

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Pós-graduação em Farmácia  
Área de Análises Toxicológicas

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INTOXICAÇÃO  
AGUDA POR COCAÍNA: ASPECTO FORENSE

ALICE A. DA MATTA CHASIN

Dissertação para obtenção do grau de  
MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. ANTONIO FLÁVIO MÍDIO

São Paulo

1990

12215

**Este trabalho é dedicado ao Moshe, à Carol e ao Deco,**

**para quem - estou certa - são música as palavras:**

**" minha tese terminou!"**

**Ao Prof. Dr. Antonio Flávio Mídio, por haver me transmitido  
o interesse pela Toxicologia, pelo exemplo de profissiona-  
lismo na orientação deste trabalho e pela amizade,  
meu especial agradecimento.**

## AGRADECIMENTOS

À amiga Irene Videira de Lima pelas inúmeras contribuições e sobretudo por ter percebido minha vocação, antes que eu mesma pudesse fazê-lo.

Às amigas Gisele de França Oliveira, Shoshana Rapoport Furtado e Vera Lúcia Lanchote pelas valiosas discussões e sugestões apresentadas.

Aos amigos do Serviço Técnico de Toxicologia Forense do Instituto Médico Legal de São Paulo, pela colaboração prestada no presente trabalho.

Aos amigos da Disciplina de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela atenção e ajuda na execução deste trabalho.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria dos Prazeres Barbalho Simonetti, pelo incentivo e interesse.

À Moema Rodrigues dos Santos, pela ajuda na obtenção e na normalização das referências bibliográficas.

À Maria Aparecida Nogueira Moraes, pela competência demonstrada no trabalho de revisão.

Ao Márcio Ferrarini, à Auriluce Missiano e ao Leonardo van Halsema, pela eficiência nos trabalhos em computação.

À Sueli Ap. Moraes Resende pela colaboração técnica.

Às amigas Myriam Clara Salvadori e Marcia Maria de Almeida Camargo, pela contribuição na ilustração fotográfica.

## RESUMO

A cocaína é um potente estimulante do sistema nervoso central-SNC e por esse motivo é utilizada como fármaco de abuso. As propriedades de reforço que ela propicia geram o alto potencial de abuso e dependência com a possibilidade de ocorrência de intoxicação aguda e letal por *overdose*.

Problemas pertinentes à rápida e completa biotransformação e possibilidade de hidrólise espontânea e enzimática *in vitro*, fazem com que a medição precisa da cocaína em material biológico, importante no diagnóstico laboratorial da intoxicação, represente um problema analítico ao toxicologista forense

Com a finalidade de fornecer subsídios para a identificação inequívoca e quantificação dos níveis sangüíneos compatíveis com a intoxicação aguda, foram padronizados métodos para identificação de cocaína e benzoilecgonina em urina e cocaína em sangue com a utilização da cromatografia em camada delgada. A quantificação da cocaína em sangue foi padronizada utilizando-se cromatografia em fase gasosa, com uso de detector por ionização em chama e coluna capilar DB1.

A otimização apropriada do processo de extração e a eficiência da técnica de detecção, após condicionamento adequado das condições cromatográficas, propiciaram determinação de quantidades absolutamente compatíveis com a faixa normalmente relacionada com a intoxicação aguda.

A metodologia proposta foi conveniente para determinação de concentrações sangüíneas de cocaína acima de 0,5  $\mu\text{g/mL}$ , faixa onde geralmente situam-se os valores relativos à intoxicação por *overdose*.

Os resultados obtidos nas análises de amostras de urina e sangue, provenientes de necrópsias, onde os históricos de óbito referiram a ocorrência de intoxicação por *overdose*, validaram a metodologia padronizada.

Por fim, dados relativos à toxicocinética e toxicodinâmica da cocaína foram abordados no sentido de propiciar a interpretação dos resultados obtidos.

---

## CONTEÚDO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. GENERALIDADES</b> .....	3
2.1. Aspectos toxicológicos da cocaína .....	3
2.1.1. Ocorrência e propriedades das suas formas de uso .....	3
2.1.2. Toxicocinética .....	5
2.1.2.1. Vias de administração e concentrações plasmáticas de pico .....	5
2.1.2.2. Distribuição e eliminação .....	8
2.1.3. Toxicodinâmica .....	12
2.1.4. Sinais e sintomas da intoxicação aguda .....	15
2.1.4.1. Síndrome tóxica e letalidade .....	15
2.1.4.2. Correlação entre doses, níveis sanguíneos e letalidade .....	18
2.2. Aspectos analíticos .....	21
<b>3. OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO</b> .....	33
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	34
4.1. Material .....	34
4.1.1. Aparelhos e acessórios .....	34
4.1.2. Soluções-padrão .....	35

*BIBLIOTECA  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Universidade de São Paulo*

4.1.2.1. Soluções-estoque .....	35
4.1.2.2. Soluções de trabalho .....	36
4.1.3. Adsorvente, sistemas-solventes e agentes cromogênicos .....	37
4.1.4. Solventes e soluções reagentes .....	38
4.1.5. Amostras de urina .....	39
4.1.5.1. Brancos de referência .....	39
4.1.5.2. Amostras selecionadas para análise .....	39
4.1.6. Amostras de sangue .....	40
4.1.6.1. Brancos de referência .....	40
4.1.6.2. Amostras selecionadas para análise .....	40
4.2. Métodos.....	40
4.2.1. Identificação de cocaína e benzoilecgonina em urina e cocaína em sangue, por cromatografia em camada delgada .....	40
4.2.1.1. Padronização da técnica cromatográfica em camada delgada .....	40
4.2.1.2. Conduta analítica para identificação de cocaína e benzoilecgonina em urina .....	41
4.2.1.3. Conduta analítica para identificação de cocaína em sangue .....	43
4.2.2. Quantificação de cocaína em sangue por cromatografia gasosa .....	45
4.2.2.1. Procedimento da extração .....	45
4.2.2.2. Condições cromatográficas .....	47

4.2.2.3. Linearidade da técnica cromatográfica .....	47
4.2.2.4. Curva de calibração .....	47
4.2.2.5. Recuperação do método .....	48
4.2.2.6. Precisão do método .....	48
4.2.2.7. Limite de detecção e limite de quantificação .....	48
4.2.2.8. Presença de fármacos interferentes.....	49
4.2.3. Aplicação da metodologia proposta às amostras de sangue e urina selecionadas para o trabalho .....	50
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>51</b>
5.1. Identificação de cocaína e benzoilecgonina em urina e cocaína em sangue, por cromatografia em camada delgada .....	51
5.1.1. Padronização da técnica cromatográfica em camada delgada .....	51
5.1.2. Conduta analítica para identificação de cocaína e benzoilecgonina em urina .....	58
5.1.3. Conduta analítica para identificação de cocaína em sangue .....	58
5.2. Quantificação de cocaína em sangue por cromatografia em fase gasosa .....	63
5.2.1. Condições cromatográficas .....	63
5.2.2. Linearidade da técnica cromatográfica .....	65
5.2.3. Curva de calibração .....	65

---

5.2.4. Recuperação do método .....	65
5.2.5. Precisão do método .....	71
5.2.6. Limite de detecção e limite de quantificação .....	72
5.2.7. Fármacos interferentes .....	72
5.2.8. Fármacos interferentes após os processos de extração .....	73
5.3. Resultados obtidos com a aplicação dos métodos propostos às amostras seleccionadas para o trabalho.....	76
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>80</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>95</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>97</b>

---

## 1. INTRODUÇÃO

Os problemas relacionados ao abuso de cocaína emergiram durante a última década e são atribuídos ao aumento da produção ilícita, à expansão do tráfico e à popularidade crescente. Parte deste recrudescimento deve-se ao conceito infundado de segurança no uso recreacional do fármaco<sup>75, 90, 94, 99, 127</sup>, em uma sociedade com valores e padrões que admitem a crença de que a alteração do humor através de substâncias químicas é correta, aceitável e faz parte da vida<sup>127</sup>.

A intensidade dos efeitos prazerosos - euforia e estimulação geral - propiciados pela cocaína são de tal ordem que apresentam alto potencial para a dependência e a *overdose*, pois o período de euforia é seguido por alteração de humor, caracterizada por disforia intensa e depressão que levam ao uso repetido e compulsivo<sup>5, 40</sup>.

A farmacodependência em cocaína constitui complexo problema de Saúde Pública e necessita de intervenção médica, legal e social para estabelecer delineamento de estratégias de tratamento<sup>12</sup>.

Data de 1982 a primeira referência de óbito relacionado à intoxicação por *overdose* de cocaína na cidade de São Paulo<sup>90</sup>. Segundo registros do

Serviço Técnico de Toxicologia Forense-STTF do Instituto Médico Legal-IML sede, o número de casos vem crescendo no decorrer dos anos e atualmente acha-se por volta de trinta mensais.

O aumento do número de mortes atribuídas à intoxicação por *overdose* de cocaína resulta da maior incidência de uso, bem como de mudanças nas formas de administração, potencialmente perigosas<sup>68, 129, 130</sup>, podendo, portanto, funcionar como indicador indireto da prevalência e incidência do uso de cocaína<sup>90</sup> em determinada população.

Para se estabelecer a *causa mortis* com finalidade forense é necessário que haja interpretação cuidadosa dos resultados das análises toxicológicas, em conjunção com os achados de necropsia e os eventos do óbito<sup>38, 94</sup>.

A interpretação adequada pressupõe um estudo sobre a toxicocinética e toxicodinâmica da cocaína, que possibilite, através do conhecimento dos níveis encontrados em material biológico, a inferência sobre a realidade da morte. Dados pertinentes a esses estudos orientam também o estabelecimento de metodologia analítica que, obviamente, deverá possibilitar a determinação de faixa de concentração compatível com a intoxicação letal por cocaína. O diagnóstico laboratorial é, portanto, a integração desses conhecimentos.

Pelo exposto, evidencia-se a premência desses estudos no STTF-IML sede, devido a alta frequência de casos que referem intoxicação por *overdose* de cocaína. Assim, a perspectiva deste trabalho é possibilitar a padronização de metodologia analítica para identificação e quantificação de cocaína em material biológico, em casos de intoxicação aguda e permitir a discussão do significado dos níveis eventualmente encontrados.

## **2. GENERALIDADES**

### **2.1. Aspecto toxicológico da cocaína**

#### **2.1.1. Ocorrência e propriedades das suas formas de uso**

A cocaína (benzoilmetilecgonina) - COC, é um fármaco que pertence, juntamente com a atropina e a escopolamina, à família dos alcalóides naturais tipo tropano. Apresenta fórmula estrutural descrita na Fig. 1 e tem fórmula empírica  $C_{17}H_{21}NO_4$ .

---

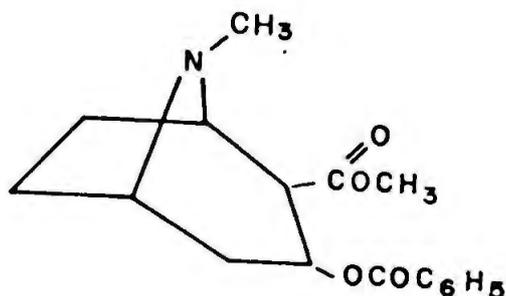


FIGURA 1 - Cocaína (benzoilmetilecgonina)

Ocorre naturalmente nas folhas de plantas provenientes de duas espécies do gênero *Erythroxylum*, vulgarmente denominado coca, originário da América do Sul, e integra um conjunto de pelo menos catorze alcalóides biossintetizados por essas folhas<sup>18, 40, 43</sup>.

A *Erythroxylum novogranatense*, variedade *trujillo*, é cultivada legalmente no Peru e sua produção é destinada à indústria farmacêutica, sendo que as folhas remanescentes, descocainizadas, são utilizadas como flavorizante de refrigerantes<sup>18, 40, 43</sup>. As folhas dessa variedade são também comercializadas sob a forma de "ervas", acondicionadas em embalagens individuais de cerca de 5,0 g e se destinam à feitura de chá, referido como estimulante. Cada porção dessas folhas contém aproximadamente 5,0 mg de COC, quantidade suficiente para produzir alteração do humor e aumento da frequência cardíaca<sup>43</sup>.

A *Erythroxylum coca* é composta por folhas pequenas de 5,0 cm de comprimento, que contêm entre 0,5 e 2,0% de COC<sup>40, 68</sup> e constitui a principal fonte do tráfico ilícito. As folhas são maceradas e o fluido e as folhas descartados, deixando uma pasta grossa marrom (pasta de coca), que contém cocaína em forma básica na proporção de 70 a 85%<sup>18</sup>. Esta constitui a forma de tráfico para laboratórios clandestinos.

A pasta é refinada, fornecendo pó branco, cristalino, geralmente na forma de cloridrato de cocaína<sup>40, 43</sup>, que é diluído com vários adulterantes, compondo-se assim a "droga de rua". Os adulterantes mais comuns são açúcares, talco, anestésicos locais e sais de baixo custo, como bicarbonato de sódio e sulfato de magnésio, sendo os teores de COC variáveis entre 15 a 90%<sup>40, 99</sup>.

A cocaína pode também ser obtida sinteticamente em laboratórios clandestinos e o seu reconhecimento químico ser feito pela presença do dextroenantiômero, uma vez que a planta biossintetiza apenas o isômero levorotatório, (-) cocaína<sup>40, 113</sup>.

O cloridrato de cocaína é um pó branco, cristalino, ou cristais higroscópicos transparentes, e constitui a formulação da cocaína legal e, geralmente, da ilícita. Apresenta ponto de fusão de aproximadamente 197°C com decomposição. É solúvel em água, e praticamente insolúvel em éter etílico e pouco solúvel em clorofórmio<sup>29</sup>. Esta forma é termolábil e se decompõe rapidamente quando fumada<sup>41, 54, 75</sup>.

A forma básica da COC, chamada de "base livre" ou cocaína alcaloidal, é substância cristalina, branca ou transparente, inodora, levemente volátil e com ponto de fusão entre 96 e 98°C. Não se decompõe às temperaturas requeridas para sua vaporização<sup>43, 75, 99</sup>. É solúvel em etanol, acetona, éter etílico e praticamente insolúvel em água<sup>29</sup>. Em virtude destas propriedades, a COC na forma básica, ao contrário da forma cloridrato, presta-se a ser inalada (fumada), hábito que surgiu nos últimos anos. Atualmente, é comercializada ilícitamente nesta forma de massa sólida, em pequenos pedaços cristalinos que recebem o nome de "craque" ("crack" ou "rock")<sup>17, 40, 43, 54, 66, 68, 75, 127, 137</sup>.

Há referências de que existem, disponíveis no mercado, dispositivos para extrações simples através de dissolução do cloridrato de cocaína, em solução alcalina como bicarbonato de sódio e separação com solvente volátil, geralmente éter, que após evaporação resulta no "craque"<sup>40, 66, 68, 127</sup>. Durante o processo de preparação dessa forma de uso, adulterantes como os anestésicos locais são extraíveis junto com a cocaína, porém os açúcares e as substâncias inorgânicas não o são<sup>40</sup>.

## **2.1.2. Toxicocinética**

### **2.1.2.1. Vias de administração e concentrações plasmáticas de pico**

As vias pelas quais pode ocorrer a auto-administração de cocaína podem ser divididas, por suas características de absorção, em intranasal, oral, intravenosa e respiratória, sendo a mais referida a intranasal e, mais recentemente, a via respiratória<sup>17, 68, 75</sup>.

A utilização da COC pela via intranasal (aspiração nasal), ou pela mucosa bucal, propicia a absorção através das membranas nasoorofaríngeas, com baixa velocidade de absorção devido às propriedades vasoconstritoras do fármaco<sup>40, 68</sup>.

A despeito disso, esta prática denominada popularmente de "cafungar", é a mais utilizada recreacionalmente. Consiste em se dispor os cristais de cloridrato de cocaína enfileirados em superfície lisa. Cada fileira de cristais tem aproximadamente 10 a 30 mg e são aspirados de tal forma que a absorção ocorre pela mucosa nasal. A média de uso, por farmacodependentes, é de 4 a 5 g por semana<sup>17, 40</sup>. A prática é geralmente feita em grupos, em média três vezes por reunião e em intervalos de 20 a 30 min, tempo que geralmente duram os efeitos relacionados à euforia<sup>17, 40</sup>.

A concentração plasmática de pico, após a aspiração intranasal, ocorre em tempos variáveis de 35 a 120 min. Estes dados foram obtidos em dois estudos que utilizaram doses comparáveis de COC (2 mg/kg) em voluntários<sup>17, 139</sup>. Há referências ainda sobre este tempo estar entre 15 e 60 min<sup>43, 73</sup> e haver variações dependendo da dose ou da forma utilizada (tempo menor para cristais em relação à solução)<sup>139</sup>.

Os motivos que explicam esta variação relacionam-se a diferentes graus de vasoconstrição induzidos pela COC, processos de biotransformação ocorrendo na própria mucosa nasal, diferenças interindividuais de velocidades de hidrólise plasmática ou diferenças na efetividade da técnica de auto-administração, levando à deglutição parcial da dose<sup>17</sup>. A cocaína pode ser encontrada na mucosa nasal até três horas após a aspiração<sup>139</sup>. Doses de aproximadamente 0,4 mg/kg de peso corpóreo (30 a 40 mg) são associadas à concentração plasmática de pico de 50 ng/mL, enquanto aquelas correspondentes a 1-2 mg/kg estão associadas a 100-200 ng/mL<sup>68</sup>.

A biodisponibilidade referida por JEFFCOAT e cols.<sup>73</sup> para a via intranasal foi em média de 80%, significativamente maior que os 60 e 25% encontrados por outros autores<sup>72, 139</sup>. BUSTO e cols.<sup>17</sup> referem que a biodisponibilidade parece ser dose-dependente.

↙ A via oral, a despeito da popularidade da cocaína como constituinte de vinhos e tônics no início do século, foi até bem recentemente questionada como efetiva em termos da estabilidade química do fármaco e de sua biodisponibilidade<sup>17, 68</sup>. Após uma fase de aproximadamente 30 min, onde não há detecção plasmática, a absorção gastrintestinal é rápida e a concentração plasmática de pico geralmente ocorre entre 45 e 90 min<sup>43, 68, 139</sup>. BUSTO e cols.<sup>17</sup> referem experimento onde, após administração oral de 2,0 mg/kg, a concentração máxima ocorreu entre 50 e 90 min e variou de 120 a 474 ng/mL.

O retardamento da absorção pela via oral, em relação ao que ocorre na mucosa nasoorofaríngea, é explicado pela ionização da cocaína no meio ácido do estômago e a demora em atingir o meio menos ácido do intestino delgado, local onde a forma não-ionizada prevalece, ocorrendo maior velocidade de absorção<sup>17</sup>.

Dados relativos a experimentos, onde a COC é ingerida em cápsulas podendo assim afastar a possibilidade de absorção pela mucosa bucal, mostram que a porcentagem de absorção do fármaco - calculada pela área sob a curva - AUC - é comparável àquela obtida na administração nasal, com efeitos fisiológicos equivalentes. Ambas

apresentam biodisponibilidade de 60%<sup>40, 66, 68, 139</sup>. A biodisponibilidade relativa similar entre as vias intranasal e oral mostra uma aparente "falta" do efeito de primeira passagem hepático, o que pode ser explicado pelo fato, conforme se verá mais adiante, de que a via hepática tem pequena contribuição na biotransformação<sup>139</sup>.

A administração da cocaína na forma de base livre, fumada, pode ser comparada em termos de velocidade de absorção e concentração plasmática de pico, à via intravenosa<sup>40, 41, 43, 54, 66, 68, 75, 99</sup>. A base livre ou "craque" é fumada em cachimbos ou em cigarros de maconha ou tabaco<sup>75, 137</sup>. A pasta de coca, na forma bruta, contém teores significativos de cocaína básica e, por isso, também se presta a este uso<sup>68</sup>.

A extensa área de superfície dos pulmões favorece a efetiva absorção<sup>41, 75</sup>. A ação é rápida e efeitos intensos, comparáveis aos que se seguem à administração intravenosa, ocorrem em 1 a 2 min<sup>75</sup>, com concentrações plasmáticas de pico de 300 a 900 ng/mL<sup>66</sup>. A meia-vida de absorção para a cocaína inalada é muito rápida - da ordem de 1,1 min<sup>73</sup>. As curvas, em termos de tempo para se atingir a concentração sanguínea máxima e eliminação, são indistinguíveis para essa via e aquelas referentes à via intravenosa, sendo a duração dos efeitos considerada curta para as duas vias, o que requer a utilização de novas quantidades para manter o estado de intoxicação.

O ato de fumar, por constituir via de administração "socialmente" aceita, posto que não necessita da parafernália associada a drogas ilícitas (agulhas, seringas, etc), propicia a busca imediata de doses adicionais do fármaco<sup>75</sup>. Estas propriedades farmacológicas tornam o ato de fumar "base livre" um componente particular do reforço, associado ao uso compulsivo e mais intenso, que contribui para acelerar o desenvolvimento de farmacodependência<sup>40, 41, 54, 127</sup>.

SNYDER e cols.<sup>117</sup> referem experimentos que simulam os cachimbos usados para fumar cocaína e concluem que, na realidade, o que se forma é um aerossol de COC, sendo apenas 6,5% vapores da substância. Os riscos decorrentes desta forma de uso incluem aparecimento de bronquite obstrutiva, hemorragias e edema pulmonar que podem levar a lesões de tecidos da superfície pulmonar, prejudicando a capacidade de trocas gasosas nos pulmões<sup>41, 68, 137</sup>.

### 2.1.2.2. Distribuição e eliminação

A despeito das variações encontradas nos vários trabalhos relativos ao assunto, pode-se concluir que a COC apresenta uma velocidade de distribuição rápida<sup>1, 25, 73, 139</sup> que dificulta até mesmo o estabelecimento de modelos fármaco e/ou toxicocinéticos para seu estudo.

CHOW e cols.<sup>25</sup> referem que se pode adotar o modelo bicompartimental para o estudo da cinética da cocaína e que os estudos que preconizam a utilização dos modelos monocompartimentais são devidos à rapidez com que a distribuição ocorre, após a administração da cocaína. WILKINSON e cols.<sup>139</sup> e JEFFCOAT e cols.<sup>73</sup>, por sua vez, referem que a rapidez na velocidade de distribuição é tal que se pode adotar o modelo monocompartimental para se tratar os dados de estudos relativos às vias intravenosa e pulmonar.

A meia-vida de distribuição após administração intravenosa é de 11 min e a meia-vida plasmática de eliminação é de aproximadamente 50 min para a via oral e 75 min para a via intranasal, quando da administração de doses equivalentes, o que reflete a absorção nasal contínua<sup>73, 139</sup>.

A ligação à proteína plasmática ocorre com a albumina e  $\alpha$ -1 glicoproteína ácida e apresenta porcentagem de ligação tão baixa que deve ter efeitos insignificantes na toxicocinética da cocaína<sup>50, 73</sup>. Os valores dos volumes de distribuição aparente (Vd) variaram, nos trabalhos consultados, entre 1,5 e 2,7 L/kg e indicam uma moderada ligação do fármaco aos tecidos<sup>17, 25, 40, 43, 61, 66, 68, 73, 79, 139</sup>. O "clearance" renal da cocaína (26,5 mL/min) é bem pequeno quando comparado ao "clearance" total (2096 mL/min) mostrando que a eliminação da cocaína é, predominantemente, controlada pela sua biotransformação<sup>4, 5, 17, 25, 61</sup>.

Como um alcalóide que apresenta dois grupos ésteres (metil-carboxil e benzoato) e um grupo N-metila (Fig. 1), a COC é suscetível à biotransformação muito extensa<sup>61</sup>.

A hidrólise das ligações ésteres ocorre espontânea e enzimaticamente. A via enzimática de hidrólise ocorre no grupo benzoato através da ação de enzimas plasmáticas e hepáticas e o produto resultante é o éster metilecgonina - EME, que constitui 32 a 49% da excreção urinária da cocaína<sup>40, 61, 62, 99, 122</sup>. A colinesterase plasmática, responsável pela hidrólise da COC, é a EC 3.1.1.8, também denominada pseudocolinesterase, cujo substrato principal é a benzoilcolina<sup>61, 70, 122, 123, 140</sup>. Esta enzima é inibida por várias substâncias, dentre elas a eserina e o fluoreto<sup>61, 140</sup>.

A biotransformação da cocaína em experimentos *in vitro*, nos quais se utilizam plasma humano, é rápida. Entretanto, isso não ocorre em plasma de indivíduos com

colinesterase atípica, os chamados "números baixos de dibucaína", e é de se esperar que nestes casos de idiosincrasia a meia-vida biológica seja anormalmente alta<sup>61, 70, 71, 122</sup>. Porém, se estes indivíduos apresentam ou não aumento de distribuição da COC ou se são mais suscetíveis à sua toxicidade, ainda não está estabelecido.

Além dos indivíduos idiosincráticos, sensíveis a succinilcolina, a atividade colinesterásica plasmática é muito menor em fetos, crianças, idosos, gestantes e pessoas com doenças hepáticas, ou que sofreram infarto do miocárdio, o que potencialmente pode aumentar o efeito do fármaco nesta população<sup>21, 75, 140</sup>.

STEWART e cols.<sup>122</sup> referem que as esterases hepáticas também hidrolisam a COC à EME e através de medição dos parâmetros cinéticos da hidrólise, verificaram que a esterase hepática tem menor afinidade pela COC, porém maior capacidade, ou seja em altas concentrações a COC é hidrolisada com velocidade menor no plasma do que no fígado.

Não há evidências de atuação enzimática no grupo metil éster da cocaína e o que ocorre nessa posição da molécula é a hidrólise espontânea da COC. Segundo STEWART e cols.<sup>122</sup>, após incubação do fármaco em solução fisiológica tamponada em pH 7,4, apresenta 42% de conversão à benzoilecgonina - BEC, o que de acordo com esses autores já seria suficiente para explicar a excreção urinária desse produto, que geralmente constitui 29 a 45% do total excretado<sup>40, 99, 122</sup>.

A BEC e EME compreendem 80 a 90% da dose total excretada na urina e a cocaína inalterada apenas 2 a 14%<sup>3, 32</sup>. INABA e cols.<sup>62</sup> referem que a excreção urinária verificada através da radioatividade, variou entre 65 a 75% após 28 horas da administração oral de cocaína marcada com <sup>14</sup>C.

A meia-vida de eliminação da COC ( $t_{1/2\beta}$ ) encontra-se entre 30 e 80 min<sup>3, 5, 17, 25, 61, 68, 73, 139</sup> para as vias de administração intravenosa, intranasal e respiratória e entre 40 e 110 min para via oral<sup>61, 139</sup>, enquanto para a BEC é referido estar entre 5 e 8 horas e para a EME, 3 e 6 horas<sup>3, 5, 32, 40, 68, 119</sup>. AMBRE<sup>3</sup> desenvolveu nomograma que permite, através das relações de concentrações urinárias de BEC, EME e COC, estabelecer uma estimativa entre o intervalo de tempo decorrido entre a exposição e a colheita da amostra.

Uma outra possível via de biotransformação em humanos é a N-desmetilação da COC à norcocaína - NOC, mediada pelo citocromo P-450, à semelhança da aminopirina, cuja presença inibe competitivamente o aparecimento da NOC a partir da COC<sup>61, 62, 121</sup>. A NOC é o único produto de biotransformação referido como farmacologicamente ativo *in vivo* e *in vitro*<sup>40, 68, 99, 107, 113</sup>.

A NOC é, à semelhança da COC, rapidamente biotransformada por hidrólise, o que possivelmente explica sua baixa concentração no plasma<sup>122</sup>. INABA e cols.<sup>62</sup> referem que em pacientes anestesiados com baixa atividade colinesterásica a relação

EME/NOC é menor que a verificada em indivíduos normais. Refere ainda que 2,4 a 6,2% da dose de COC excretada como  $^{14}\text{CO}_2$  no ar expirado representa a porcentagem de norcoína na biotransformação.

Embora a concentração de NOC seja baixa, sua hidroxilação pelo sistema P-450 como via de biotransformação pode ser importante, em termos toxicológicos, pois leva ao aparecimento de um composto denominado N-hidroxinorcoína, cuja oxidação resulta em compostos relacionados com sua hepatotoxicidade devido à possibilidade de se ligar covalentemente a proteínas, com conseqüente morte celular<sup>61, 68, 75</sup>. Esses produtos foram detectados em cérebros de animais de experimentação e podem levar a conjecturas sobre seu papel na neurotoxicidade apresentada pela COC<sup>13</sup>.

Há ainda a possibilidade de haver hidrólise enzimática da BEC e espontânea da EME e resultar no aparecimento da ecgonina, que pode contribuir com 1 a 8% da excreção urinária de COC<sup>3, 40, 50, 122, 123</sup>.

A Fig. 2 ilustra as vias de biotransformação no homem, adaptadas a partir de ELLENHORN & BARCELOUX<sup>40</sup>, GARRET & SEYDA<sup>50</sup> e INABA<sup>61</sup>.

A cinética de eliminação da COC é de primeira ordem para níveis plasmáticos relacionados à farmacodependência (doses entre 0,2 e 2,0 mg/kg para as vias intranasal e oral no homem<sup>139</sup>), e de ordem zero para níveis plasmáticos acima de 1,0  $\mu\text{g/mL}$ , o que sugere uma saturação do processo de biotransformação ou inibição do mesmo por algum metabólito<sup>5</sup>.

Os parâmetros toxicocinéticos podem diferir totalmente quando se trata de *overdose* devido às mudanças na velocidade e extensão da absorção, biodisponibilidade, saturação das principais vias de biotransformação e importância de outras vias não significativas em doses usuais. Dados específicos desses parâmetros com relação à *overdose* de COC não foram encontrados na literatura consultada, porém podemos inferir, pelo anteriormente exposto, que maior porcentagem de excreção urinária da COC inalterada com certeza será observada.

O caráter lipofílico da cocaína faz com que atravesse prontamente as barreiras biológicas. Os dados dos experimentos de CONE e WEDDINGTON<sup>32</sup>, dentre outros<sup>25, 40, 43</sup>, sugerem que a COC se acumula nos tecidos adiposos e no sistema nervoso central - SNC, resultando em concentrações até quatro vezes maiores que as plasmáticas, com sua posterior liberação desses sítios de armazenamento.

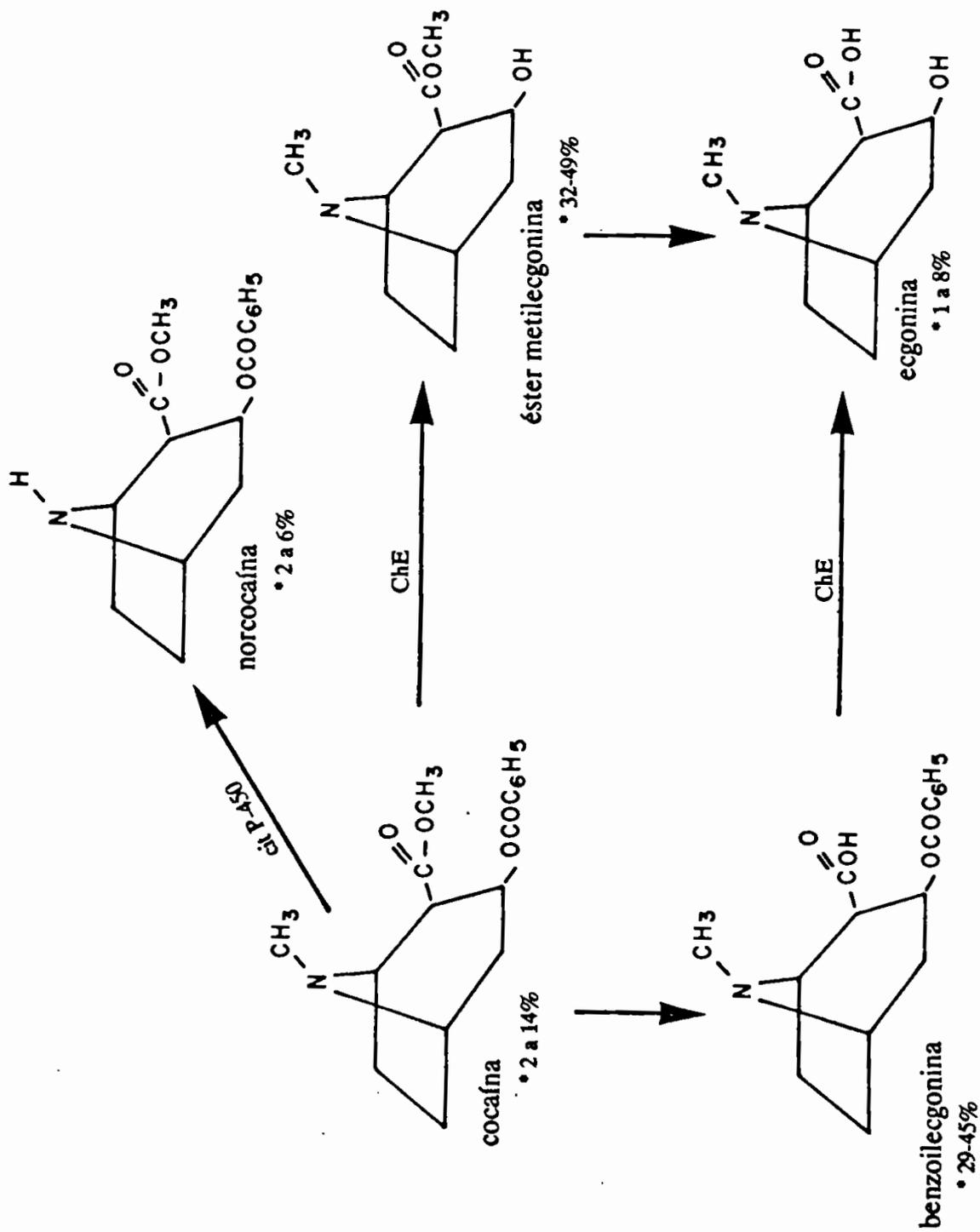


FIGURA 2 - Cocaína e seus produtos de biotransformação (benzoilecgonina-BEC, éster metilecgonina-EME, ecgonina-EC e norcocaina - NOC)<sup>40,50,61</sup>. ChE-colinesterase; cit P450 - citocromo P-450; \* porcentagem de eliminação urinária.

A COC atravessa prontamente a barreira hematencefálica - BHE, sendo que nos picos máximos de concentração, após intoxicação aguda, a relação entre concentração cérebro/sangue é de aproximadamente quatro. Os níveis sanguíneos caem mais rapidamente que os cerebrais e possibilitam relacionar concentrações de forma a se inferir sobre a natureza da intoxicação<sup>119</sup>. Em contraste com o precursor lipofílico, o produto de hidrólise BEC dada sua polaridade, tem sua passagem dificultada pela BHE e apresenta relação de concentração cérebro/sangue menor do que um. A combinação desses dois elementos possibilita a estimativa do intervalo de tempo que precedeu o óbito<sup>119</sup>.

Em análises toxicológicas realizadas com tecidos provenientes de necrópsias, em casos de *overdose* as concentrações mais elevadas de COC são encontradas na urina e nos rins, seguidas pelas concentrações no cérebro, sangue, fígado e bile<sup>40, 104</sup>.

Há também referências sobre transferência placentária, com detecção inclusive de produtos de biotransformação em urina, mecônio e cabelo de neonatos<sup>1, 22, 23, 56, 79, 83, 92, 97</sup>. A presença de cocaína na secreção láctea é discutível<sup>21, 23</sup> enquanto na estomacal, embora possível por ser a cocaína uma base fraca<sup>19, 36, 114</sup>, não foi referida nos trabalhos consultados.

A cocaína é eliminada na saliva, já que nela o valor de pH é ligeiramente menor do que no plasma, o que resulta numa concentração maior do fármaco ionizado neste material<sup>61, 130</sup>. Estudos mostram haver correlação dos níveis encontrados na saliva e no plasma, e a porcentagem de 3 a 47% maior na saliva aponta para a importância deste material como amostra biológica em estudos toxicocinéticos ou para o diagnóstico laboratorial da farmacodependência<sup>5, 30, 61, 130</sup>.

### 2.1.3. Toxicodinâmica

A cocaína é um anestésico local com propriedades simpatomiméticas. É um potente estimulante do SNC, ação pela qual é utilizada como fármaco de abuso.

O exato mecanismo fisiopatológico pelo qual ocorre esta ação estimulante central não é claro, porém, parece estar relativamente bem estabelecida a interferência com os sítios de atuação da dopamina, norepinefrina e serotonina<sup>43, 107, 127</sup>.

A poderosa capacidade de produzir reforço positivo (efeito desejado) é atribuída à sua ação nas vias dopaminérgicas dos neurônios mesocorticais e mesolímbicos. Segundo modelos experimentais com animais, essas vias parecem estar envolvidas com os mecanismos da euforia e do comportamento compulsivo de busca ao fármaco, responsável pela auto-administração<sup>24, 40, 43, 60, 125, 127</sup>.

Aceita-se que a euforia produzida pela COC se dê pelo acúmulo de dopamina nos receptores pós-sinápticos D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>, devido ao bloqueio de recaptura pré-sináptica desse neurotransmissor, observado na presença do fármaco<sup>4, 40, 41, 49, 52, 54, 60, 127</sup>. O mecanismo exato pelo qual ocorre esse bloqueio não está totalmente estabelecido<sup>49</sup>. Porém, há evidências de que a COC se liga a sítios nos transportadores de dopamina<sup>107, 108</sup>.

Para compensar essa intensificação da atividade da dopamina, o neurônio pré-sináptico diminui a liberação e a síntese do neurotransmissor<sup>49</sup>. Estudos *in-vitro* em receptores e tecidos *post-mortem* têm confirmado a hipótese de haver depleção da dopamina após o aumento que ocorre no início da exposição à COC, o que constitui a base bioquímica do ciclo euforia/disforia, ou seja, reforço/comportamento de busca, que caracteriza a farmacodependência<sup>106, 127</sup>. A cronicidade deste fenômeno leva à diminuição da dopamina cerebral<sup>127</sup> e pode resultar em anormalidade destas vias, levando a complicações psiquiátricas<sup>54</sup>.

Há referências de que a sintomatologia relacionada à síndrome de abstinência - exaustão, irritabilidade, hipersonolência e depressão - esteja relacionada à depleção aguda deste neurotransmissor<sup>52, 53, 127</sup>. Foi comprovado que durante a abstinência há uma diminuição dos níveis de dopamina no corpo estriado em relação aos do cerebelo, à semelhança do que ocorre na doença de Parkinson. Isto indica que o uso abusivo de COC prejudica a atividade funcional nesta parte do SNC, o que pode estar relacionado com a toxicidade que se expressa a nível comportamental<sup>12</sup>.

Da mesma forma, os mecanismos relacionados ao bloqueio da recaptura da norepinefrina e serotonina não estão bem estabelecidos. Sabe-se apenas que, à semelhança da dopamina, há interferência nos sítios transportadores<sup>107</sup> e, com o uso crônico, há diminuição na biossíntese da serotonina<sup>127</sup>. Este mecanismo pode potencializar a ação excitatória da dopamina.

A BEC e o EME não apresentam a capacidade de bloquear a recaptura de monoaminas nos neurônios pré-sinápticos, conforme atestam experimentos *in vitro* e em animais<sup>66, 107</sup>. A norcocaína (Fig. 2), no entanto, é biologicamente ativa. Apresenta potência anestésica superior à cocaína e capacidade de inibir a recaptura da norepinefrina em cérebros de ratos<sup>82</sup>. Segundo RITZ e cols.<sup>107</sup>, a norcocaína possui uma maior capacidade de bloquear a recaptura da norepinefrina.

A estereoquímica é muito importante para se determinar a potência da COC em nível de interferência nos transportadores monoaminérgicos: a (-) cocaína é 200 vezes mais potente que a (+) cocaína em relação à capacidade de bloqueio da recaptura da dopamina; 146 vezes em relação à norepinefrina e 478 vezes em relação à serotonina<sup>107</sup>.

A paralisia muscular causada pela COC é fato conhecido há mais de um século. É possível que essa paralisia deva-se à ação da COC nos receptores nicotínicos pós-

sinápticos e não à inibição (que também ocorre) da permeabilidade da membrana celular aos íons de sódio<sup>75, 106, 125</sup>.

Embora a ação anestésica local não seja responsável pela paralisia, sabe-se que essa ação ocorre e parece ser preponderante na presença de níveis sanguíneos altos<sup>75</sup>. À semelhança de outras substâncias usadas clinicamente como anestésicos locais, o bloqueio do potencial de ação das membranas excitáveis se dá por inibição da permeabilidade da membrana celular aos íons de sódio ( $\text{Na}^+$ ) durante a despolarização, impedindo assim a iniciação e condução do impulso nervoso<sup>18, 75, 106</sup>.

A condutância do potássio ( $\text{K}^+$ ) só se altera com concentrações de anestésico local maiores do que as necessárias para o bloqueio da condução. É possível que o anestésico local desloque o cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dos locais em que este se une aos fosfolipídios da membrana para abrir os canais de sódio. Assim, o bloqueio dos poros seria "mecânico", através da competição com o cálcio, o que evita o aparecimento do potencial de ação por diminuição da permeabilidade aos íons sódio( $\text{Na}^+$ )<sup>18</sup>.

A cocaína interage com substâncias bloqueadoras dos canais de cálcio. O antagonismo a estas substâncias, sugere que um provável mecanismo de ação da COC seja o de aumentar o fluxo de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) através das membranas celulares<sup>109</sup>. Esta constatação embasa a indicação destes fármacos, a exemplo da nifedipina, como antídotos na intoxicação aguda por cocaína<sup>131</sup>.

Há, também, estudos demonstrando que a COC inibe os receptores muscarínicos nos tecidos cardíaco e cerebral, o que poderia explicar o aparente antagonismo da atropina na auto-administração da COC. Esse antagonismo leva a crer que haja também envolvimento dos mecanismos colinérgicos centrais nas propriedades de reforço da COC. Vale aqui ressaltar que o (+) enantiômero é significativamente mais potente que o (-) enantiômero natural, e que esta estereosseletividade é oposta, como já vimos, àquela verificada pela COC no bloqueio da recaptura da dopamina. Entretanto, é possível que esta ação antimuscarínica possa ter algum papel na cardiotoxicidade demonstrada pela COC<sup>113</sup>.

## 2.1.4. Sinais e sintomas da intoxicação aguda

### 2.1.4.1. Síndrome tóxica e letalidade

Os fármacos e as drogas de abuso provenientes do comércio ilícito, inclusive a COC, podem, por vezes, apresentar sintomatologia diferente daquela estabelecida em experimentos controlados. Explica este fato a presença dos adulterantes que eventualmente ocorram nas drogas de rua, detectáveis ou não em procedimentos analíticos de triagem, mas que, com certeza, contribuirão na toxicidade<sup>106</sup>. Além desse fato de difícil predição, há a dificuldade, mesmo em situações controladas, de se mimetizar em animais, as vias de administração potencialmente de maior risco, como a intranasal ou a inalatória (ato de fumar).

Assim, a sintomatologia aguda pode ser diversa e até de difícil caracterização, e cada exposição pode se constituir num evento isolado<sup>43</sup>. Normalmente, porém, as complicações que advêm do uso da COC ocorrem dentro de um espectro de efeitos de uma intoxicação aguda, embora também possam ocorrer como efeitos isolados em determinados órgãos ou sistemas.

A potente atividade simpatomimética da COC produz resposta fisiológica estimulatória. Durante a fase inicial, acompanhando os efeitos eufóricos esperados, há progressivas mudanças no SNC, sistemas cardiovascular e respiratório.

Modificações no estado mental podem ser um sinal precoce da intoxicação e consistem em sensação de confusão e paranóia intensa que pode ser acompanhada de pânico, ansiedade, alucinações e comportamento suicida ou homicida<sup>43, 54, 68, 94, 118</sup>.

Pode ocorrer hipertermia grave, que excede 40°C, como resultado da estimulação do centro hipotalâmico regulador da temperatura e hiperatividade motora em combinação com a vasoconstrição periférica que diminui a dissipação do calor<sup>40, 43, 68, 127</sup>. Essa hipertermia pode levar a convulsões secundárias<sup>75</sup>.

Outro sinal neurológico é a midríase com hiper-reflexia, decorrente do efeito central e local ( $\alpha$ - adrenérgico) nos músculos radiais da íris<sup>40, 43, 106</sup>. Podem ainda ocorrer náuseas e vômitos por estimulação dos centros do vômito no bulbo e diarreias e cólicas devido à ação simpatomimética na parede intestinal<sup>40, 99</sup>.

Doses excessivas, inclusive aquelas relacionadas com fatalidades, são freqüentemente associadas a convulsões tônico-clônicas, referidas como precedentes da parada respiratória<sup>40, 68, 99</sup>. TARR & MACKLIN<sup>127</sup> ressaltam que o que ocorre não é verdadeiramente uma convulsão do tipo "grande mal", mas sim um tremor corpóreo, que é

reportado incorretamente pois, geralmente, a testemunha não é um profissional capacitado para a diferenciação.

Outros autores, entretanto, referem que realmente ocorrem mudanças nos sistemas neuroquímicos, que culminam em convulsões tônico-clônicas e que são decorrentes da administração repetida da cocaína. O aumento da probabilidade de gerar convulsões, apresentado pela COC, foi comparado ao fenômeno denominado "kindling", que consiste no desenvolvimento de predisposição a convulsões epileptiformes devido à repetida estimulação elétrica focal no sistema límbico. Assim, estímulos elétricos que, inicialmente, não têm efeito aparente, podem, após a chamada "sensibilização", ser suficientes para desencadear a convulsão, até semanas após o último evento<sup>75</sup>.

Esse fenômeno parece ocorrer também com outros fármacos e dá-se o nome de "kindling" farmacológico. Devido à administração repetida, há diminuição do limiar convulsígeno levando ao aparecimento de convulsões mesmo em doses não compatíveis com a intoxicação aguda<sup>12, 75, 105, 106, 127</sup>. Entretanto, esse efeito é considerado como sendo decorrente da intoxicação a longo prazo, e há comprovação experimental em animais, onde as convulsões são desencadeadas com doses sub-convulsivantes, sem que haja alteração dos níveis sanguíneos ou cerebrais da cocaína<sup>40</sup>. Este fenômeno pode explicar a tolerância reversa relacionada a esse fármaco<sup>105</sup>.

A COC inicialmente estimula os centros bulbares da respiração, resultando num aumento da velocidade e profundidade da respiração, que caracteriza a hiperpnéia<sup>40, 43, 68, 99, 106</sup>. Na estimulação avançada ocorre cianose, dispnéia, falência respiratória e apnéia, decorrentes da depressão dos centros bulbares<sup>99, 106</sup>.

Durante muito tempo se creditou o óbito à depressão respiratória, porém sabe-se atualmente que os efeitos letais da cocaína são devidos principalmente às suas ações no sistema cardiovascular e ocorrem independentemente da via de administração pela qual se dê a exposição.

A cardiotoxicidade apresentada pela cocaína pode resultar em infarto agudo do miocárdio, arritmias e cardiomiopatias<sup>40, 43, 75, 76, 78, 93, 100</sup>.

O efeito inicial a nível cardíaco é uma bradicardia que rapidamente evolui para taquicardia. Essa taquicardia é resultante tanto de efeitos periféricos, por aumento da estimulação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos no miocárdio, como por estimulação central hipotalâmica. O estímulo se dá por excesso de epinefrina no hipotálamo posterior e explica por que baixas doses de COC que produzem taquicardia não produzem aumento da pressão arterial<sup>76, 99, 106</sup>. AMBRE e cols.<sup>4</sup> referem que, à semelhança do que ocorre com os efeitos subjetivos, há tolerância aos efeitos cardiovasculares.

O coração pode responder à intensa estimulação ventricular ectópica com taquicardia, fibrilação ventricular e parada cardíaca<sup>40, 99, 126, 127</sup>. Podem ocorrer convulsões secundárias aos eventos cardíacos, como a taquicardia ventricular<sup>75</sup>.

Há referências de casos de morte súbita associados a infartos do miocárdio devido a arritmias ventriculares. Referem os autores que essas arritmias não devem ser primárias, mas sim resultar de modificações metabólicas substanciais que ocorrem nas convulsões generalizadas ou de síndromes isquêmicas agudas<sup>75</sup>.

A possível relação de causa e efeito entre a isquemia do miocárdio e a cocaína não é estabelecida, devido à dificuldade de se relacionar temporalmente o uso e os sintomas que ocorrem. Segundo relatos, esses sintomas aparecem de 30 minutos até 11 horas após o uso, enquanto a meia-vida biológica da COC acha-se entre 30 e 90 min<sup>75</sup>.

Pode ocorrer uma intensa hipertensão no sistema vascular ocasionada pela estimulação adrenérgica<sup>75, 80, 106</sup>. Essa hipertensão pode levar a um infarto ou uma hemorragia cerebral.

Há referências de aumento na incidência de acidente vascular cerebral associado à COC, principalmente em adulto jovem, e cujo desenvolvimento parece estar associado a anormalidades cerebro-vasculares, incluindo aneurismas<sup>43, 80, 93, 127</sup>. Um estudo sobre treze casos de isquemias e hemorragias cerebrais associadas à COC, mostra que, além da atividade simpatomimética, contribui para a elevação da pressão arterial o aumento dos níveis de serotonina, sabidamente um potente vasoconstritor para artérias de médio e grosso calibre<sup>75</sup>. Há também referência de infarto cerebral, relacionado à COC, em neonato nascido a termo de mãe que fez uso do fármaco 72 horas antes do parto<sup>23</sup>.

Evidências sugerem que em baixas concentrações predominam as ações simpatomiméticas com estimulação adrenérgica que, juntamente com a dopaminérgica e serotoninérgica nas sinapses do SNC, resultam em aumento do tônus simpático periférico com conseqüente taquicardia e vasoconstrição. Em altas concentrações, parece haver predominância das propriedades de anestésico local e o que se observa é a vasodilatação, decréscimo da pressão arterial, diminuição da excitabilidade elétrica, velocidade de condução e força de contração do miocárdio<sup>75, 99</sup>.

---

#### 2.1.4.2. Correlação entre doses , níveis sanguíneos e letalidade

A intoxicação letal por cocaína tem sido referida como acidental e como decorrente tanto do uso recreacional, resultante de todas as formas e vias de administração, quanto da chamada síndrome "body-packer". Esta síndrome ocorre quando indivíduos que ingerem pacotes de cocaína, feitos com diferentes tipos de plásticos com a finalidade de tráfico, são acometidos de intoxicação aguda e frequentemente letal, devido à ruptura dos pacotes no trato gastrointestinal<sup>40, 43</sup>.

Como já vimos, a sintomatologia terminal da intoxicação letal por COC geralmente envolve hipertermia, arritmia ventricular, midríase, convulsões e parada respiratória<sup>40, 68, 136, 138</sup>. Pode ocorrer também um estado psiquiátrico caracterizado por delírio<sup>136</sup>, com comportamento homicida ou suicida. SPERRY e SWEENEY<sup>118</sup> referem que o uso crônico pode precipitar episódios psicóticos com idéias suicidas, porém, não há referências da ocorrência de suicídio em que a COC tenha sido escolhida como agente de letalidade pelo farmacodependente que, ao invés disso, recorre a outras substâncias ou meios, como disparo com arma de fogo ou precipitação de alturas<sup>118</sup>.

A sintomatologia terminal acontece rapidamente, geralmente entre os 30 primeiros minutos após o uso<sup>40, 68, 93, 94</sup>, embora a administração oral ou nasal possa retardar a convulsão terminal por até uma hora pós exposição<sup>40, 93</sup>. SMART e ANGLIN<sup>116</sup> referem que "a morte relacionada com a cocaína é súbita... e pacientes sobrevivem se chegam com vida ao hospital".

Exceto pelas marcas deixadas por agulhas e lesões do lábio inferior resultantes da convulsão terminal, a autópsia mostra sinais inespecíficos de óbito por asfixia, isto é, edema pulmonar, congestão visceral e petéquias<sup>40, 94</sup>. São referidas evidências de infarto miocárdico e acidente vascular cerebral elucidados em exames *post-mortem*<sup>78, 80, 93, 100, 126</sup>. Esses achados, às vezes, são conclusivos na determinação da *causa mortis* por COC, mesmo quando os níveis sanguíneos encontrados estão abaixo daqueles normalmente relacionados com *overdose*<sup>33, 126</sup>. Muitas mortes que ocorrem por cocaína não são reportadas, provavelmente, porque se apresentam como quadro clínico de parada cardíaca, sem que haja suspeição de envolvimento de drogas<sup>127</sup>.

Nos casos de fatalidade por ruptura de pacotes de cocaína no lúmen gastrointestinal são observados locais de engurgitamento vascular, sugerindo necrose isquêmica aguda, devido às altas concentrações do fármaco liberadas<sup>40, 88, 94, 142</sup>.

Vários autores têm enfatizado a variabilidade dos níveis sanguíneos encontrados nos casos fatais (Tabela I). Entretanto, são esparsas as referências que relacionam esses níveis sanguíneos com as respectivas doses de exposição, que são de difícil determinação<sup>116</sup>.

TABELA I - Níveis sanguíneos encontrados em vítimas de intoxicação por *overdose* de cocaína.

Autor (ano da publicação)	nível sanguíneo ( $\mu\text{g/mL}$ )	média ( $\mu\text{g/mL}$ )	observação
LUNDBERG <sup>85</sup> (1977)	0,1 a 21		
CHINN <sup>24</sup> (1980)	0,01 a 7,62		
NAKAMURA <sup>96</sup> (1981)	0,1 a 8,0		
GRIESEMER <sup>57</sup> (1983)	0,2 a 5,5		
MITLEMAN <sup>94</sup> (1984)	0,1 a 20,9	6,2	COC como fármaco único
	0,2 a 17,8	2,6	vários fármacos
POKLIS <sup>104</sup> (1985)	0,8 a 8,2		
SANDER <sup>111</sup> (1985)	0 a 3,9		
SPIEHLER <sup>119</sup> (1985)	0,04 a 31,0	4,6	
MITTLEMAN <sup>93</sup> (1987)	0,05 a 1,45		morte súbita
SIMS <sup>115</sup> (1987)	7,6		letal
	0,1		recuperação
SWANSON <sup>125</sup> (1987)	1 a 30	4,0 a 7,0	
ELLENHORN <sup>40</sup> (1988)	0,1 a 21	2,0 a 6,0	intoxicação aguda e óbito
TEBBET <sup>129</sup> (1988)	0 a 19,4		

COC - cocaína

A dificuldade de se estabelecer as doses tóxicas, e mesmo letais, deriva das variações relacionadas com a exposição e as características individuais da velocidade de biotransformação e de excreção e com a possibilidade de pequenas variações de dose serem suficientes para levar a aumentos desproporcionalmente altos nos níveis sanguíneos.

Isso se deve a características cinéticas que, como já vimos, passa de eliminação de primeira ordem para ordem zero com conseqüente aumento do risco de ocorrência do efeito tóxico<sup>5</sup>. Outro fator, como já vimos, é o grau de pureza da droga de rua e a natureza da ação dos eventuais adulterantes<sup>116</sup>.

À parte as limitações dos experimentos com animais, a DL 100 para ratos, por diversas vias, está entre 75 e 100 mg/kg e para cães, por via intravenosa, encontra-se abaixo de 20 mg/kg<sup>116</sup>. Estudos com primatas não humanos mostram que as concentrações sanguíneas neste mamífero são muito menores que as encontradas no homem, quando há simulação da dose usada por um indivíduo de 70 kg (15 mg/kg ou 1 g leva à concentração sanguínea, no macaco, de 0,7 a 1,0 µg/mL)<sup>116</sup>. Supõe-se então que a quantidade que caracteriza uma *overdose* seria em torno de 0,5 g, ou seja, por volta de duas vezes o que os usuários geralmente utilizam<sup>116</sup> e estudos indicam que a morte ocorre após o uso de 0,8 a 1,2 g<sup>40, 116, 127</sup>.

Os níveis sanguíneos determinados em amostras *post-mortem*, não podem ser interpretados como aqueles que levaram ao óbito, pois há remoção espontânea ou enzimática da COC, pré e pós morte. Servem, entretanto, como indicadores, pois não há referências de níveis acima de 1,0 µg/mL relacionados com efeitos de euforia, ou seja concentrações desta ordem constituem alto indício de que houve intoxicação por *overdose*. De fato, geralmente concentrações referidas como letais estão entre 1 e 25 µg/mL, embora valores tão altos, quanto 211 µg/mL<sup>6</sup> tenham sido reportados, geralmente nas síndromes "body packer"<sup>116, 142</sup>, ou tão baixos quanto 26 e 94 ng/mL relacionados à intoxicação aguda em criança, onde os achados anátomo-patológicos evidenciaram a COC como agente do óbito<sup>33, 94</sup>, ou ainda valores de 30 µg/mL, não associados à *causa mortis* em usuários com tolerância desenvolvida<sup>59</sup>.

Algumas possibilidades de interações que possam potencializar o efeito da COC devem ser consideradas. MITTLEMAN e WETLI<sup>94</sup> referem que a média letal encontrada em análises, que evidenciaram a presença de COC como fármaco único, foi de 6,2 µg/mL contra 2,6 µg/mL naquelas onde outras substâncias foram detectadas concomitantemente.

Os farmacodependentes em COC frequentemente são fumadores habituais de maconha. O fato da COC, assim como o tetrahydrocannabinol, apresentar efeitos cardiovasculares indica haver uma possibilidade de potencialização entre os dois agentes, como de fato observaram FOLTIN e cols.<sup>47</sup>, em experimento onde foi demonstrado haver aumento adicional na frequência cardíaca e pressão sanguínea em relação aos efeitos observados com cada um dos agentes em separado.

A interação entre a cocaína, o halotano e a quetamina é relatada em caso considerado "acidente anestésico", que refere a morte de um indivíduo devido à utilização desta mistura em cirurgia de urgência, sem que tenha havido verificação prévia da presença de COC. A quetamina potencializa a ação da COC devido à similaridade da natureza do efeito, pois também age por bloqueio de neurotransmissores nas terminações adrenérgicas, enquanto os anestésicos voláteis, como o halotano, podem desencadear ou agravar arritmias cardíacas e hipertensão arterial<sup>35</sup>.

A potencialização com outros anestésicos locais também pode ocorrer. Pode advir dessa interação colapso cardiovascular com assistolia e óbito<sup>35</sup>. A interação com álcool etílico, também freqüente, pode resultar em efeitos cardiovasculares (frequência cardíaca e pressão sanguínea) mais acentuados que os observados com cada condição em separado, o que sugere que, em indivíduos suscetíveis, essa interação pode contribuir para a toxicidade, referida como esporádica, mas que ocorre e se relaciona com a utilização de dose única de COC<sup>75</sup>.

## 2.2. - Aspectos analíticos

A metodologia analítica para identificação e quantificação de cocaína e seus produtos de biotransformação vem sofrendo um rápido avanço desde a década de 70, no sentido de suprir as necessidades relacionadas às investigações científicas, pertinentes ao conhecimento da toxicologia do fármaco.

A possibilidade de se medir concentrações de COC em fluidos corpóreos é condição essencial para investigação sobre os efeitos farmacológicos e toxicológicos que lhe são atribuídos<sup>66</sup>. Além disso, a determinação dos níveis plasmáticos de cocaína é necessária para o estabelecimento do diagnóstico laboratorial de intoxicações com várias finalidades.

A detecção e quantificação da cocaína em material biológico apresenta certas dificuldades em razão de seu curto tempo de meia vida e seu rápido e complexo processo de biotransformação<sup>134</sup>. Entretanto, quando se trata de intoxicação por *overdose*, esses parâmetros obviamente estão alterados e portanto quantidades significativas do fármaco são eventualmente encontradas.

Os métodos utilizados na análise de COC e seus produtos, de biotransformação em materiais biológicos são constituídos por várias técnicas de extração e quantificação, que apresentam diferentes rendimentos e sensibilidades. Assim, a seleção de uma metodologia e substratos a serem analisados, devem ser orientados pela finalidade da análise, que constitui o fator determinante da precisão, exatidão, sensibilidade e especificidade necessárias.

Investigações com finalidade forense relacionadas com o abuso de drogas exigem métodos altamente sensíveis. Já para o diagnóstico da intoxicação letal, ou sub-letal, os métodos deverão priorizar a especificidade, uma vez que as concentrações esperadas nas várias amostras biológicas deverão ser relativamente altas, quando comparadas às primeiras.

Em casos de intoxicações, a possibilidade de se estabelecer correlação entre os níveis sanguíneos do fármaco e o estado do paciente faz do sangue a amostra mais adequada para a caracterização laboratorial da intoxicação. Sua utilização ocorre, sempre que possível, na quantificação em casos de óbito por *overdose*<sup>24, 57, 85, 119, 129</sup>, sendo nesse caso colhido da cavidade cardíaca, ou vaso de grosso calibre. Além disso, é através desta matriz biológica que se tenta estimar a DL50 para humanos<sup>116</sup>.

Para a triagem da presença da cocaína no organismo em casos de intoxicação por *overdose*, a urina é muito importante, pois há neste material uma concentração relativamente alta do fármaco inalterado, bem como de seus produtos de biotransformação, principalmente a BEC e a EME<sup>6</sup>.

O conteúdo estomacal também pode constituir amostra de análise *post-mortem*, uma vez que prevalece no estômago o fármaco na sua forma inalterada, por vezes ali presente pela possível secreção gástrica da COC<sup>114</sup>, que facilita substancialmente a análise. Visceras como fígado, rins e cérebro, também são utilizados nos casos de necrópsia<sup>57, 104, 119</sup> e constituem amostras úteis nos estudos sobre distribuição.

Análises de cocaína em cabelo, segundo BAUMGARTNER e cols.<sup>10</sup> e GRAHAM e cols.<sup>56</sup>, são preferíveis às análises de urina na verificação da farmacodependência, pois apresenta a possibilidade de detecção em usuários que tenham análise urinária negativa por um longo período de tempo, podendo alcançar meses ou anos, e pode prover informações relativas à severidade ou a padrões individuais de uso<sup>10, 11, 56</sup>. Essas informações mostram a utilidade, em potencial, que este tipo de amostra apresenta na investigação toxicológica forense, principalmente nos casos provenientes de exumações, onde os fâneros constituem materiais de eleição, sempre que a distribuição no xenobiótico a ser pesquisado, assim o permitir.

Com relação à saliva, que tem sido objeto de inúmeras pesquisas em toxicologia nos últimos anos, devido à sua fácil obtenção e caráter não-invasivo na coleta, ocorrem alguns trabalhos relativos à análise de COC e seus produtos de biotransformação. A finalidade da análise, porém, objetivou dados pertinentes à conservação de amostras ou tentativas de correlação com níveis plasmáticos, para posterior utilização em programas de verificação de uso<sup>30, 31, 32, 130</sup>.

Qualquer que seja a amostra, o acondicionamento e o armazenamento da mesma são fatores importantes a serem considerados na análise de cocaína, pois é bem conhecido o fato de ocorrer hidrólise química espontânea e enzimática *in vivo* e *in vitro*.

Em meio básico e condições adequadas de temperatura, a COC se hidrolisa à benzoilecgonina<sup>16, 30, 57, 122, 123</sup>. O efeito do valor de pH na conversão foi estudado por FLETCHER e HANCOCK<sup>45</sup>, que concluíram haver a hidrólise da COC, mesmo em meios levemente básicos. STEWART e cols.<sup>122</sup>, igualmente, referem que, mesmo em valor de pH de 7,4, há conversão de COC à BEC.

Amostras de sangue armazenadas geralmente se tornam alcalinas, o mesmo ocorrendo com amostras de urina, cujo pH pode alcançar valores entre 8 - 9<sup>18</sup>. A diminuição da velocidade da hidrólise espontânea pode ser obtida por refrigeração ou congelamento das amostras<sup>9</sup>, ou pela manutenção do pH em valores entre neutro e ácido<sup>9, 40, 45, 50, 84</sup>.

A hidrólise enzimática da COC no sangue ocorre, como já vimos, através da pseudocolinesterase, levando à formação do EME que, por sua vez, ao sofrer hidrólise espontânea, leva ao aparecimento da ecgonina. Há evidências de que este fenômeno ocorra *in vitro* e, para inibi-lo, preconiza-se a adição de anticolinesterasicos como fisostigmina, prostigmina e fon fluoreto.

O fluoreto de sódio, além de funcionar como anticoagulante e ser utilizado como conservante para evitar a produção *in vitro* de álcool etílico em amostras de sangue estocadas<sup>26</sup>, foi indicado por vários autores como inibidor enzimático em amostras de plasma ou sangue total, para evitar a perda da COC por esta via<sup>9, 24, 40, 57, 64, 66, 67, 71, 72, 104, 119, 120, 129</sup>. BASELT e cols.<sup>9</sup> observaram que a adição de fluoreto de sódio a amostras de urina com pH 8, influenciou negativamente na estabilidade da COC, devido, muito provavelmente, ser esta uma condição propícia à hidrólise espontânea da referida substância<sup>9, 45, 84</sup>.

Pelo exposto, em relação à cinética da COC, pode-se inferir que o método ideal de análise é aquele capaz de quantificar não só o precursor como também seus produtos de biotransformação, para que se possa estimar a concentração inicial do fármaco.

Com efeito, são considerados os melhores métodos de quantificação aqueles que detectam concomitantemente a COC e BEC, uma vez que a concentração total das duas substâncias permanece inalterada<sup>84</sup>, desde que a via enzimática esteja devidamente inibida.

Além da COC e da BEC, o éster metilecgonina-EME, produzido pela ação de esterases plasmáticas e hepáticas na cocaína, pode ser efetivamente analisado, pois assim como os dois primeiros, ocorre em quantidades mensuráveis nos fluidos biológicos<sup>3, 27, 68, 71</sup>. Mais recentemente, tem sido apontado como o produto de biotransformação de eleição a ser analisado na urina pelo fato de ser o principal em termos de porcentagem excretada (32 a 49%) e por apresentar propriedades físico-químicas que facilitam sua identificação<sup>31</sup>, além de, juntamente com a BEC e a COC, possibilitar relações que propiciam a obtenção de dados relativos ao intervalo decorrente da introdução do fármaco no organismo<sup>3</sup>. A norcocaína também é referida em análises de sangue e vísceras humanas em metodologia desenvolvida por CHINN e cols.<sup>24</sup>.

A COC por ser uma base fraca de pKa igual a 8,6 é mais bem extraída de fluidos biológicos por solventes orgânicos em meio básico. Todavia, em virtude da possibilidade de hidrólise, nesse meio, há uma certa dificuldade em sua análise quantitativa, pois inevitavelmente ocorrem perdas do composto<sup>64</sup>. Por exemplo, FLETCHER e HANCOCK<sup>45</sup> referem que em pH 8,0 a COC se hidrolisa na extensão de 17% em uma hora à temperatura ambiente e em pH 9,4 a perda é de 41%. O efeito de valores de pH básicos na conversão de COC e BEC aponta para a possibilidade de aparecimento de BEC como artefato, problema decorrente de meios básicos e processos de extração demorados<sup>45</sup>.

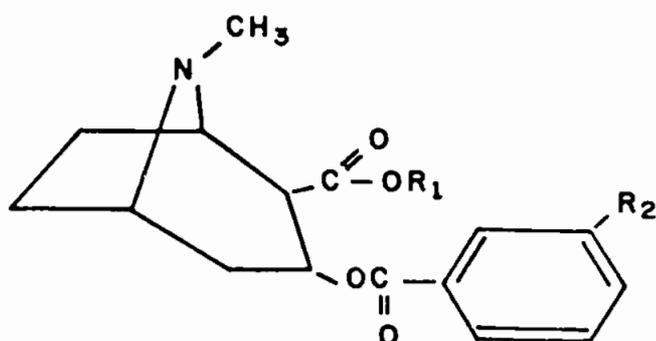
Em extrações que se destinam a ensaios cromatográficos para quantificação, erros devidos à perda da substância a ser analisada podem ser minimizados pelo uso de padrão interno com propriedades físico-químicas similares ao agente ensaiado.

Assim, para funcionar como padrão interno da cocaína, a substância precisa manter o grupo funcional crítico, onde ocorre a hidrólise para que durante as passagens alcalinas da extração, a hidrólise do análogo estrutural ocorra em velocidade similar àquela da cocaína. O sítio de labilidade na molécula de COC é o grupo metil ester que é hidrolisado aos derivados carboxílicos ácidos: benzoilecgonina e ecgonina.

Este fato embasa a síntese do padrão interno como, por exemplo, o éster metil *m*-toluilecgonina<sup>63, 64</sup>, apresentado à Fig. 3 e a utilização cada vez mais freqüente de cocaína deuterada (cocaína D-3) para esse fim, como recurso de aumento de precisão e sensibilidade de métodos analíticos<sup>24, 66, 119, 128</sup>.

A análise da BEC excretada na urina e também encontrada no plasma<sup>63, 68</sup> constitui um desafio ao analista devido ao seu caráter polar anfotérico (apresenta funções amina e carboxila) e hidrofílico, o que não permite a efetivação de sua extração pelas técnicas analíticas convencionais<sup>63, 68, 132</sup>.

Para que sua separação de dada matriz biológica aconteça, é necessário que se utilize solventes polares, que tenham a capacidade de extraí-la. Vários autores preconizam a extração com misturas solventes, como clorofórmio e etanol ou isopropanol<sup>63, 65, 132, 134</sup> e saturação da fase aquosa com cloreto de sódio para aumentar a eficiência da mesma<sup>119</sup>.



(1)  $R_1 = \text{CH}_3$ ;  $R_2 = \text{H}$

(2)  $R_1 = \text{CH}_3$ ;  $R_2 = \text{CH}_3$

FIGURA 3 - Estruturas químicas da cocaína (1) e do padrão interno éster metil *m*-toluilecgonina (2).

As extrações provenientes de matrizes biológicas mais complexas, como sangue, plasma e vísceras, exigem sucessivas passagens de purificação no sentido de se separar a COC dos interferentes endógenos, para possibilitar a aplicação de técnicas de identificação e quantificação, geralmente sensíveis às substâncias co-extraíveis da matriz <sup>8, 24, 38, 57, 63, 64, 66, 67, 69, 72, 81, 104, 119</sup>. Esse fato geralmente acarreta uma diminuição do rendimento da extração.

Alguns autores, inclusive, atribuem essa dificuldade à falta de técnicas sensíveis para medição de níveis sanguíneos ou plasmáticos, o que explicaria a quantidade relativamente pequena de informações sobre esse tema, a despeito da importância da COC como anestésico local e fármaco de abuso <sup>38, 64, 69</sup>.

Mais recentemente, esse problema de extração vem sendo solucionado através da utilização de colunas de sílica quimicamente ligada, como um processo alternativo a

extração líquido-líquido, principalmente para análise de soro, plasma e urina<sup>89, 124, 128, 129</sup>. Para sangue total, entretanto, há a desvantagem da possibilidade de obstrução, provocada pelos eritrócitos e que tendem a causar bloqueio da coluna. Nesses casos, há a necessidade de se promover a hemólise total. Para isto, os métodos recomendados são o ultrassom, a diluição em água ou agitação em "vortex" com pérolas de vidro<sup>129</sup>.

A extração em fase sólida oferece a vantagem de evitar a formação de emulsão, de ser mais rápida que os processos tradicionais de extração e de suprimir as passagens de purificação com conseqüente aumento da porcentagem de recuperação das substâncias a serem analisadas.

As principais técnicas de identificação da cocaína e seus produtos de biotransformação em material biológico são: colorimetria, imunoenensaio, cromatografia em camada delgada -CD, cromatografia em fase gasosa -CG, cromatografia líquida de alta eficiência -CLAE e cromatografia em fase gasosa acoplada com espectrômetro de massa -CG/EM.<sup>18</sup>.

As técnicas colorimétricas desenvolvidas na década de 50 para a quantificação de COC em material biológico, caíram em desuso devido à sua baixa especificidade<sup>18</sup>. Atualmente, restringem-se aos testes de campo, desenvolvidos por agências governamentais para detecção de cocaína em "drogas de rua". O mais utilizado é o teste de Scott's, que utiliza o tiocianato de cobalto em meio ácido. Este teste é pouco sensível e necessita de confirmação laboratorial em virtude dos resultados falso-positivos que apresenta<sup>141</sup>.

A cromatografia em camada delgada, apesar de sua limitação quanto à possibilidade de quantificação de xenobióticos, constitui técnica de grande utilidade para detecção da COC, BEC e EME em material biológico<sup>65, 68, 133, 134</sup>.

Esta técnica oferece a vantagem de ser capaz de separar, através de diversos sistemas-solventes disponíveis, os vários interferentes que podem ocorrer em potencial, por constituírem os adulterantes freqüentemente encontrados nas "drogas de rua"<sup>55</sup>.

A sensibilidade de detecção por CD é considerada por vários autores<sup>68, 71, 132, 134</sup> como sendo melhor tanto para COC, quanto para BEC, quando se utiliza o reagente de Dragendorff ao invés do Iodoplatinado, apesar deste ocorrer com maior frequência na literatura referida por CAMARGO<sup>18</sup>. Quantidades da ordem de 0,1 µg/mL de COC e BEC são referidas como detectáveis em amostras de urinas submetidas a métodos que utilizam a CD como técnica de identificação<sup>134</sup>.

Mais recentemente, como o desenvolvimento de placas cromatográficas de alta resolução -HPTLC, ("high performance thin-layer chromatography"), esta técnica de identificação para cocaína recrudescu<sup>37, 55</sup>.

Estas placas constituem sistemas altamente sensíveis, precisos e práticos e propiciam, inclusive, determinações feitas diretamente por densitometria *in situ* na própria

placa<sup>37</sup>. Apresentam granulações de adsorventes extremamente finas e são altamente homogêneas, o que promove tempos e distâncias menores de desenvolvimento e melhor resolução cromatográfica. É referido que quantidades tão baixas quanto 50 ng de COC podem ser detectadas<sup>55</sup>.

Assim como a CD, as técnicas de imunoensaio (enzimaimunoensaio e radioimunoensaio) também são freqüentemente indicadas para verificação de uso de COC em programas de triagem em material biológico, sendo a de eleição para este fim nos programas de verificação de farmacodependência.

Explicam este fato sua alta sensibilidade (radioimunoensaio pode detectar níveis de BEC de até 2 ng/mL <sup>43</sup>) e possibilidade de detecção dos produtos de biotransformação por um período relativamente longo após a exposição. A COC, devido à sua curta meia-vida - 0,5 a 1,5h - geralmente desaparece da urina após 4 a 6 horas do uso e, por isso, não é enfocada nos métodos que utilizam imunoensaio. A BEC e EME apresentam meia-vida de, aproximadamente, 8 e 6 horas respectivamente e podem ser detectados até 48 horas após o uso da COC, o que significa um período considerável após a dissipação dos efeitos<sup>66, 68, 119</sup>.

Há referências de haver detecção dos produtos de biotransformação da COC até 72 horas após o uso pela técnica de imunoensaio, o que a torna mais efetiva em relação à CD, compatível com quantidades detectáveis na urina no máximo por 24 horas<sup>127</sup>. Além disso, outra vantagem destes ensaios é o fato de poderem ser automatizados e executados em minutos <sup>120, 127</sup>.

Os achados positivos pelos métodos de imunoensaio necessitam de confirmação por meio de outras técnicas, devido à baixa especificidade que apresentam pela possibilidade de ocorrência de reações cruzadas entre COC, BEC e outros membros da família dos alcalóides tropânicos <sup>18, 120</sup>.

SPIEHLER e SEDEWICK<sup>120</sup> referem que amostras de sangue hemolisadas não se prestam à utilização de enzimaimunoensaio ou radioimunoensaio que utilize trítio (<sup>3</sup>H) porque a absorbância da hemoglobina interfere na medida espectrofotométrica direta. Preconizam para este fim a utilização de um radioimunoensaio que empregue antígeno marcado com <sup>125</sup>I, cuja ligação pode ser medida por contador de cintilação gama, afastando assim a interferência dos pigmentos sanguíneos. Referem ainda que a BEC é freqüentemente detectada por enzimaimunoensaio e como sua confirmação é dificultada por outras técnicas, preconiza-se que seja realizada por EME em CG e em CD<sup>27</sup>. Referem ainda, que as mudanças em sangue associadas à putrefação, aumentam a probabilidade de resultados falso-positivos para radioimunoensaio. Há, ainda, referências ao uso de imunoensaio por polarização de fluorescência (fluorescence polarization imunoassay TDx) com limite de detecção de 0,3 µg/mL para BEC com reatividade cruzada abaixo de 2%<sup>103</sup>.

A cromatografia em fase gasosa, utilizando detectores por ionização em chama, de nitrogênio e fósforo ou captura de elétrons, tem sido empregada com significativa frequência na determinação da COC e seus produtos de biotransformação em fluidos biológicos<sup>18, 82</sup>.

A cocaína é termicamente estável, tem pressão de vapor suficientemente alta e pode ser cromatografada em CG sem derivatização. A benzoilecgonina, devido à sua polaridade, não é volátil o suficiente para ser satisfatoriamente analisada pelos métodos que requerem vaporização. Conseqüentemente, várias técnicas têm sido desenvolvidas para convertê-la a compostos com suficiente volatilidade para ser analisada por CG<sup>63</sup>.

As várias técnicas de derivatização descritas, usualmente envolvem esterificação do grupo carboxila, inclusive a re-esterificação à cocaína<sup>24, 42, 57, 63, 81, 119, 133</sup>. Este recurso permite ainda o aumento da eficiência de BEC nos solventes orgânicos normalmente utilizados nos processos de extração da COC de material biológico.

O detector por ionização em chama, usado em 11 dos 23 trabalhos em CG relacionados por CAMARGO<sup>18</sup>, descritos entre 1969 a 1981, foi considerado o de eleição até o advento do detector seletivo de nitrogênio e fósforo.

A sensibilidade do DIC é considerada baixa para as análises de concentrações de COC, relacionadas com a farmacodependência (abaixo de 100 ng/mL de urina), e a resolução cromatográfica é problemática, devido à capacidade de detecção dos interferentes endógenos, normalmente extraíveis das diversas matrizes biológicas. Apesar dessas limitações, quanto à sensibilidade, presta-se à análise dos níveis sanguíneos de COC em casos relacionados à distribuição em amostras post-mortem<sup>82</sup>.

O detector de nitrogênio e fósforo, dada sua especificidade e sensibilidade, é considerado o de eleição e lhe é atribuída a facilitação de realização de análise de COC em plasma<sup>64, 66, 69</sup>.

Quantidades da ordem de 3 a 10 ng/mL em plasma podem ser quantificadas com alta precisão por este detector<sup>63, 64, 67, 69, 81, 119</sup>, o que o torna de eleição nas análises de fluidos biológicos, mormente quando a finalidade das análises assim o requer.

A utilização do detector de captura de elétrons também é referida na quantificação de COC e seus produtos de biotransformação. Em se considerando, ainda que a BEC precisa ser derivatizada para ser convenientemente cromatografada, o DCE torna-se de especial utilidade.

KOGAN e cols.<sup>81</sup> utilizaram o recurso da esterificação da BEC através do brometo de pentafluorbenzila, o que propicia um derivado da BEC analisável por detector de captura de elétrons - DCE e com limite de quantificação de 5 ng/mL de plasma.

JAVAID e cols.<sup>72</sup>, através de um processo de redução da COC a 2-hidroximetiltropina e posterior acilação com anidrido pentafluorpropionico (PFPA), propôs um método de quantificação em urina, plasma e eritrócitos, usando esse mesmo detector.

A combinação da cromatografia a gás e espectrometria de massa-CG/EM é reconhecida como o instrumento mais sensível e específico para análise da COC e seus produtos da biotransformação em qualquer que seja o material biológico considerado. Esta técnica é também utilizada com muita frequência como método de referência para outros menos específicos, como por exemplo enzimaímunoensaio<sup>24, 74, 120</sup>.

A CG/EM é indicada por vários autores para análises de materiais provenientes de necrópsia: CHINN e cols.<sup>24</sup> referem análises em sangue, fígado, urina e conteúdo gástrico, proveniente de necrópsia com sensibilidade menor que 5 ng/mL para 1 mL ou 1 g de material analisado, com coeficiente de variação da técnica menor do que 10%.

GRIESEMER e cols.<sup>57</sup>, da mesma forma, propõem um procedimento para determinação de BEC e COC em fluidos *post-mortem*, usando CG/EM e CG/DNP e referem sensibilidade de até 15 ng/mL.

SPIECHLER e REED<sup>119</sup> também utilizaram a detecção por CG/EM como técnica de eleição para o estabelecimento de correlação das quantidades de COC e BEC no cérebro e sangue provenientes de necrópsia. Os resultados foram utilizados para estabelecer a proposição de interpretação da razão de concentrações encontradas neste dois tecidos, e para possibilitar, inclusive, a dedução do tempo decorrido entre a introdução da COC no organismo e o evento do óbito.

Os trabalhos de MATSUBARA et cols.<sup>89</sup> e TAYLOR e JAIN<sup>128</sup> também referem o uso da CG/EM para quantificação da COC e seus produtos de biotransformação em material biológico.

A técnica CG/EM constituem ainda, ao lado da ressonância nuclear magnética (RNM), a de eleição para detectar os isômeros (-) e (+) e diferenciar a cocaína natural da sintética em amostras de rua<sup>40</sup>.

A cromatografia líquida de alta eficiência é particularmente útil para análise de BEC, pois devido ao seu caráter polar, pode ser cromatografada por esta técnica, sem necessidade da derivatização<sup>58, 66, 124, 129</sup>.

SVENSSON<sup>124</sup> refere a detecção de BEC por CLAE em concentrações de até 20 ng/mL como metodologia de eleição na confirmação de resultados positivos em radioímunoensaio e HACKETT e cols.<sup>58</sup> a utilizam em programa de verificação de farmacodependência.

Há, ainda, referência da utilização do sistema de fase reversa por CLAE como técnica de purificação da BEC em urina para posterior derivatização do eluato e quantificação por espectrometria de massa<sup>82</sup>.

JAVOID e cols.<sup>72</sup> referem um experimento que compara resultados obtidos em métodos que utilizam DIC, CG/EM e DCE, onde o coeficiente de correlação foi de 0,986, mostrando que as diversas técnicas se equivalem, a despeito da sensibilidade incontestavelmente maior observada para a CG/EM.

A combinação de diferentes técnicas de detecção com aquelas referentes à extração e à derivatização, permite a composição de métodos com capacidade variada quanto à especificidade e à sensibilidade, o que orientará a escolha, dependendo da finalidade da análise.

A Tabela II agrupa alguns trabalhos analíticos, em função da técnica de identificação, natureza da amostra e aplicação analítica indicada pelo autor.

TABELA II - Técnicas analíticas utilizadas na determinação de COC e produtos de biotransformação em diferentes amostras biológicas, referidas em diversos trabalhos consultados.

Técnica	amostra	analito	sensibilidade do método ( $\mu\text{g/mL}$ ou $\mu\text{g/g}$ )	finalidade da análise	referência
imunoensaio	urina	BEC	0,3	verificação de farmacodependência	66
CCD	urina	BEC COC	3,0 1,0	verificação de farmacodependência	65
	urina	BEC COC	0,1 0,25	verificação de farmacodependência	134
	urina	BEC	2,0	verificação de farmacodependência	16
	urina	BEC EME COC	0,5	verificação de farmacodependência	66
	urina	BEC COC	0,3 0,2 0,1	estudo toxicocinético	42 133
CG/DIC	urina	BEC	0,3		42
CG/DCE	urina	BEC COC	0,2 0,1		133
	plasma	BEC	0,005	estudos toxicocinéticos	81
CG/DNP	plasma	COC	0,005	estudos toxicodinâmicos e cinéticos	69
	sangue	COC	0,02	estudos toxicocinéticos	38
	plasma	COC	0,01	estudos toxicodinâmicos	81
	plasma	COC	0,005		67
	sangue	COC	0,01	estudo de	8
	plasma	COC	0,003	intoxicações estudos farmacocinéticos	64
	sangue	BEC	0,015	estudo de	57
	urina plasma	COC COC BEC	0,01	intoxicações estudos farmacocinéticos	63

cont. - TABELA II

Técnica	amostra	analito	sensibili- dade do mé- todo ( $\mu\text{g/mL}$ ou $\mu\text{g/g}$ )	finalidade da análise	referência
CG/EM	sangue	BEC	0,04	diagnóstico de intoxicações	119
	tecido	COC			
CLAE	sangue	BEC	0,005	diagnóstico de intoxicações	24
		COC			
		NOR			
	urina	BEC	0,035	verificação de farmacodependência	74
	sangue	COC	0,05	verificação de	128
	urina	BEC		farmacodependência	
	urina	BEC	0,02	verificação de	124
				farmacodependência	
	urina	BEC	0,05	verificação de	66
				farmacodependência	
	sangue	BEC	0,05	estudos	66
				toxicocinéticos	
	sangue	BEC	0,05	diagnóstico de	129
	urina	COC		intoxicações	

analito - substância analisada

COC - cocaína  
 BEC - benzoilecgonina  
 EME - éster metil ecgonina  
 CD - cromatografia em camada delgada  
 CG - cromatografia em fase gasosa  
 DIC - detector por ionização em chama  
 DCE - detector por captura de elétrons  
 DNP - detector específico de nitrogênio e fósforo  
 EM - espectrometria de massa  
 CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência

### 3. OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO

De acordo com as considerações feitas preliminarmente, a título de introdução, o presente trabalho objetiva o estabelecimento de metodologia analítica, que forneça subsídios auxiliares no diagnóstico da intoxicação aguda por cocaína, nos casos de interesse médico-legal.

Para cumprir tal objetivo, elaborou-se o seguinte plano de trabalho:

- revisão dos métodos analíticos existentes na literatura para identificação e quantificação de cocaína em material biológico;
- padronização de metodologia para identificação de cocaína e benzoilecgonina em urina e cocaína em sangue por cromatografia em camada delgada;
- padronização de método para quantificação de cocaína em sangue por cromatografia em fase gasosa, com uso do detector por ionização em chama;
- aplicação dos métodos padronizados às amostras de sangue e urina de cadáveres, cujos históricos de óbitos sugerem a intoxicação por *overdose* de cocaína.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Material

#### 4.1.1. Aparelhos e acessórios

- . Aparelho de cromatografia em camada delgada "Quickfit" - (Quickfit & Quartz), equipado com cubas de vidro, placas de vidro de 20 x 20 cm, nebulizadores e micropipetas de 5 e 10  $\mu\text{L}$ .
- . Cromatógrafo a gás, modelo 3300 - Intralab, equipado com detector por ionização em chama (DIC); injetor tipo "split/splitless", com insersor do tipo "on-column".
- . Coluna cromatográfica capilar de sílica fundida e metilsilicona quimicamente ligada (100% metilpolisiloxano-DB1-Intralab) com 30<sup>m</sup> x 0,242 mm de diâmetro interno; espessura do filme 0,25  $\mu\text{m}$ ; eficiência: 4665 pratos teóricos/metro, calculada para o tridecano.
- . Integrador Intralab, modelo 4290 (Intralab S/A - Instrumentação Analítica, São Paulo).
- . Centrífuga GLC-1, (Sorvall).

- . Potenciômetro digital, modelo 601 (Orion).
- . Estufas, banhos de água e agitador mecânico tipo "vortex".
- . Gases especiais para cromatografia em fase gasosa (CG) : nitrogênio, oxigênio e hidrogênio (White Martins S/A).

#### 4.1.2. Soluções-padrão

##### 4.1.2.1. Soluções-estoque

- . solução etanólica de cocaína (Merck), a 0,5% como base livre (112,02 mg de cloridrato de cocaína/20 mL de etanol);
- . solução etanólica de cocaína a 0,1 e 0,01% obtidas por diluição da solução a 0,5%;
- . solução etanólica de codeína (Sandoz SA - BALE - Swiss), padrão de referência, a 0,5% como base livre;
- . solução etanólica de benzoilecgonina (obtida por doação da "Division of Narcotic Drugs - United Nations Organization", Viena) a 0,1% (5 mg foram dissolvidos em 5 mL do solvente);
- . soluções etanólicas a 0,5% dos seguintes fármacos: benzocaína, cafeína, dibucaína, lidocaína, nicotina, procaína, propoxifeno e tetracaína (fármacos estudados como interferentes das análises).

#### 4.1.2.2. Soluções de trabalho

- . solução etanólica de cocaína a 0,1 e 0,01% (padrões usados na cromatografia em camada delgada - CCD);
- . soluções de cocaína preparadas a partir das soluções-estoque, nas seguintes alíquotas: 0,5 a 2,5 mL da solução-padrão a 0,01% e 0,5 a 4,0 mL da solução-padrão a 0,1%. Todas as alíquotas foram transferidas para balões volumétricos de 5,0 mL, adicionadas de 1 mL de solução-estoque de codeína e completadas ao volume em etanol. As soluções resultantes apresentaram concentrações, respectivamente de 10, 25, 50, 100, 200, 400 e 800 ng/ $\mu$ L para a cocaína e 1  $\mu$ g/ $\mu$ L para a codeína (padrões usados na cromatografia em fase gasosa - CG);
- . soluções dos fármacos estudados como interferentes, preparadas a partir das respectivas soluções-estoque, de maneira a se obter concentrações de 0,1% (padrões utilizados em CCD);
- . soluções dos fármacos estudados como interferentes, preparadas a partir das respectivas soluções-estoque e às quais foi adicionada solução-estoque de codeína, resultando em concentrações de 500 ng/mL para cada um dos fármacos de 1  $\mu$ g/mL de codeína (padrões utilizados em CG);
- . solução de codeína a 0,1% em etanol.

Todas as soluções (estoque e de trabalho) foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar e mantidas em congelador. As soluções de trabalho foram refeitas a cada três meses.

#### 4.1.3. Adsorvente, sistemas-solventes e agentes cromo gênicos

##### . Adsorvente

- placas de vidro de 20 x 20 cm, revestidas com silicagel G-60, Merck<sup>R</sup> (20 g para 40 mL de água destilada) com espessura de 0,25 mm. As placas foram secadas durante 15 minutos em temperatura ambiente e ativadas em estufa a 110°C, durante uma hora - "placas confeccionadas";
- cromatoplasmas de silicagel G-60, Merck<sup>R</sup>, 20 x 20 cm, com espessura de 0,25 mm e ativadas por 30 minutos a 110°C - "placas prontas".

##### . Sistemas-solventes

- (A) metanol-amônia (100:1,5)<sup>29</sup>

A saturação da cuba foi feita por uma hora e o máximo de duas cromatoplasmas foram desenvolvidas concomitantemente, tendo sido o sistema utilizado apenas uma vez.

- (B) clorofórmio-metanol (1:1)<sup>37,98</sup>

O sistema foi guardado em frasco de vidro âmbar e usado no máximo até quatro semanas após a preparação.

- (C) acetato de etila-cicloexano-metanol-amônia (70:15:10:5) - (C<sub>1</sub>)

acetato de etila-cicloexano-amônia (50:40:0,1) - (C<sub>2</sub>)

Observação: Segundo recomendações do autor<sup>77</sup>, o solvente (C<sub>1</sub>) deve ser preparado pelo menos 24 horas antes de ser utilizado e usado até quatro semanas após a preparação; o (C<sub>2</sub>), por sua vez, deve ser preparado uma

hora antes do uso e descartado após 24 horas da preparação.

- (D) cicloexano-tolueno-dietilamina (75:15:10)<sup>29</sup>

A saturação da cuba foi feita durante uma hora e foram desenvolvidas o máximo de três cromatoplasmas.

#### . Agentes cromogênicos

- Reativo de Dragendorff iodado (DI)<sup>110</sup> 10 mL de solução aquosa de iodeto de potássio a 40%; 10 mL de solução 1N de nitrato de bismuto em ácido acético glacial a 20%; 80 mL de ácido sulfúrico a 10%; 2 g de iodo ressublimado.
- Reativo de iodoplatinato (IPt)<sup>28</sup> 0,25 g de cloreto platínico (ácido IV hexacloroplatínico); 5,0 g de iodeto de potássio; 100 mL de água destilada.
- Reativo de iodoplatinato fortemente ácido (HIPt)<sup>28</sup> 1 mL solução de cloreto platínico a 5%; 9 mL solução de iodeto de sódio a 10%; 2 mL de água destilada; 3 mL de ácido clorídrico concentrado;

#### 4.1.4. Solventes e soluções reagentes (utilizados nas técnicas de extração)

. clorofórmio, isopropanol, cloreto de n-butila

. cloreto de sódio

. tampão fosfato pH 7,0<sup>29</sup>

(A) 0,9465 g de fosfato de sódio bibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) em 100 mL de água destilada.

(B) 0,4536 g de fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) em 50 mL de água destilada.

80 mL da solução (A) foram adicionados a 20 mL da solução (B). Ajustou-se o pH para 7,0 pelo gotejamento da solução (B) em um béquer, submetido à agitação magnética e à medição potenciométrica.

- . solução de ácido sulfúrico a 0,5 N
- . bicarbonato de sódio
- . sulfato de sódio anidro

À exceção do cloreto de *n*-butila, proveniente da Riedel - de Haëneg, os demais solventes e reagentes foram grau "pró-análise" Merck<sup>R</sup>.

#### **4.1.5. Amostras de urina**

##### **4.1.5.1. Brancos de referência**

- . Urina colhida de voluntários, não medicados pelo menos durante 48 horas precedentes da coleta.
- . Urina proveniente de cadáveres humanos necropsiados no Instituto Médico Legal - sede, sem indicação de uso de cocaína ou de outros fármacos, conforme notificações expressas nas respectivas requisições de exame toxicológico.

##### **4.1.5.2. Amostras selecionadas para análise**

- . Urina de cadáveres humanos necropsiados nos postos médico-legais do interior do Estado de São Paulo e no IML-sede, cujas requisições de exame referem histórico de uso de cocaína ou "droga de abuso" sem qualquer especificação (4 amostras).

#### **4.1.6. Amostras de sangue**

##### **4.1.6.1. Brancos de referência**

- . Sangue proveniente de cadáveres humanos, necropsiados no IML-sede, cujos históricos de óbito expressos em requisição de exame não indicam o uso de cocaína ou qualquer outro fármaco.

##### **4.1.6.2. Amostras selecionadas para análise**

- . Sangue de cadáveres humanos necropsiados nos postos médico-legais do interior do Estado de São Paulo e no IML-sede, com histórico de uso de cocaína ou "droga de abuso", sem qualquer especificação (25 amostras).

A todas as amostras de sangue foi adicionado fluoreto de sódio de maneira a se obter concentração final de 2,5 mg/mL<sup>72</sup>.

## **4.2. Métodos**

### **4.2.1. Identificação de cocaína e benzoilecgonina em urina e cocaína em sangue por cromatografia em camada delgada .**

#### **4.2.1.1. Padronização da técnica cromatográfica em camada delgada .**

Foram aplicados respectivamente em três séries de quatro cromatoplasmas prontas e confeccionadas 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 e 10 µg dos padrões de cocaína e benzoilecgonina e 10 µg de codeína e dos fármacos relacionados no item 4.1.2.2., como fármacos

interferentes. As placas foram desenvolvidas, nos quatro sistemas-solventes descritos no item 4.1.3.: 10 cm para os sistema (A) e (B); 15 cm para o sistema (D) e para o sistema (C) seguiu-se a conduta preconizada por KAISTHA e cols.<sup>77</sup>, a saber: aquecimento da placa a 90°C por 3 minutos após aplicação dos padrões; desenvolvimento até 9,0 cm em (C<sub>1</sub>); secagem à temperatura ambiente por 20 minutos; aquecimento por 3 minutos a 90°C e desenvolvimento até 14,5 cm no sistema (C<sub>2</sub>).

Após completa evaporação dos solventes, as placas foram nebulizadas com IPt, HIPt e DI, conforme descrito no item 4.1.3.

#### 4.2.1.2. Conduta analítica para identificação de cocaína e benzoilecgonina em urina<sup>119, 134</sup>

Foram transferidos 5 mL de urina para funis de separação e adicionados 3,0g de NaCl e 25 mL da mistura clorofórmio-etanol (80:20). Após agitação vigorosa manual por 1 minuto e repouso de 3 a 5 minutos, a fase orgânica foi filtrada sobre papel de filtro e sulfato de sódio anidro, sendo a extração repetida. Os extratos foram recolhidos em béqueres, levados a evaporar em banho de água a 60°C e antes da completa evaporação foram transferidos para béqueres afunilados de 5 mL, silanizados (a silanização foi realizada com solução a 10% de diclorometilsilano em tolueno) e evaporação total realizada à temperatura ambiente. Os resíduos foram retomados em 200 µL de clorofórmio-etanol (80:20), agitados em "vortex" por 30 segundos e transferidos quantitativamente para cromatoplasca desenvolvidas no sistema solvente (B) e nebulizadas com DI (Fig. 4).

Uma segunda alíquota foi submetida ao mesmo procedimento, sendo os resíduos retomados em 200 µL de clorofórmio-etanol (80:20), agitados em "vortex"

por 30 segundos e transferidos quantitativamente para cromatoplasmas desenvolvidas no sistema (D) e nebulizadas com HIPT.

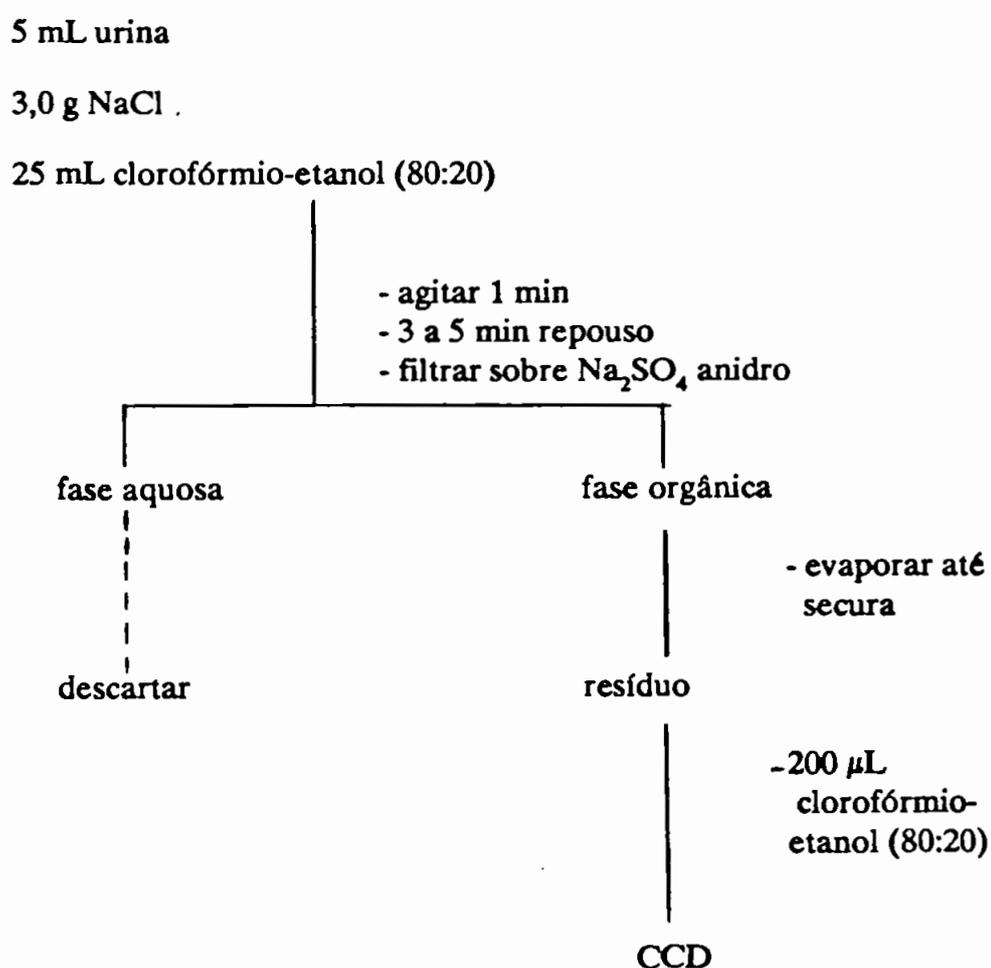


FIGURA 4 - Fluxograma do procedimento da extração de urina para identificação de cocaína e benzoilecgonina.

#### 4.2.1.3. Conduta analítica para identificação de cocaína em sangue<sup>19</sup>.

Foram transferidos 5 mL de sangue, 5 mL de tampão fosfato (pH 7,0) e 3,0 g de NaCl para funis de separação com capacidade para 50 mL. A extração foi realizada com 25 mL da mistura clorofórmio-isopropanol (9:1), por agitação vigorosa manual, durante 1 minuto. Após repouso de 5 a 10 minutos, a fase orgânica foi desidratada por filtração sobre sulfato de sódio anidro em papel de filtro. Após repetição do processo, os extratos orgânicos foram recolhidos em béquer, levados a evaporar à secura em banho de água a 60°C. O resíduo foi retomado com 3 mL de ácido sulfúrico 0,5N e 3 mL da mistura clorofórmio-isopropanol (9:1) e a fase orgânica descartada após agitação manual vigorosa por 1 minuto. Mais 3 mL da mistura de clorofórmio-isopropanol (9:1) foram adicionados à fração aquosa e o processo repetido. À camada aquosa remanescente, foram adicionados 3,0 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio e mais 3,0 mL da mistura clorofórmio-isopropanol (9:1) e a extração efetuada por agitação vigorosa manual durante 1 minuto. A fase orgânica foi transferida para béquer de 5 mL afunilado, silanizado e o processo repetido. Os extratos assim obtidos foram evaporados à temperatura ambiente. Os resíduos foram retomados com cerca de 200 µL, agitados durante 30 segundos em agitador tipo "vortex" e transferidos quantitativa e equitativamente para duas cromatoplasmas desenvolvidas nos sistemas-solventes (B) e (D) e nebulizados com DI e HIPT, descritos em 4.1.3. (Fig. 5).

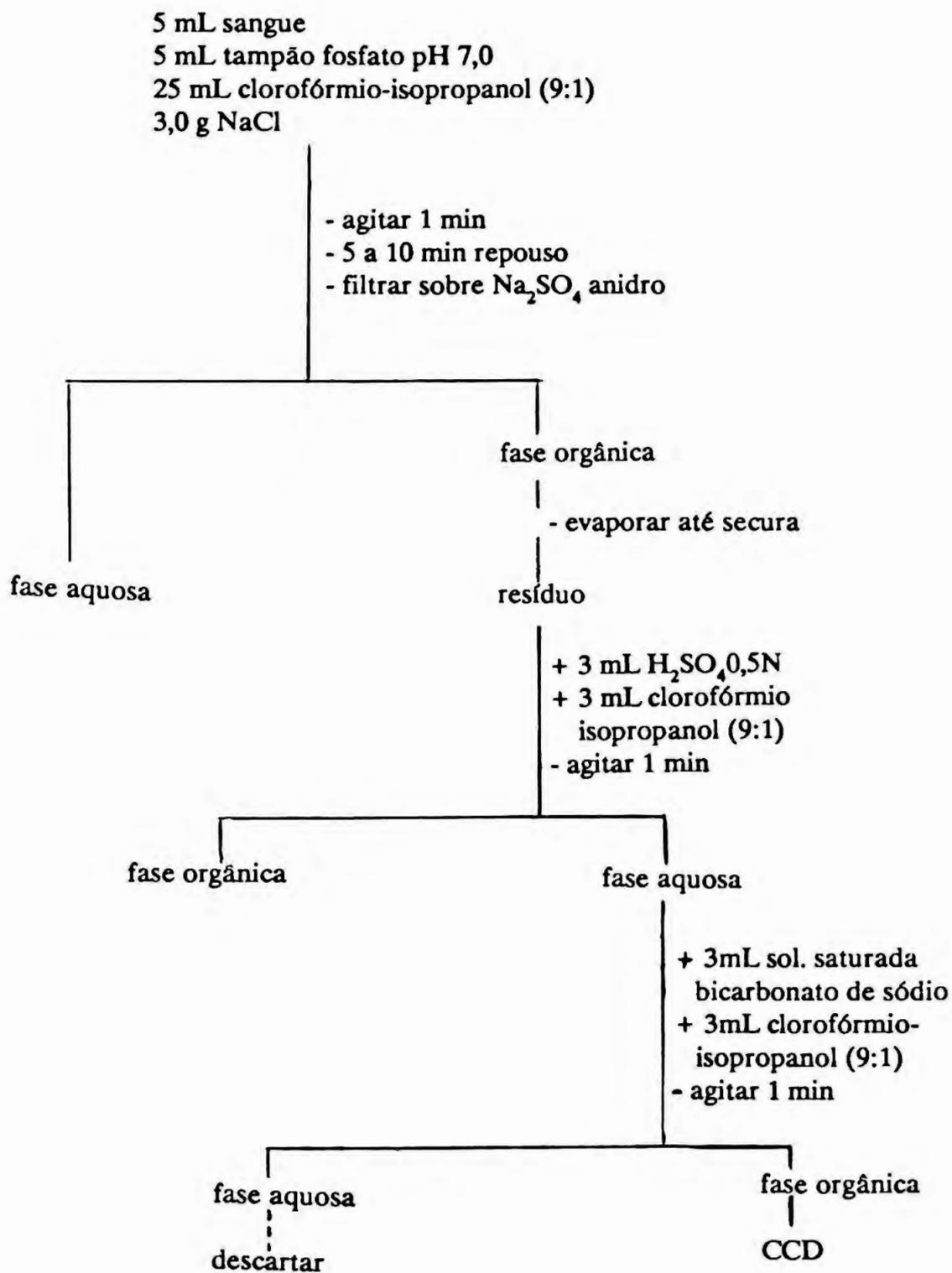


FIGURA 5 - Fluxograma do procedimento para identificação de cocaína em sangue.

## 4.2.2. Quantificação de cocaína em sangue por cromatografia gasosa

### 4.2.2.1. Procedimento da extração<sup>119</sup>

Foram transferidos 2 mL de sangue, 2 mL de tampão fosfato pH 7,0 e 1,5 g de NaCl para tubos de 25 mL dotados de rolha esmerilhada. Aos tubos, após agitação em "vortex", foram adicionados 10 mL da mistura clorofórmio-isopropanol (9:1) e a extração realizada por agitação vigorosa manual por 1 minuto e centrifugação a 3000 rpm durante 15 minutos. Após centrifugação, as "rolhas" de sangue obtidas foram inferiores a 10 mm e os sobrenadantes descartados. As fases orgânicas foram então filtradas sobre papel de filtro para tubos limpos e levados à evaporação em banho de água até *secura*. Os resíduos foram retomados com 3 mL de cloreto de *n*-butila e 3 mL de ácido sulfúrico 0,5N, por agitação em "vortex" durante 30 segundos. Após agitação manual vigorosa por 1 minuto, os tubos foram centrifugados a 2000 rpm por 10 minutos e o cloreto de *n*-butila aspirado e descartado. Adicionais 3 mL de cloreto de *n*-butila foram utilizados e a operação repetida. As fases aquosas remanescentes foram saturadas com bicarbonato de sódio e extraídas com 3,0 mL de cloreto de *n*-butila, por agitação manual durante 30 segundos e posterior centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos. As fases orgânicas foram transferidas para béqueres afunilados de 5 mL, silanizados, e evaporados à *secura* em temperatura ambiente. Os resíduos foram retomados com 50  $\mu$ L de solução etanólica de cocaína a 0,1%, agitados durante 30 segundos em agitador mecânico tipo "vortex" e 1,0  $\mu$ L imediatamente injetado no cromatógrafo a gás (Fig. 6).

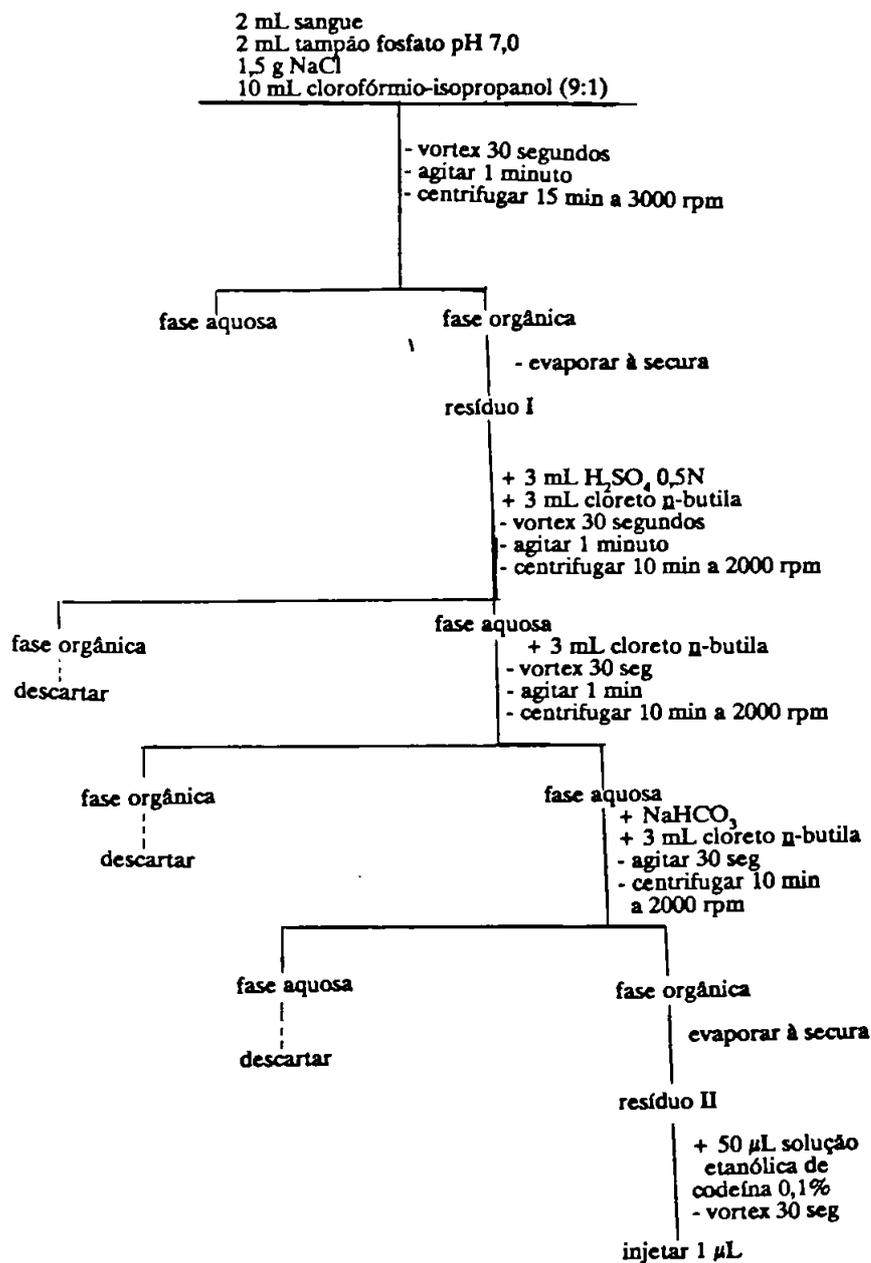


FIGURA 6 - Fluxograma do procedimento de extração de sangue para quantificação de cocaína.

#### **4.2.2.2. Condições cromatográficas**

Os resíduos II, oriundos de sangue "branco" e obtidos de acordo com o descrito no item 4.2.2.1. foram retomados com 50  $\mu\text{L}$  de soluções-padrão de trabalho (CG) de cocaína, agitados em "vortex" por 30 segundos e 1  $\mu\text{L}$  injetado no cromatógrafo, após o condicionamento da coluna através de 5 injeções de extrato de sangue "branco". Foram escolhidas as temperaturas e a atenuação mais convenientes às propostas do trabalho.

#### **4.2.2.3. Linearidade da técnica cromatográfica**

A linearidade da técnica cromatográfica definida pelo intervalo de concentrações, no qual a intensidade do sinal gerado pelo detector é diretamente proporcional à concentração da amostra, foi verificada através do uso das soluções de trabalho (CG) descritas no item 4.1.2. e submetidas ao tratamento descrito no item 4.2.2.2.

#### **4.2.2.4. Curva de calibração**

Foram transferidos volumes entre 0,025 e 0,5 mL, respectivamente, das soluções-padrão de trabalho de 0,1 e 0,01% de cocaína para tubos de 25 mL com tampas esmerilhadas, silanizados. O solvente foi evaporado à secura em banho de água a 60°C. Os resíduos foram retomados com 10 mL de sangues "branco" por agitação em "vortex" durante 1 minuto, resultando em amostras de 0,25 até 20 microgramas de cocaína por mililitro de sangue.

Imediatamente após o enriquecimento foram retiradas, em triplicata, alíquotas de 2 mL, submetidas ao procedimento descrito no item 4.2.2.1. A curva de calibração foi obtida através da projeção das concentrações da cocaína ( $\mu\text{g/mL}$ ) no eixo das abcissas, e das relações (R) obtidas entre as áreas da cocaína e codeína (padrão de referência) no eixo das ordenadas.

#### **4.2.2.5. Recuperação do método**

A porcentagem de recuperação do método foi avaliada, para as diferentes concentrações, por comparação entre a relação (R), obtida entre as áreas da cocaína e padrão interno, na curva de calibração com as correspondentes obtidas no estudo da linearidade.

#### **4.2.2.6. Precisão do método**

A precisão do método foi avaliada através da determinação, em dias diferentes, de alíquotas de sangue enriquecido com cocaína, nas concentrações de 0,25; 0,5; 2,0 e 10  $\mu\text{g/mL}$  e através da análise de alíquotas intra-ensaio para as concentrações 2,0 e 10  $\mu\text{g/mL}$ .

#### **4.2.2.7. Limite de detecção e limite de quantificação**

O limite de detecção, definido pela concentração de cocaína que resulta em um pico com área duas vezes

---

maior do que aqueles correspondentes ao ruído da linha de base, foi verificado através da análise de amostras de sangue enriquecidas com soluções-padrão de cocaína, preparadas de acordo com o procedimento descrito no item 4.2.2.4.

O limite de quantificação, definido como a menor concentração para medidas quantitativamente precisas<sup>20,91</sup>, foi determinado através da análise dos resultados obtidos no item 4.2.2.6.

#### **4.2.2.8. Presença de fármacos interferentes**

##### **. Adicionados aos extratos**

Foram transferidos 50  $\mu\text{L}$  de cada uma das soluções de trabalho, relacionados como fármacos interferentes (CG) no item 4.1.2., para béqueres afunilados de 5 mL com extratos da análise de sangue "branco", obtidos de acordo com procedimentos descritos no item 4.2.2.1. Após agitação em agitador do tipo "vortex" por 30 seg, 1  $\mu\text{L}$  foi injetado no cromatógrafo e os valores de tempo de retenção relativo à codeína foram comparados àqueles obtidos para a cocaína.

##### **. Adicionados a amostras de sangue**

Foram transferidos volumes das soluções de propoxifeno e lidocaína, relacionados no item 4.1.2., para tubos de 25 mL, com tampas esmerilhadas, silanizados, de maneira a resultar amostras com concentrações compatíveis com as superdoses para os dois fármacos, após adição de 20 mL de sangue "branco" de referência (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para lidocaína e 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para o propoxifeno)<sup>34,87</sup>. Imediatamente após o enriquecimento, foram retiradas, em triplicata, alíquotas de 2 mL e submetidas aos procedimentos de extração descritos no item 4.2.2.1. Os extratos foram cromatografados e os tempos de retenção relativos à codeína comparados àqueles obtidos para a cocaína.

### **4.2.3. Aplicação da metodologia proposta às amostras de sangue e urina selecionadas para o trabalho**

As amostras de urina e sangue descritas nos itens 4.1.5.2. e 4.1.6.2. foram submetidas aos procedimentos descritos em 4.2.1.3 e 4.2.2.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Identificação de cocaína e benzoilecgonina em urina e cocaína em sangue por cromatografia em camada delgada (CCD)

#### 5.1.1. Padronização da técnica cromatográfica em camada delgada

Os resultados da avaliação da sensibilidade da cocaína e benzoilecgonina frente aos agentes cromogênicos estudados, estão apresentados na Tabela III.

A Tabela IV ilustra o comportamento dos fármacos estudados, frente aos agentes propostos, para quantidades de 10  $\mu\text{g}$ , exceção feita à cocaína (5  $\mu\text{g}$ ).

As Tabelas V e VI apresentam a média dos valores de  $R_f$  da COC, BEC, bem como dos fármacos estudados como interferentes, obtidos após 10 e 5 determinações, respectivamente em placas "confeccionadas" e "prontas", desenvolvidas nos quatro sistemas solventes estudados, conforme descrito no item 4.2.1.1.

A Tabela VII apresenta as médias dos desvios-padrão obtidos para os diferentes fármacos, para cada sistema-solvente utilizado, respectivamente para placas "prontas" e "confeccionadas".

Os resultados de  $R_f$  obtidos para os sistemas-solventes B e D em placas cromatográficas "prontas" foram dispostos comparativamente, conforme mostra a Fig. 7.

TABELA III - Freqüência com que as diferentes quantidades de cocaína (COC) e benzoilecgonina (BEC) foram detectadas por três agentes cromogênicos, distribuídos quanto ao tipo de placa utilizado.

agente	COC ( $\mu\text{g}$ )						BEC ( $\mu\text{g}$ )					
	0,25		0,5		1,0*		2,0**		5,0		10,0*	
cromogênico	pp	pc	pp	pc	pp	pc	pp	pc	pp	pc	pp	pc
	freqüência (%)											
IPt	40	20	60	50	100	100	0	0	0	0	20	0
HIPI	50	30	80	60	100	100	20	0	100	70	100	100
DI	50	30	90	70	100	100	10	0	100	80	100	100

\* Resultado do valor expresso e dos demais valores superiores estudados.

\*\* Resultado do valor expresso e dos demais valores inferiores estudados.

IPt - reativo de iodoplatinato

HIPI - reativo de iodoplatinato fortemente ácido

DI - reativo de Dragendorff iodado

pp - placas cromatográficas "prontas"

pc - placas cromatográficas "confeccionadas"

Sistema-solvente (B): clorofórmio-metanol (1:1)

n = 10 determinações "placas prontas"

25 determinações "placas confeccionadas"

TABELA IV - Comportamento cromatográfico em camada delgada de 11 fármacos submetidos à detecção com agentes cromogênicos.

fármaco (10 ug)	agentes cromogênicos		
	IPt	HIPI	DI
benzocaína	-	-	cs +
benzoilecgonina	-	az ++	cs ++
cafeína	-	pu cs +++	cs ++
cocaína*	vi +++	pu cs +++	cs +++
codeína	az ++	pu al ++	cs +++
dibucaína	vi ++	pu cs +++	cs +++
lidocaína	az cn +++	vi al +++	cs +++
nicotina	az vd ++	cs vd ++	cs +++
procaína	vi ++	cs vd +++	cs +++
propoxifeno	pu ++	pu cs ++	cs ++
tetracaína	vi +++	pu cs +++	cs +++

al	alaranjado	pu	púrpura		
az	azul	ro	róseo	-	reação negativa
cn	cinza	vd	verde	+	fraco
cs	castanho	vi	violeta	++	evidente
*	5 ug			+++	forte

Sistema-solvente (B): clorofórmio-metanol (1:1)

IPt - Reativo de iodoplatinato

HIPI - Reativo de iodoplatinato fortemente acídico

DI - Reativo de Dragendorff iodado

TABELA V - Valores de hRf dos fármacos para os quatro sistemas solventes propostos, obtidos em placas cromatográficas "confeccionadas".

fármaco (10 µg)	hRf ( $\bar{X} \pm S$ )			
	(A)	sistemas-solventes (B)	(C)	(D)
benzocaína	67,0 ± 5,0	86,0 ± 3,0	77,0 ± 10,0	4,0 ± 1,9
benzoilecgonina	24,3 ± 6,1	23,1 ± 3,4	24,0 ± 7,2	00
cocaína *	69,7 ± 5,4	60,6 ± 3,8	66,6 ± 6,5	50,1 ± 6,1
codeína	40,9 ± 4,9	33,6 ± 3,4	39,9 ± 4,9	4,0 ± 2,0
cafeína	65,5 ± 9,1	79,4 ± 3,1	48,2 ± 6,1	4,0 ± 1,1
dibucaína	62,1 ± 4,1	59,4 ± 7,4	65,3 ± 4,7	24,9 ± 4,7
lidocaína	72,7 ± 4,2	85,2 ± 5,6	74,4 ± 3,0	30,1 ± 3,8
nicotina	64,4 ± 8,1	68,3 ± 3,4	52,0 ± 4,3	37,6 ± 3,1
procaína	65,5 ± 6,5	48,0 ± 4,5	61,0 ± 3,1	4,1 ± 1,8
propoxifeno	67,6 ± 4,8	63,1 ± 4,3	76,9 ± 6,5	60,5 ± 3,5
tetracaína	60,0 ± 3,7	56,9 ± 4,8	61,6 ± 2,4	13,6 ± 3,8

\* 5 µg

$\bar{X}$  = média de 10 determinações

S = desvio-padrão

(A) metanol-amônia (100:1,5)

(B) clorofórmio-metanol (1:1)

(C) acetato de etila-cicloexano-metanol-amônia (70:15:10:5)  
e acetato de etila-cicloexano-amônia (50:40:0,1)

(D) cicloexano-tolueno-dietilamina (75:15:10)

Agente cromogênico: DI

TABELA VI - Valores de hRf dos fármacos para os quatro sistemas-solventes propostos, obtidos em placas cromatográficas "prontas".

fármaco (10 µg)	hRf ( $\bar{X} \pm S$ )			
	(A)	(B)	(C)	(D)
benzocafina	68,8 ± 5,6	90,2 ± 2,1	70,0 ± 5,3	5,0 ± 0,8
benzoilecgonina	23,2 ± 4,0	21,8 ± 1,6	18,8 ± 4,0	00
cocafina*	70,0 ± 4,2	55,0 ± 1,7	64,6 ± 3,9	44,8 ± 2,7
codeína	36,0 ± 2,4	32,4 ± 2,0	38,8 ± 6,0	4,2 ± 1,3
cafeína	62,8 ± 5,0	81,2 ± 1,9	48,0 ± 4,3	3,0 ± 0,7
dibucaína	64,8 ± 3,0	67,4 ± 4,5	64,0 ± 1,6	24,6 ± 1,1
lidocafina	72,8 ± 2,1	84,8 ± 4,0	72,8 ± 1,9	30,2 ± 4,0
nicotina	70,6 ± 2,1	72,6 ± 1,6	48,0 ± 2,2	36,4 ± 2,3
procaína	61,0 ± 5,7	54,2 ± 3,9	64,8 ± 3,7	4,0 ± 1,5
propoxifeno	69,6 ± 2,0	56,2 ± 2,6	76,2 ± 1,7	58,6 ± 1,5
tetracaína	61,2 ± 2,8	61,0 ± 2,2	60,0 ± 2,1	14,4 ± 0,9

\* 5 µg

$\bar{X}$  = média de 5 determinações

S = desvio-padrão

(A) metanol-amônia (100:1,5)

(B) clorofórmio-metanol (1:1)

(C) acetato de etila-cicloexano-metanol-amônia (70:15:10:5)  
e acetato de etila-cicloexano-amônia (50:40:0,1)

(D) cicloexano-tolueno-dietilamina (75:15:10)

Agente cromogênico: DI

**TABELA VII - Médias dos desvios-padrão em quatro sistemas-solventes, obtidos em placas cromatográficas "prontas" e "confeccionadas".**

Sistema solvente	pp	pc
(A)	3,5	5,6
(B)	2,5	4,2
(C)	3,4	5,3
(D)	1,5	2,9

pp - placa "pronta"

pc - placa "confeccionada"

clorofórmio-metanol  
(1:1)

cicloexano-tolueno-dietilamina  
(75:15:10)

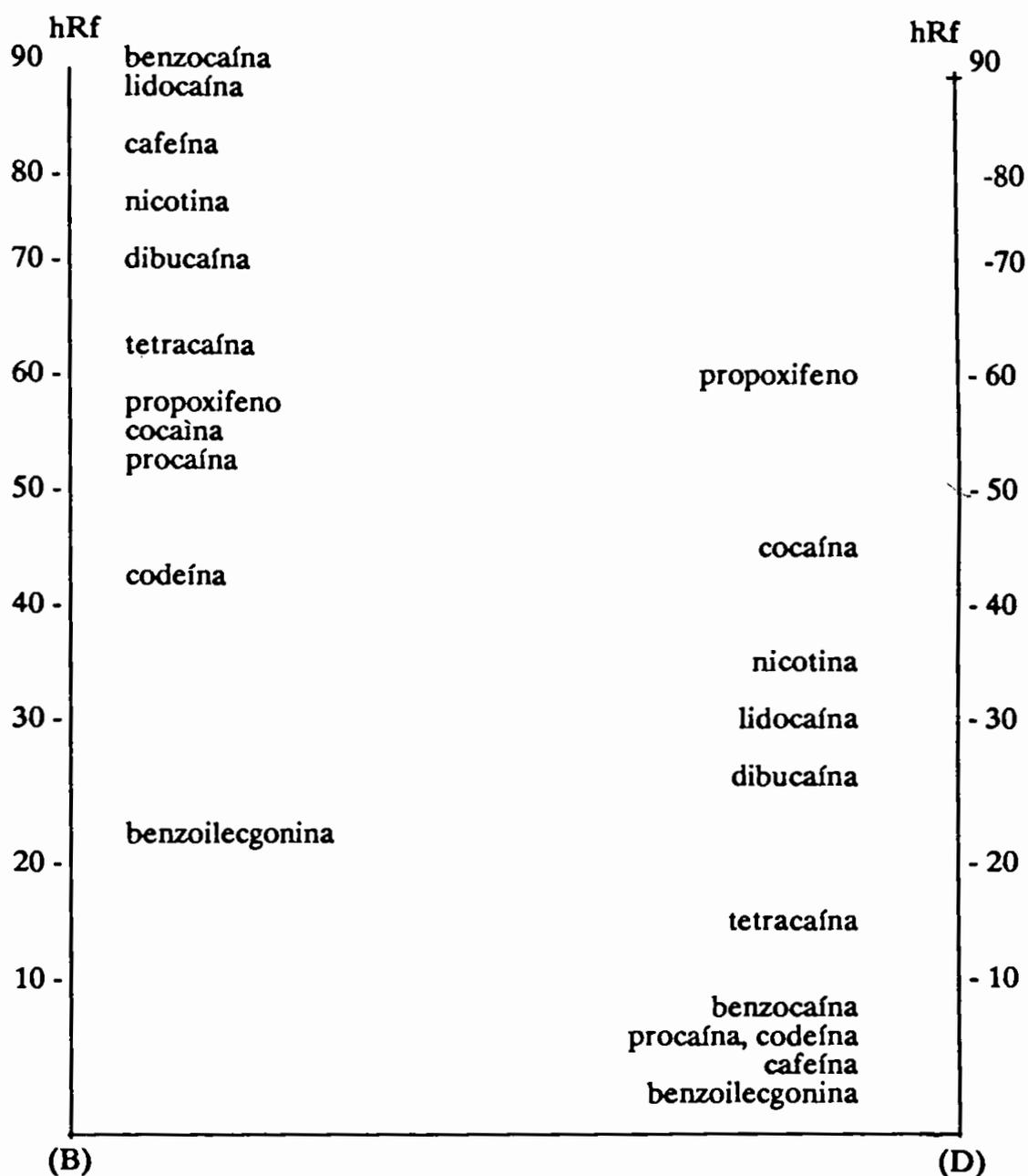


FIGURA 7 - Disposição dos valores de hRf obtidos em cromatoplaças "prontas", desenvolvidas em dois sistemas solventes e revelação com três agentes cromogênicos.

### **5.1.2. Conduta analítica para identificação de cocaína e benzoilecgonina em urina**

As Figuras 8 e 9 mostram os cromatogramas - CD de extratos de urinas enriquecidas com COC e BEC e submetidas ao procedimento descrito no item 4.2.1.2.

O limite de detecção foi de 0,5 e 10  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente para COC e BEC.

### **5.1.3. Conduta analítica para identificação de cocaína em sangue**

A cocaína foi identificada em amostras de sangue enriquecidas com concentrações a partir de 0,5  $\mu\text{g/mL}$  (Figuras 10 e 11).

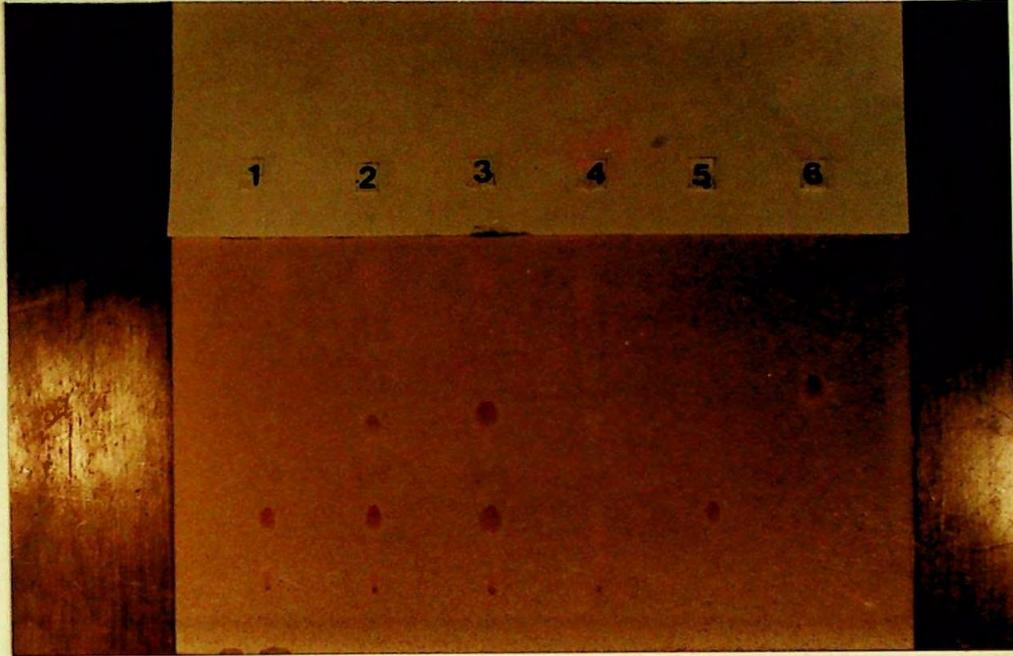


FIGURA 8 - Cromatograma CD de amostras de urina contendo concentrações conhecidas de COC e BEC

Legenda:

- 1 - 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de COC e 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BEC
- 2 - 1,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de COC e 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BEC
- 3 - 2,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de COC e 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BEC
- 4 - urina branco de referência
- 5 - padrão de referência de BEC (10  $\mu\text{g}$ )
- 6 - padrão de referência de COC ( 5  $\mu\text{g}$ )

Sistema-solvente (B) clorofórmio-metanol (1:1)

Agente cromogênico : DI

BIBLIOTECA  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Universidade de São Paulo

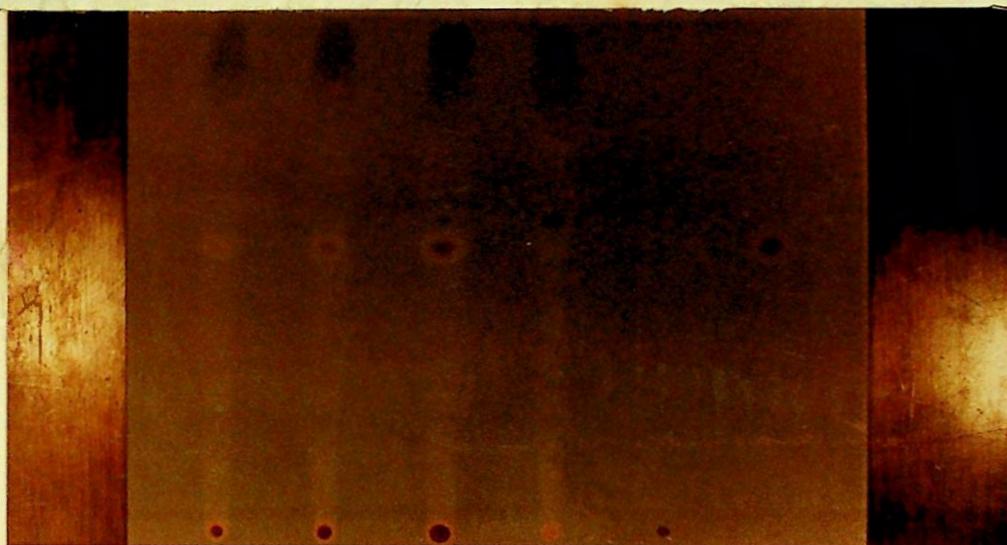


FIGURA 9 - Cromatograma CD de amostras de urina contendo concentrações conhecidas de BEC e COC

Legenda:

1 - 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de COC e 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BEC

2 - 1,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de COC e 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BEC

3 - 2,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de COC e 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BEC

4 - urina branco de referência

5 - padrão de referência de BEC (10  $\mu\text{g}$ )

6 - padrão de referência de COC ( 5  $\mu\text{g}$ )

Sistema-solvente (D) cicloexano-tolueno-dietilamina  
(75:15:10)

Agente cromogênico : HIPt



**FIGURA 10** - Cromatograma CD de amostras de sangue enriquecidas com COC. Da esquerda para a direita: 0,5, 1,0, 2,0 e 5,0  $\mu\text{g/mL}$  de cocaína; sangue "branco" e padrão de referência de cocaína.

Sistema-solvente (B) clorofórmio-metanol (1:1)

Agente cromogênico : DI

Nota da BCQ: No impresso, está faltando a página 62.

## 5.2. Quantificação de cocaína em sangue por cromatografia em fase gasosa

### 5.2.1. Condições cromatográficas

As condições analíticas cromatográficas foram escolhidas, de acordo com o descrito no item 4.2.2.2, como se segue:

#### 1. Temperaturas

coluna ( $T_c$ ) = 210°C

injetor ( $T_i$ ) = 230°C

detector ( $T_D$ ) = 245°C

#### 2. Vazão gás de arraste ( $H_2$ )

fluxo na coluna: 1 mL/min

razão de divisão (injetor na condição "split"): 50

#### 3. Fluxos dos gases no detector

$N_2$  = 30 mL/min

$H_2$  = 30 mL/min

$O_2$  = 210 mL/min

#### 4. Atenuação: 32

Velocidade do papel registrador: 0,25 cm/min

A Fig.12 apresenta os cromatogramas referentes a extratos provenientes de amostras de sangue "branco" de referência e sangue enriquecido com cocaína 5,0  $\mu\text{g/mL}$  submetidos aos procedimentos descritos nos itens 4.2.2.1. e 4.2.2.4.

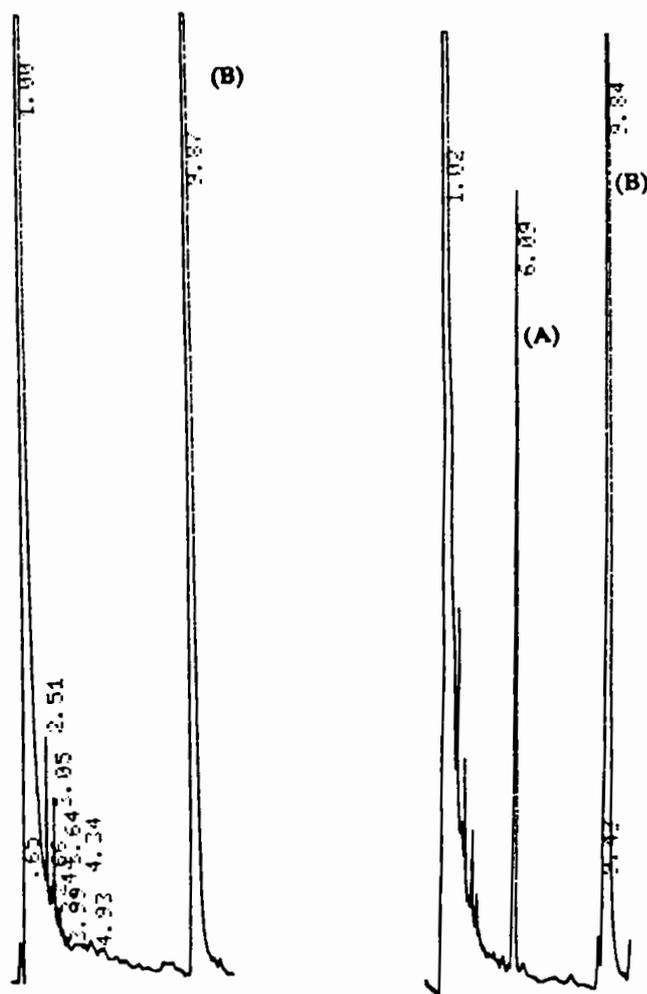


FIGURA 12 - Cromatograma referente a amostras de sangue "branco" de referência e enriquecida com cocaína. (A): cocaína e (B): codeína

Coluna capilar DB1  
 Detector: DIC  
 $T_c = 210^\circ\text{C}$ ;  $T_i = 230^\circ\text{C}$  e  $T_D = 245^\circ\text{C}$ .  
 Fluxo ( $H_2$ ) = 1 mL/min  
 Aten.: 32

### **5.2.2. Linearidade da técnica cromatográfica**

A resposta do detector foi linear para a faixa estudada, ou seja, quantidades de 10 a 800 ng.

A Tabela VIII apresenta os valores médios de três determinações, em cinco dias diferentes e a Fig. 13 representa o gráfico da linearidade construído com estes valores.

### **5.2.3. Curva de calibração**

A curva de calibração (Fig. 14) foi obtida através dos dados apresentados na Tabela IX.

A equação da reta foi estabelecida pelo método dos mínimos quadrados e utilizada na quantificação da cocaína em amostras de sangue selecionadas para análise.

### **5.2.4. Recuperação do método**

A recuperação média da cocaína extraída de amostras enriquecidas e determinadas de acordo com o item 4.2.2.5. foi de 67,8% e os dados relativos à diferentes concentrações estão relacionados na Tabela X.

**TABELA VIII - Relação entre as áreas dos picos produzidos pela cocaína (COC) e codeína (PR) ( $1\mu\text{g}$ ) com a quantidade injetada no aparelho, obtidas em cinco dias ( $n = 5$ ).**

cocaína (ng)	RELAÇÃO ENTRE AS ÁREAS COC/PR (R)					R
	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	
10	0,012	0,012	0,012	0,014	0,012	0,012
25	0,035	0,032	0,030	0,030	0,030	0,031
50	0,065	0,060	0,057	0,050	0,058	0,058
100	0,130	0,120	0,130	0,110	0,130	0,124
200	0,300	0,240	0,250	0,221	0,240	0,250
400	0,540	0,520	0,450	0,490	0,490	0,498
800	0,980	0,996	1,080	0,900	1,040	0,980

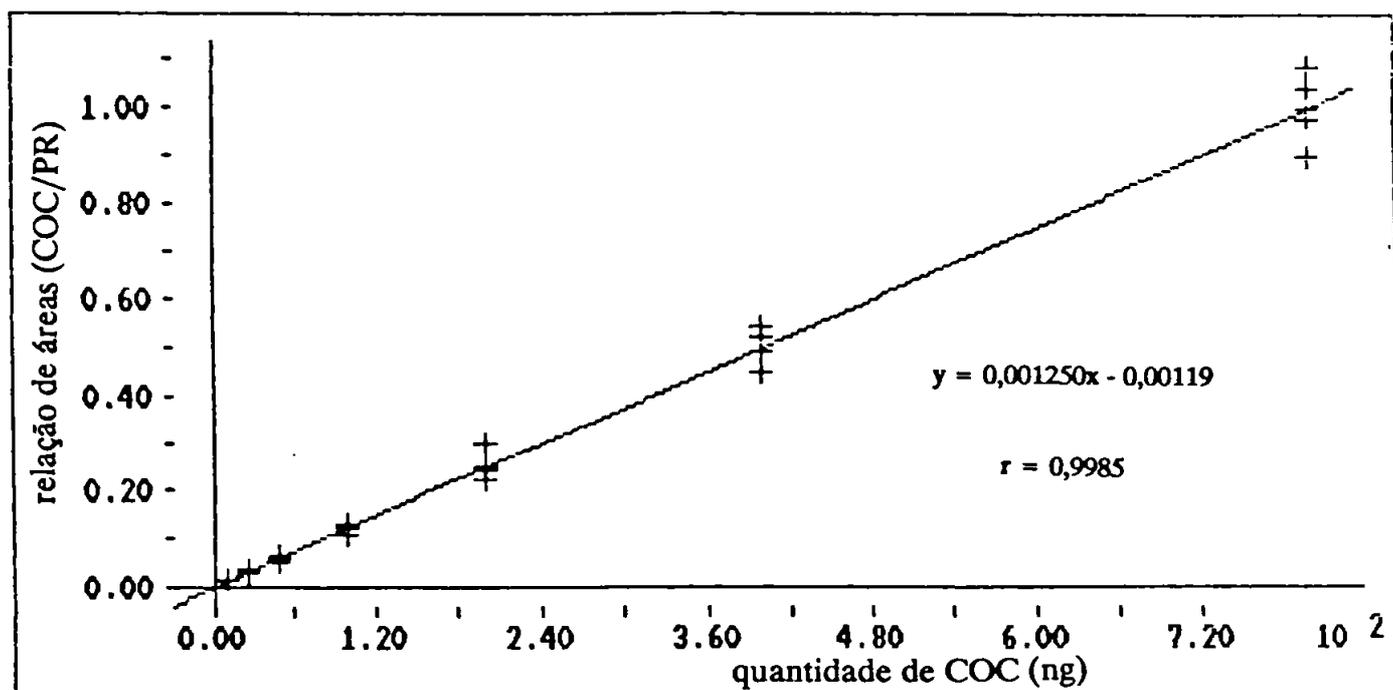


FIGURA 13 - Representação da correlação entre quantidade de cocaína injetada no cromatógrafo (CG) e a relação de áreas dos picos cromatográficos de cocaína (COC) e codeína (PR).

TABELA IX - Parâmetros analíticos obtidos para a elaboração da curva de calibração.

Concentração sangüínea ( $\mu\text{g/mL}$ )	R <sup>*</sup>
0,5	0,0143
1,0	0,0304
2,0	0,0672
5,0	0,1700
10,0	0,3267
20,0	0,7156

R<sup>\*</sup> = relação entre as áreas cocaína/codeína - média obtida em nove determinações realizadas em três dias diferentes.

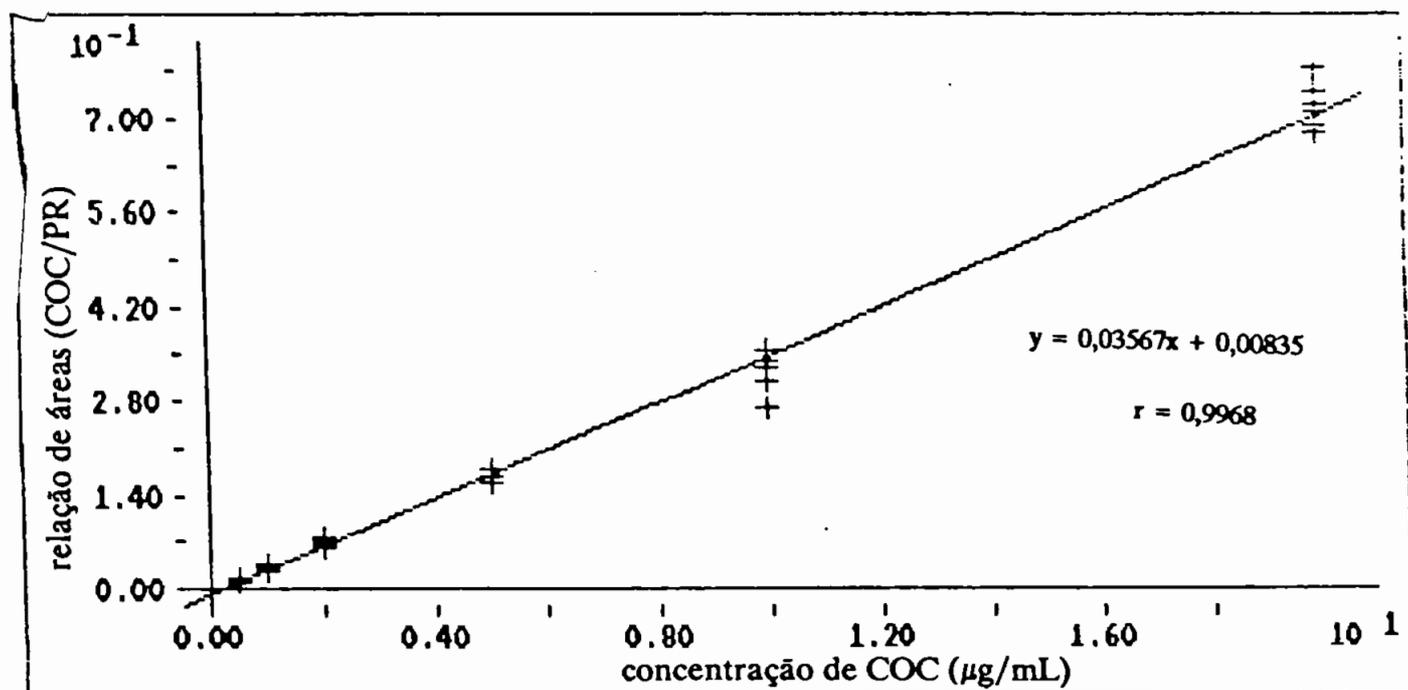


FIGURA 14 - Representação da curva de calibração para a determinação de cocaína nas concentrações sanguíneas de 0,5 a 20  $\mu\text{g/mL}$ .

TABELA X - Recuperação da cocaína adicionada a amostras de sangue.

concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	n	recuperação %
0,5	9	62,5
1,0	9	63,9
2,0	16	66,3
5,0	9	70,8
10,0	9	68,7
20,0	9	74,5

n = número de determinações

### 5.2.5. Precisão do método

Os coeficientes de variação obtidos nas análises das concentrações sanguíneas em diferentes dias (inter-ensaios) estão relacionados na Tabela XI. Os coeficientes obtidos intra-ensaios estão relacionados na Tabela XII.

TABELA XI - Coeficientes de variação das concentrações sanguíneas de cocaína (COC) obtidas inter-ensaios.

concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	n	$\bar{R}$	S	CV (%)
0,25	7	0,0060	0,0015	25,0
0,50	9	0,0143	0,0014	9,79
2,0	9	0,0672	0,0051	7,59
10,0	9	0,3267	0,0265	8,11

n = número de amostras analisadas

-

R = média das relações entre as áreas cocaína/codeína obtidas

S = desvio-padrão

CV = coeficiente de variação

TABELA XII - Coeficientes de variação das concentrações sanguíneas de cocaína (COC) obtidos intra-ensaios.

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	n	$\bar{R}$	S	CV (%)
2,0	6	0,0700	0,0032	4,57
10,0	6	0,3333	0,0121	3,63

n = número de amostras analisadas

$\bar{R}$  = média das relações entre as áreas cocaína/codeína obtidas

S = desvio-padrão

CV = coeficiente de variação

### 5.2.6. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção do método foi de  $0,25 \mu\text{g/mL}$ , quando da análise de 2,0 mL de sangue. O limite de quantificação foi de  $0,5 \mu\text{g/mL}$  para 2,0 mL de sangue (coeficiente de variação menor que 10%).

### 5.2.7. Fármacos interferentes

A Tabela XIII mostra os tempos de retenção relativos à codeína para cocaína, benzoilecgonina e fármacos testados como possíveis interferentes e as respectivas quantidades injetadas.

TABELA XIII - Tempos de retenção relativos à codeína, para cocaína, benzoilecgonina e fármacos testados como interferentes.

fármacos	* $t_{RR}$ (min)	quantidade (ng)
benzocafna	0,1590	500
benzoilecgonina	1,5487	4000
caféina	0,2413	500
cocaína	0,6210	500
dibucaína	ND	500
lidocaína	0,2898	500
nicotina	0,1247	500
procaína	0,3871	500
propoxifeno	0,6230	500
tetracaína	0,6730	500

$t_{RR}$  = retenção relativa à codeína (tempo de retenção do fármaco/tempo de retenção da codeína)

\* = média de 10 determinações

ND = não detectado no intervalo de 0,9 a 20 minutos

### 5.2.8. Fármacos interferentes após os processos de extração

A lidocaína e o propoxifeno foram extraídos utilizando-se a metodologia proposta e os cromatogramas estão representados nas Figuras 15 e 16.

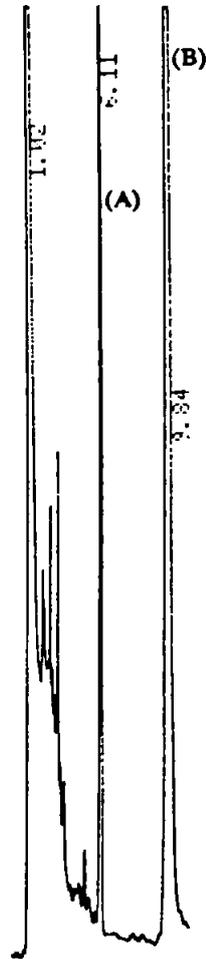


FIGURA 15 - Cromatograma CG de amostra de sangue enriquecida com propoxifeno. (A): propoxifeno e (B): codeína

Coluna capilar DB1

Detector: DIC

$T_c = 210^\circ\text{C}$ ;  $T_1 = 230^\circ\text{C}$  e  $T_D = 245^\circ\text{C}$ .

Fluxo ( $\text{H}_2$ ) = 1 mL/min

Aten.: 32

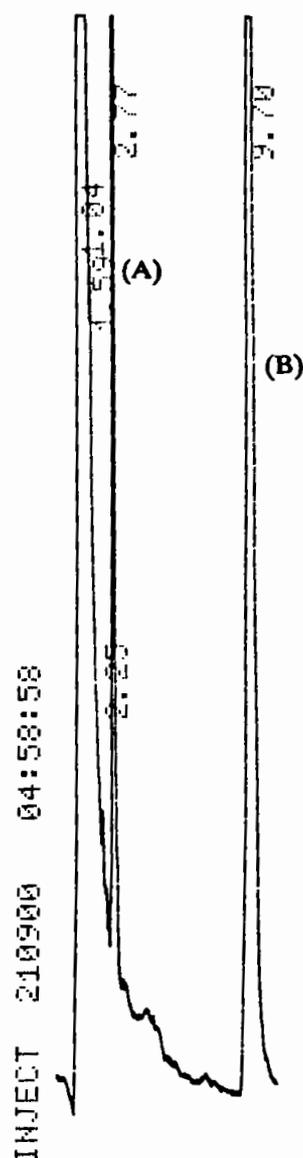


FIGURA 16 - Cromatograma CG de amostra de sangue enriquecida com lidocaína.  
(A): lidocaína e (B): codeína

Coluna capilar DB1  
Detector: DIC  
 $T_c = 210^\circ\text{C}$ ;  $T_i = 230^\circ\text{C}$  e  $T_D = 245^\circ\text{C}$ .  
Fluxo ( $\text{H}_2$ ) = 1 mL/min  
Aten.: 32

### **5.3. Resultados obtidos com a aplicação dos métodos propostos às amostras selecionadas para o trabalho**

A Fig 17 mostra o cromatograma relativo à amostra de sangue integrante daquelas referidas no item 4.1.6.2.

Cocaína (COC) e benzoilecgonina (BEC) foram pesquisadas em amostras de sangue e urina, de cadáveres humanos necropsiados no IML de São Paulo, conforme descrito nos itens 4.1.5.2. e 4.1.6.2.

As análises foram realizadas segundo o descrito nos itens 4.2.1. e 4.2.2. e os resultados obtidos para 25 amostras analisadas estão apresentados na Tabela XIV.

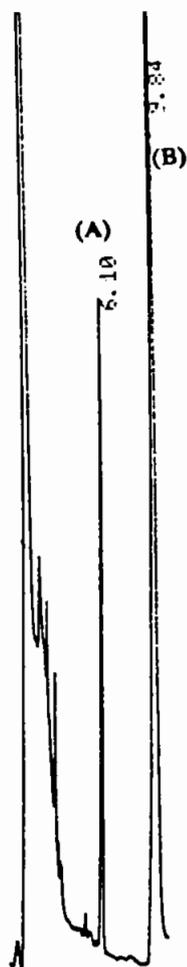


FIGURA 17 - Cromatograma CG de amostra de sangue proveniente de necrópsia com histórico de intoxicação aguda por cocaína. (A): cocaína e (B): codeína

Coluna capilar DB1  
Detector: DIC  
 $T_c = 210^\circ\text{C}$ ;  $T_i = 230^\circ\text{C}$  e  $T_D = 245^\circ\text{C}$ .  
Fluxo ( $\text{H}_2$ ) = 1 mL/min  
Aten.: 32

**TABELA XIV - Resultados da aplicação da metodologia proposta a 25 casos de sangue e urina colhidos de cadáveres humanos, cujos históricos indicam ou não intoxicação por superdose de cocaína.**

Caso	amostra	cocaína CCD	CG	benzoilecgonina CCD	observações
1	urina sangue	+	+	+	histórico de superdose
		+	6,26 µg/mL		
2	urina	+	+	+	
3	sangue	+	2,18 µg/mL		histórico de superdose
4	sangue	+	+		
5	sangue	ND	ND		histórico de superdose DA = 1,0
6	sangue	ND	ND		histórico de superdose
7	sangue	+	2,50 µg/mL		
8	sangue	+	0,869 µg/mL		histórico de superdose
9	sangue	ND	ND		suspeita de superdose
10	sangue	ND	ND		histórico de suicídio por superdose
11	sangue	+	4,43 µg/mL -		histórico de dependência a drogas
12	sangue	+	10,59 µg/mL -		"body packer"
13	sangue urina	ND ND	ND ND	ND	histórico superdose COC, presença fenobarbital

- cont. Tabela XIV -

Caso	amostra	cocaína CCD	CG	benzoilecgonina CCD	observações
14	sangue	+	7,35 µg/mL -		histórico super dose
15	sangue	+	4,08 µg/mL -		histórico de uso de "entorpecentes"
16	sangue	+	2,60 µg/mL -		
17	sangue	ND	ND		verificação de uso de entorpecentes "politraumatismo"
18	sangue urina	+ +	3,36 µg/mL - +	+	histórico de superdose DA = 0,2 g/L
19	sangue	+	3,20 µg/mL -		presença de lidocaína
20	sangue	+	3,42 µg/mL -		histórico de intoxicação exógena
21	sangue	+	18,80 µg/mL -		"body packer" presença lidocaína
22	sangue	+	1,60 µg/mL -		histórico de superdose
23	sangue	+	3,31 µg/mL -		histórico de superdose
24	sangue	+	2,75 µg/mL -		histórico de superdose
25	sangue	+	7,70 µg/mL -		histórico de superdose

ND = não detectado \* abaixo do limite de quantificação

CCD - cromatografia em camada delgada

CG - cromatografia gasosa

COC - cocaína

BEC - benzoilecgonina

## 6. DISCUSSÃO

Este trabalho pretendeu, conforme já descrito anteriormente, apresentar uma metodologia analítica, que possibilite ao toxicologista forense estabelecer um diagnóstico laboratorial inequívoco da intoxicação por *overdose* de cocaína.

Para cumprir tal objetivo, foi necessário adequar a obtenção do maior número possível de parâmetros analíticos às condições existentes nos diversos laboratórios de Toxicologia Forense do Estado de São Paulo, onde, na maioria das vezes, não se dispõe de equipamentos sofisticados para as análises .

Assim, para não comprometer a exeqüibilidade da análise, os critérios de escolha da metodologia a ser testada após revisão da literatura, procuraram na medida do possível se adequar às técnicas cromatográficas de triagem já padronizadas no Serviço Técnico de Toxicologia Forense do IML - sede e otimizá-las para a identificação de cocaína e benzoilecgonina. Esta conduta possibilitou, inclusive, a inserção desses métodos na rotina laboratorial, sem que houvesse a necessidade de utilização de alíquotas adicionais de amostras.

Nas análises toxicológicas, principalmente naquelas com finalidade forense, é fundamental que a especificidade - entre outros parâmetros - seja avaliada criteriosamente,

evitando-se assim erros de interpretação decorrentes da presença de outras substâncias, os chamados interferentes.

O padrão de benzoilecgonina utilizado neste trabalho foi gentilmente cedido pela Organização Mundial de Saúde - OMS, após sucessivas solicitações a diversas instituições. Baseando-nos em dados da literatura<sup>9, 45, 122</sup>, tentamos obter a benzoilecgonina, através da hidrólise alcalina da cocaína. Para tanto, submetemos diferentes alíquotas de solução etanólica de cocaína a 1%, a diferentes valores de pH entre 8 e 10. Obtivemos benzoilecgonina em todas as amostras, numa velocidade e eficiência que não nos foi possível precisar. A separação da benzoilecgonina assim obtida foi feita em placas cromatográficas em camada delgada preparativas e o rendimento, após eluição, não foi considerado satisfatório quando comparado em CCD a 10 µg do padrão.

Os anestésicos locais estudados como interferentes foram os que ocorrem mais freqüentemente como adulterantes na cocaína comercializada no município de São Paulo, sendo este dado análogo ao que ocorre em outras localidades<sup>7, 40, 55</sup>.

A nicotina e a cafeína foram estudadas, devido à possibilidade da presença das mesmas em materiais biológicos, provenientes dos usuários de cocaína.

O propoxifeno, embora em nosso meio não seja um agente importante de letalidade, ao contrário de outros países<sup>34, 87</sup> constitui problema principalmente na análise de material contido em seringas apreendidas, onde sua ocorrência é freqüente. A constatação de que apresenta comportamento analítico semelhante, quando não idêntico à COC, quando submetido a sistemas cromatográficos em CD e CG amplamente utilizados em Laboratórios de Toxicologia<sup>7, 29, 39, 44, 101, 102, 135</sup>, indicou a necessidade de estudá-lo como interferente.

Pelos registros de resultados de análise do Serviço Técnico de Toxicologia Forense, foi verificado, à semelhança de dados internacionais<sup>7</sup>, ser a lidocaína o anestésico local mais freqüentemente detectado como adulterante, o que obviamente aumenta a probabilidade de sua ocorrência nos casos de intoxicação por *overdose* de cocaína<sup>94, 96, 136</sup>. Assim, considerou-se oportuno estudá-lo como interferente após o processo de extração de matrizes enriquecidas. O propoxifeno também foi estudado através deste procedimento, para a verificação da influência do meio biológico e das condições de extração na interferência anteriormente observada, quando do estudo do comportamento cromatográfico em CG e CD da substância pura.

A identificação inequívoca por CCD pressupõe uma padronização bem conduzida. Para tanto, torna-se imperativo a aplicação de uma série de sistemas-solventes que possibilitem, inclusive, a confirmação do resultado, caso seja necessário, mormente quando não há disponibilidade de outra técnica analítica que possa fazê-lo<sup>15, 95</sup>.

Os sistemas-solventes (A) e (B)<sup>29, 37, 98</sup> fazem parte daqueles utilizados na rotina de triagem do Serviço Técnico de Toxicologia Forense, sendo que o sistema (A), dada

sua utilização por outros autores<sup>29, 95</sup>, propiciou comparação dos valores de hRf obtidos para os dois tipos de placas cromatográficas (Tabelas V e VI).

O sistema (C)<sup>77</sup> foi escolhido por ser largamente empregado para fármacos de interesse toxicológico, devido ao seu caráter discriminatório em relação às substâncias endógenas e aos xenobióticos, normalmente presentes nas amostras de urina.

Os solventes (B) e (C) mostraram-se satisfatórios na separação dos fármacos estudados, bem como na análise dos extratos de urina. No entanto, a necessidade de discriminação entre cocaína e propoxifeno exigiu a utilização do sistema-solvente (D)<sup>29</sup> que, à semelhança de outros, onde a dietilamina aparece como componente<sup>16</sup>, propiciou melhor resolução, principalmente otimizando-se o desenvolvimento para 15 cm.

A manutenção da dietilamina sob refrigeração foi crítica na reprodução dos valores de hRf obtidos no sistema (D). Em relação aos sistemas (A) e (C) houve melhora da reprodutibilidade após adoção de conduta de manutenção da amônia sob refrigeração.

Um outro parâmetro gerado pelo sistema (D) para diferenciação entre cocaína e propoxifeno é a coloração: 5  $\mu$ g de cocaína revelados com Iodoplatinato fortemente ácido (HIPt) apresentam a cor vermelha, enquanto 10  $\mu$ g de propoxifeno apresentam descoloração com o referido agente cromogênico. Neste sistema, entretanto, a sensibilidade quanto à intensidade da reação frente aos reveladores estudados foi menor. Outro inconveniente é o desvanecimento rápido da coloração após nebulização.

O Iodoplatinato fortemente ácido (HIPt) foi utilizado como agente cromogênico, devido ao caráter alcalino dos solventes utilizados<sup>28</sup>, e eleito para a revelação da benzoilecgonina, já que a mesma não apresentou coloração diferenciada com DI (Tabela IV) e não foi detectada com suficiente sensibilidade pelo IPT, fato este já reportado por outros autores<sup>68, 71, 132, 134</sup>.

A análise comparativa entre as Tabelas V e VI mostra que, para os fármacos estudados, os valores se assemelharam, porém os desvios-padrão observados evidenciaram que a dispersão em torno do valor-médio foi menor para aqueles obtidos quando foram utilizadas placas cromatográficas prontas (Tabela VII).

Pelas características de estabilidade, pelo poder discriminatório (separação e comportamento dos fármacos frente aos agentes estudados) e pela precisão, escolheu-se o sistema (B) como preferível para a triagem e o sistema (D) para a confirmação, sendo os sistemas (A) e (C) respectivamente, os alternativos.

Assim, distribuíram-se os hRf (Fig. 7), obtidos nos sistemas-solventes (B) e (D), para os diferentes fármacos, em três faixas (hRf 0-30, 30-60 e 60-90) objetivando a visualização simultânea do comportamento das mesmas nos dois sistemas, o que fornece um recurso adicional na interpretação do resultado<sup>95</sup>.

Esta seqüência de padronização mostrou-se útil na identificação de COC e BEC em CCD, o que sugeriu sua utilização no diagnóstico laboratorial de intoxicação por *overdose* dos fármacos padronizados.

As técnicas analíticas que integram um "exame toxicológico" podem ser realizadas em diversos materiais provenientes de necrópsia ou da clínica médica, respectivamente para auxílio-diagnóstico do agente de letalidade ou de morbidade.

A escolha de um dado substrato, no caso de necrópsia, deve levar em consideração características toxicocinéticas dos agentes a serem investigados, e a orientação dessa pesquisa feita pelo histórico de exposição, dado essencial em se tratando de suspeição de intoxicação com envolvimento forense. Normalmente, porém, o que ocorre é a ausência de dados pertinentes ao histórico e o material enviado é composto por sangue, conteúdo estomacal e vísceras (fígado e rim). O sangue é, via de regra, a amostra ideal para se proceder à quantificação, através da qual pode se freqüentemente estabelecer relação com a *causa mortis*<sup>24, 94, 104, 116, 119, 125, 129</sup>.

A urina, embora não disponível com a mesma freqüência, constitui amostra útil para o diagnóstico laboratorial da intoxicação por *overdose*, devido aos valores relativamente altos de COC inalterada e BEC encontrados nesse material. Nos casos provenientes da clínica médica, esse tipo de amostra consiste, juntamente com o sangue, material de envio freqüente.

Dada a possibilidade de hidrólise enzimática e espontânea de cocaína *in vitro* em amostras de sangue e urina, conforme relatado anteriormente, preocupamo-nos em compor um protocolo com normas para a estocagem das amostras a serem submetidas às análises. Optamos pela adição do fluoreto de sódio às amostras de sangue, na concentração de 2,5 mg/mL, preconizada por JAVAID e cols.<sup>72</sup> e pelo congelamento. No caso das amostras de urina, foram apenas congeladas.

É de interesse esclarecer que este procedimento era realizado assim que as amostras davam entrada nas dependências do STTF, não nos sendo possível obter dados exatos sobre as condições de armazenamento anteriores. Este fato torna-se especialmente problemático para as amostras provenientes de postos médico-legais distantes, caso o acondicionamento proposto não tenha sido realizado logo após a colheita, na autópsia.

A inobservância desses critérios de acondicionamento pode comprometer o resultado da análise e conseqüentemente a interpretação do diagnóstico, posto que uma amostra originalmente positiva para cocaína pode resultar negativa, dependendo do tempo decorrido entre a colheita e a análise.

O método preconizado por WALLACE e cols.<sup>134</sup>, utilizado por vários outros autores, na íntegra ou parcialmente<sup>42, 57, 132, 133</sup> foi o primeiro por nós ensaiado. Mostrou-se sensível para a determinação de benzoilecgonina em urina, identificada a partir de 20 µg/mL,

quando 5 ml de urina foram analisados, e para cocaína em concentrações acima de 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A substituição do etanol pelo *n*-butanol<sup>50</sup>, no solvente extrator, conforme o proposto por GARRET & SEYDA<sup>50</sup>, não interferiu na sensibilidade do método, enquanto a adição de NaCl<sup>119</sup> aumentou a eficiência de extração da BEC para 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Com relação aos valores de pH urinários, necessários a uma eficiente recuperação, deverão estar, segundo o autor, entre 5,5 e 9,5, o que cobre perfeitamente a faixa de pH normalmente relacionada à urina. As urinas por nós adicionadas, apresentaram valores de pH entre 6,0 e 7,0.

O procedimento de extração, preconizado por JAIN<sup>65</sup>, também foi testado, porém a detecção ocorreu apenas para urinas enriquecidas com benzoilecgonina com quantidades superiores a 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Foram testadas, também, extrações em valores de pH básico (9-10), através da adição de hidróxido de amônio a 2%, conduta que compõe o procedimento rotineiro para extrações de substâncias de caráter básico em nossos laboratórios. O limite de detecção para este método foi de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Nas extrações feitas por este último procedimento, em amostras onde houve a adição de COC concomitantemente, foi verificado um aparente aumento da recuperação em relação à BEC, o que foi posteriormente elucidado como sendo um artefato, ocorrido por hidrólise da COC devido ao valor alto de pH e ao tempo relativamente longo de extração.

Esse fato motivou a realização de alguns ensaios com urina enriquecidas com COC e alcalinizadas a valores de pH até 10. A eficiência no aparecimento da BEC, variou com o pH e o tempo de extração. Um aumento significativo da BEC ocorreu quando a agitação foi mecânica e por mais de 5 minutos.

Esta constatação corrobora o preconizado por FLETCHER & HANCOCK<sup>45</sup>, segundo o qual os processos analíticos, via de regra, empregados na análise de cocaína, propiciam a superestimação da BEC, o que explicaria os altos teores encontrados.

Os ensaios para o estabelecimento da sensibilidade do método de identificação de COC e BEC, foram realizados primeiramente com urinas de indivíduos vivos, devido à pouca disponibilidade desse material proveniente de cadáveres. A faixa estudada foi de 0,1 a 10,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de COC e 1,0 a 50,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de BEC, valores que se enquadram nas faixas relacionadas nos casos de intoxicação por *overdose*. Os resultados foram os mesmos, independentemente da origem da urina.

A identificação de COC e BEC nos extratos urinários foi realizada no sistema solvente (B) e o agente cromogênico DI utilizado na localização das manchas e a confirmação feita no sistema (D) por nebulização de HIPt.

Cuidados especiais inerentes à técnica cromatográfica em camada delgada foram tomados. Foram utilizadas placas prontas e confeccionadas a fim de homogeneizar as condições de trabalho, pois sabe-se que os valores de  $R_f$  em CCD apresentam variações decorrentes da diversidade de condições climáticas, preparo de cromatoplaças, vedação precária de cubas de desenvolvimento e falta de controle de qualidade dos solventes<sup>14, 95</sup>.

Interferências dos componentes extraíveis de determinado material biológico podem ser minimizados dependendo da "limpeza" dos resíduos, determinada pelas características do solvente extrator, ou pelo número de fases de purificação que compõem o método.

Além desses dados, há ainda os recursos de utilização de amostras biológicas enriquecidas ou extratos "brancos" enriquecidos, que passam então a funcionar como marcadores e indicadores da influência da matriz frente ao método utilizado (padrões de correção).

Em nossa metodologia para identificação de cocaína em urina, tanto em amostras enriquecidas quanto nas autênticas não foram observadas diferenças significativas entre os valores de  $R_f$  dos padrões puros e aqueles correspondentes às bases livres nos extratos das respectivas matrizes.

Os cromatogramas relativos à identificação de COC e BEC de diversos adicionados apresentaram-se, relativamente isentos de interferentes endógenos da urina ou mesmo de caféina e nicotina. Entre os voluntários doadores de urina, havia consumidores habituais de alimentos xantínicos bem como tabagistas.

A boa qualidade dos cromatogramas (Figuras 8 e 9) deve-se provavelmente ao caráter polar da mistura solvente extratora (clorofórmio-etanol 80:20) que, devido a este fato, tem sua capacidade de extração dos interferentes naturais da urina diminuída e, portanto, propicia extratos mais limpos<sup>134</sup>.

A sensibilidade desta metodologia proposta (10  $\mu\text{g/mL}$ ) para BEC está muito aquém daquela observada nos métodos que utilizam o recurso da derivatização da mesma para contornar a dificuldade em sua análise<sup>16, 24, 57, 63, 81, 119, 133</sup>. Para nossos estudos, pudemos apenas selecionar aqueles métodos que não se valem desse recurso<sup>65, 132, 134</sup>, uma vez que não dispúnhamos de padrão em quantidade suficiente para empreender adequadamente os diversos experimentos necessários. Obviamente, a urina foi o material de eleição para os ensaios de identificação da BEC, posto que sua concentração neste material é significativamente maior do que no sangue.

O sangue foi utilizado pela possibilidade de freqüente obtenção e por ser, como já vimos, a amostra mais adequada para quantificação da cocaína e seus produtos de biotransformação. Além disso, propicia o estabelecimento de correlação entre os níveis

encontrados e seus efeitos e conseqüentemente, possibilita a realização do diagnóstico laboratorial da intoxicação por overdose.

Comparativamente à urina, são poucos os trabalhos sobre identificação e quantificação de cocaína e seus produtos de biotransformação em sangue total, o mesmo acontecendo com vísceras. CAMARGO<sup>18</sup>, através de abordagem adequada, realizou revisão bibliográfica relacionada aos aspectos analíticos da cocaína. Foram referidos dados relativos a 35 trabalhos em urina, 15 em sangue e 10 em vísceras, num período compreendido entre 1951 e 1983.

A Tabela XV relaciona aspectos básicos pertinentes às referências analíticas estudadas, no sentido de se propor uma metodologia para identificação e quantificação de cocaína em sangue total.

Como já referimos anteriormente a título de generalidades, a extração de cocaína de sangue total apresenta algumas implicações de ordem analítica, determinada pelas características deste material. Essa dificuldade parece explicar a baixa freqüência de trabalhos que utilizam especificamente sangue total, sendo que a amostra de eleição é o plasma, de impossível obtenção em sangues provenientes de necrópsias.

As sucessivas etapas de purificação realizadas no método proposto, que utiliza a técnica de extração preconizada por SPIEHLER & REED<sup>19</sup>, com a modificação em relação à substituição do cloreto de *n*-butila, pela própria mistura extratora, propiciaram a obtenção de extratos limpos, de fácil dissolução no solvente proposto (clorofórmio-isopropanol 9:1) e fácil e rápida aplicação na cromatoplaca.

Os cromatogramas apresentaram, após nebulização, fácil visualização de cocaína, tanto em termos do *R<sub>f</sub>* quanto da coloração das manchas (Figuras 10 e 11).

A sensibilidade do método foi de 0,5 µg/mL para 5 ml de sangue, sendo que a faixa estudada para amostras enriquecidas foi de 0,1 a 5,0 µg/mL.

A eficiência observada na metodologia proposta para identificação de COC em sangue total levou-nos a testá-la também em outros materiais provenientes de necrópsia.

Em relação ao fígado e ao rim, foram utilizados 5g homogeneizados com 5 ml de água destilada. A extração foi então realizada com 50 mL de clorofórmio-isopropanol (9:1), para manutenção da relação de volume matriz/solvente. Os extratos neste caso também se mostraram satisfatórios para a cromatografia em camada delgada. Alíquotas de 5 g de cérebro também foram extraídas por esse procedimento e a purificação não foi satisfatória quando se utilizou a mistura clorofórmio-isopropanol (9:1) sendo que a substituição da mesma pelo cloreto de *n*-butila, propiciou extratos relativamente isentos da

TABELA XV - Métodos para quantificação de cocaína e seus produtos de biotransformação em sangue e vísceras por cromatografia em fase gasosa.

Autor (ano publicação)	matriz volume (mL) massa (g)	analito	padrão interno	pH de extração	puri- fica- ção	iden- tifi- cação	recu- pera- ção %	sensibi- lidade (ng/mL)
JATLOW <sup>69</sup> (1975)	plasma 2	COC	propilester de benzoilecgonina	9,5	S	DNP	-	5-10
DVORCHIK <sup>38</sup> (1977)	plasma sangue 1-2	COC	etil morfina	11,0	S	DNP	65	20
KOGAN <sup>81</sup> (1977)	plasma 0,5	COC BEC	cloridrato de clorproetazina	9,5	S	DNP DCE	-	5
JAVAJD <sup>72</sup> (1978)	plasma eritrocitos 1,0	COC	-	8,9	S	DCE	65-80	-
PIERCE <sup>102</sup> (1978)	sangue 1,0	COC	prazepam	-	S	DNP	-	-
CHINN <sup>24</sup> (1980)	sangue 2,0	COC BEC	cocaína D <sub>3</sub> benzoilecgonina D <sub>3</sub> -	-	S	CG/EM	-	-
JATLOW <sup>67</sup> (1982)	plasma	COC	n-propilester de benzoilecgonina	9,5	S	DNP	-	5
BALKON <sup>8</sup> (1982)	sangue 1,0	COC	SKF-525A carbocafina	9,5	S	DNP	-	-
GRIESEMER <sup>57</sup> (1983)	sangue 5,0	COC	SKF-525A	-	S	CG/EM	-	15
JACOB <sup>64</sup> (1984)	plasma 1,0	COC	metil m-toluil ecgonina	9,5	S	DNP	-	-

- cont. Tabela XV -

Autor (ano publi- cação)	matriz volume (mL) massa (g)	analito	padrão interno	pH de extra- ção	puri- fica- ção	iden- tifi- cação	recu- pera- ção %	sensibi- dade (ng/mL)
SPIEHLER <sup>119</sup> (1985)	sangue 1,0	COC BEC	cocaína D <sub>3</sub> benzoilecgonina D <sub>3</sub>	7,0	S	CG/EM	-	-
WATTS <sup>135</sup> (1986)	sangue 2,0	COC	SKF-525A	9,0	S	DNP	-	-
JACOB <sup>63</sup> (1987)	plasma 1,0	COC BEC	metil m-toluil ecgonina e m-to luilecgonina	8,5	S	DNP	-	10

analito - substância analisada

COC - cocaína

BEC - benzoilecgonina

D<sub>3</sub> - deutério

DCE - detector de captura de elétrons

DNP - detector de nitrogênio/fósforo

CG/EM - cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massa

- - não constava no trabalho consultado

S - sim

presença de lipídios. Da mesma forma, conteúdo gástrico (5 ml) também foi ensaiado, sendo o volume da mistura extratora mantido em 25 ml e com supressão de uma passagem de purificação. O resultado, por este procedimento, mostrou-se extremamente satisfatório.

A quantificação de COC e eventualmente de seus produtos de biotransformação, é obviamente necessária para se estabelecer com segurança o diagnóstico laboratorial da intoxicação, não obstante as diferenças de susceptibilidade individuais, como já abordado, possam dificultar o estabelecimento dos níveis letais.

Para estabelecer um método que se adequasse às nossas condições laboratoriais, precisamos empreender esforços no sentido de obter êxito primordialmente no processo de extração, pois os procedimentos de purificação deveriam ser especialmente criteriosos, posto que os resíduos se destinariam à técnica de identificação cromatográfica sensível à detecção dos componentes endógenos co-extraíveis do sangue.

A técnica de identificação em questão é a cromatografia de fase gasosa (CG) com detector por ionização em chama (CG-DIC), freqüentemente preterido na análise de cocaína pelo detector específico de nitrogênio/fósforo (DNP), dada sua seletividade e sensibilidade<sup>8, 38, 64, 66, 69, 102, 135</sup>. Até mesmo com a utilização do DNP há a necessidade de purificação, o que possibilita a eliminação de triglicérides e fosfolípidos para os quais há resposta do detector<sup>69</sup>.

No sentido de promover uma extração e uma recuperação satisfatórias, ensaiamos as técnicas de extração preconizadas por SPIHLER & REED<sup>119</sup>, e JACOB e cols.<sup>63, 64</sup>. A opção pela padronização da primeira técnica deu-se em função da recuperação significativamente diminuída apresentada pela segunda bem como a "pureza" dos extratos e resolução cromatográficas prejudicadas.

Foi relevante o fato de que a utilização de tubos de vidro silanizados na etapa de incorporação da cocaína ao sangue, para enriquecimento das amostras, contribuiu para o maior rendimento de extração.

Na otimização do método, as passagens a seguir relacionadas exerceram papel crítico nos resultados obtidos.

. A separação da matriz biológica, através da mistura clorofórmio-isopropanol (9:1), exigiu a formação de "rolhas" de sangue com espessuras inferiores a 10 mm e sobrenadantes límpidos, antes dos respectivos descartes. Se tal fato não ocorresse, as fases eram novamente misturadas através de agitação vigorosa, com adição de mais 2 mL de mistura e novamente centrifugados. A não observância desta conduta resultava em diminuição significativa da porcentagem de recuperação.

. Os tubos da mistura clorofórmio-isopropanol (9:1) levados ao banho de água a 60°C para evaporação (resíduo I), exigiram retirada imediata após a secura, pois nos casos em contrário houve prejuízo na recuperação.

. O tempo de agitação para o estágio da extração, após o processo de purificação, pela adição do bicarbonato de sódio, mostrou-se mais eficaz para 30 segundos, o que pode ser explicado pela diminuição do tempo de exposição da cocaína à solução alcalina, o que diminui a possibilidade de sua conversão à BEC<sup>45, 66, 67</sup>. Este procedimento é de especial importância devido ao pKa da cocaína ser de 8,6, havendo portanto maior probabilidade da mesma ser extraída nesta faixa de pH. Esta constatação contra-indica o uso de agitadores mecânicos, que geralmente demandam um tempo maior na extração, sempre que as condições de alcalinidade forem observadas. Ahamos ainda precedente ser esta a explicação para o maior rendimento observado pelo tamponamento para pH 7,0 na fase da separação, ao invés daquele obtido pelo método de JACOB e cols.<sup>63</sup> e que propicia um contato relativamente longo (29 minutos entre agitação e centrifugação) com a fase alcalina tamponada em pH 8,5.

. A recuperação final do cloreto de *n*-butila deve ser cuidadosa para evitar a transferência de pequena emulsão que se forma na interface das fases (aquosa e cloreto de *n*-butila). A transferência de mais solvente, sem que se observe esse fato, resulta em resíduos, cujos cromatogramas apresentam padrões de perfis não tão satisfatórios (alteração do ruído da linha de base) comprometendo a eficiência da resolução cromatográfica.

O cloreto de *n*-butila, freqüentemente indicado como solvente extrator para fluidos biológicos e tecidos, em substituição àqueles considerados clássicos para tal fim, como, por exemplo, o éter e o clorofórmio<sup>8, 46, 51, 85, 102, 119, 135</sup>, utilizado através de duas passagens de purificação, propiciou a obtenção de extratos, cujas características foram determinantes na possibilidade de quantificação por CG-DIC.

Tentativas no sentido de substituição do cloreto de *n*-butila por outros de ocorrência freqüente nos laboratórios de toxicologia e de menor custo não foram satisfatórias, como atestam os cromatogramas CG reproduzidos na Fig. 18.

A utilização de coluna de separação cromatográfica capilar acoplada ao DIC constituiu um recurso para aumentar a sensibilidade da técnica, o que de fato ocorreu, como demonstra o resultado obtido na verificação do limite de detecção da técnica cromatográfica para cocaína - 5ng - aproximadamente vinte vezes menor que o observado numa coluna cromatográfica empacotada com fase estacionária SE-30, equivalente à DB-1.

A capacidade de resolução da coluna empregada permitiu separação das substâncias interferentes, inclusive endógenas, o que se reveste de particular importância em se tratando de matrizes biológicas complexas. Daí a contribuição enfática dessas colunas para as análises toxicológicas<sup>2, 39, 42, 48, 101, 112, 135</sup>.

Este fator, aliado ao uso do cloreto de *n*-butila como solvente extrator e otimização adequada da técnica de extração, propiciou a obtenção do limite de detecção observado: 0,25 µg/mL, considerado satisfatório para o objetivo proposto, e em

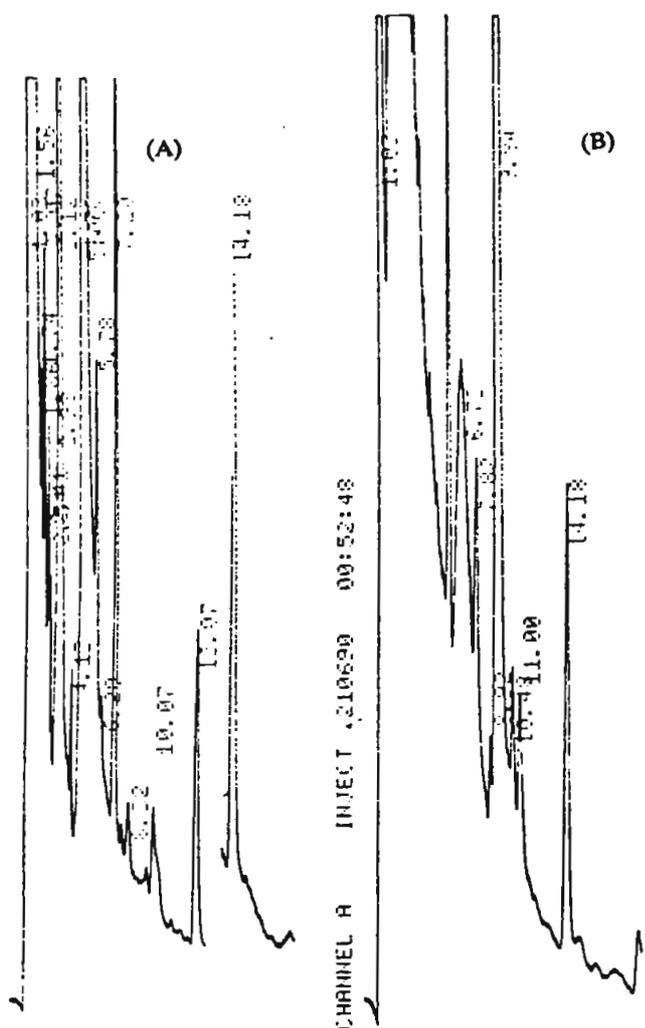


FIGURA 18 - Perfis cromatográficos (CG) de amostras de sangue total, obtidas nas condições padronizadas para quantificação de cocaína, substituindo-se o cloreto de *n*-butila por acetato de *n*-butila (A) e clorofórmio-isopropanol (9:1) (B).

Coluna capilar DB1

Detector: DIC

$T_C = 210^\circ\text{C}$ ;  $T_I = 230^\circ\text{C}$  e  $T_D = 245^\circ\text{C}$

Fluxo ( $\text{H}_2$ ) = 1 mL/min

Aten.: 32

consonância com o reportado por JATLOW e cols.<sup>71</sup>, relativo à detecção em CG por ionização em chama.

A precisão do método foi estudada através das análises de amostras de sangue enriquecidas e verificada inter e intra-ensaios (Tabelas XI e XII).

Os coeficientes de variação das análises realizadas inter-ensaios foram menores que 10%, excluindo-se o obtido para a concentração de 0,25 µg/mL que, exatamente por este motivo, não foi considerado quantificável, posto que assumimos como nível máximo aceitável para imprecisão o coeficiente de variação de 20%<sup>20, 86</sup>.

As análises, cujos resultados integraram os cálculos para obtenção dos coeficientes de variação intra-ensaio, foram realizadas com alíquotas de sangue provenientes da mesma amostra. Isso pode ter contribuído para o fato de estarem os coeficientes de variação obtidos abaixo de 5%, o que se deu muito provavelmente devido à exclusão das variações decorrentes de fatores inter-individuais inerentes às amostras, como, por exemplo, teor de lípidos. Segundo JAVAID e cols.<sup>72</sup> estes interferem na recuperação de COC em amostras de plasma, pois resulta numa maior interface entre a fase orgânica e aquosa.

A recuperação média de 67,8% observada foi satisfatória e compatível com os valores encontrados na literatura para os procedimentos que utilizam estágios sucessivos de purificação<sup>38, 63, 69, 72</sup>. Valores semelhantes de recuperação foram encontrados para tecidos (fígado, rim e cérebro), ensaiados em três experimentos, mostrando que a metodologia proposta para quantificação presta-se também a análises destes materiais.

Por não ter sido possível a obtenção de uma substância que pudesse funcionar como padrão interno estruturalmente semelhante à cocaína, e assim aferir o processo de extração, optamos pela utilização de um padrão de referência. A codeína foi o de escolha para este fim pois é o de eleição em nossos laboratórios para a identificação por CG de substâncias de caráter básico<sup>44</sup> e, assim como o observado por FALK & HARRISON<sup>42</sup>, apresentou em nossas condições, eluição em tempo ótimo para referenciar a separação da cocaína e dos fármacos estudados como interferentes.

A obtenção dos tempos de retenção relativos à codeína para os diferentes fármacos, serviu para a utilização dos mesmos como parâmetros de identificação dos casos onde ocorreram autenticamente (Tabela XIV). A BEC apresentou baixa sensibilidade nas condições cromatográficas estabelecidas e foram necessários 4 µg para haver sinal, cuja intensidade gerada pelo detector correspondesse à área duas vezes maior que aquelas provenientes do resíduo da linha de base.

A lidocaína e o propoxifeno foram extraídos pelo procedimento estudado para a quantificação da COC, sendo que o propoxifeno requereu a realização da CCD como técnica de diferenciação, devido à proximidade entre seu tempo de retenção relativa e aquele observado para a COC (Tabela XIII).

A aplicação da metodologia proposta neste trabalho às amostras selecionadas para estudo permitiu elaborar a Tabela XIV. A análise dos dados mostra que os valores encontrados situam-se entre aqueles considerados como sendo caracteristicamente intoxicação por *overdose*, conforme referências apresentadas à Tabela I.

Apresentaram valores anormalmente altos aqueles cujos históricos se relacionam com os internacionalmente referidos sob a denominação de síndrome de "body-packer", ou seja indivíduos que ingerem pacotes de COC com finalidade de tráfico.

Nos casos positivos para COC, em sangue, com valores relacionáveis com intoxicação por *overdose*, houve positividade também para urina nos casos onde ela foi analisada. Além disso, teores detectáveis de BEC também ocorreram, mostrando ser a urina o material de eleição para a análises desse produto.

A eficiência do processo de extração para sangue, como já relatamos, levou-nos à sua utilização para outras amostras pertencentes aos mesmos casos constantes da Tabela XIV. A Tabela XVI mostra os resultados dessas análises.

Os dados da Tabela XVI permite-nos observar que a análise no fígado e rins sempre forneceu resultados positivos para COC nos casos que apresentaram concentração sanguínea acima de 0,25 µg/mL (limite de detecção do método), à exceção de apenas um caso (número 17) cujo histórico, entretanto, não fazia referência ao uso de dose excessiva e a *causa mortis* foi politraumatismo.

O conteúdo estomacal, sempre que analisado, apresentou teores detectáveis de COC. Cabe ressaltar que numa avaliação semiquantitativa das manchas observadas, para 5,0 ml deste material, analisados pela técnica proposta, quando comparada ao sangue, houve uma concentração significativamente maior, talvez devido ao pH ácido que como já relatamos, constitui situação de impedância de hidrólise espontânea. Por outro lado, a presença de COC em conteúdo estomacal de pessoas cujos históricos referem a via intravenosa de uso, tem sido observação constante e sugere, à semelhança do que ocorre com outros anestésicos locais de caráter básico, a secreção estomacal<sup>19, 36, 114</sup>.

TABELA XVI – Aplicação da metodologia proposta para identificação de cocaína, a amostra de vísceras e conteúdo estomacal de casos, cujos sangue e urina foram ensaiados para esse fim.

caso	amostra	cocaína	
		CCD	CG
2	fígado	+	+
	rim	+	+
	CE	+	+
3	fígado	+	+
	cérebro	+	+
	rim	+	+
	CE	+	+
5	fígado	ND	ND
	rim	ND	ND
8	fígado	+	+
	rim	+	+
	CE	+	+
11	fígado	+	+
	cérebro	+	+
	rim	+	+
	CE	+	+
12	fígado	+	+
	rim	+	+
15	fígado	+	+
	rim	+	+
	CE	+	+
16	fígado	+	+
	rim	+	+
17	fígado	+	+
	cérebro	+	+
	CE	+	+
21	fígado	+	+
	rim	+	+
	CE	+	+
22	fígado	+	+
	rim	+	+
	CE	+	+
25	fígado	+	+
	rim	+	+
	CE	+	+

CE = conteúdo estomacal

+ = identificação positiva para COC

ND = não detectado.

## 7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados experimentais do presente trabalho, apesar das limitações decorrentes das condições em que foi realizado, podemos concluir que:

. amostras de sangue total e urina são suficientes para estabelecimento do diagnóstico laboratorial de intoxicação aguda por cocaína;

. a metodologia proposta para identificação de COC e BEC em amostras de urina permite a qualificação inequívoca destes compostos quando presentes, em caso de intoxicação aguda;

. a metodologia proposta para identificação de COC por CCD em sangue total apresenta sensibilidade compatível com os valores relacionados com a intoxicação aguda; a detecção de teores acima de 0,5  $\mu\text{g/mL}$  (sensibilidade do método) é forte indício de intoxicação letal por *overdose* de cocaína.

. a metodologia proposta para quantificação de COC em sangue total foi conveniente para a determinação de concentrações do fármaco a partir de 0,5  $\mu\text{g/mL}$ , acima da qual, via de regra, se configura a intoxicação por *overdose*;

. a aplicação da metodologia às amostras de sangue e urina nos casos com suspeita de intoxicação por *overdose* foi considerada satisfatória, tendo sido portanto cumprido o objetivo proposto.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (\*)

1. AHMED, M.S.; ZHOU, D.H.; MAULIK, D.; ELDEFRAWI, M.E. - Characterization of cocaine binding protein in human placenta. Life Sci., Elmsford, **46**: 553-61, 1990.
2. ALM, S.; JONSON, S.; KARLSSON, H.; SUNDHOLM, E.G. - Simultaneous gas chromatographic analysis of drugs of abuse on two fused-silica columns of different polarities, J. Chromatogr., Amsterdam, **254**: 179-86, 1983.
3. AMBRE, J. - The urinary excretion of cocaine and metabolites in humans: a kinetic analysis of published data. J. Anal. Toxicol., Niles, **9**: 241-5, 1985.
4. AMBRE, J.J.; BELKNAP, S.M.; NELSON, J.; RUO, T.I.; SHIN, S.G.; ATKINSON, A.J. - Acute tolerance to cocaine in humans. Clin. Pharmacol. Ther., St. Louis, **44**: 1-8, 1988.

(\*) De acordo com a norma NB 66/78 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos de periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACT SERVICE SOURCE INDEX (CASSI) 1990.

5. AMBRE, J.; RUO, T.I.; NELSON, J.; BELKNAP, S. - Urinary excretion of cocaine, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester in humans. J. Anal. Toxicol., Niles, 12: 301-6, 1988.
6. AMON, C.A.; TATE, L.G.; WRIGHT, R.K.; MATUSIAK, W. - Sudden death due to ingestion of cocaine. J. Anal. Toxicol., Niles, 10: 217-8, 1986.
7. BAKER, P.B. & GOUGH, T.A. - The rapid determination of cocaine and other local anesthetics using field tests and chromatography. J. Forensic Sci., Chicago, 24: 847-55, 1979.
8. BALKON, J. & DONNELLY, B. - Determination of basic drugs in post mortem tissues: a microextraction technique utilizing GLC/NPD of effluents. J. Anal. Toxicol., Niles, 6: 181-4, 1982.
9. BASELT, R.C. - Stability of cocaine in biological fluids. J. Chromatogr., Amsterdam, 268: 502-5, 1983.
10. BAUMGARTNER, W.A.; BLACK, C.T.; JONES, P.F.; BLAHD, W.H. - Radioimmunoassay of cocaine in hair: concise communication. J. Nucl. Med., New York, 23: 790-2, 1982.
11. BAUMGARTNER, W.A.; HILL, V.A.; BLAHD, W.H. - Hair analysis for drugs of abuse. J. Forensic Sci., Chicago, 34: 1433-53, 1989.
12. BAXTER, L.R.; SCHWARTZ, J.M.; PHELPS, M.E.; MAZZIOTTA, J.C.; BARRIO, J.; RAWSON, R.A.; ENGEL, J.; GUZE, B.H.; SELIN, C.; SUMIDA, R. - Localization of neurochemical effects of cocaine and other stimulants in the human brain. J. Clin. Psychiatry, Memphis, 49: 23-6, 1988.
13. BENUCK, M.; REITH, M.E.A.; LAITHA, A. - Presence of the toxic metabolite N-hydroxy-norcocaine in brain and liver of the mouse. Biochem. Pharmacol., Oxford, 37: 1169-72, 1988.
14. BOGUSZ, M.; FRANKE, J.P.; WJSBEEK, J.; ZEEUW, R.A. - Influence of biological matrix of retention behaviour and identification possibilities of selected neutral and acidic drugs in thin layer chromatography. An Interlaboratory investigation. J. Anal. Toxicol., Niles, 10: 245-9, 1986.
15. BOGUSZ, M.; WJSBEEK, J.; FRANKE, J.P.; ZEEUW, R.A. - Impact of biological matrix and isolation methods on detectability and interlaboratory variations of TLC Rf-values in systematic toxicological analysis. J. Anal. Toxicol., Niles, 8: 149-54, 1984.

16. BUDD, R.D.; MATHIS, D.F.; YANG, F.C. - TLC analysis of urine for benzoylecgonine and norpropoxyphene. Clin. Toxicol., New York, **16**: 1-5, 1980.
17. BUSTO, U.; BENDAYAN, R.; SELLERS, E.M. - Clinical pharmacokinetics of non-opiate abuse drugs. Clin. Pharmacokinet., Auckland, **16**: 1-26, 1989.
18. CAMARGO, M.M.A. - Cocaina: aspectos toxicológicos e analíticos. São Paulo, 1983. 128 p. [Dissertação Mestrado-Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP].
19. CARVALHO, J.C.A. - Avaliação da transferência placentária da bupivacaína através de sua quantificação no conteúdo gástrico do recém-nascido. São Paulo, 1988. 89 p. [Tese doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas da USP].
20. CHAMBERLAIN, J. - Analysis of drugs in biological fluids., Boca Raton, CRC Press, 1985. p. 1-49.
21. CHANEY, N.E.; FRANKE, J.; WADLINGTON, W.B. - Cocaine convulsions in a breast feeding baby. J. Pediatr., St. Louis, **112**: 134-5, 1988.
22. CHASNOFF, I.J.; BURNS, W.J.; SCHNOLL, S.H.; BURNS, K.A. - Cocaine use in pregnancy. N. Engl. J. Med., Boston, **313**: 666-9, 1985.
23. CHASNOFF, I.J.; BUSSEY, M.E.; SAVICH, R.; STACK, C.M. - Perinatal cerebral infarctation and maternal cocaine use. J. Pediatr., St. Louis, **108**: 456-9, 1986.
24. CHINN, D.M.; CROUCH, D.J.; PEAT, M.A.; FINKLE, B.; JENNISON, T.A. - Gas chromatography - chemical ionization mass spectrometry of cocaine and its metabolites in biological fluids. J. Anal. Toxicol., Niles, **4**: 37-42, 1980.
25. CHOW, M.J.; AMBRE, J.J.; RUO, T.I.; ATKINSON, A.J.; BOWSER, D.J.; FISCHMAN, M.W. - Kinetics of cocaine distribution, elimination, and chronotropic effects. Clin. Pharmacol. Ther., St. Louis, **38**: 318-24, 1985.
26. CHRISTOPOULOS, G.; KIRCH, E.R.; GEARIEN, J.E. - Determination of ethanol in fresh and putrefied post mortem tissues. J. Chromatogr., Amsterdam, **87**: 455-72, 1973.
27. CLARK, D.R. & HAJAR, T.M. - Detection and confirmation of cocaine use by chromatographic analysis for methylecgonine in urine. Clin. Chem., Winston-Salem, **33**: 118-9, 1987.

28. CLARKE, E.G.C. - Isolation and identification of drugs, London, Pharmaceutical Press, 1978. p. 267, 268, 801.
29. CLARKE's isolation and identification of drugs. 2. ed. London, Pharmaceutical Press, 1986. p. 86, 162, 167, 385, 489, 490, 1170.
30. CONE, E.J.; KUMOR, K.; THOMPSON, L.K.; SHERER, M. - Correlation of saliva cocaine levels with plasma levels and with pharmacologic effects after intravenous cocaine administration in human subjects. J. Anal. Toxicol., Niles, 12: 200-6, 1988.
31. CONE, E.J. & MENCHEN, S.L. - Stability of cocaine in saliva. Clin. Chem., Winston-Salem, 34: 1508, 1988.
32. CONE, E. & WEDDINGTON, J.W.W. - Prolonged occurrence of cocaine in human saliva and urine after chronic use. J. Anal. Toxicol., Niles, 13: 65-8, 1989.
33. CRAVEY, R.H. - Cocaine deaths in infants. J. Anal. Toxicol., Niles, 12: 354-5, 1988.
34. CRAVEY, R.H.; SHAW, R.F.; NAKAMURA, G.R. - Incidence of propoxyphene poisoning: a report of fatal cases. J. Forensic Sci., Chicago, 19: 72-80, 1974.
35. CREMONESI, E. - Interação de cocaína com a anestesia. Relato de um caso. Rev. Bras. Anest., São Paulo, 33: 185-7, 1983.
36. DATTA, S.; HOULE, G.L.; FOX, B.S. - Concentration of lidocaine hydrochloride in newborn gastric fluid after elective caesarean section and vaginal delivery with epidural analgesia. Can. Anaesth. Soc. J., Toronto, 22: 79-83, 1975.
37. DELLA CASA, E. & MARTONE, G. - A quantitative densitometric determination of heroin and cocaine samples by high-performance thin-layer chromatography. Forensic Sci. Int., Lausanne, 32: 117-20, 1986.
38. DVORCHIK, B.H.; MILLER, S.H.; GRAHAM, W.P. - Gas chromatographic determination of cocaine in whole blood and plasma using a nitrogen-sensitive flame ionization detector. J. Chromatogr., Amsterdam, 135: 141-8, 1977.

39. EHRESMAN, D.J.; PRICE, S.M.; LAKATUA, D.J. - Screening biological samples for underivatized drugs using a splitless injection technique on fused silica capillary column gas chromatography. J. Anal. Toxicol., Niles, 9: 55-62, 1985.
40. ELLENHORN, M.J. & BARCELOUX, D.G. - Medical toxicology. New York, Elsevier, 1988. p. 644-61.
41. ETTINGER, N.A.; ALBIN, R.J. - A review of the respiratory effects of smoking cocaine. Am. J. Med., New York, 87: 664-8, 1989.
42. FALK, P.M. & HARRISON, B.C. - Use of DB-1 capillary columns in the CG/FID Analysis of benzoylecgonine. J. Anal. Toxicol., Niles, 9: 273-4, 1985.
43. FARRAR, H.C. & KEARNS, G.L. - Cocaine: clinical pharmacology and toxicology. J. Pediatr., St. Louis, 115: 665-75, 1989.
44. FINKLE, B.; CHERRY, E.J.; TAYLOR, D.M. - A GLC based system for the detection of poisons, drugs and human metabolites encountered in forensic toxicology J. Chromatogr. Sci., Amsterdam, 9: 393-419, 1971.
45. FLETCHER, S.M. & HANCOCK, V.S. - Potential errors in benzoylecgonine and cocaine analysis. J. Chromatogr., Amsterdam, 206: 193-5, 1981.
46. FOERSTER, E.H.; MASON, M.S.; MASON, M.F. - Preliminary studies on the use of n-butyl chloride as an extractant in a drug screening procedure. J. Forensic Sci., Chicago, 19: 155-62, 1974.
47. FOLTIN, R.W.; FISCHMAN, M.W.; PEDROOS, J.J.; PEARLSON, D. - Marijuana and cocaine interactions in humans: cardiovascular consequences. Pharmacol. Biochem. Behav., Phoenix, 28: 459-64, 1987.
48. FRETTHOLD, D.; JONES, P.; SEBROSKY, G.; SUNSHINE, I. - Testing for basic drugs in biological fluids by solvent extraction and dual capillary GC/NPD. J. Anal. Toxicol., Niles, 10: 10-4, 1986.
49. GALLOWAY, M.P. - Neurochemical interactions of cocaine with dopaminergic systems. Trends Pharmacol. Sci., Amsterdam, 9: 451-4, 1988.
50. GARRETT, E.R. & SEYDA, K. - Prediction of stability in pharmaceutical preparations XX: stability evaluation and bioanalysis of cocaine and benzoylecgonine by high-performance liquid chromatography. J. Pharm. Sci., Washington, 72: 258-71, 1983.

51. GARRIOT, J.C.; LATMAN, N. - Drug detection in cases of "driving under the influence" - J. Forensic Sci., Chicago, 21: 398-415, 1976.
52. GAWIN, F.H. - Chronic neuropharmacology of cocaine: progress in pharmacotherapy. J. Clin. Psychiatry, Memphis, 49(2S): 11-6, 1988.
53. GAWIN, F.H. - Laboratory assessments in treatments of substance abuse: utilization and effects on treatment design. Clin. Chem., Winston-Salem, 33(11B): 95B-100B, 1987.
54. GAWIN, F.H. & ELLINWOOD JR, E.H. - Cocaine and other stimulants: actions, abuse and treatment. N. Engl. J. Med., Boston, 318: 1173-82, 1988.
55. GOUGH, T.A. & BAKER, P.B. - Identification of major drugs of abuse using chromatography. J. Chromatogr. Sci., Niles, 20: 289-329, 1982.
56. GRAHAM, K.; KOREN, G.; KLEIN, J.; SCHNEIDERMAN, J.; GREENWALD, M. - Determination of gestational cocaine exposure by hair analysis. JAMA J. Am. Med. Assoc., Chicago, 262: 3328-30, 1989.
57. GRIESEMER, E.C.; LIU, Y.; BUDD, R.D.; RAFTOGIANIS, L.A.S.; NOGUCHI, T.T. - The determination of cocaine and its major metabolite, benzoylecgonine, in postmortem fluids and tissues by computerized gas chromatography mass spectrometry. J. Forensic Sci., Chicago, 28: 894-900, 1983.
58. HACKETT, L.P.; DUSCI, L.J.; HETT, K.F. - The analysis of several nonopiate narcotic analgesics and cocaine in serum using high-performance liquid chromatography. J. Anal. Toxicol., Niles, 11: 269-71, 1987.
59. HOWELL, S.L.; EZELL, A.L. - An example of cocaine tolerance in a gunshot wound fatality. J. Anal. Toxicol., Niles, 14: 60-1, 1990.
60. HURD, Y.L.; WEISS, F.; KOOB, G.; UNGERSTEDT, U. - The influence of cocaine self administration on "in vivo" dopamine and acetylcholine neurotransmission in rat caudate putamen. Neurosci. Lett., Shannon, 109: 227-33, 1990.
61. INABA, T. - Cocaine: pharmacokinetics and biotransformation in man. Can. J. Physiol. Pharmacol., Ottawa, 67: 1154-7, 1989.
62. INABA, T.; STEWART, D.J.; KALOW, W. - Metabolism of cocaine in man. Clin. Pharmacol. Ther., St. Louis, 23: 547-52, 1978.

63. JACOB, P.; BAKER, B.A.E.; JONES, R.T.; BENOWITZ, N.L. - Determination of benzoylecgonine and cocaine in biologic fluids by automated gas chromatography. J. Chromatogr., Amsterdam, 417: 277-86, 1987.
64. JACOB, P.; BAKER, B.A.E.; JONES, R.J.; BENOWITZ, N.L. - Determination of cocaine in plasma by automated gas chromatography. J. Chromatogr., Amsterdam, 306: 173-81, 1984.
65. JAIN, N.C. - Thin-layer chromatographic screening and confirmation of basic drugs of abuse in urine. J. Chromatogr., Amsterdam, 115: 519-26, 1975.
66. JATLOW, P.I. - Cocaine: Analysis, pharmacokinetics and metabolic disposition. Yale J. Biol. Med., New Haven, 61: 105-13, 1988.
67. JATLOW, P.I. - Cocaine by GLC and nitrogen detector. In: SUNSHINE, I. & JATLOW, P.I., eds. - Methodology for analytical toxicology, Boca Raton, CRC Press, 1982. p. 133-137.
68. JATLOW, P.I. - Drug of abuse profile: cocaine. Clin. Chem., Winston-Salem, 33(11B): 66B-71B, 1987.
69. JATLOW, P.I. & BAILEY, D.N. - Gas-chromatographic analysis for cocaine in human plasma, with use of a nitrogen detector. Clin. Chem., Winston-Salem, 21: 1918-21, 1975.
70. JATLOW, P.; BARASH, P.G.; VANDYKE, C.; RADDING, J.; BYCK, R. - Cocaine and succinylcholine sensitivity: a new caution. Anesth. Analg., New York, 58:235-8, 1979.
71. JATLOW, P.; VAN DYKE, C.; BARASH, P.; WILKINSON, P.; BYCK, R. - Analysis of cocaine and its metabolites in human biological fluids: technical, metabolic and pharmacokinetics considerations. In: JERI, F.R., ed. Cocaine 1980, Lima, Pacific Press, 1980. p. 111-9. Proceeding of the Interamerican Seminar on Coca and Cocaine.
72. JAVAID, J.I.; DEKIRMENJIN, H.; DAVIS, J.M.; SCHUSTER, C.R. - Determination of cocaine in human urine plasma and red blood cells by gas - liquid chromatography. J. Chromatogr., Amsterdam, 152: 105-13, 1978.
73. JEFFCOAT, A.R.; REYS, P.M.; HILL, J.M.; SADLER, B.M.; COOK, C.E. - Cocaine disposition in humans after intravenous injection, nasal insufflation (snorting) or, smoking. Drug Metab. Dispos., Baltimore, 17: 153-9, 1989.

74. JOERN, W.A. - Routine detection of benzoylecgonine in urine at a sensitivity of 35 ng/mL by a combination of EMIT and gas chromatography mass spectrometry. - J. Anal. Toxicol., Niles, 11: 110-2, 1987.
  75. JOHANSON, C.E. & FISCHMAN, M.W. - The pharmacology of cocaine related to its abuse. Pharmacol. Rev., Baltimore, 41: 3-52, 1989.
  76. JONES, L.F. - Central mechanisms of action involved in cocaine induced tachycardia. Life Sci., Elmsford, 46: 723-8, 1990.
  77. KAISTHA, K.K.; JADRUS, R.; JANDA, R. - Simultaneous detection of a wide variety of commonly abused drugs in a urine screening program using thin - layer identification techniques. J. Chromatogr., Amsterdam, 107: 359-79, 1975.
  78. KARCH, S.B. & BILLINGHAM, M.E. - The pathology and etiology of cocaine - induced heart disease. Arch. Pathol. Lab. Med., Chicago, 112: 225-30, 1988.
  79. KEITH, L.G.; MAC GREGOR, S.; FRIEDEL, S.; ROSNER, M.; CHASNOFF, I.J.; SCIARRA, J.J. - Substance abuse in pregnant women: recent experience at the perinatal center for chemical dependence of North Western Memorial Hospital, Obstet. Gynecol., New York, 73: 715-20, 1989.
  80. KLONOFF, D.C.; ANDREWS, B.T.; OBANA, W.G. - Stroke associated with cocaine use. Arch. Neurol., Chicago, 46: 989-93, 1989.
  81. KOGAN, M.J.; VEREBY, K.G.; De PACE, A.C.; RESNICK, R.B.; MULÉ, S.J. - Quantitative determination of benzoylecgonine and cocaine in human biofluids by gas-liquid chromatography. Anal. Chem., Washington, 49: 1965-9, 1977.
  82. LINDGREEN, J.E. - Guide to the analysis of cocaine and its metabolites in biological material. - J. Ethnopharmacol., Lausanne, 3: 337-51, 1981.
  83. LITTLE, B.B.; SNELL, L.M.; KLEIN, V.R.; GILSTRATT III, L.C. - Cocaine abuse during pregnancy: maternal and fetal implications Obstet. Gynecol., New York, 73: 157-60, 1989.
  84. LIU, Y.; BUDD, R.D.; GRIESEMER, E.C. - Study of the stability of cocaine and benzoylecgonine, its major metabolite, in blood samples. J. Chromatogr., Amsterdam, 248: 318-20, 1982.
-

85. LUNDBERG, G.D.; GARRIOT, J.C.; REYNOLDS, P.C.; CRAVEY, R.N.; SHAW, R.F. - Cocaine - related death. J. Forensic Sci., Chicago, **22**: 402-8, 1977.
86. Mc BAY, A.J. - Drug - analysis technology - pitfalls and problems of drug testing. Clin. Chem., Winston-Salem, **33**(11B): 33B-40B, 1987.
87. Mc BAY, A.J. - Propoxyphene and norpropoxyphene concentrations in blood and tissues in cases of fatal overdose. Clin. Chem., Winston-Salem, **22**: 1319-21, 1976.
88. MARC, B.; BAUD, F.; AELION, M.J.; GUERARDI, R.; BERGER, O.D.; BLERY, M.; BISMUTH, C. - The cocaine body-packer syndrome: evaluation of a method of contrast study of the bowel. J. Forensic Sci., Chicago, **35**: 345-55, 1990.
89. MATSUBARA, K.; MASEDA, C.; FUKUI, Y. - Quantitation of cocaine, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester by CG-CI-SIM after extrelut<sup>R</sup> extraction. Forensic Sci. Int., Lausane, **26**: 181-92, 1984.
90. MATTA CHASIN, A.A. da & MIDIO, A.F. - Cocaine - related problems in the city of São Paulo, 1982-1986. Bull. Narc., New York, **41**: 99-101, 1989.
91. MILLER, J.C. & MILLER, J.N. - Statistics for analytical chemistry 2 ed., Chichester, Ellis Horwood, 1988. 227 p.
92. MITTLEMAN, R.E.; COFINO, J.; HEARN, W.L. - Tissue distribution of cocaine in a pregnant woman. J. Forensic Sci., **34**: 481-6, 1989.
93. MITTLEMAN, R.E. & WETLI, C.V. - Cocaine and sudden "natural" death. J. Forensic Sci., Chicago, **32**: 11-9, 1987.
94. MITTLEMAN, R.E. & WETLI, C.V. - Death caused by recreational cocaine use. JAMA J. Am. Med. Assoc., Chicago, **252**: 1889-93, 1984.
95. MORAES, E.C.F. & SZNELWAR, R.B. - Identificação de fármacos de caráter básico e neutro por cromatografia em camada delgada. Rev. Soc. Bras. Toxicol., Salvador, **1**: 29-32, 1988.
96. NAKAMURA, G.R. & NOGUCHI, T.T. - Fatalities from cocaine overdoses in Los Angeles county. Clin. Toxicol., New York, **18**: 895-905, 1981.
97. NANDKUMAR, S.S.; MAY, D.A.; YATES, J.D. - Disposition of levo - [ <sup>3</sup>H ] Cocaine in pregnant and nonpregnant mice. Toxicol. Appl. Pharmacol., New York, **53**: 279-84, 1980.

98. NOIRFALISE, A. - Mise en évidence et différenciation de quelques stimulants et dépresseurs du système nerveux central par chromatographie sur couche mince. J. Chromatogr., Amsterdam, 20: 61-77, 1965.
99. ODERDA, G.M. & KLEIN - SCHWARTZ, W. - Cocaine In: SKOUTAKIS, V.A., ed. - Clinical toxicology of drugs. Philadelphia, Lea & Febiger, 1982. p. 201-15.
100. PENG, S.K.; FRENCH, W.J.; PELIKAN, P.C.D. - Direct cocaine cardiotoxicity demonstrated by endomyocardial biopsy. Arch. Pathol. Lab. Med., Chicago, 113: 842-5, 1989.
101. PERRIGO, B.J.; PEEL, H.W.; BALLANTYNE, D.J. - Use of dual-column fused-silica capillary gas chromatography in combination with detector response factors for analytical toxicology. J. Chromatogr., Amsterdam, 341: 81-8, 1985.
102. PIERCE, W.O.; LAMOREAUX, T.C.; URRY, F.M. - A new rapid gas chromatography method for the detection of basic drugs in postmortem blood, using a nitrogen phosphorus detector. Part I. Qualitative analysis. J. Anal. Toxicol., Niles, 2: 26-31, 1978.
103. POKLIS, A. - Evaluation of TDx Cocaine metabolite assay. J. Anal. Toxicol., Niles, 11: 228-30, 1987.
104. POKLIS, A.; MACKELL, M.A.; GRAHAM, M. - Disposition of cocaine in fatal poisoning in man. J. Anal. Toxicol., Niles, 9: 227-9, 1985.
105. POST, R.M. & KOPANDA, R.T. - Cocaine, kindling, and reverse tolerance. Lancet, London, 1: 409-10, 1975.
106. QUANDT, C.M.; SOMMI, R.W.; PIPKIN, T.; McCALLUM, M.H. - Differentiation of cocaine toxicity: role of the toxicology drug screen- Drug Intell. Clin. Pharm., Hamilton, 22: 582-7, 1988.
107. RITZ, M.C.; CONE, E.J.; KUHAR, M.J. - Cocaine inhibition at dopamine, norepinephrine and serotonin transporters: a structure activity study. Life Sci., Elmsford, 46(9): 635-45, 1990.
108. RITZ, M.C.; LAMB, R.J.; GOLDBERG, S.R.; KUHAR, M.J. - Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self administration of cocaine. Science, Washington, 237: 1219-23, 1987.

109. ROWBOTHAM, M.C.; HOOKER, W.D.; MENDELSON, J.; JONES, R.T. - Cocaine calcium channel antagonist interactions. Psychopharmacology, Berlin, 93: 152-4, 1987.
  110. RUBIA, L.B. & GOMEZ, R. - TLC sensitivity of six modifications of Dragendorff's reagent. J. Pharm. Sci., Washington, 66: 1656-7, 1977.
  111. SANDER, R.; RYSER, M.A.; LAMOREAUX, T.C.; RALEIGH, K. - An epidemic of cocaine associated deaths in Utah. J. Forensic Sci., Chicago, 30: 478-84, 1985.
  112. SCHEPERS, P.; WJSBEEK, J.; FRANKE, J.P.; ZEEUW, R.A. - Applicability of capillary gas chromatography to substance identification in toxicology by means of retention indices. J. Forensic Sci., Chicago, 27: 49-60, 1982.
  113. SHARKEY, J.; RITZ, M.C.; SCHENDEN, J.A.; HANSON, R.C.; KUJAR, M.J. - Cocaine inhibits muscarinic cholinergic receptors in heart and brain. J. Pharmacol. Exp. Ther., Baltimore, 246: 1048-52, 1988.
  114. SHORE, P.A.; BRODIE, B.B.; HOGBEN, C.A. - The gastric secretion of drugs: a pH partition hypothesis. J. Pharmacol. Exp. Ther., Baltimore, 119: 361-9, 1957.
  115. SIMS, D.N. - Death due to combined overdose of cocaine and heroin. Bull. Int. Assoc. Forensic Toxicol., Berks, 19: 11-2, 1987.
  116. SMART, R. & ANGLIN, S. - Do we know the lethal dose of cocaine? J. Forensic Sci., Chicago, 32: 303-12, 1987.
  117. SNYDER, C.A.; WOOD, R.W.; GRAEFE, J.F.; BOWER, A.; MAGAR, K. - Crack smoke is a respirable aerosol of cocaine. Pharmacol. Biochem. Behav., Phoenix, 29: 93-5, 1988.
  118. SPERRY, K. & SEENEY, E.S. - Suicide by intravenous injection of cocaine. A report of three cases. J. Forensic Sci., Chicago, 34: 244-8, 1989.
  119. SPIEHLER, V.R. & REED, D. - Brain concentrations of cocaine and benzoylecgonine in fatal cases. J. Forensic Sci., Chicago, 30: 1003-11, 1985.
  120. SPIEHLER, V.R. & SEDGWICK, P. - Radioimmunoassay screening and GC/MS confirmation of whole blood samples for drugs of abuse. J. Anal. Toxicol., Niles, 9: 63-6, 1985.
-

121. STEWART, D.J.; INABA, T.; KALOW, W. - N-demethylation of cocaine in rat and isolated rat hepatocytes: comparison with aminopyrine demethylation. J. Pharmacol. Exp. Ther., Baltimore, 207: 171-7, 1978.
122. STEWART, D.J.; INABA, T.; LUCASSEN, M.; KALOW, W. - Cocaine metabolism: cocaine and norcocaine hydrolysis by liver and serum esterases. Clin. Pharmacol. Ther., St. Louis, 25: 464-8, 1979.
123. STEWART, D.J.; INABA, T.; TANG, B.K.; KALOW, W. - Hydrolysis of cocaine in human plasma by cholinesterase. Life Sci., Elmsford, 20: 1557-64, 1977.
124. SVENSSON, J.O. - Determination of benzoylecgonine in urine from drug abusers using ion pair high performance liquid chromatography. J. Anal. Toxicol., Niles, 10: 122-4, 1986.
125. SWANSON, K.L. & ALBUQUERQUE, E.X. - Nicotinic acetylcholine receptor ion channel blockade by cocaine: the mechanism of synaptic action. - J. Pharmacol. Exp. Ther., Baltimore, 243: 1202-10, 1987.
126. TARDIFF, K.; GROSS, E.; WU, J.; STAJIC, M.; MILLMAN, R. - Analysis of cocaine - positive fatalities. J. Forensic Sci., Chicago, 34: 53-63, 1989.
127. TARR, J.E. & MACKLIN, M. - Cocaine. Pediatr. Clin. North Am., Philadelphia, 34: 319-31, 1987.
128. TAYLOR, R.W.; JAIN, N.C.; GEORGE, M.P. - Simultaneous identification of cocaine and benzoylecgonine using solid phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry. J. Anal. Toxicol., Niles, 11: 233-4, 1987.
129. TEBBET, I.R. & CARTNEY, Q.W. - A rapid method for the extraction of cocaine and benzoylecgonine from body fluids. Forensic Sci. Int., Lausanne, 39: 287-91, 1988.
130. THOMPSON, L.K.; YOUSEFNEJAD, D.; KUMOR, K.; SHERER, M.; CONE, E.J. - Confirmation of cocaine in human saliva after intravenous use. J. Anal. Toxicol., Niles, 11: 36-8, 1987.
131. TROUVE, R. & NAHAS, G. - Nitrendipine: an antidote to cardiac and lethal toxicity of cocaine. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., New York, 183: 392-7, 1986.

132. WALLACE, J. E.; HAMILTON, H. E.; CHRISTENSON, J. G.; SHIMEK, E.L.; LAND, P.; HARRIS, S.C. - An evaluation of selected methods for determining cocaine and benzoylecgonine in urine. J. Anal. Toxicol., Niles, **1**: 20-6, 1977.
  133. WALLACE, J.E.; HAMILTON, H.E.; KING, D.E.; BOSON, D.J.; SCHWERTNER, H.A.; HARRIS, S.C. - Gas-liquid chromatographic determination of cocaine and benzoylecgonine in urine. Anal. Chem., Washington, **48**: 34-8, 1976.
  134. WALLACE, J.E.; HAMILTON, H.E.; SCHWERTNER, H.; KING, D.E. - Thin - layer chromatographic analysis of cocaine and benzoylecgonine in urine. J. Chromatogr., Amsterdam, **114**: 433-40, 1975.
  135. WATTS, V.W. & SIMONICK, T.F. - Screening of basic drugs in biological samples using dual column capillary chromatography and nitrogen - phosphorus detectors. J. Anal. Toxicol., **10**: 198-204, 1986.
  136. WETLI, C.V. & FISHBAIN, D.A. - Cocaine - induced psychosis and sudden death in recreational cocaine users. J. Forensic Sci., Chicago, **30**: 873-80, 1985.
  137. WEISS, R.D.; GOLDENHEIM, P.D.; MIRIN, S.M.; HALES, C.A.; MENDELSON, J.H. - Pulmonary dysfunction in cocaine smokers. Am. J. Psychiatry, Washington, **138**: 1110-2, 1981.
  138. WETLI, C.V. & MITTLEMAN, R.E. - The following ingestion of illicit drugs packaged for transportation. J. Forensic Sci., Chicago, **26**: 492-500, 1981.
  139. WILKINSON, P.; VAN DYKE, C.; JATLOW, P.; BARASH, P.; BYCK, R. - Intranasal and oral cocaine kinetics. Clin. Pharmacol. Ther., St. Louis, **27**: 386-94, 1980.
  140. WILLIAMS, F.M. - Clinical significance of esterases in man. Clin. Pharmacokinet., Auckland, **10**: 392-403, 1985.
  141. WINEK, C.L. & EASTLY, T. - Cocaine identification. Clin. Toxicol., New York, **8**: 205-10, 1975.
  142. WINEK, C.L.; WAHBA, W.W.; ROZIN, L.; JANSSEN, J.K. - An unusually high blood cocaine concentration in a fatal case. J. Anal. Toxicol., Niles, **11**: 43-6, 1987.
-