. O cloridrato de cocaína é obtido através do tratamento da pasta de coca purificada com ácido clorídrico, sendo auto-administrada por aspiração nasal, por via oral ou intravenosamente (CHASIN & SILVA, 2003).

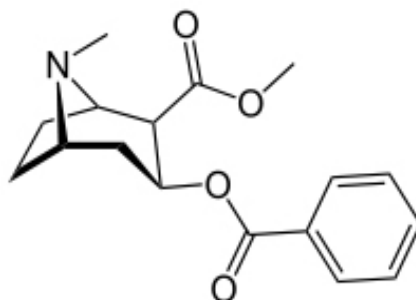


Figura 1. Estrutura da Cocaína (Disponível em http://www.edinformatics.com/interactive_molecules/3D/cocaine_molecule.htm. Acesso 10/03/2010)

A cocaína bloqueia os transportadores de dopamina, noradrenalina e serotonina presentes na membrana plasmática dos neurônios pré-sinápticos. Esses 3 neurotransmissores estão envolvidos em diferentes processos fisiológicos e, portanto, o bloqueio da função de um desses transportadores pela cocaína pode ser responsável pelas ações específicas dessa droga. A noradrenalina é responsável pelos efeitos adrenérgicos observados no uso da cocaína, como a midríase, vasoconstricção, hipertensão, taquicardia e taquipnéia. As alterações comportamentais parecem ser mediadas pela dopamina, além de efeitos como intensa euforia, aumento da excitação sexual e da autoconfiança. Os potenciais efeitos indesejáveis incluem paranóia, halucinações e disforia. A estimulação central (*rush*) é seguida pela depressão (*crash*). O reforço positivo do *rush* versus o reforço negativo do *crash* é a principal razão para o abuso crônico da cocaína (ISENCHMID, 1999).

Após uma dose aguda de cocaína, as concentrações cerebrais de dopamina são elevadas rapidamente e, em seguida, reduzem a valores abaixo do normal. Em razão da inibição dos transportadores de dopamina na membrana dos neurônios pré-sinápticos, as concentrações extracelulares elevadas desse neurotransmissor resultam em estimulação crônica de seus receptores nos neurônios pós-sinápticos. A administração crônica da cocaína altera a concentração de transportadores de dopamina na região mesolímbica cerebral. Densidades elevadas *postmortem* desses transportadores foram observadas no cérebro de usuários de cocaína. A regulação positiva que a cocaína exerce nos sítios de ligação cerebral resulta na necessidade de doses adicionais para o usuário continuar experimentando os efeitos compensadores da droga (ISENCHMID, 1999).

As manifestações clínicas mais comuns após intoxicação aguda por cocaína incluem estimulação do sistema nervoso central com psicose, convulsões, arritmias

e disfunção respiratória, seguida de parada respiratória. Outros sintomas incluem midríase, hipertensão seguida de hipotensão e contração muscular. A habilidade da cocaína de aumentar a atividade muscular e a vasoconstrição pode produzir hipertermia (ISENCHMID, 1999).

Os sintomas do uso crônico da cocaína, além de distúrbios psiquiátricos, incluem rinite (com possibilidade de perfuração do septo nasal), respiração curta, suor frio, tremores, comportamento violento, percepção distorcida, taquicardia, taquipnéia, dispnéia e comportamento hiperativo. A droga pode ainda danificar artérias cerebrais e causar episódios agudos de hipertensão após uma única dose em usuários crônicos podendo levar à ruptura de vasos. A cocaína pode induzir epilepsia e piorar uma doença coronária pré-existente, levando o usuário a sofrer um ataque cardíaco (ISENCHMID, 1999).

Conforme indicado acima, a cocaína pode ser administrada intranasalmente (IN), intravenosamente (IV), oralmente ou fumada (via pulmonar). Entretanto, não é comum o uso por via oral, pois ocorre metabolização de primeira passagem no fígado, reduzindo assim a biodisponibilidade da droga, e conseqüentemente, os efeitos eufóricos da mesma no cérebro. A via intravenosa é a única via que disponibiliza 100% da droga. A biodisponibilidade das vias intranasal e pulmonar é variável. Porém, a facilidade de administração, a velocidade e a intensidade dos efeitos proporcionados, fazem delas as vias mais utilizadas. Acredita-se que a biodisponibilidade da via intranasal seja dose dependente e varie de 25 a 94%. A capacidade que a cocaína possui de atingir o cérebro pela via intranasal é mais eficiente do que a via oral, porém, sua absorção é retardada em razão de sua ação vasoconstritora e da possibilidade de deglutição da mesma durante a inalação (ISENCHMID, 1999).

A via pulmonar da cocaína produz efeitos rápidos e intensos similares à intravenosa, refletindo a eficiência da forma de administração em liberar a droga no cérebro. Apesar disso, estudos indicam que a biodisponibilidade média da cocaína pela via pulmonar seja de apenas 57 a 70%. Variações interindividuais na técnica de fumar a droga, a temperatura e a natureza da cocaína fumada são fatores importantes no processo de absorção da mesma (ISENCHMID, 1999).

O tempo de meia-vida da cocaína varia de 45 a 90 minutos, sendo em média, 60 minutos. Pode haver um moderado aumento nesse tempo, à medida que a dose aumenta. A duração dos efeitos estimulantes da droga está relacionada à via de administração: quando o cloridrato de cocaína é administrado intravenosamente, os efeitos duram de 30 a 45 minutos; quando por via intranasal, os efeitos duram de 60

a 90 minutos e, por sua vez, os efeitos do *crack* (administração por via pulmonar) duram de 15 a 20 minutos (WILLS, 2002).

A cocaína é biotransformada primariamente a benzoilecgonina e ao éster metilecgonina por diferentes mecanismos (Figura 2). Quando a cocaína é consumida pela via pulmonar (*crack*), ocorre formação do produto de pirólise denominado éster metilanidroecgonina. Se a cocaína é administrada juntamente com etanol, ocorre a transesterificação da cocaína formando o cocaetileno. Estudos apontam que a cocaína é metabolizada em éster metilecgonina, via hidrólise enzimática, por pseudocolinesterases e esterases hepáticas e em benzoilecgonina por hidrólise espontânea em pH fisiológico e alcalino e por carboxilesterases hepáticas. Após isolamento e purificação de 2 tipos de esterases hepática humana, a partir de carboxilesterases não específicas, observou-se que uma delas, a metilesterase, catalisa a conversão de cocaína a benzoilecgonina e a transesterificação da cocaína em cocaetileno. Na ausência de etanol, esta enzima metaboliza exclusivamente a benzoilecgonina. Por outro lado, a transesterificação da cocaína em cocaetileno, na presença do etanol, é até 3,5 vezes mais rápida do que a hidrólise em benzoilecgonina (ISENCHMID, 1999).

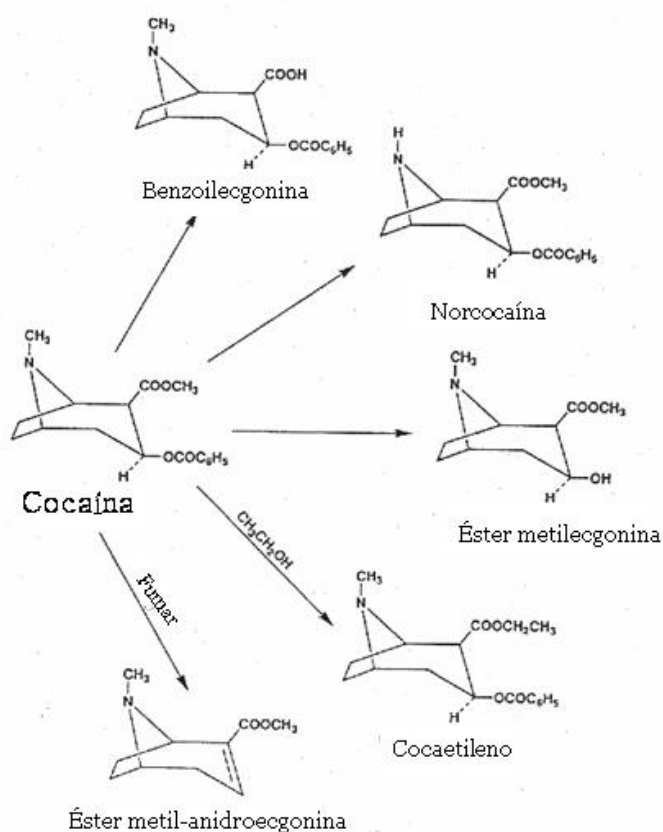


Figura 2. Produtos de biotransformação da cocaína (Modificado de Cone et al., 1994)

Crack é o nome popular dado à forma de base livre da cocaína, que é processada a partir do cloridrato de cocaína, adicionando-se amônia ou bicarbonato de sódio e água, mistura submetida a aquecimento para remoção do ácido clorídrico. Em razão da via de administração do crack (pulmonar), os usuários são expostos aos seus efeitos em menos de 10 segundos, motivo que leva ao abuso dessa droga. No Brasil, o Ministério da Saúde lançou em dezembro de 2009 uma Campanha Nacional de Alerta e Prevenção do Uso de *Crack*, veiculada pelos meios de comunicação, com objetivo de conscientizar a população dos malefícios produzidos por essa droga (Ministério da Saúde, 2009).

O éster metilanidroecgonina é produzido somente no processo de pirólise da cocaína, não é formado metabolicamente e vem sendo utilizado como um marcador analítico para o uso do *crack*. A quantidade de éster formada é dependente da temperatura aplicada durante a queima do *crack*, sendo que 2 a 89% dessa quantidade pode alcançar os alvéolos pulmonares. Este produto de pirólise é excretado pela urina, saliva e suor, indicando que quantidades significativas são absorvidas pela corrente sanguínea (TOENNES *et al.*, 1999).

1.2. População de risco: Gestantes

Os malefícios produzidos pelo uso de cocaína durante a gestação para a mãe e para o feto representam um problema de saúde pública no mundo todo. Nos Estados Unidos, por exemplo, quase 90% das mulheres usuárias de drogas estão em idade fértil, com uma estimativa de 4,6 milhões de usuárias de cocaína e 750 mil partos de bebês expostos a esta droga anualmente (STRATHEARN & MAYES, 2010). No Brasil, em estudo realizado pela Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (São Paulo, Diário Oficial do Estado de São Paulo, 2009) o número de mulheres internadas na rede pública de saúde, devido ao uso de cocaína, cresceu 91% em 3 anos. A média de idade dessas pacientes é de 29 anos, indicando que ainda estão em idade reprodutiva, podendo engravidar e gerar bebês expostos à cocaína (São Paulo, Diário Oficial do Estado de São Paulo, 2009).

De maneira geral, grávidas usuárias de drogas não fazem o acompanhamento do pré-natal corretamente, apresentando maiores chances de contrair doenças sexualmente transmissíveis como a sífilis, AIDS, tuberculose, hepatite, entre outras. As complicações induzidas pela cocaína durante a gravidez

são inúmeras e multifatoriais. Para a mãe, elas vão do retardo no crescimento intrauterino até aborto espontâneo (BAR-OZ *et al.*, 2003). Os efeitos descritos para o feto são: baixo peso ao nascer, microcefalia, anomalias congênitas, tremores, deficiências neurológicas, alterações comportamentais, retardo no desenvolvimento, arritmias cardíacas, hipertensão arterial e síndrome da morte súbita em neonatos (ARAOJO *et al.*, 2008). Além disso, os perigos da exposição pré-natal à cocaína continuam evidentes durante o desenvolvimento, mesmo após o parto. Existem relatos de fetos expostos *in utero* à cocaína que apresentaram anormalidades neurocomportamentais e alterações estruturais no desenvolvimento cerebral (GANAPATHY & LEIBACH, 1994).

A presença de cocaína na circulação materna leva a estimulação cardíaca, vasoespasmo e hipertensão. Isto resulta numa diminuição do fluxo sanguíneo uterino, reduzindo assim, a transferência placentária de oxigênio e nutrientes. Acredita-se que esses efeitos sejam responsáveis pela hemorragia placentária, rompimento de placenta, parto prematuro e má nutrição do feto em desenvolvimento. Além disso, alterações no sistema cardiovascular fetal são causadas diretamente pelo aparecimento de cocaína em sua circulação após a transferência placentária ou indiretamente pela hipóxia resultante da diminuição da perfusão placentária (GANAPATHY & LEIBACH, 1994).

A transferência placentária de drogas de abuso da mãe para o feto ocorre basicamente por difusão passiva, indicando que as propriedades físico-químicas dos compostos tais como lipofilicidade, polaridade, tamanho molecular e ligação à proteína plasmática determinam essa taxa de transferência. De acordo com as propriedades de permeabilidade da membrana, compostos com baixo peso molecular, lipofílicos e não-ionizados podem atravessar facilmente a placenta (SYME *et al.*, 2004). O fluxo sanguíneo placentário é considerado o fator limitante crítico de transporte de drogas para o feto (GARERI *et al.*, 2006).

Em estudo realizado por Cherukuri *et al.* (1988), 51% das mães que utilizaram cocaína durante a gestação tiveram partos prematuros. Para Eyler *et al.* (1998), a taxa de prematuridade foi duas vezes superior entre os filhos de usuárias de cocaína em relação aos filhos de não-usuárias.

Martins-Celini (2001) constatou que 6,1% das mães que tiveram seus partos realizados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP) de 01/12/1998 a 04/05/1999 usaram cocaína durante a gestação.

Moore *et al.* (1986) e Woods *et al.* (1987) demonstraram que o uso da cocaína na gestação está associado à hipertensão arterial, taquicardia e vasoconstrição, o que acarretaria redução do fluxo sanguíneo uterino e placentário, com possibilidade de hipoxemia fetal e de malformações. Muitos defeitos estruturais ou malformações são decorrentes da redução do fluxo sanguíneo uterino, placentário e fetal, devido a roturas vasculares, que corresponderiam a defeitos nos vasos sanguíneos previamente normais determinados por ação citotóxica direta da droga. Segundo Bingol *et al.* (1987), a ocorrência de malformações é até cinco vezes maior em crianças expostas à cocaína durante a vida fetal.

A avaliação do consumo materno de drogas pode ser feito através da utilização de matrizes biológicas alternativas ou não-convencionais provenientes da mãe, como cabelo, sangue, fluido oral, suor, urina e leite; do feto ou recém-nascido, como mecônio, cabelo, cordão umbilical e urina ou proveniente de ambos, como a placenta e o líquido amniótico (LOZANO *et al.*, 2007).

1.3. Amostra biológica alternativa: Mecônio

O mecônio (Figura 3) consiste na primeira excreção intestinal do neonato, identificado por apresentar uma coloração verde escura a negra. É uma matriz extremamente complexa, que consiste de água, células epiteliais descamadas do trato gastrointestinal e da pele, ácido e sais biliares, colesterol, precursores do esterol, enzimas, mucopolissacarídeos, açúcares, proteínas, secreções pancreáticas, intestinais e resíduos de líquido amniótico deglutido (GARERI *et al.*, 2006).



Figura 3. Foto de uma amostra de mecônio

O início da formação do mecônio ocorre por volta da 12ª semana de gestação (BROWNE *et al.*, 1992). As drogas de abuso e substâncias diversas, como os medicamentos utilizados pela mãe, são transferidas da mãe para o feto por difusão passiva através dos vasos sanguíneos da placenta. O feto metaboliza essas substâncias e as excreta para o líquido amniótico, seja através da urina ou via excreção biliar. O feto deglute o líquido amniótico, dando início ao acúmulo dessas substâncias em seu intestino (GARERI *et al.*, 2006).

Portanto, a exposição fetal às drogas é produto do consumo, metabolismo e eliminação materna, transferência placentária e metabolismo fetal. Somados, estes fatores tornam o mecônio uma ótima matriz para identificação de exposição a drogas *in utero* (GARERI *et al.*, 2006). O mecônio é facilmente coletado nas fraldas do recém-nascido e apresenta ampla janela de detecção gestacional quando comparada a outras matrizes como sangue, urina e cabelo. Uma das vantagens do mecônio é o tempo para coleta da amostra. Estudos usando zinco coproporfirina (um pigmento biliar mecônio-específico) como marcador, determinaram que o mecônio é completamente evacuado até 125 horas após o nascimento. A partir deste tempo, o feto começa a produzir uma matriz de transição entre o mecônio e as fezes (GARERI, *et al.*, 2006).

Outra vantagem do mecônio é o fato de que a cocaína se mantém estável por 24 horas em temperatura ambiente, reduzindo 25% da sua concentração inicial e, se armazenado a -20°C, conserva essa substância por pelo menos 9 meses (OSTREA Jr *et al.*, 1999). Quando comparado com a urina do bebê, outra matriz utilizada para a detecção de exposição fetal à drogas, a cocaína e seus metabólitos são detectados por não mais que 96 a 120 horas após o último uso da mesma pela mãe (LESTER *et al.*, 2001). Em outras palavras, somente exposições muito recentes à cocaína são passíveis de detecção na urina. Já o mecônio permite detectar o consumo de cocaína pela mãe a partir do segundo trimestre de gestação. Quando utilizado o cabelo como matriz, a janela de detecção restringe-se ao último trimestre de gravidez, pois o cabelo do feto somente começa crescer por volta do 6º mês de gestação. Além disso, a coleta do cabelo do bebê representa uma dificuldade adicional no uso desta matriz, originada por motivação estética e/ou cultural, ou mesmo pelo fato do neonato muitas vezes não possuir cabelo suficiente para o teste (GRAY e HUESTIS, 2007).

A detecção de cocaína, seus metabólitos e produtos de biotransformação em mecônio foi realizada por diversos autores (LÓPEZ *et al.*, 2009 e 2007; GARERI *et al.*, 2006; PICHINI *et al.*, 2003; OSTREA Jr *et al.*, 2001; XIA *et al.*, 2000; LEWIS *et al.*, 1994; ABUSADA *et al.*, 1993; BROWNE *et al.*, 1992). Entretanto, o mecônio é uma matriz biológica que possibilita a detecção não apenas de cocaína, mas de vários outros analitos como álcool, nicotina, canabinóides, heroína, codeína, morfina, anfetaminas, pesticidas organoclorados e organofosforados, medicamentos e metais pesados como cádmio, mercúrio e arsênio (ROEHSIG *et al.*, 2010; GRAY *et al.*, 2009; GALLARDO e QUEIROZ, 2008; LÓPEZ *et al.*, 2007; GARERI *et al.*, 2006; PICHINI *et al.*, 2003; LESTER *et al.*, 2001).

Além da identificação da exposição intrauterina à cocaína por técnicas laboratoriais, como análise do mecônio, a utilização de outros métodos como entrevistas com as mães, através de questionários sobre o tipo, a quantidade, a frequência e a duração do uso de drogas é importante para descoberta do histórico de uso e abuso destas substâncias pela mesma. Em um estudo realizado em 2003 no Hospital de Dublin, Irlanda do Norte, constatou-se que o tempo médio de aparecimento dos sintomas da síndrome de abstinência foi de 2,8 dias, enquanto o tempo médio de internação após o parto é de 2,6 dias. Portanto, é possível que alguns bebês fossem para casa sem apresentar sintomas de abstinência (GRAY e HUESTIS, 2007). O problema mais freqüente associado a realização de entrevistas é a veracidade das informações prestadas, visto que muitas mães omitem o uso de drogas por diversos motivos, entre eles, medo de sofrer sanções legais. Por isso, é de fundamental importância a combinação do histórico materno, das informações adquiridas em entrevistas e dos resultados da análise da presença da cocaína e/ou seus metabólitos em mecônio para não subestimar a incidência de exposição a essa substância *in utero*. Isso possibilitaria à equipe de saúde estender o tempo de hospitalização e, conseqüentemente, tratar os sintomas da síndrome de abstinência ou os efeitos que poderiam se manifestar após o nascimento da criança.

Aspectos Éticos da Pesquisa

2. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

A pesquisa em seres humanos tem o compromisso de resguardar a integridade de todos os envolvidos. Este resguardo envolve questões sobre a preservação da privacidade, a minimização de riscos e desconfortos, a busca de benefícios, a não discriminação e a proteção de grupos de pessoas vulneráveis. Entre as estratégias utilizadas com intuito de proteger os indivíduos estudados estão o termo de consentimento livre e esclarecido e a avaliação por Comitês de Ética em Pesquisa. A avaliação prévia dos projetos feita por um Comitê de Ética em Pesquisa visa assegurar que os aspectos éticos e metodológicos estejam adequados. O processo de consentimento livre e esclarecido tem por objetivo permitir que a pessoa que está sendo convidada a participar de um projeto de pesquisa compreenda os procedimentos, riscos, desconfortos, benefícios e direitos envolvidos, visando permitir uma decisão autônoma (GOLDIM et al., 2003).

A pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP – USP). A aprovação do Comitê de Ética segue em anexo (Anexo 1).

Objetivos

3. OBJETIVOS

A) Desenvolver e validar uma metodologia de análise para detecção de cocaína, seus derivados (cocaetilenos e éster metilanidroecgonina) e metabólito (benzoilecgonina) em mecônio, utilizando a Cromatografia em fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS);

B) Aplicar a metodologia desenvolvida e validada em algumas amostras de mecônio coletadas de neonatos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP).

Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

Os padrões analíticos certificados utilizados foram: Cocaína (COC), Cocaína – d3 (COC – d3), Benzoilecgonina (BE), Benzoilecgonina – d3 (BE – d3), Cocaetileno (CE) e Éster metilanidroecgonina (EMA), todos obtidos da Cerilliant (EUA). Os reagentes utilizados foram: metanol, acetonitrila, diclorometano e acetato de etila da JT Baker (EUA); isopropanol e hidróxido de amônio da Mallinkrodt (EUA); tolueno da Synth (Brasil); diclorodimetilsilano e N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) com 1% trimetilclorosilano (TMCS) da Sigma-Aldrich (EUA). Foram utilizados cartuchos Bond Elut Certify I da Varian (EUA) e ponteiras DPX – CX da Gerstel (EUA) para extração em fase sólida e fibra SPME polidimetilsiloxano-divinilbenzeno da Supelco (EUA).

4.2. Equipamentos e Acessórios

Para as análises das amostras de mecônio foi utilizado um cromatógrafo em fase gasosa CP 3800 acoplado a um espectrômetro de massas, modelo Saturn 2000, ambos da empresa Varian (EUA), com um amostrador automático CombiPal da CTC *Analytics*, (Suíça); Coluna capilar de sílica fundida DB – 5MS (30m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro x 0,25 µm de espessura de filme) da J & W Scientific (EUA); Cilindro de gás hélio 5.0 analítico da White Martins (Brasil); Seringas de injeção cromatográfica Hamilton (EUA). Centrifuga Universal 32 Hettich (Alemanha); Concentrador de Amostras Caliper LifeScience Turbo Vap LP (EUA); Banho seco TE – 021, Tecnal (Brasil); Agitador TE – 140, Tecnal (Brasil); Vórtex AP – 56 da Phoenix (Brasil); Deionizador de água Simplicity da Millipore (EUA) e Balança analítica BP211D da Sartorius (Alemanha).

4.3. Preparação de soluções e reagentes

4.3.1. Preparação das soluções padrão de calibradores, controle de qualidade e padrão interno

Para preparação das soluções padrão de calibradores e controle de qualidade, ampolas dos padrões analíticos de cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno e éster metilanidroecgonina, na concentração inicial de 1 mg/mL, foram diluídas para

concentrações de 10, 2 e 1 µg/mL da seguinte forma: 100 µL da ampola de 1 mg/mL foram transferidos para um balão volumétrico de 10 ml e o volume foi completado com acetonitrila para as soluções de cocaína, cocaetileno e éster metilanidroecgonina ou com metanol para as soluções de benzoilecgonina, originando a solução de concentração de 10 µg/mL. Em seguida, 1 mL dessa solução foi transferido para outro balão volumétrico de 10 mL originando a solução de 1 µg/mL e outro 1 mL foi transferido para o balão de 5 mL originando a solução de 2 µg/mL.

As soluções de padrão interno (cocaína-d3 e benzoilecgonina-d3) foram preparadas na concentração de 10 µg/mL. Para tanto, foi transferido 1 mL da ampola de cocaína-d3, de concentração 100 µg/mL para um balão volumétrico de 10 mL e completado o volume com acetonitrila; para a benzoilecgonina-d3, foi transferindo 100 µL da ampola, de concentração 1 mg/mL, para um balão volumétrico de 10mL e completado o volume com metanol.

Todas as soluções de padrão e padrão interno preparadas foram armazenadas na geladeira, em frascos com tampa rosqueável e envolvidos por papel alumínio.

4.3.2. Preparação dos reagentes

4.3.2.1. Preparação do tampão fosfato pH 6,0

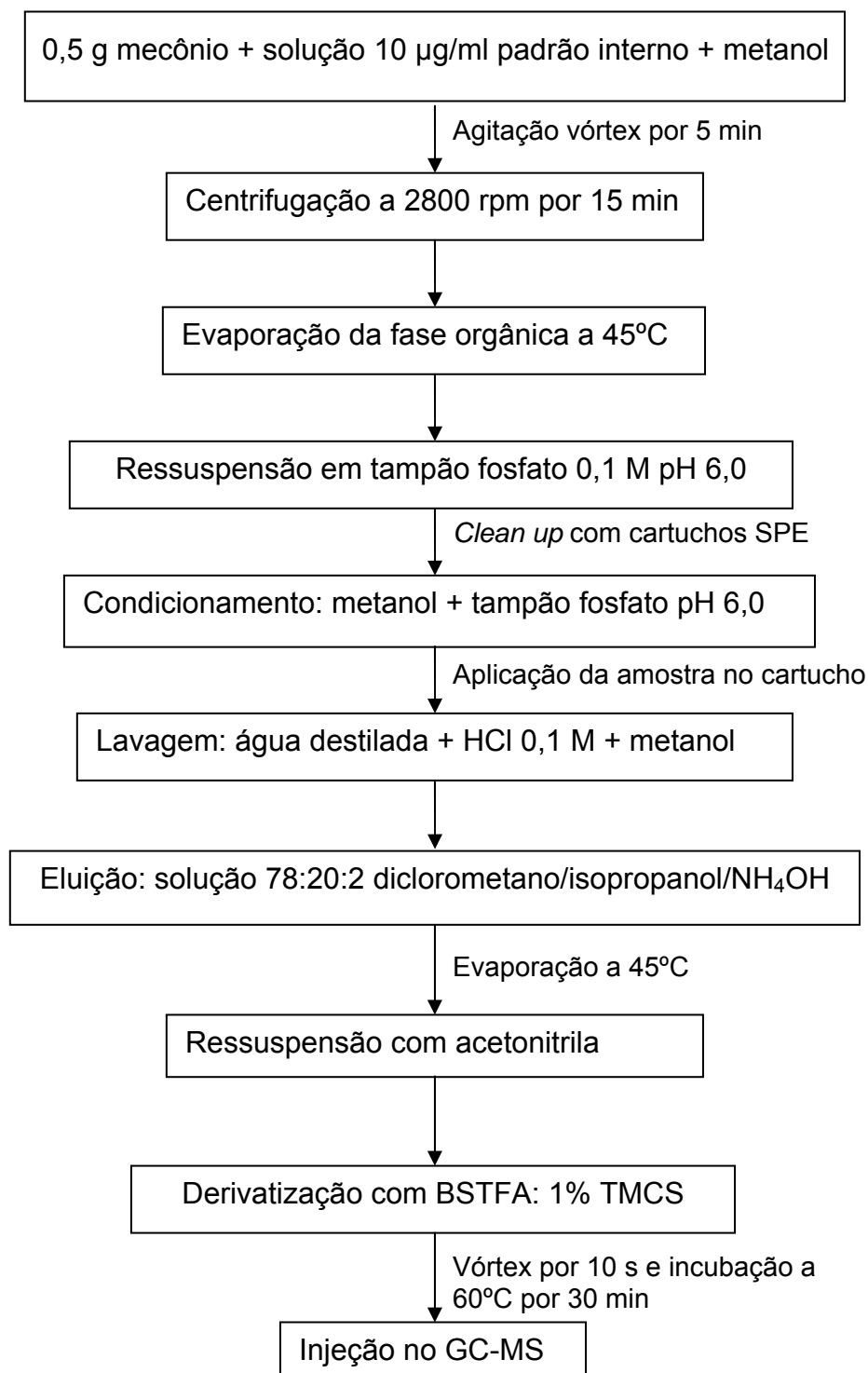
Preparou-se uma solução 0,25 M de fosfato de potássio monobásico (34 g KH_2PO_4 /litro água). Em seguida, o pH foi ajustado a 6,0 com uma solução 0,25 M de fosfato de sódio dibásico (35,5 g Na_2HPO_4 /litro água).

4.3.2.2. Preparação da solução 5% trimetilclorosilano

A solução de trimetilclorosilano a 5% é utilizada na silanização dos *inserts*. Foram pipetados 5 mL do reagente num balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com tolueno.

4.4. Metodologia

A metodologia desenvolvida para extração da cocaína, cocaetileno, éster metilanidroecgonina e benzoilecgonina no mecônio foi desenvolvida a partir dos métodos propostos por Oyler et al. (1996), Moriya et al. (1994), Abusada et al. (1993), Clark et al. (1992) e está esquematizada a seguir:



0,5 g de mecônio (com variação de 5%) foi pesado num tubo de ensaio e fortificado com 250 ng de cocaína-d3 e 370 ng de benzoilecgonina-d3 e as massas dos demais analitos. O tubo foi agitado para homogeneização dos analitos com o mecônio. Posteriormente, foram adicionados 3 mL de metanol e o tubo agitado no vórtex por 5 minutos, até sua completa homogeneização. A amostra foi centrifugada a 2800 rpm por 15 minutos, seguida de transferência de 2,5 mL da fase orgânica para outro tubo de ensaio. O extrato foi evaporado, até 40 µL aproximadamente, no concentrador de amostras a 45°C e ressuspenso em 2 mL de tampão fosfato pH 6,0, preparando assim a amostra para a fase de purificação ou *clean up*, que foi realizada com os cartuchos SPE Bond Elut certify I acoplados a um *manifold* ligado a uma bomba de vácuo. Para tanto, após condicionamento do cartucho com 2 mL de metanol e 2 mL de tampão fosfato pH 6,0, o extrato foi adicionado e eluído com fluxo de 1 mL/min. Em seguida, o cartucho foi lavado com 3 mL de água destilada, 3 mL de HCl 0,1 M e 6 mL de metanol. Foi utilizado vácuo de 50 kPa por 2 minutos para que o cartucho ficasse completamente seco, para posterior eluição com 3 mL de uma solução (preparada no momento da utilização) de diclorometano: isopropanol: hidróxido de amônia (80:20:2). Esse extrato foi evaporado a 45°C no concentrador de amostras, ressuspenso em 40 µL de acetonitrila, agitado em vórtex por 10 segundos e transferidos 30 µL para o *vial*. Devido à presença de um grupamento hidroxila livre na molécula da benzoilecgonina e da polaridade da molécula do éster metilanidroecgonina, foi realizado a derivatização através da adição de 30 µL do derivatizante BSTFA: 1% TMCS (vórtex por 10 s) no *vial*, e banho seco no *dry block* a 60°C por 30 minutos. Em seguida, 1 µL do extrato foi injetado no cromatógrafo. O passo do *clean up* foi realizado no *manifold* ligado a uma bomba de vácuo mostrado a seguir (Figura 4).



Figura 4. *Manifold* utilizado na extração em fase sólida

4.5. Curva de Calibração

Após a otimização da metodologia, foi construída uma curva de calibração para cada analitos com 6 concentrações diferentes: 20 ng, 50 ng, 100 ng, 200 ng, 500 ng e 1000 ng por grama de mecônio para a cocaína e o cocaetileno; 40 ng, 100 ng, 200 ng, 500 ng, 1000 ng e 1500 ng para a benzoilecgonina e 60 ng, 140 ng, 200 ng, 500 ng, 1000 ng e 1500 ng para o éster metilanidroecgonina. Os controles de qualidade foram feitos nas seguintes concentrações (ng/g de mecônio):

$$\begin{array}{ccc}
 \text{CQ 1} \left\{ \begin{array}{l} \text{COC/CE: 40ng} \\ \text{BE: 80ng} \\ \text{EMA: 120ng} \end{array} \right. &
 \text{CQ 2} \left\{ \begin{array}{l} \text{COC/CE: 480ng} \\ \text{BE/EMA: 760ng} \end{array} \right. &
 \text{CQ 3} \left\{ \begin{array}{l} \text{COC/CE: 900ng} \\ \text{BE/EMA: 1340ng} \end{array} \right.
 \end{array}$$

Segundo Chasin et al. (1994), em detecções fragmentográficas de massas, o ideal é que se use um padrão interno análogo à molécula do analito pesquisado. Por isso, a cocaína deuterada (COC-d3) foi utilizada como padrão interno para a cocaína, cocaetileno e para o éster metilanidroecgonina na concentração de 500 ng/g. Já a benzoilecgonina deuterada (BE-d3) foi utilizada como padrão interno da benzoilecgonina, na concentração de 750 ng/g.

Na curva de calibração, aplicou-se métodos estatísticos de regressão linear e o fator de ponderação 1/X.

4.6. Parâmetros utilizados na validação da metodologia

Os parâmetros avaliados durante a validação da metodologia foram os recomendados na resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que disponibiliza um guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.

4.6.1. Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Na cromatografia, a curva analítica é construída plotando-se os valores de concentração do analito encontrado na amostra pela razão área do padrão/área do padrão interno.

4.6.2. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma corrida. É determinada utilizando-se, no mínimo 3 concentrações (baixa, média e alta), que estejam dentro do intervalo da curva de calibração, realizando-se 5 determinações por concentração. Considerou-se 2 níveis da precisão:

Precisão Intra-Ensaio: é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo, com o mesmo analista e mesma instrumentação.

Precisão Inter-Ensaio: é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes.

Pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas, em que o limite inferior de quantificação deve apresentar valores inferiores a 20% e os demais pontos valores inferiores a 15%. É calculado pela fórmula abaixo:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

Onde:

DPR: Desvio padrão relativo

DP: Desvio padrão

CMD: Concentração média determinada

A validação da precisão foi realizada em 5 dias. Foram avaliadas as precisões intra-ensaio e inter-ensaio com a utilização de 5 replicatas para cada um dos 3 CQs (baixo, médio e alto). A precisão intra-ensaio foi calculada obtendo-se os coeficientes de variação dos controles de qualidade de cada composto dividindo-se o desvio padrão pela média aritmética em cada dia de análise. Para a precisão inter-ensaio, foi calculado o coeficiente de variação de todas as análises dividindo-se pela média aritmética de todas as análises, que foram 25 ensaios no total.

4.6.3. Exatidão

É a proximidade dos resultados obtidos pela metodologia estudada em relação ao valor verdadeiro. É calculada pela fórmula:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

O parâmetro da exatidão é validado utilizando-se no mínimo 3 concentrações (baixa, média e alta) ao longo da faixa de variação da curva de calibração, com no mínimo 5 determinações por concentração. Os valores de exatidão aceitos podem variar de 80 a 120% para o limite inferior de quantificação e de 85 a 115% para os demais pontos. A exatidão da metodologia foi avaliada juntamente com a precisão, aplicando-se o cálculo nas médias das concentrações dos cinco dias de análises para cada controle de qualidade.

4.6.4. Limite de detecção

É a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser determinada. É estabelecido por meio da análise de amostras fortificadas com soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectado, não necessariamente quantificado, em que a razão sinal/ruído seja 3:1.

Os experimentos foram realizados em duplicata, fortificando-se as amostras de mecônio com concentrações decrescentes, até que os picos cromatográficos dos compostos analisados apresentassem valores iguais ou maiores que 3 para a relação sinal/ruído, em ambas corridas.

4.6.5. Limite de quantificação

O limite inferior de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão (até 20%) e exatidão (80 – 120%) aceitáveis, sob as condições experimentais estabelecidas. O limite superior de quantificação é a maior quantidade de analito que pode ser determinada com precisão de até 15% e exatidão entre 85 e 115%.

O limite inferior de quantificação foi estabelecido por meio de análises de mecônio fortificado com concentrações decrescentes dos analitos até o menor nível quantificável, com precisão e exatidão aceitáveis, considerando-se também a razão sinal/ruído 10:1. O limite superior de quantificação foi determinado analisando-se as amostras de mecônio em concentrações crescentes até o valor de 1000ng/g para a cocaína e o cocaetileno e 1500 ng/g para a benzoilecgonina e o éster metilanidroecgonina.

4.6.6. Recuperação

A recuperação mede a eficiência do método em extrair os analitos de uma matriz biológica dentro de um limite de variação. Porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximas a 100% são desejáveis, embora admita-se valores menores, desde que a metodologia seja precisa, exata. Foi determinada comparando-se os resultados de quantificação de amostras que foram fortificadas posteriormente à extração, com os resultados de quantificação das amostras que

foram fortificadas anteriormente à extração. Os padrões internos foram adicionados anteriormente à extração nas duas situações, de forma que os resultados de quantificação obtidos pudessem avaliar a capacidade do solvente de extrair os analitos do mecônio quando fossem comparados com uma situação que, teoricamente, equivale a 100% de eficiência de extração. A recuperação foi avaliada nos 3 controles de qualidade (baixo, médio e alto).

4.6.7. Especificidade

É a capacidade do método em detectar e quantificar com exatidão aceitável um analito em presença de outros componentes, como impurezas, produtos de decomposição, metabólitos, medicamentos e os próprios componentes da matriz biológica. O limite inferior de quantificação não deve ser estar fora do intervalo de 80-120% quando calculado na presença dos interferentes investigados.

4.6.8. Carry over

O parâmetro *carry over* avalia a influência de uma análise anterior no resultado da análise seguinte, devido à presença de resíduos que possam ficar retidos em componentes do cromatógrafo, como *liner*, injetor, coluna, seringa e detector. Foi avaliado submetendo-se uma amostra de mecônio branco (amostra que não apresenta os analitos investigados) imediatamente após a análise do ponto mais alto da curva de calibração.

4.6.9. Estabilidade

Esse parâmetro permite avaliar a capacidade do analito em resistir às condições exigidas durante a análise em uma dada matriz biológica. A ANVISA recomenda a avaliação de 4 tipos de estabilidade:

1. Estabilidade de curta duração: avalia o tempo que o analito pode resistir exposto a temperatura ambiente, sobre a bancada de análise.
2. Estabilidade de longa duração: avalia o tempo de permanência do analito numa matriz biológica, quando congelado a – 20°C.

3. Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento: avalia a capacidade do analito de resistir à degradação quando submetido a vários ciclos de congelamento e descongelamento.
4. Estabilidade pós-processamento: avalia o tempo de permanência do analito na amostra processada para análise. Foi determinada através da reinjeção do controle de qualidade inferior (CQ 1) e superior (CQ 3) 8 horas após a primeira injeção.

4.6.10. Casuística

As amostras de mecônio foram coletadas das fraldas de recém nascidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, cujas mães consentiram em participar da pesquisa. Obtivemos um total de 36 participantes no período de 01/09/2009 a 31/12/2009. Os critérios de seleção e inclusão no estudo foram os seguintes: (1) para o grupo de gestantes não-usuárias de cocaína, foram consideradas as mulheres que negaram o uso de cocaína, tinham união estável, endereço fixo, 2 ou mais filhos e (2) para o grupo das gestantes usuárias de cocaína, foram consideradas as mulheres que aceitaram participar da pesquisa e assumiram que usaram cocaína durante a gestação. O questionário sobre hábitos de consumo de drogas e o termo de consentimento livre e esclarecido foram aplicados após o parto, na entrevista materna, e os modelos seguem em anexo (Anexos 2 e 3).

As amostras de mecônio foram coletadas diretamente das fraldas dos bebês e transferidas para um recipiente de plástico, onde foram armazenadas em freezer a – 20°C até o momento da análise.

Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Desenvolvimento da metodologia

5.1.1. Escolha do tipo de extração

Vários processos de extração foram avaliados durante do desenvolvimento da metodologia: microextração em fase sólida, extração líquido-líquido e extração em fase sólida.

A microextração em fase sólida foi realizada fortificando-se uma amostra de mecônio (0,5g) com 100 μ L da solução de 1 μ g/ml de cocaína, benzoilecgonina e cocaetileno. Foi adicionado 4 mL de tampão fosfato pH 6,0, a fibra foi colocada em contato com a solução que se formou e o frasco foi colocado sob agitação magnética por 20 minutos. Em seguida, a fibra foi injetada no cromatógrafo. O resultado obtido foi a detecção apenas de cocaetileno, conforme ilustrado no cromatograma da Figura 5.

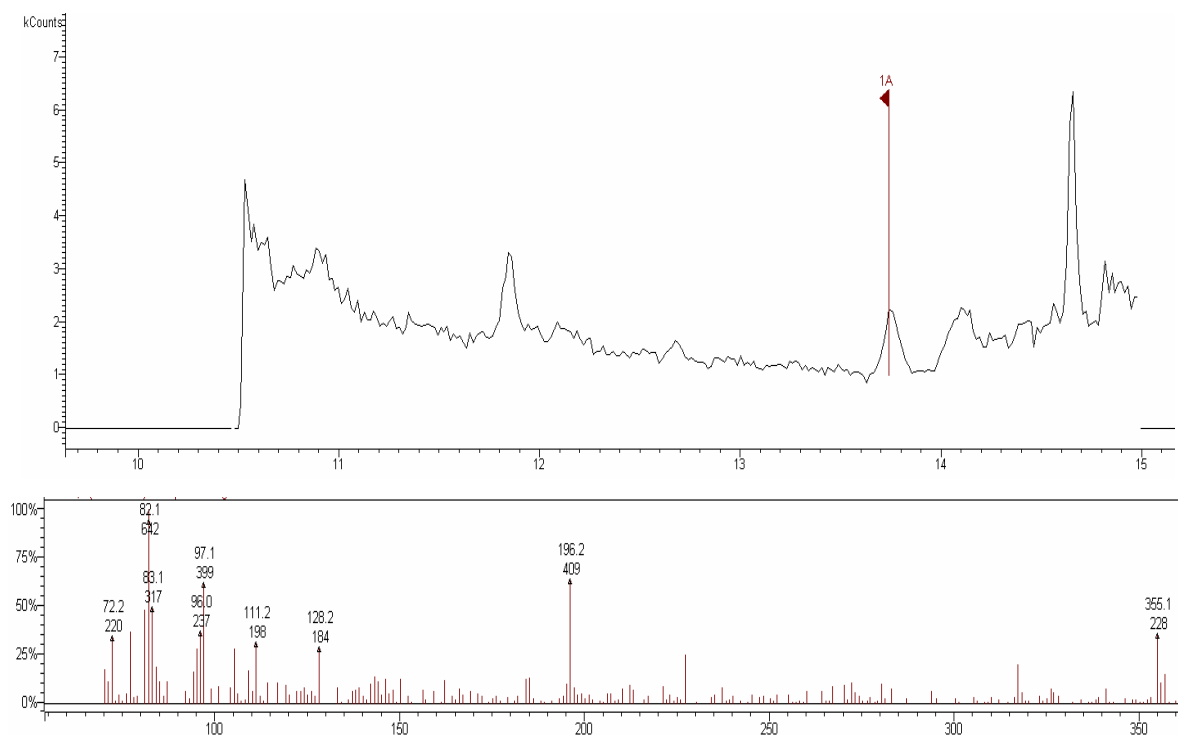


Figura 5. Cromatograma de uma amostra de mecônio extraída por SPME e espectro de massas do único analito obtido, cocaetileno

Em razão da fibra de SPME ser um dispositivo relativamente caro, preferimos testar outros métodos de extração economicamente mais viáveis de serem executados.

A extração líquido-líquido foi realizada em amostras de mecônio (0,5g) fortificadas com os analitos, adicionadas de 1mL de água e 2 mL dos seguintes reagentes, em tubos de ensaio separados: hexano, cloro-butano, acetato de etila, diclorometano, éter de petróleo e clorofórmio. Em seguida, os tubos foram colocados na mesa de agitação horizontal por 15 minutos e centrifugados a 2000 rpm por 5 minutos. A fase orgânica (1,5 mL) foi evaporada no concentrador de amostras a 45°C, ressuspensa com 55 µL de acetato de etila, dos quais foram transferidos 50 µL para o *vial*. Foram acrescentados 25 µL de BSTFA: 1% TMCS e colocado no *dry block* por 30 minutos a 60°C para a derivatização. Foi injetado 1 µL no CG-MS.

O hexano não extraiu nenhum dos analitos; o acetato de etila, o cloro-butano e o éter de petróleo conseguiram extrair a cocaína e o cocaetileno. Já com o clorofórmio, foi possível extrair os três analitos: cocaína, cocaetileno e a benzoilecgonina. Porém, em uma amostra fortificada e guardada em freezer para extração no dia seguinte, o clorofórmio não foi eficiente em detectar nenhum analito no extrato da amostra.

Tanto o experimento de microextração em fase sólida como no de extração líquido-líquido foram utilizados apenas os padrões de cocaína, o cocaetileno e a benzoilecgonina, uma vez que o padrão do éster metil-anidroecgonina não estava disponível no laboratório naquele momento.

Abukhalaf et al. (2001) afirmam que a extração em fase sólida (SPE) apresenta várias vantagens em relação à líquido-líquido: reduzido número de solventes, diminuindo os custos do laboratório; alta recuperação dos analitos e baixos limites de detecção e quantificação. Estes fatos também foram observados por Juhascik e Jenkins (2009), que compararam a extração líquido-líquido com a extração em fase sólida para várias drogas de caráter básico, entre elas a cocaína, concluindo que a SPE é mais sensível e, inclusive, capaz de detectar analitos como a benzoilecgonina, não detectados na extração líquido-líquido.

A extração em fase sólida (SPE) foi realizada utilizando dois dispositivos: (1) as ponteiros de extração em fase sólida DPX – CX, que possuem uma resina de troca catiônica (Figura 6) e (2) os cartuchos Bond Elut Certify I, (200mg – 6mL) que apresentam uma fase extratora mista, formada por grupamentos octil (C8) ligados a

grupamentos de ácido benzenosulfônicos,. Os resultados parciais do estudo com as ponteiras DPX foram apresentados oralmente no V Encontro Regional de Toxicologia Forense (TIAFT) em 2009 (ALVES e DE MARTINIS, 2009). A extração utilizando as ponteiras DPX é mais rápida em comparação com os cartuchos, porém, com objetivo de aumentar a sensibilidade do método, optou-se pela utilização dos cartuchos, que possuem uma quantidade de fase extratora 4 vezes maior que as ponteiras. Tal escolha baseou-se na premissa de que os métodos de análise para mecônio requerem maior sensibilidade do que para outras matrizes biológicas em razão da pequena quantidade de amostra disponível para o teste, principalmente de bebês prematuros. Portanto, esses métodos devem ser desenvolvidos com capacidade de utilizar menor quantidade possível de amostra, com maior sensibilidade possível (MOORE et al., 1995).



Figura 6. Foto das ponteiras DPX

5.1.2. Otimização da metodologia

Após a escolha da SPE como técnica de extração, foram testados diferentes solventes para eluição em busca de maior recuperação dos analitos. Inicialmente foram utilizados metanol, acetato de etila, clorofórmio, hexano, diclorometano, éter de petróleo, mistura de clorofórmio:metanol (70:30) e acetato de etila:metanol (70:30). Cada um destes solventes foi adicionado em tubos separados contendo as amostras de mecônio (0,5g) e os analitos, seguido de agitação em vórtex, centrifugação, evaporação da fase orgânica e purificação ou *clean up* com o cartucho Bond Elut Certify I. O único solvente que apresentou resultado satisfatório para os 3 analitos (cocaína, cocaetileno e benzoilecgonina) foi o metanol. Como já foi dito anteriormente, o padrão do éster

metilanidroecgonina só foi adquirido no final dos experimentos, na fase de validação. Porém, ele foi facilmente incorporado à metodologia desenvolvida.

Alternativamente, tentou-se adicionar água ou tampão fosfato (pH 4, pH 6, pH 8,6 ou pH 9) ao mecônio para completa homogeneização da amostra e, em seguida, adicionou-se todos os solventes descritos acima. Entretanto, o metanol misturou-se a água, tornando inviável o passo de secagem dessa fase. Os demais solventes foram evaporados, passados pelo cartucho, mas não conseguiram extrair os 3 analitos pesquisados simultaneamente.

Após a escolha do solvente, foram testadas diferentes formas de homogeneização do mecônio, o que representou uma das grandes dificuldades deste trabalho. Foram testados 3 procedimentos: agitação horizontal por 20 minutos; ultra-som por 30 minutos e agitação em vórtex por 5 minutos. Este último apresentou resultado satisfatório com economia de tempo, e foi escolhido como forma de homogeneização.

Em seguida, passou-se para a fase do *clean up* da amostra com os cartuchos de SPE. Os solventes de condicionamento e o solvente de eluição do cartucho foram utilizados de acordo com o descrito na maioria da bibliografia consultada (Clark *et al.*, 1992; Abusada *et al.*, 1993; Oyler *et al.*, 1996). Entre as adaptações testadas com relação aos protocolos descritos está a quantidade do solvente de eluição (2, 3, 5 ou 6 mL), sendo 3 mL suficientes para extrair todos os analitos. Para o passo da lavagem do cartucho, além da utilização de água, HCl 0,1 M e metanol, recomendados pelo fabricante, com a finalidade de obter extratos mais “limpos” foram testados os seguintes solventes: acetonitrila, hexano, tampão fosfato pH 6 e tampão bicarbonato pH 4. Entretanto, todos os solventes testados provocaram perda de um ou mais analitos estudados.

Com relação ao processo de derivatização, foram testados o BSTFA:1% TMCS e o MTBSTFA (N-Methyl-N-Terc-butildimetilsililtrifluoracetamida). O BSTFA:1% TMCS apresentou melhor resultado, sendo então, o derivatizante escolhido. De acordo com Segura *et al.* (1998), o BSTFA é um dos reagentes de sililação mais utilizados no trabalho analítico, devido a seu alto poder de volatilização e de sililação dos analitos, combinados a estabilidade química e térmica que os seus derivados adquirem. O TMCS (trimetilclorosilano) atua como um catalisador da reação. Foi testado também, diferentes tempos e temperaturas no processo de derivatização: 100°C/15 min, 80°C/15 min, 70°C/15 min e 60°C/30 min. O melhor resultado foi 60°C/30 min. A derivatização é feita diretamente no *vial* de injeção, o que evita perda dos analitos durante a etapa de transferência tubo-*vial*. Para melhorar o rendimento do processo, os *inserts* foram

silanizados com uma solução a 5% de dimetilclorosilano em tolueno, que melhorou a recuperação da benzoilecgonina e não alterou os resultados da cocaína e do cocaetileno.

A Figura 7 mostra extratos metanólicos de algumas amostras de mecônio analisadas. Os extratos destas amostras, dependendo da concentração de pigmentos, “sujavam” em maior ou menor proporção o injetor do cromatógrafo. Farina et al. (2002) e Abukhalaf et al. (2001) afirmaram que a extração em fase sólida produz extratos mais limpos. Porém, como o mecônio é uma matrix complexa, composta por diversos pigmentos biliares responsáveis pelas diferentes colorações do mecônio, a extração em fase sólida não foi capaz de fornecer extratos tão “limpos”. Por esse motivo, o septo, o *liner* e *O-ring* eram trocados após as análises de 3 curvas analíticas e dos controles de qualidade.

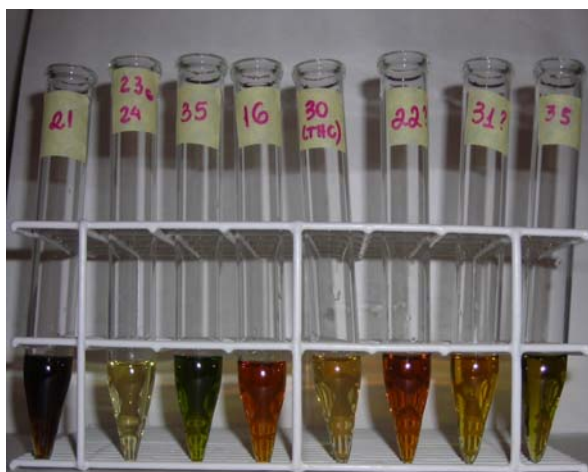


Figura 7. Coloração do extrato em metanol das amostras de mecônio

5.1.3 Determinação de cocaína, cocaetileno, benzoilecgonina e do éster metilanidroecgonina em amostras de mecônio

As concentrações de cocaína, cocaetileno, benzoilecgonina e do éster metilanidroecgonina foram determinadas utilizando um cromatógrafo em fase gasosa acoplado a um espectrômetro de massas com analisador de massas do tipo *ion trap* no modo *Full Scan* de detecção. Os compostos foram separados em coluna capilar de sílica fundida DB – 5MS (5% de fenil/95% dimetilpolisiloxano - 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). As amostras foram injetadas no modo *splitless*. Gás hélio foi usado como gás de arraste a um fluxo de 1 mL/min.

As condições do cromatógrafo estão descritas abaixo:

- T injetor: 260°C
- T coluna: Tabela 1

Tabela 1 – Programação da temperatura da coluna

<i>T inicial</i> (°C)	<i>Taxa de</i> <i>aquecimento</i> (°C/min)	<i>Tempo de</i> <i>permanência</i> (min)	<i>Tempo de</i> <i>corrida</i> (min)
60	-	-	
180	15	-	8
206	35	-	8,74
208	0,2	3	21,74
280	35	-	23,8

- T *trap*: 200°C
- T *transfer line*: 230°C
- T *manifold*: 40°C

A Tabela 2 apresenta os íons monitorados na identificação e quantificação dos analitos:

Tabela 2 - Íons de identificação, quantificação e tempo de retenção dos analitos

Analitos	Íons de Identificação (m/z)	Íon de Quantificação (m/z)	Tempo de Retenção (min)
EMA	152, 166, 181	152	7,76
COC	82, 182, 303	182	19,44
COC – d3	85, 185, 306	185	19,37
CE	82, 196, 317	196	21,54
BE	82, 240, 361	240	21,74
BE – d3	85, 243, 364	243	21,69

A identificação desses íons foi realizada através da injeção de uma amostra contendo apenas os padrões de cada substância, no modo *full* de detecção. Os íons da benzoilecgonina e do éster metilanidroecgonina são dependentes do derivatizante utilizado. Os íons obtidos com o BSTFA: 1% TMCS confirmam os obtidos por López et al. (2007), Toennes et al. (1999), Kintz et al. (1997), Oyler et al. (1996), Lewis et al. (1994) e Clark et al. (1992).

A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas é a combinação de 2 instrumentos analíticos importantes. A cromatografia gasosa pela eficiência na separação de compostos em misturas complexas, e a espectrometria de massas pela confirmação da identidade desses compostos, pela sensibilidade a pequenas quantidades dos analitos, por fornecer informações qualitativas e quantitativas e por distinguir substâncias diferentes com o mesmo tempo de retenção

A Figura 8 representa a injeção de uma concentração conhecida dos analitos para observação do sinal e tempo de retenção de cada composto. Podemos observar que o cocaetileno e a benzoilecgonina eluem praticamente juntos. Isso é observado devido ao tamanho da coluna capilar (30 metros). Trabalhos que utilizam colunas cromatográficas menores conseguem separar com melhor resolução esses dois analitos (Abukhalaf et al., 2001; Oyler et al., 1996; Cone et al., 1994; Abusada et al., 1993). Esse fato não compromete a utilização da metodologia, pois através do espectro de massas podemos identificá-los separadamente, além de utilizarmos íons de quantificação diferentes no processamento das amostras.

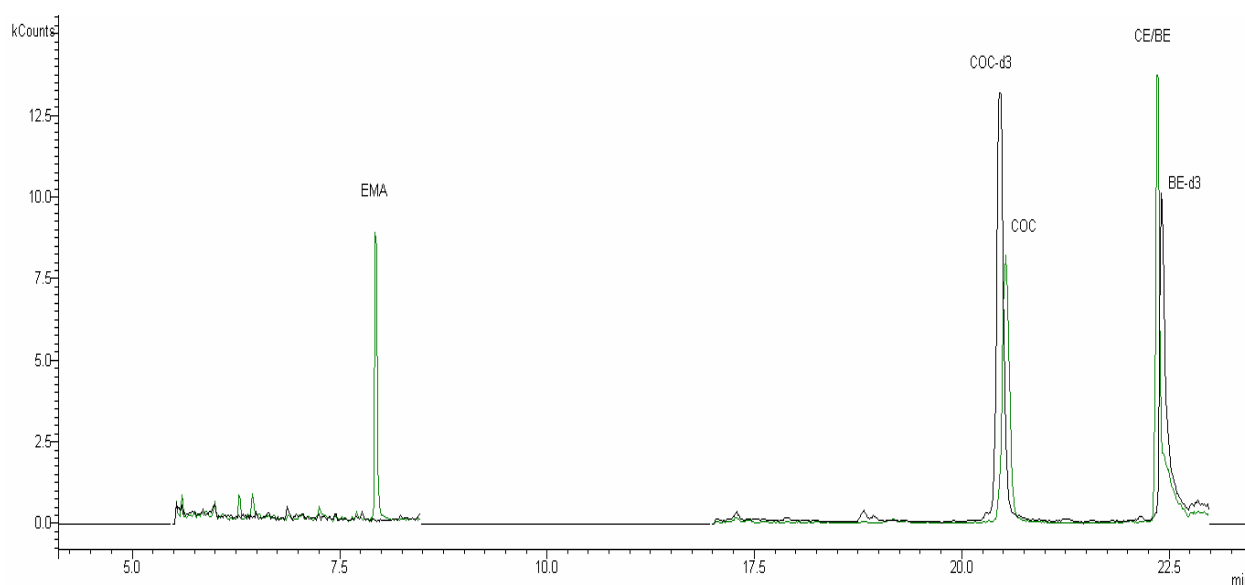


Figura 8. Cromatograma de uma amostra de mecônio fortificada com 100 ng de padrão (EMA, COC, CE e BE) e 250/370ng de padrão interno (COC-d3 e BE-d3)

A Figura 9 representa um cromatograma de uma amostra de mecônio branco (isenta dos analitos pesquisados), comprovando que a matriz biológica não apresenta nenhum componente endógeno interferindo nos tempos de retenção dos analitos estudados.

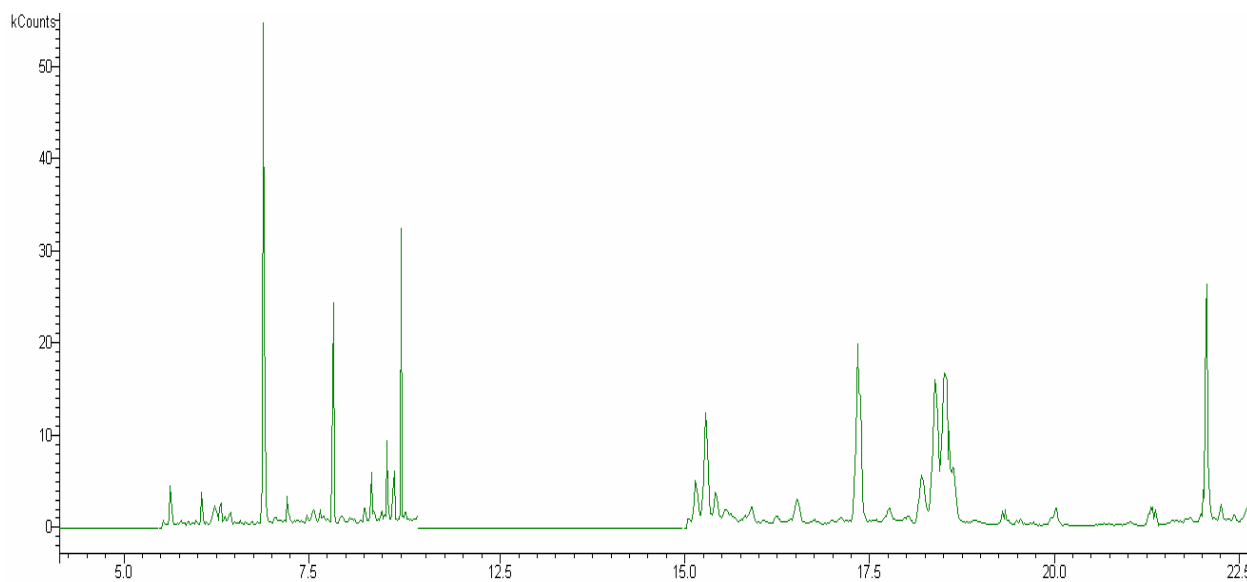


Figura 9. Cromatograma de uma amostra de mecônio branco

Esse cromatograma comprova a complexidade de se trabalhar com o mecônio, uma matriz complexa, “suja”, mas é a matriz biológica mais utilizada e que apresenta maior sensibilidade para avaliar a exposição *in utero* à drogas (Gray e Huestis, 2007; Lozano et al., 2007; Gareri et al., 2006; Bar-Oz et al., 2003; Bearer, 2003).

Em 2003, Bar-Oz et al. publicaram um estudo comparando o uso de mecônio e cabelo do neonato na análise de cocaína, benzoilecgonina e outras drogas. Relataram que, em casos de suspeita do uso de drogas pela mãe e resultado negativo no teste de urina do recém-nascido, o mecônio e o cabelo do bebê são as matrizes biológicas de escolha para a realização de um novo teste, e o mecônio apresentou maior sensibilidade para a cocaína e a benzoilecgonina do que o teste com o cabelo. O total de amostras positivas para cocaína era 53, das quais 51 apresentaram resultados positivos no mecônio, enquanto 43 deram positivo no cabelo. A sensibilidade do teste foi de 96% no mecônio e 84% no cabelo. Já para a benzoilecgonina, das 53 amostras positivas, 50 foram positivas no mecônio (sensibilidade de 95%) comparada a 30 casos positivos no cabelo (sensibilidade de 78%).

As figuras de 10 a 15 representam os picos cromatográficos dos íons selecionados de cada analito, seguido dos respectivos espectros de massas. O cromatograma apresenta a abundância de cada íon dos analitos selecionados. O íons mais abundante foram utilizados como íon de quantificação no processamento das amostras.

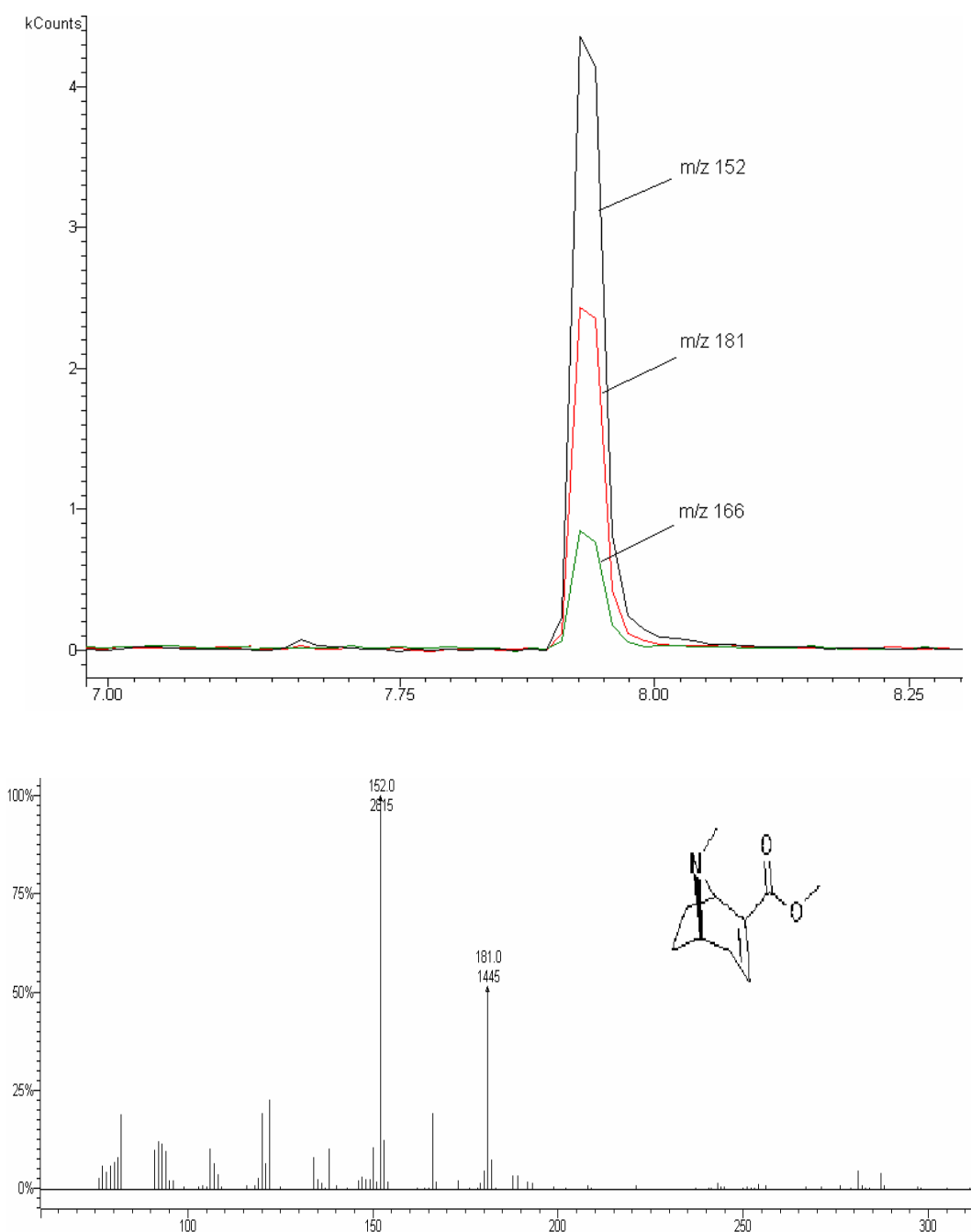


Figura 10. Cromatograma dos íons selecionados para o EMA, seguido do respectivo espectro de massas

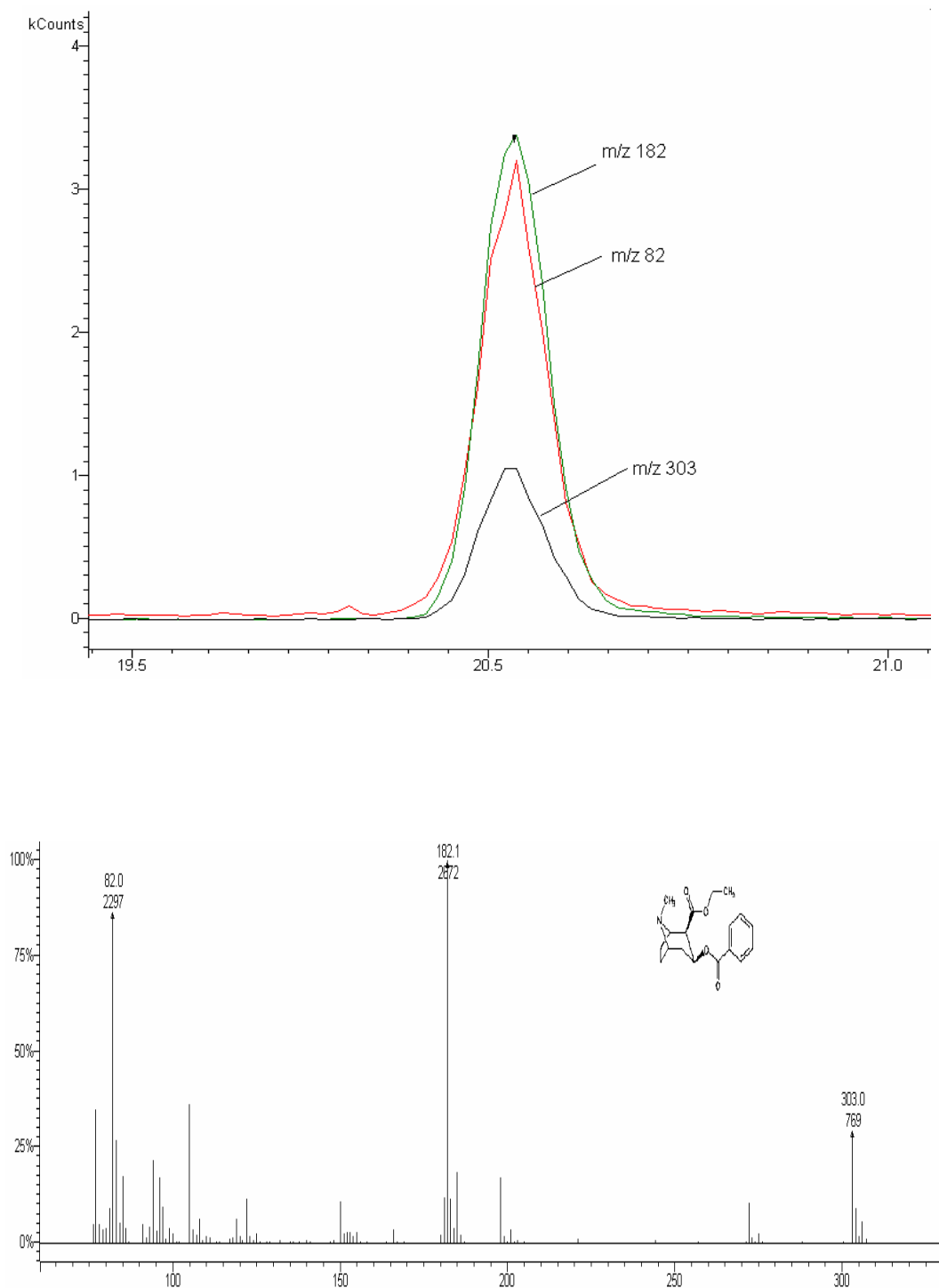


Figura 11. Cromatograma dos íons selecionados para o COC, seguido do respectivo espectro de massas

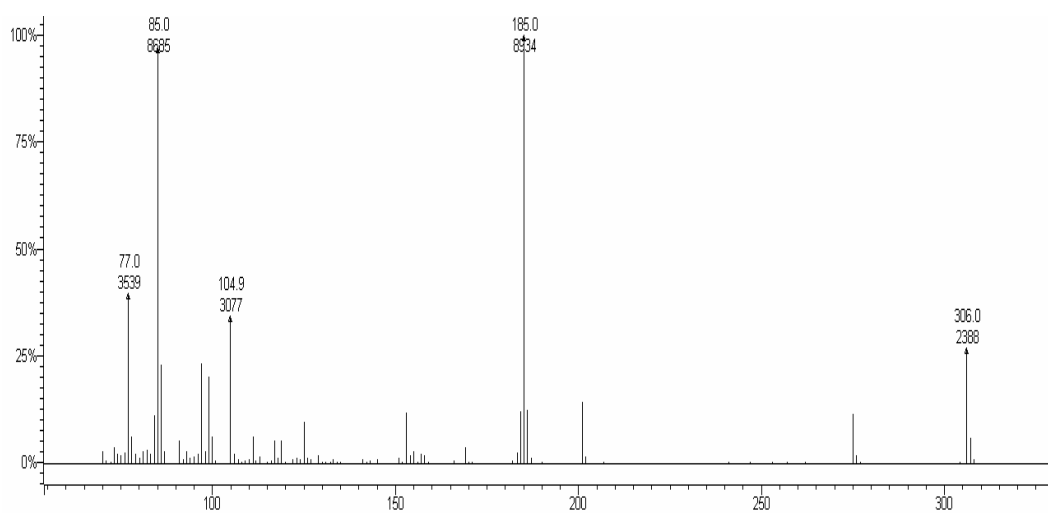
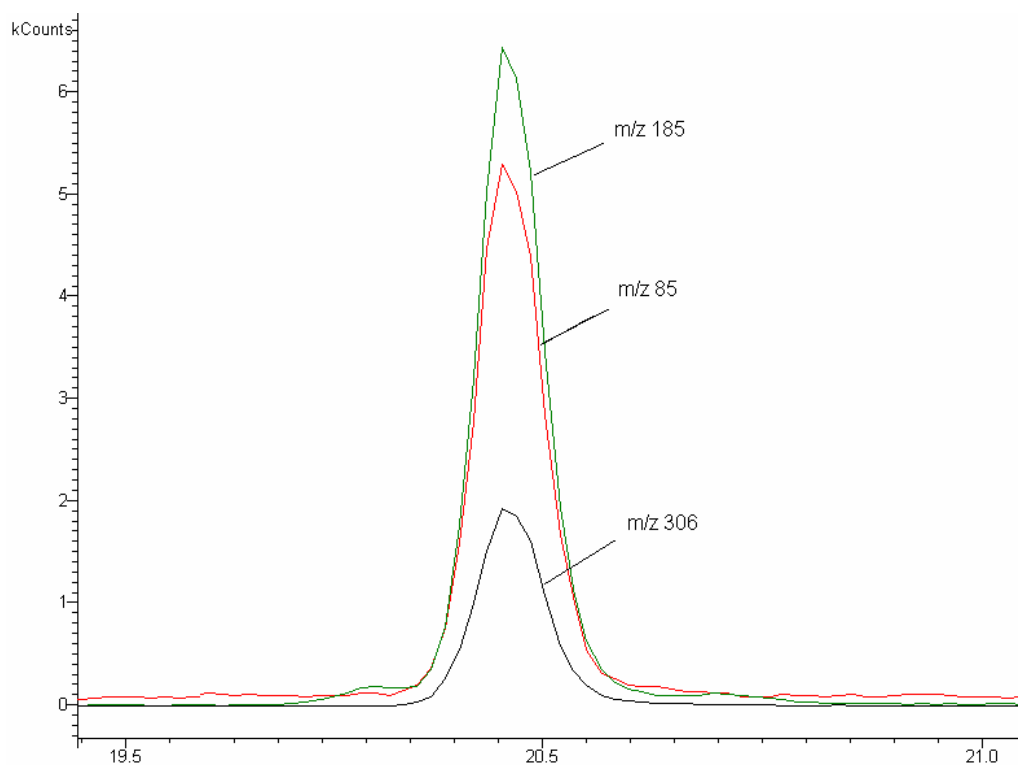


Figura 12. Cromatograma dos íons selecionados para o COC-d3, seguido do respectivo espectro de massas

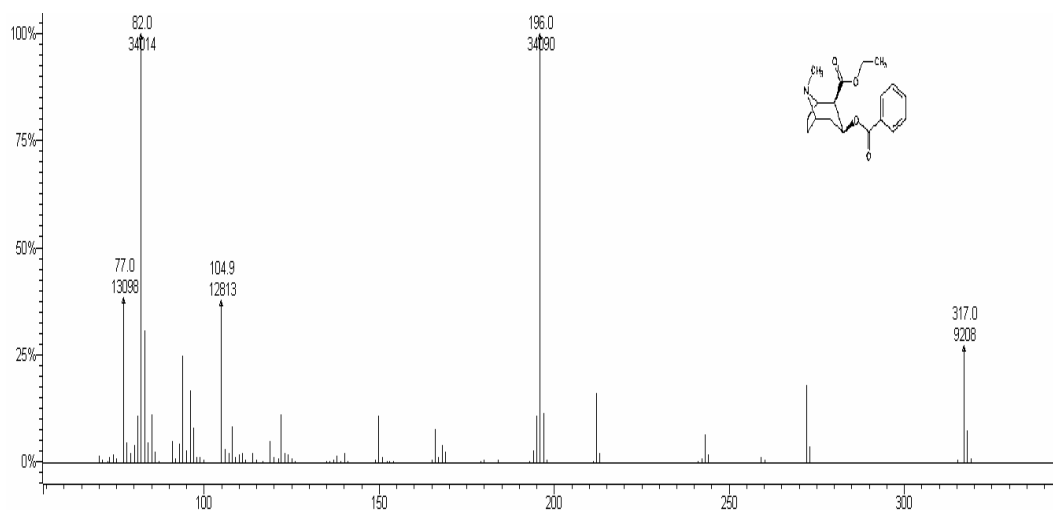
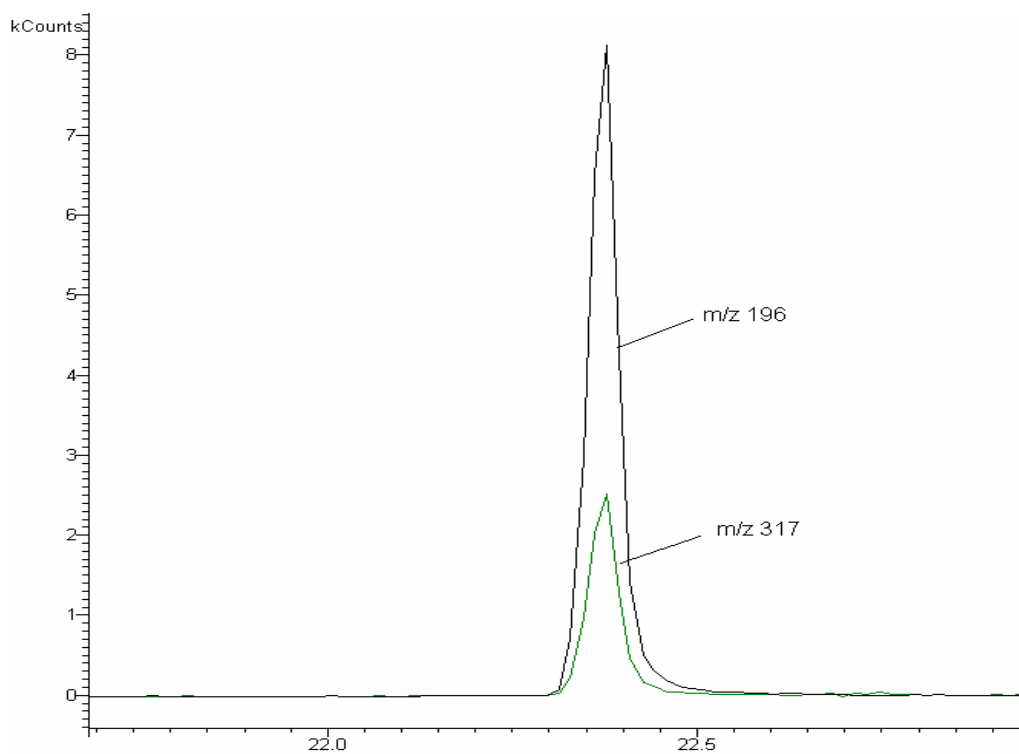


Figura 13. Cromatograma dos íons selecionados para o CE, seguido do respectivo espectro de massas

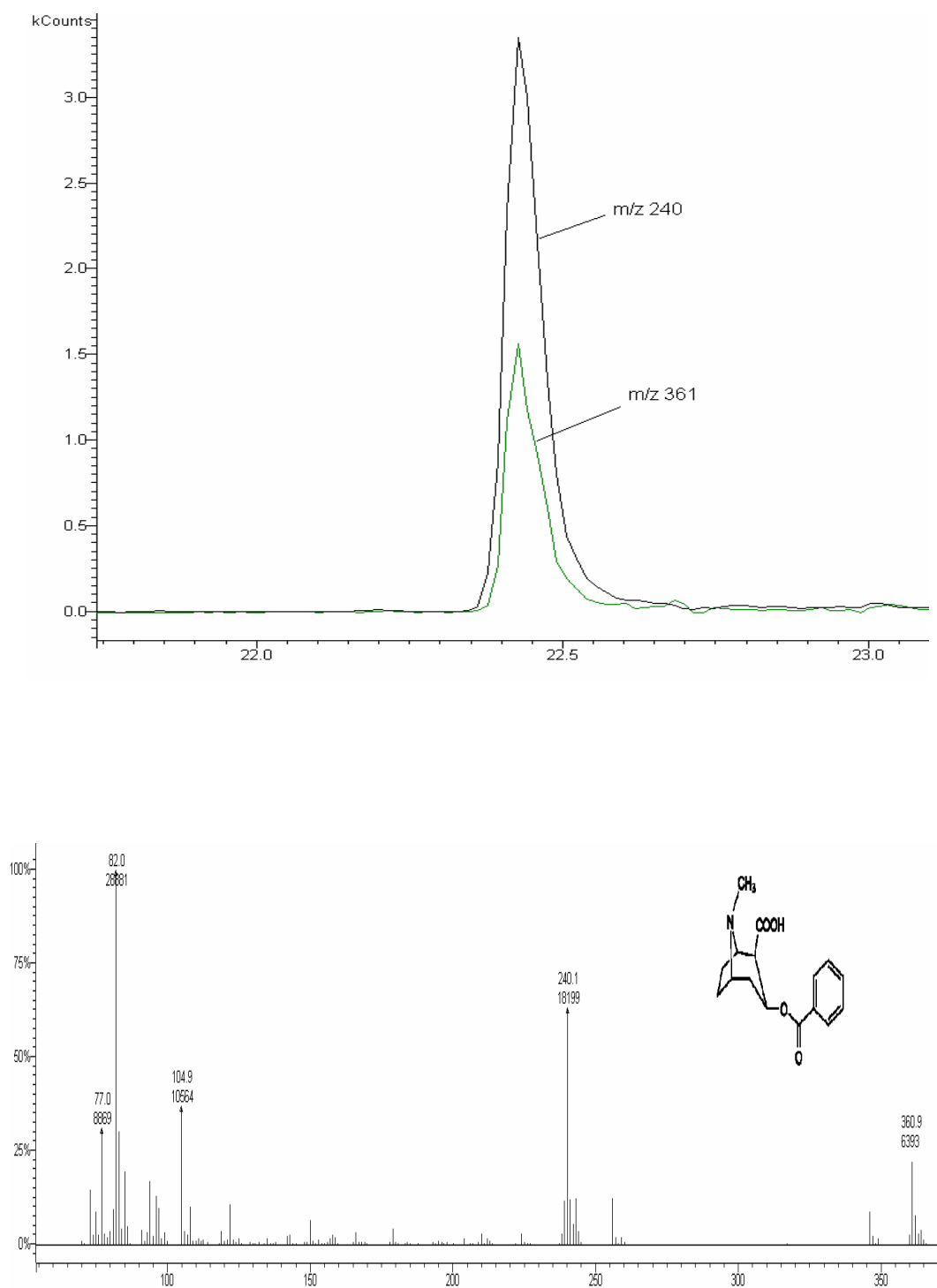


Figura 14. Cromatograma dos íons selecionados para o BE, seguido do respectivo espectro de massas

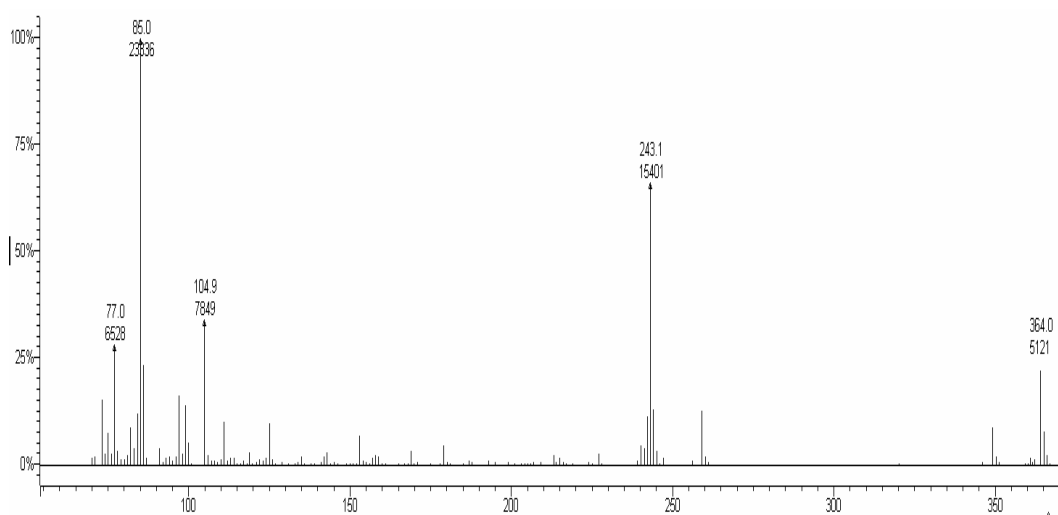
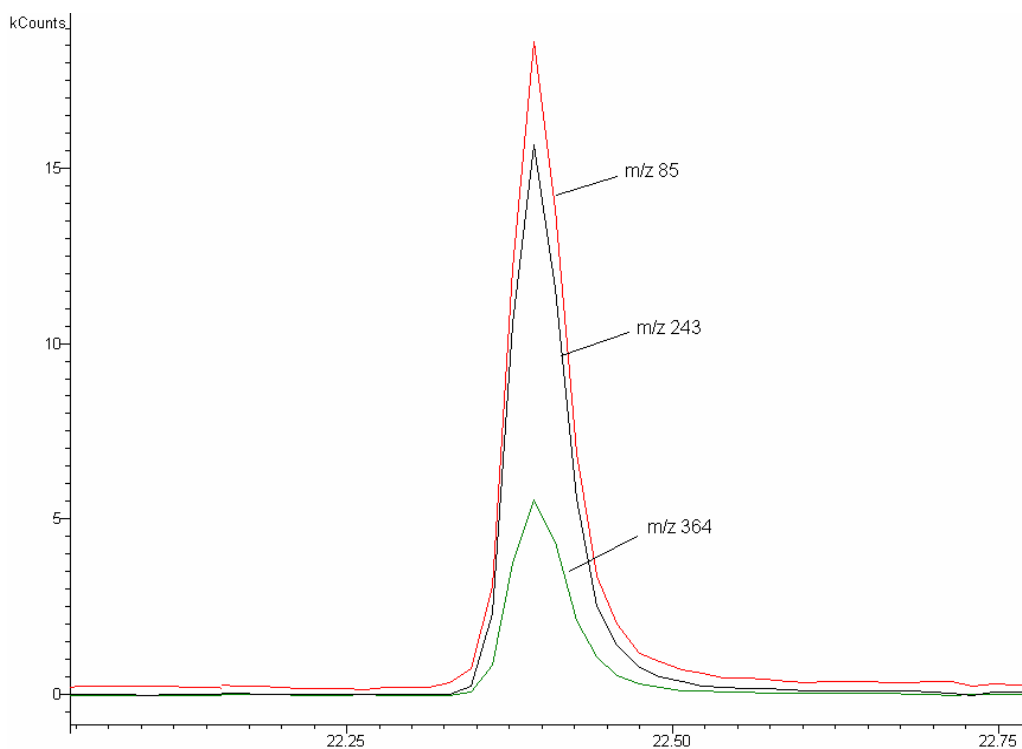


Figura 15. Cromatograma dos íons selecionados para o BE-d3, seguido do respectivo espectro de massas

5.2. Validação da metodologia

5.2.1. Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção dos analitos foi determinado nas amostras de mecônio fortificadas com concentrações decrescentes, até o limite mínimo de 10 ng/g para todos os analitos. Os valores determinados para limite de detecção (LD), limite inferior (LIQ) e superior de quantificação (LSQ) estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Limites de detecção, inferior e superior de quantificação dos analitos

<i>Analito</i>	<i>LD (ng/g)</i>	<i>LIQ (ng/g)</i>	<i>LSQ (ng/g)</i>
EMA	40	60	1500
COC	10	20	1000
CE	20	20	1000
BE	30	40	1500

O limite inferior de quantificação de uma metodologia é importante, pois determina a sensibilidade do método, podendo ser responsável por resultados falso-negativos, se esse valor for muito elevado (MOORE et al., 1995).

López et al. (2007) encontraram limite de detecção de 30 ng/g e limite inferior de quantificação de 40 ng/g para COC e BE, limites estes superiores aos encontrados no presente trabalho. Oyler et al. (1996) determinaram limite de detecção para COC e seus metabólitos inferior a 7,5 ng/g em sua metodologia. Abusada et al. (1993) encontraram os seguintes valores para o limite inferior de quantificação: 5,94 ng/g para a BE, 6,02 ng/g para o CE e 23,42 ng/g para a COC (valor superior ao determinado no presente estudo). Esses valores foram menores do que os determinados para sangue total e plasma.

5.2.2. Linearidade

A linearidade do método verificada foi de 20 ng/g de mecônio a 1000 ng/g para a cocaína e o cocaetileno; 40 a 1500 ng/g para a benzoilecgonina e de 60 a 1500 ng/g para o éster metilanidroecgonina. López et al. (2007) determinaram a

faixa de linearidade de 40 – 2000 ng/g para a COC e BE. Oyler et al. (1996) determinaram a linearidade para a COC e a BE de 3 – 1000 ng/g e para os demais analitos de 1,6 – 500 ng/g. Em 2000, Xia et al. publicaram uma metodologia de análise de cocaína e metabólitos em mecônio usando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas-espectrometria de massas (LC-MS/MS), e determinaram uma faixa linear de 5 – 5000 ng/g, com R^2 que variou de 0,982 a 0,999.

Abusada et al. (1993) encontraram linearidade de 0 – 1000 ng/g com R^2 que variou de 0,85 a 0,94, para COC, CE e BE. Clark et al. (1992) determinaram para a cocaína e para a benzoilecgonina, uma faixa linear de 0 – 10 $\mu\text{g/g}$, com R^2 de 0,99 e 0,97, respectivamente.

As Figuras de 16 a 19 representam as curvas de calibração e linearidade de cada analito. O eixo Y representa a razão área do padrão (A_p) pela área do padrão interno ($A_{p \text{ int}}$) e o eixo X representa a concentração do analito expressa em nanogramas por grama de amostra de mecônio (ng/g).

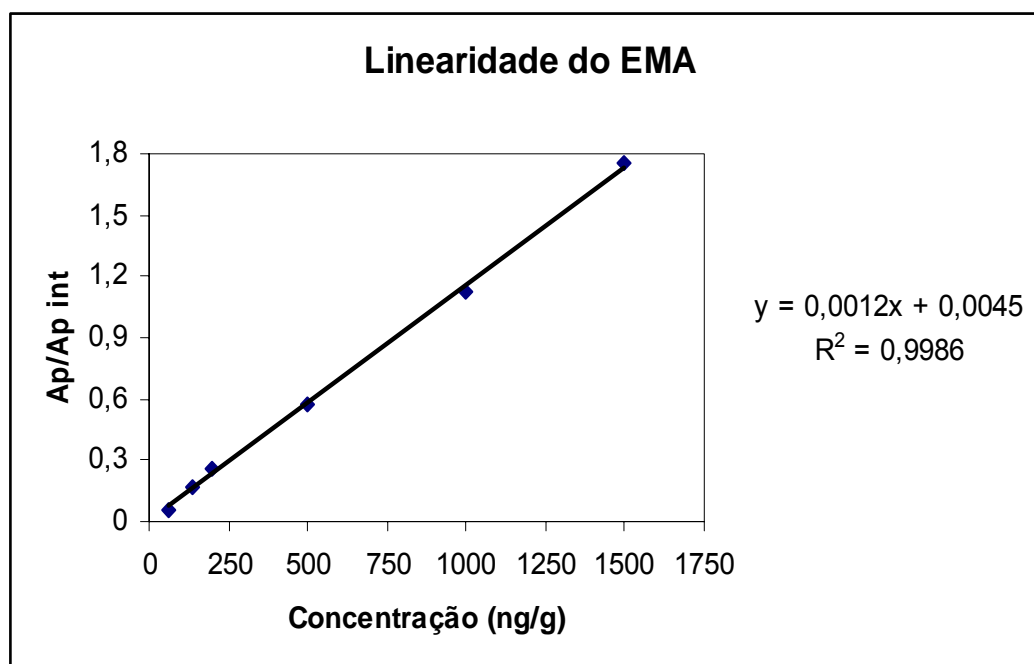


Figura 16. Linearidade do EMA

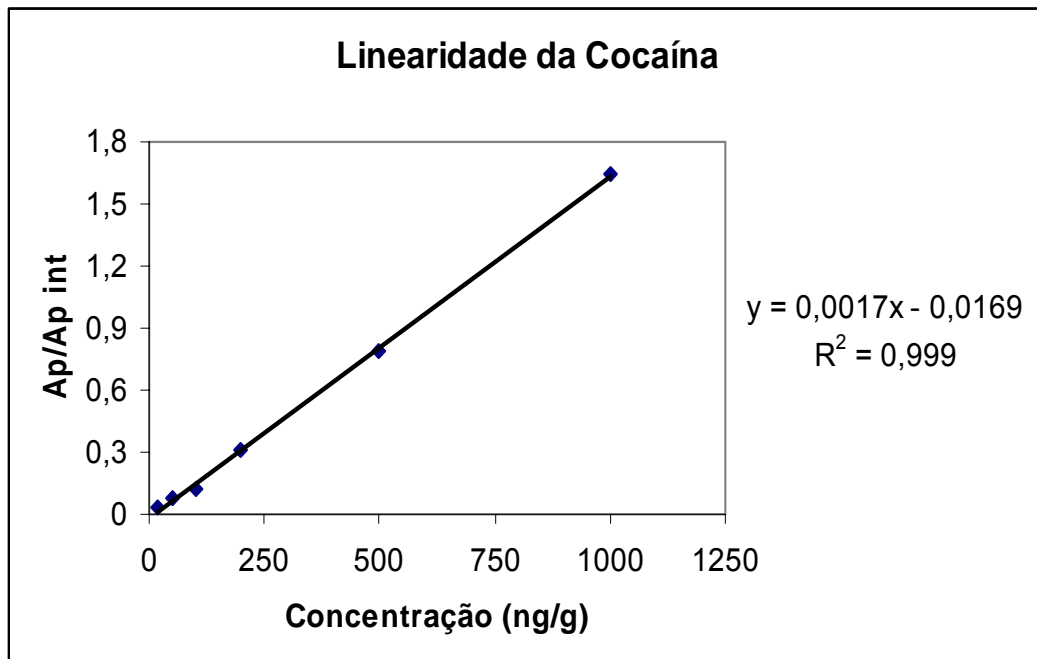


Figura 17. Linearidade da COC

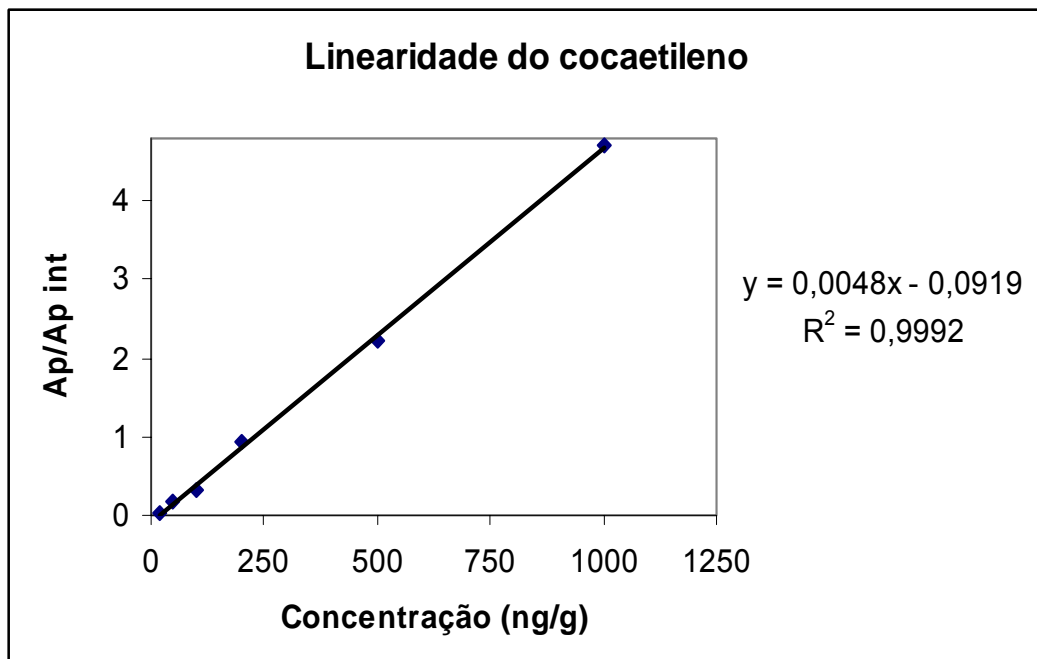


Figura 18. Linearidade do CE

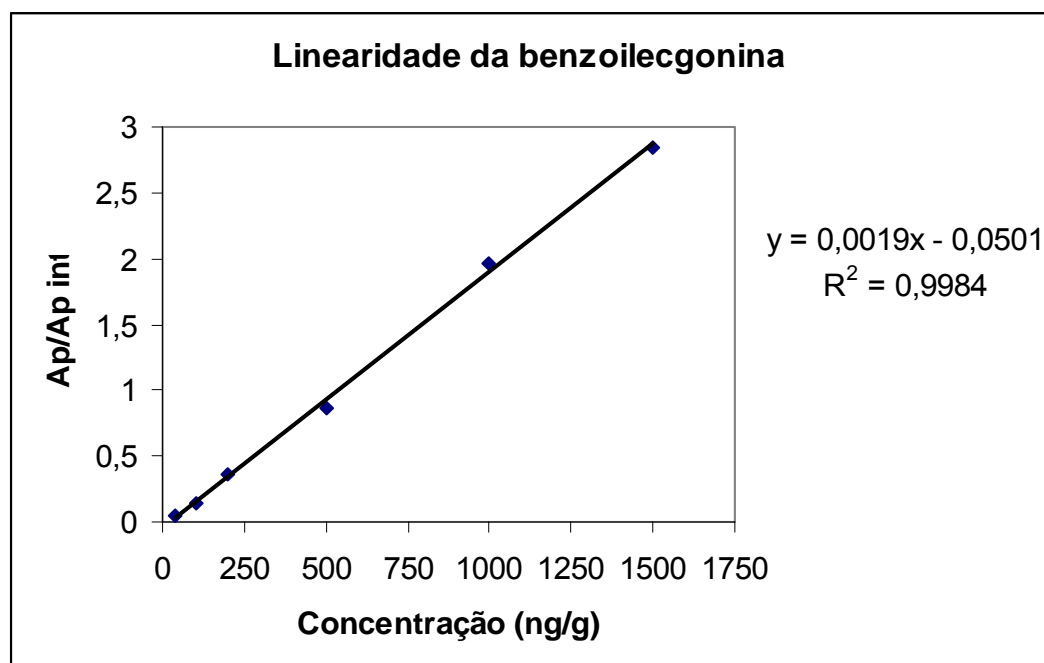


Figura 19. Linearidade da BE

5.2.3. Precisão

As análises foram realizadas em cinco dias diferentes. As Tabelas 4 e 5 apresentam, respectivamente, os valores de precisão intra-ensaio e inter-ensaio. A precisão intra-ensaio variou de 3,01% a 10,15%, que foram os valores encontrados respectivamente para o CQ 2 da cocaína e o CQ 1 do cocaetileno. Para a precisão inter-ensaio, os valores encontrados variaram de 5,31% a 11,12%, que correspondem aos valores respectivamente do CQ 2 da benzoilecgonina e do CQ 1 do cocaetileno.

Tabela 4 - Valores de precisão intra-ensaio (%)

CQs	EMA	COC	CE	BE
CQ 1	4,34	3,01	10,15	4,12
CQ 2	3,19	3,10	6,38	5,76
CQ 3	3,71	6,39	2,48	8,05

Tabela 5 - Valores de precisão inter-ensaio (%)

CQs	EMA	COC	CE	BE
CQ 1	9,54	7,78	11,12	7,25
CQ 2	8,75	10,67	7,38	5,31
CQ 3	7,40	8,57	7,57	8,20

Xia et al. (2000) destacaram em seu trabalho que os elevados valores de precisão (desvio padrão relativo) para os analitos usando mecônio são maiores do que os resultados usando outras matrizes biológicas como urina, plasma ou soro. Isso pode ser explicado pelo fato do mecônio apresentar uma complexa mistura de componentes e dos vários passos necessários no preparo da amostra, além de que os dados de cada curva de calibração foram gerados a partir de amostras de mecônio diferentes, devendo ser considerado a variabilidade entre os pacientes.

5.2.4. Exatidão

Os valores de exatidão encontrados para todos os analitos estavam dentro dos limites aceitáveis, ou seja, 80 a 120% para os controles de qualidade inferior (CQ 1) e 85 a 115% para os demais controles de qualidade (CQ 2 e CQ 3). A Tabela 6 apresenta os valores médios de exatidão obtidos nos cinco dias de análises para os 3 controles de qualidade de cada um dos compostos. A exatidão variou de 91,47% (CQ 2 do éster metilanidroecgonina) a 105,31% (CQ 1 da benzoilecgonina)

Tabela 6 - Valores de exatidão (%)

CQs	EMA	COC	CE	BE
CQ 1	99,42	94,14	96,13	105,31
CQ 2	91,47	100,29	101,04	102,29
CQ 3	95,75	97,44	97,24	102,85

5.2.5. Recuperação

Os valores de recuperação encontrados para os analitos variaram de 56,30% (CQ 2 da cocaína) até 94,18% (CQ 1 da cocaína), conforme podemos observar na tabela 7.

Tabela 7 - Valores de recuperação (%)

CQs	EMA	COC	CE	BE
CQ 1	66,20	94,18	56,30	82,93
CQ 2	64,64	60,30	60,88	70,45
CQ 3	77,14	64,01	62,35	63,80
MÉDIA	69,33	72,83	59,84	72,40

Em 2007, López et al. publicaram valores médios de recuperação de 60,55% para a COC e 51,5% para a BE, valores inferiores ao encontrados no presente trabalho. Abusada et al. (1993) determinaram valores de recuperação para a COC de 88,73%, 82,30% para a BE e 81,63% para CE. Essa vantagem pode ser explicada devido à dupla extração com metanol no preparo da amostra, o que porém, gera extratos mais “sujos”. Clark et al. (1992) publicaram que a recuperação de seu método para a cocaína foi de 99%, enquanto que para benzoilecgonina foi de apenas 30%.

5.2.6. Especificidade

O parâmetro da especificidade foi determinado fortificando-se o controle de qualidade inferior (120 ng/g para EMA, 40 ng/g para COC e CE e 80 ng/g para a BE) em triplicata, com uma concentração elevada (2 µg/g) de possíveis compostos interferentes, que podem estar presentes em situações reais de análises. Os interferentes testados foram: ácido acetilsalicílico (AAS), alprazolam, dipirona, fluoxetina, metoclopramida e sulfato ferroso, medicamentos comumente utilizados durante a gestação; anfetamina e Δ^9 – THC (delta-9 tetraidrocanabinol), possíveis drogas ilícitas; cafeína e nicotina, substâncias amplamente consumidas e, por fim, efedrina e fenilefrina, compostos de caráter básico, aminas, semelhantes à cocaína.

Tabela 8 – Valores de especificidade (ng/g)

INTERFERENTES	EMA	COC	CE	BE
AAS	117,36	35,60	32,34	91,16
Alprazolam	99,00	34,72	34,28	85,10
Anfetamina	124,14	38,42	36,48	87,38
Cafeína	102,40	34,64	41,80	86,88
Dipirona	106,84	33,02	37,32	84,38
Efedrina	112,60	36,70	40,92	87,92
Fenilefrina	113,34	38,50	32,64	90,14
Fluoxetina	114,54	36,82	37,12	88,78
Metoclopramida	116,80	35,54	33,16	87,76
Nicotina	100,40	39,60	34,08	85,42
Sulfato ferroso	123,20	39,28	36,32	90,50
THC	104,92	43,60	34,36	77,58

5.2.7. Carry over

O *carry over* foi avaliado injetando-se uma amostra livre de analitos imediatamente após a injeção do ponto mais alto da curva de calibração. Nenhum dos analitos apresentou *carry over*.

5.2.8. Estabilidade

Os experimentos de estabilidade foram realizados apenas para a estabilidade pós-processamento. Segundo Peters et al. (2007), a validação total do método deve incluir experimentos de estabilidade, a menos que esses dados estejam disponíveis na literatura. Em 1999, Ostrea et al. publicaram que a cocaína se mantém estável no mecônio por até 24 horas em temperatura ambiente (estabilidade de curta duração), reduzindo apenas 25% de sua concentração. Porém, se o mecônio for ressuspenso em um solvente orgânico, como o metanol, isso possibilita a permanência do mecônio em temperatura ambiente por até 72 horas, sem perdas na concentração de cocaína. Porém, para armazenagem por um período maior de tempo, o mecônio deve ser congelado a -15°C , onde a cocaína permanece estável

por pelo menos 9 meses (estabilidade de longa duração). A estabilidade de congelamento e descongelamento não foi avaliada, uma vez que a quantidade de mecônio disponível para as análises era suficiente para realização de um único teste.

A estabilidade pós-processamento foi determinada através da reinjeção do controle de qualidade inferior (120 ng/g para EMA, 40 ng/g para COC e CE e 80 ng/g para a BE) e superior (900 ng/g para COC e CE e 1340 ng/g para EMA e BE) 8 horas após a primeira injeção, em triplicata.

Tabela 9 – Estabilidade pós-processamento

Analitos	CQ 1 (ng/g)	C.V. (%)	Exatidão (%)	CQ 3 (ng/g)	C.V. (%)	Exatidão (%)
EMA	104,40	2,70	87,0	1309,46	9,94	97,72
COC	37,08	3,80	92,71	865,5	7,45	96,16
CE	34,02	3,0	85,04	795,06	3,43	88,34
BE	89,80	3,16	112,24	1285,02	2,55	95,90

5.2.9. Aplicação da metodologia desenvolvida na análise das amostras de mecônio

A análise cromatográfica foi realizada nas amostras de mecônio das pacientes que relataram uso de drogas ilícitas alguma vez na vida, independente do tipo de substância utilizada. A Tabela 10 apresenta as respostas de todas as mães entrevistadas que assumiram ter experimentado cocaína alguma vez na vida.

Tabela 10 – Respostas do questionário aplicado as pacientes que relataram uso de cocaína alguma vez na vida

Nº da Amostra	Forma de uso	Frequência de uso	Última exposição	Análise do mecônio
05	Inalatória	Esporadicamente	1 ano atrás	Negativo
16	Inalatória	Toda semana	Dias atrás	Positivo
21	Inalatória	Toda semana	Dias atrás	Negativo
22	Inalatória	Esporadicamente	1 ano atrás	Positivo
23	Inalatória e Pulmonar	Toda semana	Meses atrás	Negativo
30	Inalatória e Pulmonar	Esporadicamente	Anos atrás	Negativo
32	Pulmonar	Toda semana	Dias atrás	Positivo
35	Inalatória	Esporadicamente	Meses atrás	Negativo
36	Inalatória	Esporadicamente	Meses atrás	Negativo

A amostra nº 22 apresentou resultado positivo apesar de a mãe afirmar ter abandonado o uso há 1 ano. Em uma das amostras em que a mãe disse ter feito uso de outra droga (maconha), foi detectada a cocaína, apesar da mãe relatar no questionário que nunca havia utilizado essa substância. Este caso, assim como o nº 22, são exemplos de que a utilização apenas de um questionário é insuficiente para avaliação da exposição *in utero* a drogas. O ideal é a combinação da análise do mecônio com a entrevista pós-parto (LESTER et al., 2001; ARENDT et al., 1999).

O resultado negativo da amostra 23 provavelmente ocorreu devido à análise com pequena quantidade de amostra (0,3 g), pois o bebê nasceu prematuro, com baixo peso, tendo que permanecer na UTI (Unidade de Terapia Intensiva) neonatal por vários dias. A coleta do mecônio foi realizada pelos funcionários da unidade por duas vezes, e mesmo assim, a quantidade de mecônio foi inferior ao 0,5 grama utilizado na metodologia. Já o caso da amostra 21 pode representar um falso-negativo, mas não foi possível repetir a análise em função da pequena quantidade de mecônio coletada.

Tanto na amostra 35 como na amostra 36, o resultado da análise do mecônio foi negativo. De acordo com a resposta do questionário das mães, a nº 35 usou

esporadicamente a cocaína e interrompeu esse uso do 4º para o 5º mês de gestação. Já a mãe nº 36 disse ter usado uma única vez durante a 36ª semana de gestação.

Os demais resultados condizem com o relatado no questionário aplicado as pacientes. Como podemos observar na tabela acima, a paciente nº 32 afirmou ter feito uso de *crack*, e isso foi confirmado pela análise do mecônio através da detecção do éster metilanidroecgonina, que é o produto de pirólise do *crack*. Abaixo, segue o cromatograma da amostra 32 (Figura 20), que identifica a cocaína, a benzoilecgonina e o éster metilanidroecgonina.

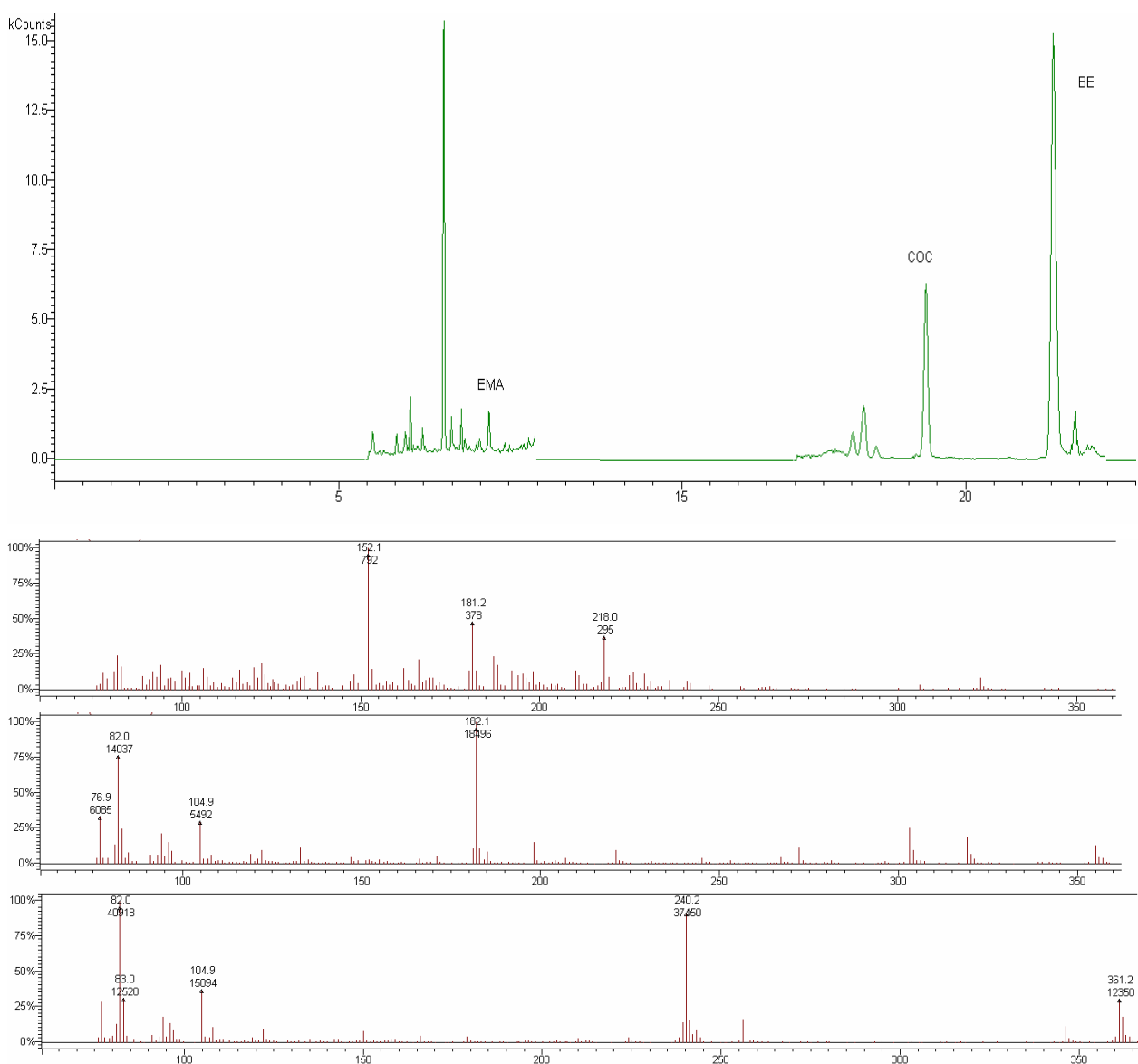


Figura 20. Cromatograma da amostra de mecônio nº 32, seguido do espectro de massas dos analitos identificados (EMA, COC e BE, respectivamente)

Portanto, das 36 amostras de mecônio coletadas, 9 amostras (25%) eram provenientes de mães que relataram uso da cocaína alguma vez na vida e 3 casos (33,33%) deram resultado positivo para análise do mecônio. Esses dados não são epidemiologicamente relevantes, já que o número de casos estudados representa apenas uma pequena parcela dos partos da cidade de Ribeirão Preto. Além disso, os partos realizados no Hospital das Clínicas da FMRP são geralmente de mulheres com gestações de alto risco, dentre as quais estão usuárias de drogas, o que levaria a concentração de casos no hospital, tornando o resultado não representativo da situação real, superestimando o número de recém-nascidos expostos à cocaína durante a vida intrauterina.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- A metodologia desenvolvida mostrou ser eficiente e sensível para identificação e quantificação da cocaína, cocaetileno, benzoilecgonina e do éster metilanidroecgonina em amostras de mecônio ;

- O mecônio é uma matriz biológica complexa, de difícil manipulação, porém efetiva na preservação dos analitos estudados e amplamente utilizada na avaliação da exposição *in utero* as drogas;

- Através da metodologia desenvolvida, foi possível diferenciar as mães que fizeram uso de cocaína das que consumiram *crack*, por meio da identificação do éster metilanidroecgonina, já que este produto só é formado no processo de queima da cocaína;

- A hipótese de que a utilização apenas do histórico materno ou de um questionário não é suficiente para a avaliação da exposição fetal às drogas foi reforçada, uma vez que, entre os casos avaliados, foi encontrado resultado positivo na análise de cocaína no mecônio, enquanto a mãe afirmou nunca ter feito uso de cocaína. Portanto, se faz necessária a combinação do histórico materno e análise toxicológica laboratorial para não subestimar a incidência do uso de drogas durante a gestação.

- A metodologia desenvolvida e validada tem potencial de aplicação em análises de rotina dos analitos estudados, com o objetivo de determinar com segurança se o recém nascido foi exposto às drogas durante a gestação, o que pode acarretar problemas de saúde ao mesmo logo após o nascimento ou durante o seu desenvolvimento.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUKHALAF, I.K.; PARKS, B.A.; SILVESTROV, N.A.; DEUTSCH von, D.A.; MOZAYANI, A.; ABOUL-ENEIN, H.Y. Validation of a solid phase extraction procedure for the GC-MS identification and quantitation of cocaine and three metabolites in blood, urine and milk. **J Liq Chrom & Rel Technol**, v. 24, n. 3, p. 401-414, 2001.

ABUSADA, G.M.; ABUKHALAF, I.K.; ALFORD, D.D.; VINZON-BAUTISTA, I.; PRAMANIK, A.K.; ANSARI, N.A.; MANNO, J.E.; MANNO, B.R. Solid-phase extraction and GC-MS quantitation of cocaine, ecgonine methyl ester, benzoylecgonine, and cocaethylene from meconium, whole blood and plasma. **J Anal Toxicol**, v. 17, p. 353-358, October, 1993.

ALVES, M.N.R.; MARTINIS DE, B.S. Fast methodology for determination of cocaine and benzoylecgonine in meconium using disposable pipette extraction tips and gas chromatograph-mass spectrometry. V Encontro Regional de Toxicologia Forense (TIAFT), Porto Alegre/RS, resumo (CD Rom), jun, 2009.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL). Resolução RE nº 899, 29 de maio de 2003. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/legis>>. Acesso em: 10 abril 2008.

ARAOJO, R.; McCUNE, S.; FEIBUS, K. Substance abuse in pregnant women: making improve detection a good clinical outcome. **Clin Pharmacol Ther.**, v. 83, n. 4, p. 520-522, April, 2008.

ARENDRT, R.E.; LYNN, T.S.; MINNES, S.; SALVATOR, A. Accuracy in detecting prenatal drug exposure. **J Drug Issues**, v. 29, n. 2, p. 203-214, 1999.

BARANOWSKI, J., POCHOPIEN, G., BARANOWSKA, I. Determination of nicotine, cotinine and caffeine in meconium using high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr B**, p. 317 – 321, 1997.

BAR-OZ, B.; KLEIN, J.; KARASKOV, T.; KOREN, G. Comparison of meconium and neonatal hair analysis for detection of gestational exposure to drugs of abuse. **Arch Dis Child Fetal Neonatal**, v. 88, 2003.

BEARER, C.F. Meconium as a biological marker of prenatal exposure. **Ambul Pediatrics**, v. 3, n. 1, p. 40-43, Jan-Feb, 2003.

BIELAWSKI, D.; OSTREA Jr, E.; POSECION Jr, N.; CORRION, M.; SEAGRAVES, J. Detection of several classes of pesticides and metabolites in meconium by gas chromatography-mass spectrometry. **Chromatographia**, v. 62, n. (11-12), p. 623-629, 2005.

BINGOL, N.; FUCHS, M.; DIAZ, V.; STONE, R.K.; GROMISCH, D.S. Teratogenicity of cocaine in humans. **J. Pediatr**, v. 110, n. 1, p.93-96, 1987.

BROWNE, SP; TEBBETT, IR; MOORE, CM; DUSICK, A; COVERT, R; YEE, GT. Analysis of meconium for cocaine in neonates, **J Chromatogr**, v. 575, p. 158-161, 1992.

CARLINI, E.A. *et al.* II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país, 2005. São Paulo : CEBRID - Centro Brasileiro de Informação sobre Drogas Psicotrópicas: UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo, 2006.

CHASIN, A.A.M.; SILVA, E.S. Estimulantes do Sistema Nervoso Central. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003. Cap. 4.3, p.239-257.

CHASIN, A.A.M.; CHASIN, M.; SALVADOR, M.C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Rev Farm Bioquim Univ S Paulo**, v. 30, n. 2, p. 49-53, jul-dez, 1994.

CHERUKURI, R.; MINKOFF, H.; FELDMAN, J.; PAREKH, A.; GLASS, L. A cohort study of alkaloidal cocaine ("crack") in pregnancy. **Obstet Gynecol**, v. 72, n. 2, p. 147-151, 1988.

CLARK, G.D.; ROSENZWEIG, I.B.; RAISYS, V.A.; CALLAHAN, C.M.; GRANT, T.M.; STREISSGUTH, A.P. The analysis of cocaine and benzoylecgonine in meconium. **J Anal Toxicol**, v. 16, July/August, 1992.

CONE, E.J.; HILLSGROVE, M.; DARWIN, W.D. Simultaneous measurement of cocaine, cocaethylene, their metabolites and "crack" pyrolysis products by gas chromatography-mass spectrometry. **Clin Chem**, v. 40, n. 7, p. 1299-1305, 1994.

EYLER, FD; BEHNKE, M; CONLON, M; WOODS, NS; WOBIE, K. Birth outcome from a prospective, matched study of prenatal crack/cocaine use: I. Interactive and dose effects on health and growth. **Pediatrics**, v. 101, n. 2, p. 229-236, February, 1998.

FARINA, M.; YONAMINE, M.; SILVA, O.A. One-step liquid-liquid extraction of cocaine from urine samples for gas chromatographic analysis. **Forensic Sci Int.**, v. 127, n. 3, p. 204-207, Jul, 2002.

GALLARDO, E.; QUEIROZ, J.A. The role of alternative specimens in toxicological analysis. **Biomed Chromatogr**, v. 22, p. 795-821, 2008.

GANAPATHY, V.; LEIBACH, F.H. Human Placenta: a direct target for cocaine action. **Placenta**, v. 15, p. 785-795, 1994.

GARERI, J.; KLEIN, J.; KOREN, G. Drugs of abuse testing in meconium. **Clin Chim Acta**, Toronto, v. 366, p. 101-111, 2006.

GOLDIM, J.R.; PITHAN, C.F.; OLIVEIRA, J.G. O processo de consentimento livre e esclarecido em pesquisa: uma nova abordagem. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 49, n. 4, p. 372-374, 2003.

GRAY, T.R.; LaGASSE, L.L.; SMITH, L.M.; DERAUF, C.; GRANT, P.; SHAH, R.; ARRIA, A.M.; GROTTA, S.A.D.; STRAUSS, A.; HANING, W.F.; LESTER, B.M.; HUESTIS, M.A. Identification of prenatal amphetamines exposure by maternal interview and meconium toxicology in the infant development, environment and lifestyle (IDEAL) study. **The Drug Monit**, v. 31, n.6, Dec, 2009.

GRAY, T.R.; MAGRI, R.; SHAKLEYA, D.M.; HUESTIS, M.A. Meconium nicotine and metabolites by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: differentiation of passive and nonexposure and correlation with neonatal outcome measures. **Clin Chem**, v. 54, n. 12, 2008.

GRAY, T.; HUESTIS, M. Bioanalytical procedures for monitoring in utero drug exposure. **Anal Bioanal. Chem**, v. 388, p. 1455-1465, 2007.

ISENCHMID, D.S. Cocaine. In: LEVINE, B. **Principles of Forensic Toxicology**. USA, 1999. Cap. 13, p. 221-245.

JUHASCIK, M.P.; JENKINS, A.J. Comparison of liquid/liquid and solid-phase extraction for alkaline drugs. **J Chrom Science**, v. 47, aug, 2007.

KINTZ, P.; SENGLER, C.; CIRIMELE, V.; MANGIN, P. Evidence of crack use by anhydroecgonine methyl ester identification. **Hum Experim & Toxicol**, v. 16, p. 123-127, 1997.

LESTER, *et al.* The Maternal Lifestyle Study: drug use by meconium toxicology and maternal self-report. **Pediatrics**, v. 107, n. 2, p. 309-317, February, 2001.

LEWIS, D.E.; MOORE, C.M.; LEIKIN, J.B. Cocaethylene in meconium specimens. **Clin Toxicol**, n. 32, v. 6, p. 697-703, 1994.

LÓPEZ, P.; BERMEJO, A.M.; TABERNERO, M.J.; FERNÁNDEZ, P.; ALVAREZ, I. Determination of cocaine and heroin with their respective metabolites in meconium by gas chromatography-mass spectrometry. **J. Appl Toxicol**, v. 27, n.5, Sep-Oct, p.464-71, 2007.

LOZANO, J.; GARCIA-ALGAR, O.; MARCHEI, E.; VALL, O.; MONLEON, T.; GIOVANNANDREA, R.; PICHINI, S. Prevalence of gestational exposure to cannabis in a Mediterranean city by meconium analysis. **Acta Paediatrica**, v. 96, p. 1734-1737, 2007.

MARIN, S.J.; KEITZ, L.; MERRELL, M.; McMILLINZ, A.G. Evaluation of a new ELISA kit for the detection of benzodiazepines in meconium. **J Anal Toxicol**, v. 33, April, 2009.

MARTINS-CELINI, F.P. Prevalência da exposição fetal à cocaína: métodos de detecção e características maternas. 2001. 123 f. Dissertação (Mestrado em Pediatria), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Ministério da Saúde lança Campanha nacional sobre crack. Disponível em <<http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias>>. Acesso em 10 novembro 2009.

MOORE, C.; LEWIS, D.; LEIKIN, J. False-positive and false-negative rates in meconium drug testing. **Clin Chem**, v. 41, n. 11, p. 1614-1616, 1995

MOORE, T.R.; SORG, J.; MILLER, L.; KEY, T.C.; RESNIK, R. Hemodynamic effects of intravenous cocaine on the pregnant ewe and fetus. **Am J Obst Gynecology**, v. 115, n. 4, p. 883-888, 1986.

MORIYA, F.; CHAN, K.M.; NOGUCHI, T.T.; WU, P.Y.K. Testing for drugs of abuse in meconium of newborn infants. **J Anal Toxicol**, v. 18, Jan/Feb, 1994.

O'BRIEN, C.P. Drogagem e uso abusivo de drogas. In: Goodman & Gilman. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11 ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2006. Cap. 23, p. 543-562.

OSTREA Jr, E.M. Testing for Exposure to Illicit Drugs and Other Agents in the Neonate: A Review of Laboratory Methods and the Role of Meconium Analysis. **Curr Probl Pediatr**, February, 1999.

OSTREA Jr, *et al.* Estimates of illicit drug use during pregnancy by maternal interview, hair analysis and meconium analysis. **J Pediatr**, v. 138, n. 3, p. 344-348, March, 2001.

OYLER, J.; DARWIN, W.D.; PRESTON, K.L.; SUESS, P.; CONE, E.J. Cocaine disposition in meconium from newborns of cocaine-abusing mothers and urine of adult drug users. **J Anal Toxicol**, v. 20, October, 1996.

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

PICHINI, S.; PUIG, C.; ZUCCARO, P.; MARCHEI, E.; PELLEGRINI, M.; MURILLO, J.; VALL, O.; PACIFICI, R.; GARCÍA-ALGAR, O. Assessment of exposure to opiates and cocaine during pregnancy in a Mediterranean city: Preliminary results of the "Meconium Project". **Forensic Sci Int**, v. 153, p. 59-65, 2005.

PICHINI, S.; PACIFICI, R.; PELLEGRINI, M.; MARCHEI, E.; PÉREZ-ALARCÓN, E.; PUIG, C.; VALL, O.; GARCÍA-ALGAR, O. Development and validation of a liquid chromatography–mass spectrometry assay for the determination of opiates and cocaine in meconium. **J Chromatogr B**, v. 794, p. 281-292, 2003.

ROEHSIG, M.; PAULA, D.M.L. de; MOURA, S.; DINIZ, E.M.A.; YONAMINE, M. Determination of eight fatty acid ethyl esters in meconium samples by headspace solidphase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. **J. Sep. Sci.** v. 33, p. 1-8, 2010.

SÃO PAULO (Estado). Diário Oficial do Estado. Cresce número de mulheres internadas na rede pública por uso de cocaína. Disponível em <http://www.imprensaoficial.com.br>. Acesso 02 maio 2010.

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

SIMONE, C.; BRYNE, B.M.; DEREWLANY, L.O.; OSKAMP, M.; KOREN, G. The transfer of cocaethylene across the human term placental cotyledon perfused in vitro. **Reprod Toxicol**, v. 11, n. 2/3, p. 215-219, 1997.

STRATHEARN, L.; MAYES, L.C. Cocaine addiction in mothers: potential effects on maternal care and infant development. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1187, p. 172-183, 2010.

SYME, M.R.; PAXTON, J.W.; KEELAN, J.A. Drug transfer and metabolism by the human placenta. **Clin Pharmacokinet**, v. 43, n. 8, p. 487-514, 2004.

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

U.N.O.D.C. United Nations Office on Drugs and Crime. World Drug Report 2009. Viena: United Nations Publication Sales, 2009, 314 p.

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

WILLS, S. **Drugs of abuse**. 3 ed. Cambridge: The Pharmaceutical Press, 2002. Cap. 5, p. 48-60.

WOODS, J.R.; PLESSINGER, M.A.; CLARK, K.E. Effect of cocaine on uterine blood flow and fetal oxygenation. **JAMA**, v. 257, p. 957-961, 1987.

Anexos

ANEXOS

Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética do HCFMRP – USP



Ribeirão Preto, 16 de setembro de 2009

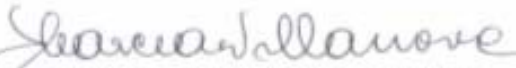
Ofício nº 3084/2009
CEP/MGV**Prezada Senhora,**

O trabalho intitulado **“DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE COCAÍNA E NICOTINA EM MECÔNIO POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 295ª Reunião Ordinária realizada em 14/09/2009, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 4299/2009.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente,


DR. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora
MARCELA NOGUEIRA RABELO ALVES
PROF. DR. BRUNO SPINOSA DE MARTINS (Orientador)
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP

Anexo 2 – Questionário da pesquisa

1. A senhora possui endereço fixo?

() SIM () NÃO

2. A senhora é casada ou possui uma união estável (2 anos ou mais juntos)?

() SIM () NÃO

3. A senhora possui quantos filhos?

() 1 () 2 ou mais

4. A senhora já experimentou cigarro alguma vez na sua vida?

() SIM () NÃO

5. Caso já tenha experimentado cigarro, quando foi a última vez que a senhora fumou?

() meses atrás () alguns dias atrás () ontem

6. Se a senhora fuma, quantos cigarros por dia a senhora tem costume de fumar?

() entre 1 e 10 () entre 11 e 20 () mais de 20

7. Se a senhora parou de fumar durante a gravidez, você se lembra de quando isso aconteceu?

() 1°, 2° ou 3° mês () 4°, 5° ou 6° mês () 7°, 8° ou 9° mês

8. Na sua casa, no seu trabalho ou em lugares que você frequenta muito, tem pessoas que fumam?

() SIM () NÃO

9. A senhora já experimentou cocaína alguma vez na sua vida?

() SIM () NÃO

10. Caso já tenha experimentado cocaína, quando foi a última vez que a senhora usou?

() meses atrás () alguns dias atrás () 1 ano atrás

11. Com que frequência a senhora usava cocaína?

() 1 vez por mês () quase toda semana () outro _____

12. A senhora usou cocaína de que maneira?

- cheirou fumou injetou
 outra forma _____

13. Se a senhora parou de usar cocaína durante a gravidez, você se lembra de quando isso aconteceu?

- 1°, 2° ou 3° mês 4°, 5° ou 6° mês 7°, 8° ou 9° mês

14. A senhora ingeriu bebida alcoólica durante a gravidez?

- SIM NÃO

15. Com que frequência a senhora bebia-----

- diariamente 1 x na semana outro _____

Data: _____

Número da Amostra: _____

Anexo 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TÍTULO DA PESQUISA: “Desenvolvimento e validação de método de análise de cocaína, crack e nicotina em amostras de mecônio de neonatos atendidos no HCFMRP-USP”.

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis, CRQ N° 04.100.360 - tels (16) 3602-4424, (16) 3602-3359, martinis@fmrp.usp.br

Marcela Nogueira Rabelo Alves, tels (16) 3602-4424, (16) 3602-3359, marcelausp76@usp.br

Luiza Saldanha Ribeiro Barros, tels (16) 3602-4424, (16) 3602-3359, saldanha@fcrp.usp.br

PROMOTORES DA PESQUISA

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP

Centro de Medicina Legal - CEMEL

Você e seu bebê estão sendo convidados para participar, como voluntários, em uma pesquisa. Após ser esclarecida sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte da pesquisa, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é dos pesquisadores responsáveis. Você é livre para não querer participar ou desistir da pesquisa a qualquer momento que desejar caso mude de idéia, você e seu bebê não serão prejudicados e o atendimento dado a vocês no hospital será o mesmo se vocês participarem ou não da pesquisa. Você tem direito a perguntar o que quiser durante a pesquisa. Você não pagará nada e também não receberá nenhum dinheiro ou benefício adicional.

MOTIVO DA PESQUISA

O objetivo dessa pesquisa é desenvolver um método de análise e detecção de substâncias devido ao uso de cocaína e cigarro em amostras das primeiras fezes do bebê recém nascido. Alguns bebês sofrem complicações após o parto e o motivo muitas vezes é desconhecido e pode estar relacionado com o uso dessas substâncias.

EXPLICAÇÕES SOBRE O USO DE COCAÍNA E CIGARRO DURANTE A GRAVIDEZ

O uso de substâncias como cocaína e cigarro durante a gravidez pode trazer problemas sérios tanto para a mãe quanto para o bebê que pode nascer com problemas físicos e/ou mentais, o bebê pode apresentar necessidade da substância logo após o parto e problemas respiratórios que podem aparecer durante o crescimento da criança.

PROCEDIMENTOS DA PESQUISA

Se você concordar em participar da pesquisa, será coletada uma amostra das fezes da fralda do seu bebê nos primeiros dias de vida e você será convidada a responder um questionário. Essas fezes serão examinadas para verificar a presença de tais substâncias (cocaína ou cigarro).

RISCOS E/OU DESCONFORTOS

A coleta das fezes do bebê não trará nenhum desconforto ou risco para você ou para seu bebê, já que serão retiradas diretamente da fralda sem nenhum contato com o bebê.

BENEFÍCIOS

Caso você esteja disposta a parar com o uso da cocaína, a assistente social do hospital pode encaminhá-la ao Centro de Apoio Psico Social Álcool e Drogas de Ribeirão Preto (CAPS-AD), se você for de Ribeirão Preto; se você for de outra cidade, será encaminhada a uma unidade de apoio social da sua cidade, para ajudá-la a abandonar o uso dessa substância. E se você pretende ter outros filhos já vai saber que suspendendo o uso dessas substâncias (cocaína e/ou cigarro) a gravidez será mais tranqüila e tanto a sua saúde quanto a do seu bebê serão preservadas.

CONFIDENCIALIDADE

Os seus dados e os dados do seu bebê são confidenciais. Seu bebê será identificado por um número. As informações obtidas na entrevista, o resultado da análise sobre a presença ou ausência das substâncias nas amostras de fezes do seu bebê serão mantidos em segredo. Você e seu bebê não serão identificados em nenhum trabalho que possa resultar dessa pesquisa.

PROBLEMAS OU PERGUNTAS

Se você tiver alguma pergunta ou qualquer dúvida sobre essa pesquisa, entre em contato com **Marcela Nogueira Rabelo Alves** ou **Luiza Saldanha Ribeiro Barros** ou **Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis** pelos telefones: (16) 3602-4424 ou (16) 3602-3359. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – HCFMRP, tel (16) 3602-2228.

ASSINATURAS

Se tiver lido o consentimento livre e esclarecido, tiver entendido a informação e concorda voluntariamente em permitir que seu (ua) filho (a) recém nascido (a) participe desse estudo, por favor, assine abaixo:

Nome do voluntário (mãe) Assinatura do voluntário (mãe) Data

Nome da testemunha Assinatura da testemunha Data

Eu expliquei o propósito desse estudo à voluntária. Estou certo de que ela entendeu o propósito, os procedimentos, riscos e benefícios desse estudo.

Nome do pesquisador: _____

Assinatura: _____ Data: _____