

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

- COCAÍNA E COCAETILENO -
influência do etanol nas concentrações
de cocaína em sangue humano *post mortem*

ALICE A. DA MATTA CHASIN

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Titular ANTONIO FLÁVIO MÍDIO

São Paulo

1996

15330

15330-F



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

C487c Chasin, Alice Aparecida da Matta
Cocaína e cocaetileno : influência do etanol nas concentrações de
cocaína em sangue humano *post mortem* / Alice Aparecida da Matta
Chasin. -- São Paulo, 1996.
141p.

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

Orientador: Mídio, Antonio Flávio

I. Cocaína : Toxicologia 2. Toxicologia : Forense I. T. II. Mídio,
Antonio Flávio, orientador.

615.9523214 CDD

ALICE A. DA MATTA CHASIN

- COCAÍNA E COCAETILENO -
influência do etanol nas concentrações
de cocaína em sangue humano *post mortem*

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Prof. Tit. *Antonio Flávio Mídio*

Presidente e Orientador

Profª. Dra. *Carmem Cinira Santos Martin*

1º. Examinador

Prof. Dr. *Daniel Romero Muñoz*

2º. Examinador

Profª. Dra. *Yara Araújo*

3º. Examinador

Prof. Dr. *Ovandir Alves Silva*

4º. Examinador

São Paulo, 04 de fevereiro de 1997.

Dedico este trabalho

*a meus pais e à minha querida “nona”
por terem me indicado os caminhos,*

*a Carol e André
que, espero, entendam-no como um
exemplo de perseverança,*

*ao Moshe
pelos inúmeros momentos difíceis que lhe
foram impostos...*

Em especial

*ao Prof. Antonio Flávio Mídio,
pela orientação, confiança, amizade
e incentivo constantes,*

*ao Prof. Rodger L. Foltz,
pelos ensinamentos, apoio e amizade,*

*ao Dr. David Andrenyak
pela carinhosa ajuda.*

Agradecimentos

Às diretorias do Instituto Médico Legal de São Paulo e de seu Serviço Técnico de Toxicologia Forense, pelo apoio e inestimável colaboração na realização deste projeto.

À prof^ª Titular. M. A. Pourchet-Campos, diretora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Bioquímicas "Oswaldo Cruz", pelo incentivo.

Aos Coordenadores do Programa de Pós-graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento - CNPq -, pela concessão da bolsa de estudo modalidade "doutorado-sandwich" na University of Utah.

Aos funcionários do Center for Human Toxicology, da University of Utah, Salt Lake City, e em especial ao Dr. Douglas Rollins, pelo carinho e entusiasmo com que acolheram a mim e à minha família durante nossa estadia naquela cidade.

Aos funcionários do Serviço Técnico de Toxicologia Forense do IML-SP, pela compreensão, e em especial à Aparecida Marisa Rocha pela efetiva ajuda na parte técnica.

À prof^ª Dra. Irene Videira de Lima, pela ajuda, companheirismo e amizade sempre presentes e por todos os momentos de discussões e reflexões.

À Débora Gonçalves de Carvalho, pelo carinho com que se responsabilizou por minhas atribuições funcionais nos momentos em que me afastei para realizar este trabalho.

À Varian, Indústria e Comércio Ltda, pela doação das colunas de fase sólida e pela permissão para que utilizasse seus equipamentos cromatográficos; em especial, a Paulo Bernardo, pela ajuda na elaboração analítica em espectrometria de massa, e ao Luis Ricate Lopes que, em todas as etapas, facilitou a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Controle e Pesquisas Antidopagem do Jockey Club de São Paulo, pela efetiva colaboração na parte analítica, e em especial à Myriam C. Salvadori pelo carinho, apoio e sugestões.

À Maristela H. Andraus, pelo carinho na execução das figuras e valiosas discussões e sugestões.

Ao Departamento de Estatística, do Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo, pela elaboração da análise estatística; em especial aos professores Dr. Dalton Francisco de Andrade e Rinaldo Artes e à aluna Adriana Sañudo, pela colaboração nas considerações conclusivas.

Ao prof. Titular Naim Sauaia, do Departamento de Medicina Preventiva da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, cujo entusiasmo em ensinar a disciplina de Estatística, despertou-me o interesse em aprendê-la.

Ao prof Moacyr Lobo, do Departamento de Estatística da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, pelas valiosas horas de discussão sobre o tratamento estatístico.

À Moema Rodrigues dos Santos, pela normalização das referências bibliográficas.

À prof^a Ivone Daré Rabello, pelo trabalho de revisão gramatical e ortográfica do texto.

CONTEÚDO

LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
SUMMARY.....	xv
1 - INTRODUÇÃO.....	01
2 - ASPECTOS GERAIS DA EXPOSIÇÃO HUMANA	
À COCAÍNA.....	04
2.1 Padrões de uso.....	04
2.2 Disposição cinética.....	10
2.3 Parâmetros farmacológico e toxicocinéticos.....	19
2.4 Mecanismos de toxicidade da cocaína.....	25
2.5 Tolerância, dependência e síndrome de abstinência.....	28
2.6 Espectro dos efeitos tóxicos decorrentes do uso abusivo.....	31
2.7 A interação cocaína e etanol.....	36
2.7.1 Toxicidade do cocaetileno.....	40
2.8 Fluidos e tecidos utilizados na caracterização da exposição humana à cocaína.....	44
2.9 Cocaína como agente da <i>causa mortis</i>	51
2.9.1 Efeitos tóxicos relacionados à letalidade.....	52
2.9.2 Letalidade e achados de necropsia.....	53
2.9.3 Teores sanguíneos de COC, BE, EME e CE em casos <i>post mortem</i>	55

3 - OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO.....	59
4 - MATERIAL E MÉTODOS.....	61
4.1 Casuística.....	61
4.2 Metodologia analítica.....	62
4.2.1 Metodologia proposta para análise de cocaína, benzoilecgonina, estermetilecgonina e cocaetileno em sangue total.....	62
4.2.2 Validação do método proposto.....	69
4.2.2.1 Especificidade.....	69
4.2.2.2 Preparação da curva de calibração.....	69
4.2.2.3 Parâmetros de confiança.....	70
4.3 Determinação de cocaína, benzoilecgonina, estermetilecgonina e cocaetileno em sangue total nas amostras selecionadas para estudo.....	72
4.4 Determinação de etanol em sangue total nas amostras selecionadas para estudo.....	73
4.5 Análise estatística dos resultados.....	73
5 - RESULTADOS.....	75
5.1 Metodologia analítica.....	75
5.1.1 Identificação dos analitos.....	75
5.1.2 Validação do método proposto.....	75
5.1.2.1 Especificidade.....	75
5.1.2.2. Curvas de calibração.....	76
5.1.2.3 Parâmetros de confiança do método	76
5.2 Determinação de cocaína, benzoilecgonina, éster metilecgonina e cocaetileno em sangue total nas amostras selecionadas para estudo.....	76
5.3 Determinação de etanol em sangue total nas amostras selecionadas para estudo.....	77
5.4 Análise estatística dos resultados.....	77

6 - DISCUSSÃO.....	99
7 - CONCLUSÃO.....	122
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	123

LISTA DE TABELAS

TABELA I	- Meia-vida de eliminação da cocaína de acordo com a via de exposição.....23
TABELA II	- Concentrações de COC e CE em sangue humano <i>post mortem</i>58
TABELA III	- Normalização das abundâncias dos íons qualificadores para EME-TBDMS, COC, CE e BE-TBDMS em relação aos correspondentes deuterados.....82
TABELA IV	- Variações nos parâmetros estatísticos das curvas de calibração da cocaína, realizadas em 3 dias diferentes....88
TABELA V	- Variações nos parâmetros estatísticos das curvas de calibração do cocaetilen, realizadas em 3 dias diferentes.....88
TABELA VI	- Variações nos parâmetros estatísticos das curvas de calibração da benzoilecgonina, realizadas em 3 dias diferentes.....89
TABELA VII	- Variações nos parâmetros estatísticos das curvas de calibração do éster metilecgonina, realizadas em 3 dias diferentes.....89
TABELA VIII	- Parâmetros de confiança do método proposto para determinação de cocaína em sangue total.....90
TABELA IX	- Parâmetros de confiança do método proposto para a determinação de cocaetilen em sangue total.....90
TABELA X	- Parâmetros de confiança do método proposto para a determinação de benzoilecgonina em sangue total.....91
TABELA XI	- Parâmetros de confiança do método proposto para a determinação de éster metilecgonina em sangue total....91
TABELA XII	- Concentrações de etanol (g/L) cocaína, cocaetilen, benzoilecgonina e éster metilecgonina (ng/mL) encontrados nos casos onde houve interação da cocaína com etanol (Grupo 1).....92
TABELA XIII	- Concentrações de etanol (g/L), cocaína, benzoilecgonina e éster metilecgonina (ng/mL) encontrados nos casos onde não houve evidências da interação com etanol (Grupo 2).....93

TABELA XIV	- Estimativa do valor médio de concentração e erro padrão das quatro variáveis separadas por grupos G1 e G2.....	95
TABELA XV	- Coeficientes de correlação linear de Pearson para a combinação da variável etanol, CE, COC, EME e BE nas amostras com CE positivo.....	97
TABELA XVI	- Resultados obtidos pela técnica de Análise de Variância (ANOVA) Univariada para as quatro variáveis ($\alpha=0,05$)	97
Tabela XVII	- Estatísticas descritivas da variável BE/COC nas amostras <i>com</i> e <i>sem</i> a presença de cocaetileno.....	97
TABELA XVIII	- Estatísticas descritivas da variável COC+EME nas amostras <i>com</i> e <i>sem</i> a presença de cocaetileno.....	98
TABELA XIX	- Características dos cadáveres cujas amostras evidenciaram a interação cocaína/etanol.....	103
TABELA XX	- Características dos cadáveres cujas amostras não apresentaram evidências de interação cocaína/etanol....	104

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	<ul style="list-style-type: none"> - Mecanismo proposto para a formação de cocaetileno por uma serina hidrolase genérica. R - porção tropânica da molécula de cocaína; Asp - ácido aspártico; Glu - ácido glutâmico; His - histidina; Ser - serina.....17
FIGURA 2	<ul style="list-style-type: none"> - Produtos de biotransformação, transesterificação e pirólise da cocaína encontrados em material biológico. 1 - carboxilesterases; 2 - colinesterases; 3 - enzimas P₄₅₀.....20
FIGURA 3	<ul style="list-style-type: none"> - Fluxograma do procedimento analítico usado na determinação da cocaína e produtos de biotransformação em amostras de sangue total67
FIGURA 4	<ul style="list-style-type: none"> - Espectros de massa da cocaína -COCD0 e cocaína deuterada COCD3 , com os principais sítios de fragmentação.....78
FIGURA 5	<ul style="list-style-type: none"> - Espectros de massa da cocaetileno -CED0 e cocaetileno deuterado CED3 , com os principais sítios de fragmentação.....79
FIGURA 6	<ul style="list-style-type: none"> - Espectros de massa da benzoilecgonina -BED0 e benzoilecgonina deuterada -BED3 obtidos após derivação com MTBSTFA, com os principais sítios de fragmentação.80
FIGURA 7	<ul style="list-style-type: none"> - Espectros de massa do éster metilecgonina -EMED0 e do éster metilecgonina deuterado -EMED3 obtidos após derivação com MTBSTFA, com os principais sítios de fragmentação.....81
FIGURA 8	<ul style="list-style-type: none"> - Cromatograma de sangue “branco” enriquecido com 250 ng/mL de EME, COC, CE, e BE com 250ng/mL dos respectivos padrões internos deuterados.....82
FIGURA 8A	<ul style="list-style-type: none"> - Cromatograma de sangue “branco” enriquecido com 250 ng/mL de EME, COC, CE, e BE com 250ng/mL dos respectivos padrões internos deuterados (<i>Reconstructed ion chromatogram</i>)83

FIGURA 9	- Representação gráfica da curva de calibração obtida para faixa de concentração de 10 a 2000ng/mL de COC e 250ng/mL de COCD3.....	84
FIGURA 10	- Representação gráfica da curva de calibração obtida para faixa de concentração de 10 a 2000 ng/mL de CE e 250ng/mL de CED3.....	85
FIGURA 11	- Representação gráfica da curva de calibração obtida para faixa de concentração de 10 a 2000ng/mL de BE e 250ng/mL de BED3.	86
FIGURA 12	- Representação gráfica da curva de calibração obtida para faixa de concentração de 10 a 2000ng/mL de EME e 250ng/mL de EMED3.....	87
FIGURA 13	- Disposição de cocaína e produtos de biotransformação em sangue total nos casos de interação ou não com etanol.....	94
FIGURA 14	- Representação gráfica (<i>boxplot</i>) da distribuição das concentrações de COC, BE e EME nos grupos G1 e G2.....	95
FIGURA 15	- Representação gráfica (<i>boxplot</i>) da distribuição das relações das concentrações de BE/COC.....	96
FIGURA 16	- Distribuição dos casos dos Grupos 1 e 2 por sexo e idade.....	102

RESUMO

O uso concomitante de cocaína (COC) e etanol ocorre com muita frequência e sabidamente aumenta o risco de morbidade e de mortalidade relacionadas à intoxicação cocaínica. Decorrente da interação, aparece de um produto de transesterificação da COC, o cocaetileno (CE), que apresenta mecanismos de ação tóxica semelhantes que, por vezes, porém, superam os da de COC. O CE apresenta DL_{50} menor que a do precursor, sendo, portanto, importante na letalidade atribuída a COC. Para estudar o papel do etanol como agente de interação nas intoxicações letais de COC e estabelecer sua influência nos teores do toxicante encontrados *post mortem*, foi validado um método para quantificação desse agente, de seus produtos de biotransformação - benzoilecgonina (BE) e éster metilecgonina (EME) - e do “biomarcador” dessa interação, o CE, em sangue total com posterior aplicação a 36 casos de óbito em que a cocaína ocorreu como fármaco único, e a 18 em que houve interação com o etanol. A análise estatística dos resultados pelo teste de MANOVA caracterizou os grupos como estatisticamente diferentes, quando se consideram as três variáveis concomitantemente. A análise de cada um dos parâmetros (COC, BE e EME) em separado, todavia, não é suficiente para discriminar os dois grupos. A relação BE/COC, entretanto, é significativamente maior na intoxicação por cocaína como fármaco único do que naquela verificada na interação COC/etanol.

SUMMARY

The co-ingestion of cocaine (COC) and ethanol is a very frequent occurrence and is known to increase the risk of morbidity and mortality. Along with this interaction, there is a formation of a transesterification product, the cocaethylene (CE), which is even more lethal than cocaine having lower values of LD₅₀. In order to study the role of ethanol as an agent of interaction in lethal intoxication and to establish its influence in *post mortem* cocaine concentrations, a GC/MS method was validated to quantify this agent and its biotransformation products: benzoylecgonine (BE), ecgonine methyl ester (EME) and the “biomarker” of this interaction, the CE in whole blood samples. Thirty six *post mortem* cases in which cocaine was the only cause of death and eighteen cases where there was an interaction with ethanol were studied. Statistics with MANOVA test revealed that concentration of COC, BE and EME were significantly different in the two groups while each of the substances when analyzed separately (ANOVA test) did not indicate any difference between the two groups. The BE/COC ratio was statistically greater when cocaine occurred alone than in those cases related to cocaine/ethanol interaction.

1 - INTRODUÇÃO

O uso crescente de substâncias psicoativas é fenômeno mundial e vem preocupando a sociedade em geral, que entende ser este um problema de saúde pública cuja solução envolve interação de fatores de ordem educacional e legal.

O abuso de cocaína (COC) vem crescendo rapidamente no Brasil e no resto do mundo. Além disso, considera-se alarmante a mudança dos padrões de uso que advieram com o aparecimento do *crack*, forma básica da cocaína que, por ser fumada, promove um componente adicional no já tão preocupante potencial de abuso deste fármaco^{106,135,145}.

Agrava ainda mais esta situação o fato de, com freqüência, utilizar-se concomitantemente cocaína e bebidas alcoólicas^{25,43,49,52,57,59,73,78,92,103,124,142}. Com efeito, estima-se que 50 a 90% dos usuários ingerem bebida alcólica durante os episódios recreacionais. Há referências, por parte dos mesmos, de que a interação aumenta e/ou prolonga a euforia experimentada pela cocaína e, ainda, reduz os efeitos desagradáveis que podem se seguir a seu uso^{25,43,98,104,106,124}.

Até recentemente, atribuía-se a intensificação dos efeitos à potencialização dos dois fármacos. Sabe-se agora, porém, que decorre desta interação a transesterificação da cocaína a seu homólogo etílico, o cocaetileno (CE) ou etilcocaína. Essa substância compartilha muitas das propriedades da cocaína, incluindo aquelas relativas às ações centrais, apresentando também auto-administração em estudos com animais de laboratório^{19,50,59,75,77,93}.

O uso concomitante de cocaína e etanol apresenta, portanto, o potencial de formar o CE que, de acordo com pesquisas recentes, mostrou-se mais

potente e com maior expressão de toxicidade aguda que a própria cocaína^{61,77,83,130}.

Decorrente desse fato e refletindo os padrões de utilização destes dois toxicantes, é muito freqüente tal associação esteja relacionada a episódios médico-legais^{50,124,135,142}. Cerca de 80% dos casos analisados no Serviço Técnico de Toxicologia Forense (STTF), do Instituto Médico Legal de São Paulo (IML), relacionados com morbidade e mortalidade com envolvimento de cocaína, apresentam etanol.

Como os dados de necrópsia são, na maioria das vezes, não específicos, a interpretação do achado laboratorial torna-se um desafio para os toxicologistas e patologistas forenses. A descoberta do CE, dado seu potencial tóxico, trouxe a este quadro elementos extras de complicação.

Na avaliação dos teores de cocaína relacionados com o óbito, alguns autores referiram encontrar concentrações menores deste fármaco quando em associação do que quando ocorria como fármaco único⁴⁹. Tal fato poderia indicar que houve potencialização produzida pelo etanol^{43,122} ou que, contribuiu para o óbito a toxicidade atribuída ao cocaetileno⁶⁶.

Por outro lado, existem referências de que o etanol inibe a biotransformação da cocaína, elevando suas concentrações *in vitro*^{42,43,124} e *in vivo*^{50,104,117}, o que, por si só, pode ser responsável pelos efeitos incrementados da cocaína produzidos pelo etanol. Assim, há controvérsias sobre se, de fato, a intensificação dos efeitos tóxicos se dá pelo cocaetileno *per se* ou se pelo aumento dos teores de cocaína.

Na literatura são praticamente inexistentes os dados sobre o que ocorre com os teores de COC nos casos de intoxicação aguda onde há este tipo de interação, mormente em humanos.

Assim, a perspectiva deste trabalho é estabelecer as relações das concentrações dos analitos relacionados com a exposição letal à cocaína, bem como verificar se há variação nos teores de cocaína relacionados ao óbito quando da interação com o etanol. Pretende-se, com isto, contribuir para a interpretação do significado das concentrações encontradas e elucidação de casos de interesse médico legal.

2 - ASPECTOS GERAIS DA EXPOSIÇÃO HUMANA À COCAÍNA

2.1 Padrões de uso

A cocaína ilícita é mais frequentemente encontrada como pó cristalino, cloridrato de cocaína (COC.HCl), obtido através do tratamento da pasta de coca purificada com ácido clorídrico. Sob esta forma, não se presta a ser fumada, pois não se volatiliza e se decompõe com o aumento da temperatura. Comumente é auto-administrada por aspiração nasal, “cafungar”, por via oral ou intravenosamente, sendo bem absorvida na corrente sangüínea através da mucosa nasal.

Na forma de base livre (COC-base), a cocaína apresenta baixo ponto de fusão (96°C a 98°C contra os 197°C do cloridrato); volatiliza-se a aproximadamente 90°C e, quando aquecida, permite que seus vapores sejam inalados no ato de fumar³¹.

A COC-base pode ser encontrada na pasta de coca (forma de tráfico), em proporções que variam de 40 a 91%, dependendo de estar a pasta bruta ou em estágio mais adiantado de purificação, quando então recebe o nome de *base*^{47,79}. Pode também ser obtida por processo denominado *free-basing*, realizado pelo próprio usuário, através da mistura da solução de COC.HCl com bicarbonato de sódio ou amônia, e extração da base formada pela adição de éter, filtragem e posterior evaporação¹³⁵. A droga assim obtida (*free base*) é fumada com auxílio de dispositivos que simulam cachimbos, o que apresenta o risco de ignição do eventual éter remanescente.

A forma mais comum pela qual se comercializa a base livre é o chamado *crack*, preparado através do aquecimento da solução aquosa do

cloridrato com substância básica (geralmente bicarbonato de sódio). Aquece-se até obtenção de substância oleosa, e resfria-se posteriormente em banho de gelo até a precipitação da base livre. O aspecto resultante é o de cristais irregulares em forma de “pedras”, nome pelo qual é vulgarmente referido. Uma outra forma de preparação do *crack* é a de misturar a pasta de coca ou o sal de cocaína com bicarbonato de sódio e pequena quantidade de água, suficiente apenas para umedecer a mistura, com posterior aquecimento em forno de microondas. Esse método de preparação parece ser o mais conveniente, pois propicia rápida obtenção (aproximadamente 1 min) desta forma de tráfico, devido à pouca água utilizada no processo e conseqüente secura rápida. Entretanto, quando se compara a *free base* ao *crack*, este apresenta-se com menor grau de pureza pelo fato de nele permanecerem contaminantes, produtos resultantes e excedentes do processo (bicarbonato de sódio, cloreto de sódio) ¹³⁵. Este é o motivo de ser o *crack* mais barato que a *free base*. Dependendo da maneira como foi obtido, sua pureza varia de 20 a 100% ¹³⁵.

Embora a *free base* e o *crack* sejam quimicamente idênticos, o fato de o primeiro ser preparado pelo usuário e o segundo, pelos traficantes, bem como de ser menor o preço do *crack*, constituem elementos adicionais de acesso a potenciais consumidores, pois a pronta comercialização se dá sempre na forma em que será utilizado ¹¹².

A cocaína apresenta uma longa história de uso e, na era moderna, as vias de auto-administração mais freqüentes são: a intranasal e a intravenosa, para a forma de cloridrato, ou a respiratória (ato de fumar), para a forma básica. Nos últimos anos tem havido uma mudança drástica nos padrões de uso da COC quanto à via de administração: devido ao advento do *crack*, mudou da intranasal e/ou intravenosa para a via respiratória, através do ato de fumar. As razões para este fato parecem estar embasadas no alto

potencial de abuso desta forma de uso^{47,135}, onde os efeitos prazerosos buscados ocorrem mais rápida e intensamente quando comparados à via intravenosa³⁵. Acrescem-se ainda fatores ambientais e sociais, como, por exemplo, conveniência e facilidade de aquisição, não-necessidade da parafernália relativa às drogas injetáveis e segurança quanto à impossibilidade de transmissão de doenças por esta via.

A prática de se fumar folhas de coca com finalidades religiosas e terapêuticas, entretanto, data de mais de 5000 anos¹⁰⁶. No final do século passado preconizava-se o emprego de cigarros de coca no tratamento de asma e febre do feno, na Europa e Estados Unidos, onde também eram fumados com finalidade recreacional^{79, 101}. A pasta de coca, produto obtido pela maceração das folhas da planta do gênero *Erytroxylum*, é fumada em cigarros, *per se* (“basuco”), ou em combinação com tabaco ou maconha (*grimmie*)^{31,47,79,135,146}. Este produto, dado o preço relativamente baixo, é bastante utilizado pelas populações jovens dos países andinos⁷⁹ e vem se tornando popular em outras localidades. No entanto, esta forma de uso constitui um grave problema de saúde pública, devido à quantidade de impurezas presentes na primeira fase de obtenção da pasta, como, por exemplo, querosene, gasolina, metais pesados etc^{47,79}.

A prática de fumar a forma básica da COC, *free base* ou mais comumente o *crack*, é fenômeno relativamente recente. Data de meados da década de 80 a referência de o *crack* ter se tornado sério problema nas principais cidades americanas¹³⁵. Na Europa, o problema emergiu no início da década de 90. Entre nós, na cidade de São Paulo, a primeira apreensão de *crack* com análise nos laboratórios do Serviço Técnico de Toxicologia Forense (STTF) ocorreu no final de 1992. O número de casos de apreensão de *crack*, analisados no STTF, passou de 204, em 1993, para 855, em 1994, e em 1995 atingiu a cifra de 1.906 casos. À semelhança do que vem

ocorrendo em outros países¹¹², o número de apreensões de *crack* superou o de maconha e o daqueles relativos à forma de sal de cocaína.

O fácil acesso ao *crack* deve-se, à preferência dos traficantes por comercializar esta forma, pois gera maior lucro a curto prazo. Como a farmacodependência instala-se rapidamente (menos de um mês¹¹²), o usuário se torna comprador assíduo¹¹². Além disso, como veremos adiante, as quantidades de *crack* utilizadas pelos usuários são maiores quando comparadas com a cocaína em outras formas.

De acordo com levantamento realizado nos Centros de Controle de Intoxicação dos EUA, a cocaína é a substância ilícita de maior ocorrência nos casos fatais, sendo a sétima dentre todos os xenobióticos relacionados com efeitos letais⁶⁷. ESCOBEDO *et al.*(1991) referem que mais da metade dos casos de morte relacionados com *overdose* de cocaína envolveu também o uso de outros fármacos ou drogas em combinação com a mesma. Esses dados são indicadores de prevalência de uso e refletem o que já foi observado pelos levantamentos a respeito, ou seja, a indicação de que em aproximadamente 43% dos casos a cocaína é usada em associação⁴⁹.

Um dos fármacos mais comumente associados à cocaína é o etanol^{49,57,135}. Em levantamento realizado nos Estados Unidos, estimou-se que 9 milhões de americanos utilizaram esta combinação num período de 1 ano⁵⁷. LEWIS *et al.* (1994) citam que menos de 10% dos usuários de cocaína referem o uso apenas desse fármaco, enquanto 11% dos usuários de etanol afirmam utilizar também cocaína. Refletindo tal padrão de uso, há relatos que atestam que essa associação está presente em casos de âmbito médico-legal: TARDIFF *et al.*(1995) referem que, em 1990 e 1991, a cocaína esteve envolvida em 31,3% das 2.824 vítimas de homicídio na cidade de Nova York; destas, 50% também apresentavam etanol. Segundo citação de autores, um levantamento do *National Institute of Drug Abuse*

(NIDA), datado de 1991, refere ser a combinação cocaína e álcool etílico a mais freqüentemente citada nos casos provenientes de necrópsia¹²⁴.

Sabe-se agora, que desta interação, resulta o aparecimento de um terceiro produto, o cocaetileno, homólogo etílico da cocaína, que compartilha muitas das suas propriedades, inclusive as relativas às ações centrais. As atividades farmacológicas do cocaetileno, seu significado clínico e como achado de necrópsia serão abordados oportunamente neste trabalho.

Além da associação cocaína/etanol, outras são também deliberadamente buscadas, como, por exemplo, com *Cannabis sativa*^{31,97,135}, no *grimmie* e que objetiva, segundo relatos, o aumento do prazer ou diminuição da excitação e da compulsão pelo uso continuado¹⁴⁶. A prática de misturar cocaína com cigarros de tabaco não parece ter outra finalidade senão a possibilidade de o cigarro funcionar como veículo e poder ser fumado publicamente¹⁴⁶.

Há também referência sobre a associação com ansiolíticos e antidepressivos, visando diminuir a ansiedade, agitação ou depressão que se seguem a seu uso⁴⁹.

É preciso, ainda, considerarem-se as associações que ocorrem inadvertidamente, quer com os adulterantes ou diluentes da cocaína, quer pelo uso concomitante com outras substâncias, cujas associações poderão significar interações importantes. Como veremos, é possível haver competição pelas mesmas vias de biotransformação da cocaína, o que potencialmente, poderá alterar seus níveis circulantes⁵¹. Como exemplo de fármacos que podem ser comumente associados à COC, temos o ácido acetilsalicílico, fenobarbital, petidina, antidepressivos tricíclicos etc.; entre os adulterantes mais comumente encontrados na droga de rua, encontram-se

os anestésicos locais^{31,96}, cafeína e piracetam⁹⁶; quanto aos diluentes, citam-se glicose, lactose, sacarose, amido e manitol⁹⁶.

Dada a facilidade na utilização do *crack*, é importante se considerar a população potencialmente exposta que, segundo alguns autores, compõe-se basicamente de indivíduos jovens do sexo masculino^{8,49,78,112,135}. Conforme constatação recente, em nosso meio é grande o número de menores de idade envolvidos com a prática de fumar *crack*¹¹².

Outra população de usuários de cocaína que gera graves problemas de saúde pública são as mulheres grávidas. Entre os muitos efeitos perinatais decorrentes desse uso, citam-se: retardamento do desenvolvimento fetal, malformações congênitas, placenta abrupta, cardiomiopatias, distúrbios de comportamento, microcefalia e até mesmo morte intra-uterina^{4,28,62,119,137,140,147}. O número relativamente alto de casos relacionados com a exposição materno-fetal levou à criação da expressão “bebês da cocaína” que, segundo STURNER *et al.* (1991), constituem o flagelo dos anos 90.

A frequência de uso é um dado epidemiológico de difícil obtenção, pois são poucos os trabalhos que enfocam este parâmetro de exposição. Esta informação fica mais restrita ao cumprimento ético-protocolar realizado nos experimentos com humanos. Assim, por exemplo, voluntários referem uso de aproximadamente 4 a 5 g de cocaína-pó, intranasalmente, por semana^{31,103,104} e, até 120 mg intravenosamente diários¹⁰⁸.

2.2 Disposição cinética

Absorção

A velocidade de absorção e a máxima concentração plasmática atingida dependem integralmente da via de administração. O ato de fumar COC na forma de base livre (*crack*) oferece o meio mais rápido de penetração do fármaco na corrente sanguínea, através da absorção pelos alvéolos pulmonares. Isso resulta em maior rapidez de aparecimento e intensidade de efeitos experimentados pelo usuário, se comparada à propiciada pela via intravenosa. Ambas apresentam, todavia, padrões cinéticos similares^{31,34,35,78}.

A eficiência do ato de fumar (disponibilidade química), no que se refere à velocidade e quantidade de COC a ser liberada para a corrente sanguínea em condições de produzir o efeito desejado, depende de vários fatores, como, por exemplo: a porção do fármaco sujeita à pirólise, a temperatura usada para vaporizar a COC, o recipiente onde a o *crack* é aquecido, a condensação da base livre nos dispositivos utilizados para fumar etc^{34,101,111}.

A administração por aspiração intranasal produz teores plasmáticos menores por um tempo mais prolongado devido à velocidade mais lenta de absorção. A concentração plasmática de pico ocorre entre 15 a 45 min e está condicionada às diferenças na efetividade da técnica da aspiração do fármaco e às características individuais do usuário, que produzem diferentes níveis de vasoconstrição da mucosa, possibilidade de ocorrer biotransformação na própria mucosa etc^{31,34,78}. Embora mais lenta no aparecimento dos efeitos, esta via apresenta-os em termos de magnitude, comparável aos relativos à via intravenosa^{35,78}. Os parâmetros

toxicocinéticos referentes à absorção pelas diferentes vias serão abordados oportunamente.

Distribuição e Eliminação

A cocaína liga-se às proteínas plasmáticas apresentando alta afinidade pela α -1-glicoproteína ácida, e baixa, porém significativa, pela albumina⁶. A fração livre situa-se entre 67 e 68% da quantidade absorvida, na faixa de concentração de 300 a 1500 ng/mL, e, embora independa da concentração, varia com a mudança de pH (77 e 49% respectivamente em pH sanguíneo 7,0 e 7,8)¹⁴¹.

Estudos realizados com tomografia por emissão de pósitrons (PET), após administração intravenosa de cocaína marcada com isótopo de carbono radioativo - [N-¹¹C- metil] cocaína - mostram que o pico máximo de radioatividade aparece nos pulmões em apenas 45 seg; nos rins e coração entre 2 a 3 min; nas adrenais entre 7 a 9 min; e no fígado entre 10 a 15 min, fatos estes que mostram a rápida distribuição do fármaco^{119,145}.

O acúmulo verificado no fígado é compatível com a suposição de que há receptores hepáticos com alta afinidade pela cocaína, o que foi comprovado em experimento onde COC pré-administrada bloqueou o seqüestro da correspondente marcada com radioisótopo e administrada seqüencialmente¹⁴⁵.

A incorporação da COC no cabelo se dá por mecanismos ainda não totalmente determinados. Supõe-se que ocorra por difusão passiva para o folículo piloso. HENDERSON *et al.* (1996), porém, afirmam que este mecanismo é por demais simplista e postulam que outros devam estar envolvidos.

O caráter lipofílico da cocaína faz com que a substância atravesse prontamente a barreira hematencefálica (BHE) e dados experimentais sugerem que seja seqüestrada pelos adipócitos e conseqüentemente se acumule no sistema nervoso central (SNC)^{31,34,125,147}.

A transferência placentária e a secreção láctea estão bem estabelecidas^{33,45,123,147}. DICKSON et al (1994), utilizando a equação de Henderson-Hasselbalch para bases fracas, estabeleceram que o coeficiente de partição leite/sangue é de aproximadamente 20, enquanto WIGGINS (1992), cita ter encontrado a relação de concentração leite/sangue igual a 8 após administração intravenosa de COC a ratas em período de lactação.

A transferência placentária é muito estudada, em virtude da importância que assume o abuso de cocaína por mulheres grávidas. São várias as referências sobre a detecção de COC e produtos de sua biotransformação em sangue de cordão umbilical, líquido amniótico, urina, mecônio, cabelo e tecidos de neonatos^{4,22,33,109,123,137,140,147}. Há evidências de que a cocaína atravessa a barreira placentária numa velocidade 80% daquela relativa à antipirina, marcador de simples difusão, e apresenta características de transporte passivo, o que é consistente com o caráter lipídico deste fármaco^{93,131}.

Foi também reportada a presença de COC no sêmen de usuários após experimentos controlados, em que a exposição ocorreu pelas vias intranasal, respiratória e intravenosa. A relação sêmen/plasma variou de 0,66 a 0,73. A explicação para esses valores estarem abaixo da unidade seria o fato de o sêmen conter fluido vesicular alcalino, uma vez que, em bases teóricas, o líquido prostático, pelo caráter ácido, à semelhança do conteúdo estomacal, deveria seqüestrar a COC, por ser esta uma base fraca e conseqüentemente apresentar uma maior concentração neste fluido em relação ao plasma³⁸.

O *clearance* renal da cocaína é de aproximadamente 6% do total, que por sua vez é consideravelmente maior do que aquele que pode ser atribuído ao fluxo hepático (aproximadamente 50% do total). Isso sugere mecanismos extra-hepáticos e extra-renais de *clearance* do fármaco¹⁴¹.

Com efeito, a COC, que é quimicamente a benzoilmetilecgonina, após absorvida, é rapidamente biotransformada a éster metilecgonina (EME) e benzoilecgonina (BE)^{31,34,78}, seus principais produtos de biotransformação, bem como a outros, como ecgonina, norcocaína e benzoilnorecgonina em menor porcentagem^{34,37} (Figura 2).

O éster metilecgonina resulta da hidrólise do grupo benzoato da COC e ocorre por ação de colinesterases plasmática e hepática. A colinesterase plasmática que medeia esta reação é a EC3.1.1.8, também denominada pseudocolinesterase, cujo substrato principal é a benzoilcolina^{56,69,74,139,148}. Em indivíduos com polimorfismo genético, sensíveis à succinilcolina, a atividade colinesterásica plasmática é muito menor, o mesmo ocorrendo em fetos, crianças, idosos, gestantes e pessoas com doenças hepáticas ou que sofreram infarto do miocárdio. Potencialmente o efeito do fármaco poderá estar aumentado nessas populações^{67,76,148}. Este dado é de importância na exposição materno-fetal em relação aos riscos do feto às ações do fármaco, pois além das vias de biotransformação alteradas, a imaturidade da barreira hematencefálica (BHE) constitui um elemento a mais para eventuais danos neurológicos.

A esterase hepática que hidrolisa a COC a EME, é, à semelhança da colinesterase plasmática, completamente inibida *in vitro* pelo fluoreto de sódio e eserina^{42,78}. Foi também reportada a presença de atividade colinesterásica na placenta, que demonstrou ter a capacidade de biotransformar COC a EME, funcionando portanto como “barreira metabólica” à exposição do feto^{126,134}. Há evidências de que esta enzima

não é inibida pelo etanol *in vivo*; na presença do mesmo, há aumento de aproximadamente 2 a 3 vezes na formação de EME¹²⁴. O EME constitui 32 a 49% da excreção urinária da cocaína^{69,139}.

Até bem recentemente acreditava-se que a benzoilecgonina, que corresponde a 29-45% da excreção urinária, resultasse apenas da hidrólise espontânea (pH dependente) do grupo éster carboxílico da COC. Os experimentos de DEAN et al (1991), demonstraram que este processo é também mediado enzimaticamente por carboxilesterases (EC 3.1.1.1). Estas enzimas são B-esterases, classificadas como serinas hidrolases (sítios ativos que envolvem a serina, histidina, ácido aspártico e ácido glutâmico) que ocorrem na membrana do retículo endoplasmático^{19,24,56,148}. DEAN *et al.* (1995), demonstraram que os pulmões, cérebro e coração também apresentam carboxilesterases com capacidade de catalisar a conversão COC à BE. A hidrólise enzimática do EME e BE e a hidrólise espontânea do EME resultam no aparecimento da ecgonina, que pode contribuir com 1 a 8% da excreção urinária de COC^{139,148}.

Outra via de biotransformação da cocaína é a que resulta na norcocaína (NCOC), produto farmacologicamente ativo, excretado na urina apenas em pequena fração (2 a 6%). Esta via é mediada pelo sistema citocromo P₄₅₀ por N-desmetilação direta ou seguida à oxidação da cocaína pelo sistema de monoxigenases FAD-dependente^{17,43,85,141}. A norcocaína é então convertida por ação dos dois sistemas enzimáticos à N-hidroxinorcocaína, com posterior oxidação ao radical nitróxido de norcocaína, e eventualmente ao íon nitrosônio, comprovadamente eletrofílico^{17,85}. Há evidências de que a subfamília 2B das enzimas P₄₅₀, passível de indução pelo fenobarbital, esteja envolvida na N-desmetilação microssômica da cocaína. Sabe-se que a interação com etanol, ou indutores da expressão dessa subfamília, pode potencializar a hepatotoxicidade

induzida pela cocaína¹⁷. PELLINEN *et al.* (1994), embora admitam a participação dessa subfamília, questionam sua primazia na biotransformação oxidativa da cocaína, uma vez que as subfamílias pertencentes à família 2B têm expressão extremamente baixa em humanos e animais não tratados com indutor enzimático, podendo aumentar em até 30 vezes após indução com fenobarbital. Postula-se que o primeiro passo na bioativação hepática da COC por esta via seja catalisado pela subfamília 3A. Além dessa, também parece haver envolvimento, em menor proporção, da subfamília 2E1¹⁶.

A presença BE e NCOC no cérebro reflete as concentrações plasmáticas e não parece haver evidências de envolvimento das enzimas microssômicas cerebrais na biotransformação oxidativa da cocaína¹².

Em 1979, foi demonstrada, pela primeira vez, a formação do éster etílico da benzoilecgonina nos casos onde há o consumo concomitante de cocaína e etanol³⁴. Este produto, denominado de benzoiletilecgonina ou cocaetilenol (CE) é resultado da etil transesterificação, em que o grupo carboximetil da cocaína é transesterificado a carboxietil na presença de etanol. Essa reação é mediada por carboxilesterases (EC 3.1.1.1)^{19,24,59,61}, envolvidas também na hidrólise do ácido acetil salicílico e outros ésteres alifáticos e na biotransformação da COC à BE, conforme anteriormente referido^{19,24,42,43,44,56,59,61,148}. O mecanismo proposto por BOYER *et al.* (1990), para a reação, está esquematizado na Figura 1. A partir de experimentos *in vitro*, a transesterificação da cocaína foi demonstrada pela formação do etil éster [³H]cocaína pela incorporação do [¹⁴C]etanol.

Além do etil, já foi reportada a isopropil transesterificação, com formação do correspondente cocaisopropileno, evidenciado na urina de pacientes intoxicados pela cocaína e pelo isopropanol¹⁵⁰. DEAN *et al.* (1995), baseados nos resultados de experimento delineado para correlacionar a atividade de transesterificação etílica da cocaína na presença

de etanol e distribuição de hidrolases não específicas em vários tecidos, postulam que mais de uma metilesterase catalisa a hidrólise de COC à BE. Esta constatação poderia, por exemplo, explicar o fato de que coração e pulmões, por apresentarem atividade de metilesterase menor que a correspondente etiltransferase, devem conter metilesterases que, embora hidrolisem a COC à BE, não têm a propriedade de catalisar a transesterificação etílica. Da mesma forma, foi identificada a metilesterase mas não a etiltransferase em cérebro de ratos⁴⁴. A atividade etiltransferase foi também demonstrada em tecido renal⁴⁴ e pulmonar de ratos, e os dados foram consistentes com os obtidos em tecido pulmonar humano fresco⁶³. Todavia, não foi demonstrada em tecidos pulmonar e renal provenientes de autópsia⁹.

Assim, essas enzimas têm importante papel, regulando a desintoxicação da COC com a formação de BE e mediando a formação do composto ativo, CE. Estudos sobre a ação do etanol na distribuição da COC e produtos de biotransformação em ratos mostram que o álcool aumenta os teores de COC no fígado e diminui os de BE⁴³.

As carboxilesterases também têm importante papel no metabolismo de vários compostos, incluindo esteróides e ésteres lipídicos. Foi provado seu papel no metabolismo não-oxidativo do etanol em vários órgãos, como catalisador da esterificação do ácido oléico e etanol com formação do etiloleato de etila^{24,63}, apontado como responsável pelo dano provocado pelo etanol em vários órgãos⁶³. HEITH et al (1995), demonstraram a presença de uma sintetase de ésteres etílicos de ácidos graxos, com capacidade de catalisar a formação de CE nos pulmões e baço, e referem que enzima idêntica à carboxilesterase foi isolada de tecido adiposo de ratos.

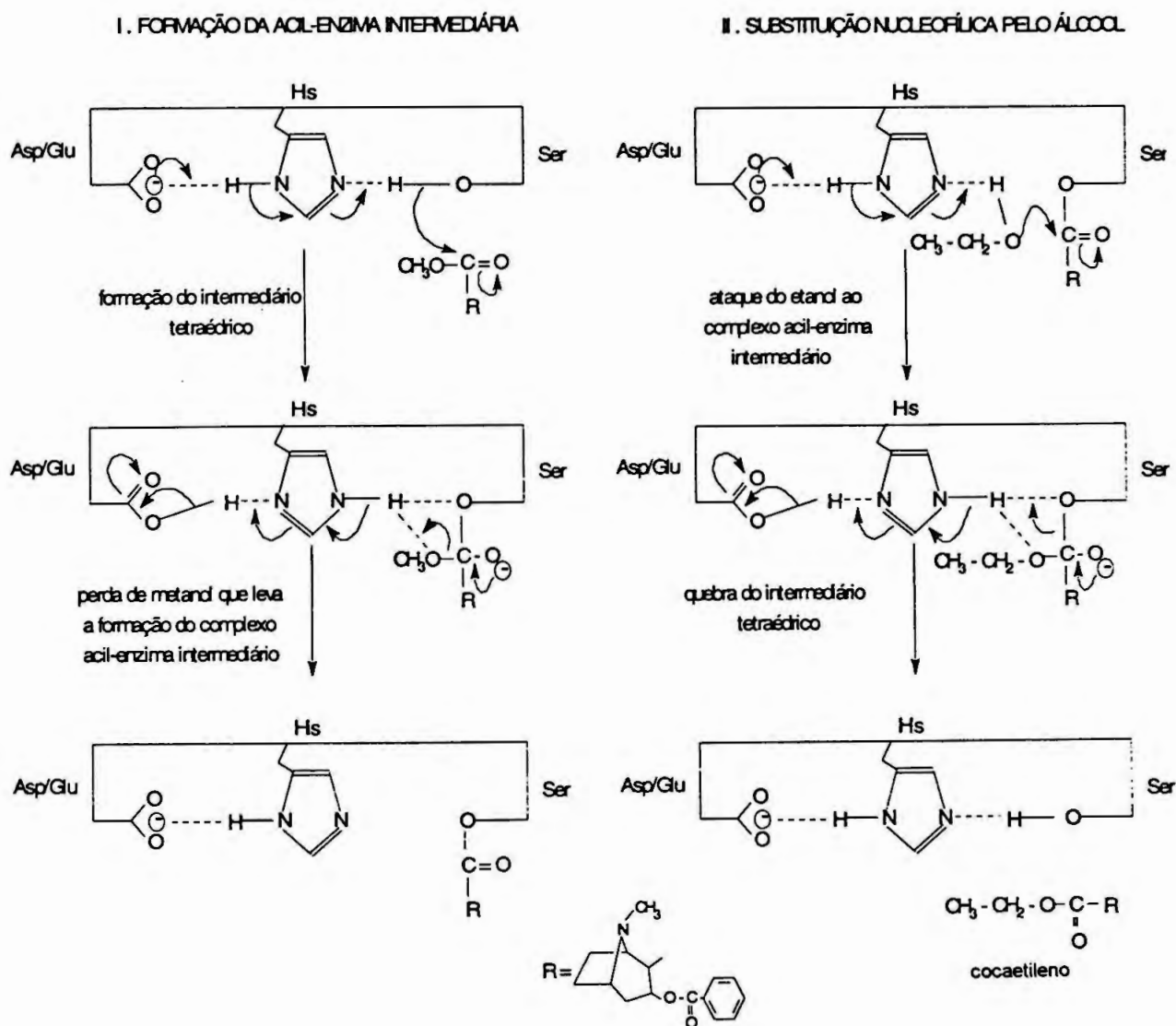


FIGURA 1 - Mecanismo proposto para a formação de cocaetileno por uma serina hidrolase genérica. R - porção tropânica da molécula de cocaína; Asp - ácido aspártico; Glu - ácido glutâmico; His - histidina; Ser - serina.[adaptado de BOYER *et al* (1992)]

A atividade dessas enzimas mostra cinética de Michaelis-Menten saturável na presença de quantidades crescentes de cocaína e etanol^{19,24}. Segundo experimentos de BRZEZINSKI *et al.* (1994), a K_m dessas esterases para a cocaína e para o etanol é de, respectivamente, 116 ± 17 mM e 43 ± 2 mM; na presença de alta concentração de etanol (100 mM), a transesterificação ocorre numa velocidade 3,5 vezes maior que a hidrólise, com consequente produção de CE da ordem de 3,5 vezes maior que a correspondente de BE. Essa esterase exibe cinética de primeira ordem nas concentrações sanguíneas de COC relacionadas às doses recreacionais (aproximadamente 3 mM)²⁴. Há evidências de que a carboxilesterase renal apresenta atividade da ordem de 1,5 maior que a hepática, o que mostra a importância do papel dos rins na formação do CE^{19,44}.

Um dos aspectos mais importantes da formação do CE é a constatação de que este produto possui ação farmacológica comparável à da COC^{59,77,124}.

Embora alguns autores, sem muita reflexão, considerem o CE um produto de biotransformação da COC^{75,92,130}, outros o consideram um produto resultante da interação do fármaco e etanol^{36,37,43,74,141}; há ainda aqueles que o consideram um aducto desse dois fármacos^{106,107}. Entretanto, qualquer que seja a concepção, o achado laboratorial deste produto significa que houve exposição concomitante ao etanol e que, portanto, o CE pode funcionar como um “biomarcador” dessa exposição.

Dada sua semelhança estrutural com a COC, o CE, segue os mesmos padrões cinéticos que o precursor. Assim, à semelhança da COC, apresenta alta afinidade pela α -1-glicoproteína ácida⁶, atravessa a barreira placentária em velocidade similar à da cocaína¹³¹ e sofre biotransformação pelas mesmas vias que a cocaína, resultando em benzoilecgonina, éster

etilecgonina, norcocaetileno e outros produtos ativos resultantes da sua oxidação¹⁸ (Figura 2).

Quando o *crack* é fumado, além da COC, seus produtos de biotransformação e do CE, um outro produto que também aparece na urina é o éster metil-anidroecgonina (metilecgonidina), um subproduto que se forma pela degradação térmica quando a cocaína é fumada^{36,37,101,111}. A metilecgonidina já foi identificada na urina de usuários fumadores de *crack* e é considerada um marcador desta forma de uso^{37,74}. A Figura 2 mostra os produtos de biotransformação, transesterificação e pirólise da cocaína, encontrados em material biológico.

2.3 Parâmetros fármaco e toxicocinéticos

Os parâmetros cinéticos para a cocaína variam de acordo com a via de administração. Embora se utilize o modelo monocompartimental para seu estudo, há autores que postulam a utilização do modelo bicompartimental ou ainda tricompartmental devido à velocidade com que ocorre sua distribuição e biotransformação^{31,35,78}.

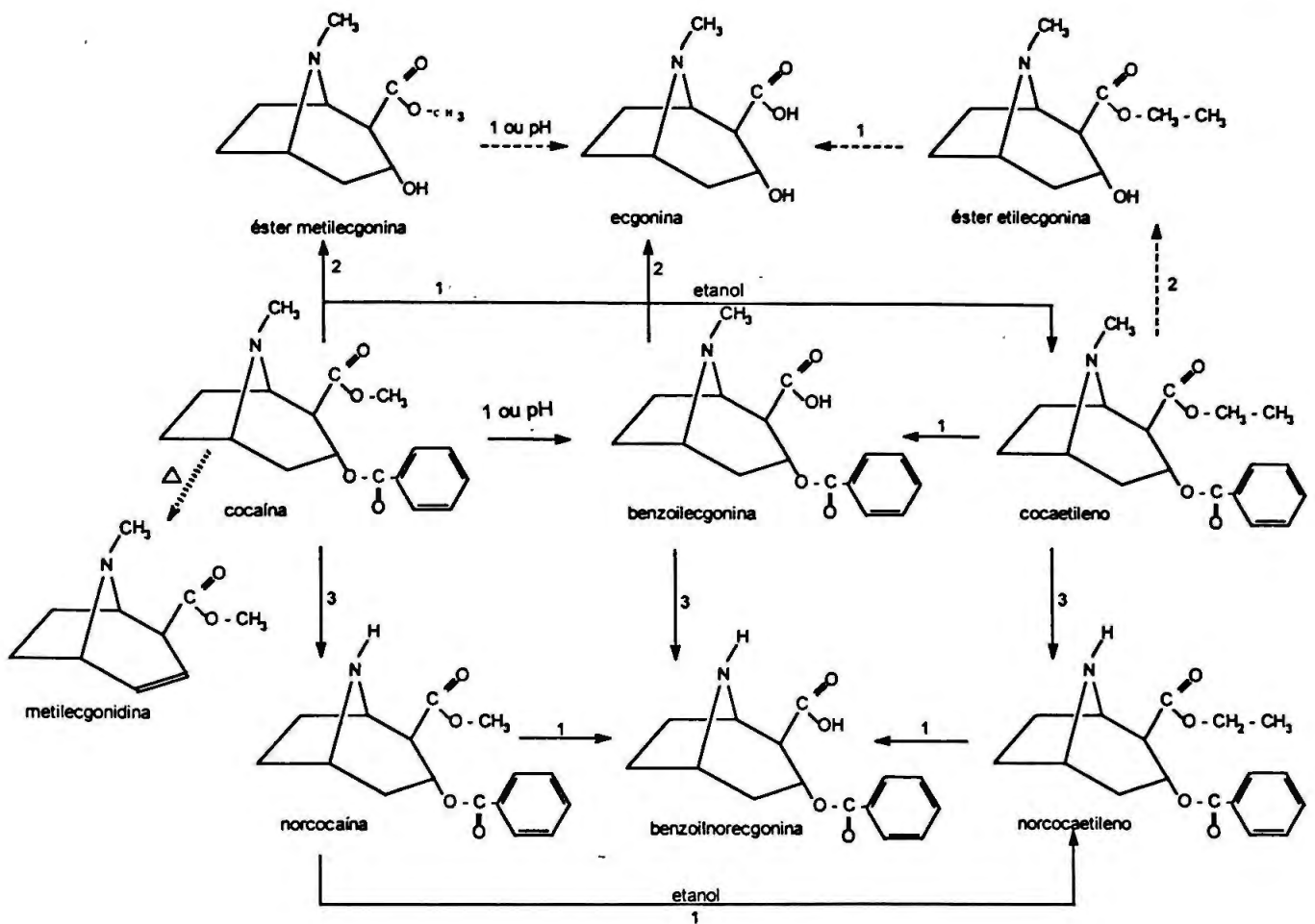


FIGURA 2 - Produtos de biotransformação, transesterificação e pirólise da cocaína encontrados em material biológico. 1 - carboxilesterases; 2 - colinesterases; 3 - enzimas
 P₄₅₀^{36,37,43,74,101,111,141}

Há um grande número de dados relacionados a esses parâmetros, por vezes não concordantes. A explicação para isso pode estar no fato de que os estudos, realizados com diferentes grupos de indivíduos, levam a variações mais relacionadas às significativas diferenças inter-individuais do que às variáveis enfocadas ³⁵.

CONE (1995), delineou estudo experimental em que os parâmetros cinéticos e a biodisponibilidade foram estabelecidos para o mesmo grupo de indivíduos para as vias intravenosa, respiratória e intranasal. Neste experimento ficou demonstrado que os picos máximos de concentração plasmática de COC, situados entre 98 e 349 ng/mL (média 230 ng/mL) e 154 e 345 ng/mL (média 227 ng/mL), ocorreram 5 minutos após administração de, respectivamente, 25 mg de COC.HCl intravenosamente e 42 mg de base livre (preparada em laboratório e com 99% de pureza) pela via inalatória. As análises estatísticas mostraram não haver diferença entre os picos máximos de concentração plasmática e a extensão da absorção (área sob a curva -AUCs, semelhantes).

Após a utilização de 32 mg por via intranasal, a COC apareceu rapidamente em baixas quantidades, no sangue venoso, e a concentração plasmática de pico se situou entre 40 a 88 ng/mL (média 63 ng/mL) num período entre 30 e 45 min. Embora a AUC não tenha sido estatisticamente diferente das vias intravenosa e respiratória, o pico máximo de concentração foi menor e também ocorreu mais tardiamente. Nos experimentos de PEREZ-REYES *et al.* (1992), a concentração máxima também foi observada aproximadamente 1 hora após a administração de diferentes doses pela via intranasal.

ISENCHMID *et al.* (1992a), examinaram a toxicocinética da COC e os produtos de biotransformação em usuários crônicos após duas doses sucessivas e equivalentes (32 mg de COC.HCl por via intravenosa e 50 mg

de COC básica por via respiratória). Os autores observaram que as concentrações máximas plasmáticas de COC ocorreram em 4 min e foram de respectivamente 260 e 220ng/mL para as vias intravenosa e respiratória.

No experimento realizado por CONE (1995), a BE aparece no plasma entre 15 a 30 min após a inalação e injeção, com concentrações que variaram entre 47 e 169 ng/mL e pico de concentração entre 1,10 e 2,64 h, com AUCs semelhantes para as duas vias. No caso da via intranasal, o aparecimento de BE na corrente sanguínea se deu em 30 min, aumentando gradualmente até atingir concentrações máximas de 94 a 158 ng/mL em intervalos de tempo que variaram entre 2,94 a 3,81 h.

O pico máximo de concentração do CE ocorre aproximadamente 2 horas após a utilização da COC pela via intranasal¹¹⁷. Nos experimentos de McCANCE *et al.* (1995), compararam-se os parâmetros farmacocinéticos da COC-HCl e do CE administrado na forma de fumarato, ambos pela via intranasal. Os resultados demonstraram que a AUC e as concentrações plasmáticas foram maiores para o CE que para a correspondente dose de COC, embora o pico máximo de concentração plasmática tenha ocorrido mais tardiamente para o CE (30 min contra os 15 observados para a COC). Nestes experimentos, determinou-se que a $t_{1/2}$ de absorção foi de 13 min para as doses equivalentes às de cocaína.

A meia-vida de absorção pulmonar e intranasal para a cocaína foi de respectivamente 1,1 min e 12 min, nos experimentos de JEFFCOAT *et al.* (1989), e 9 e 17 min, respectivamente, para a via intranasal, nos experimentos de CONE (1995), e de McCANCE *et al.* (1995).

A biodisponibilidade da COC fumada é de aproximadamente 70%^{35,53,78}, o que é explicado pelo fato, já mencionado, de que há cerca de 26% de perda da cocaína na forma básica, antes de ser inalada, e de que tal perda pode se dar por decomposição ou condensação no dispositivo utilizado para

este fim³⁵. A biodisponibilidade pela via intranasal é referida como sendo da ordem de 60 a 80%^{31,78}. No experimento de CONE (1995), entretanto, a biodisponibilidade foi de aproximadamente 94% e, em função disso, o autor discute a necessidade de monitorar as concentrações plasmáticas por mais tempo para que este dado não seja subestimado; isso porque, embora haja retardamento de absorção, não há prejuízo por esta via³⁵.

Os dados sobre a meia-vida plasmática de eliminação da COC diferem nos experimentos descritos na literatura. A Tabela I relaciona os $t_{1/2}$ (β) constantes dos trabalhos consultados.

TABELA I - Meia-vida de eliminação da cocaína de acordo com a via de administração

via de administração	$t_{1/2}$ (β) (min)	referência
inalatória	50-75	70
	64	118
	86	104
	78	78
	111	103
	299*	35
respiratória	38	70
	58	78
	272*	35
intravenosa	40	70
	67	64
	37	37
	48	32
	244*	35

* tempo de coleta de sangue de 12 horas

Os valores anormalmente altos de meias-vidas plasmáticas para as vias inalatória, respiratória e intravenosa, observados nos experimentos de

CONE (1995), podem ser explicados pelo tempo mais prolongado de coleta, em relação a outros experimentos, e pelo baixo limite de detecção do método-LD (aproximadamente 1 ng/mL). Se confirmados, esses dados mostrariam que os trabalhos anteriores subestimaram a meia-vida de eliminação da cocaína.

Segundo PEREZ-REYES *et al.*(1994b), o CE apresenta meia-vida de eliminação ($t_{1/2\beta}$) de 142min, semelhante às determinadas por LEWIS *et al.*(1995), e McCANCE-KATZ *et al.*(1993), de 148 min. Nos experimentos de McCANCE *et al.* (1995), a meia-vida foi de 155 min para administração intranasal de CE na concentração de 0,48 mg/kg e de 138 min para a dose de 0,95 mg/kg.

As meias-vidas hepáticas da COC e do CE são praticamente iguais (de 6 a 7 min) e o estudo da AUC hepática para os dois compostos propicia a inferência de que 3 a 5% da dose de COC são convertidas ao etilcomposto¹⁹.

A BE apresenta meia-vida de eliminação entre 3,5 e 8h^{3,31,34,98}, enquanto a da EME ocorre entre 3 a 6h³¹. Conseqüentemente, a BE é detectada por um período mais longo; daí sua determinação ser o parâmetro mais comumente utilizado nos programas de verificação de uso de COC.

A eliminação urinária, reflete as concentrações sangüíneas e, uma vez que a COC apresenta meia-vida relativamente baixa, são comuns os casos em que a intoxicação por cocaína é evidenciada pela presença apenas dos produtos de biotransformação. Por ser excretada mais vagarosamente que o EME, a BE apresenta, via de regra, concentrações sangüíneas que excedem este produto, bem como a do precursor. Além disso, há referências de que, após uso crônico, a BE pode ser encontrada no cérebro até 22 dias após o uso⁹⁸, o que talvez se explique pelo fato de que a COC,

após atravessar a barreira hematoencefálica, sofre biotransformação à BE nesse local e, dada sua polaridade, fica mais tempo armazenada.

O volume de distribuição aparente (V_d) da COC é de aproximadamente 2 L/kg (1,5 a 2,7 L/kg)^{3,31,35}; para a BE é de 0,7L/Kg³. O V_d da COC é maior que o volume da água total corpórea, porém bem menor que outros fármacos que apresentam ampla distribuição. Isto significa que acumula em certos tecidos, e os estudos *post mortem* mostram concentrações muito maiores no cérebro²³ e no fígado¹⁰⁸ que no sangue.

2.4 Mecanismos de toxicidade da cocaína

A cocaína é um anestésico local com propriedades adrenomiméticas. À semelhança de outros anestésicos, diminui ou impede a transmissão nervosa bloqueando o influxo de sódio nos neurônios sensoriais^{11,98}.

Postula-se que a propriedade de alterar estados de consciência e alto potencial de abuso da COC sejam decorrentes de sua capacidade de bloquear a recaptação dopaminérgica nos neurônios pré-sinápticos cerebrais^{11,20,73,98}. O mecanismo pelo qual se dá esse bloqueio parece ser a ligação da COC aos sítios transportadores da dopamina (DA), considerados por alguns autores como os “receptores” da cocaína. O acúmulo de DA nos receptores pós-sinápticos D1 e D2 parece ser o mecanismo fisiopatológico pelo qual ocorre a estimulação central^{11,31}. A estimulação adrenérgica parece ocorrer pelo mesmo mecanismo¹¹⁹.

A COC apresenta também a propriedade de impedir a recaptação da 5-hidroxitriptamina^{11,20,73,98} mas não estão ainda bem estabelecidos os mecanismos pelos quais ocorre o bloqueio da recaptura deste neurotransmissor. Sabe-se apenas que, à semelhança da DA e norepinefrina (NE), há interferência nos sítios transportadores. A propriedade

convulsivogênica da COC parece se relacionar às propriedades serotoninérgicas¹⁰⁵.

Após exposição à COC em doses recreacionais, há elevação temporária das concentrações de NE e DA, com subsequente redução a valores abaixo dos normais. Na ausência dos mecanismos de recaptação que ocorre com o uso crônico de cocaína, os neurotransmissores afetados pelo fármaco são depletados e tanto a NE quanto a DA tornam-se significativamente reduzidas no cérebro^{31,119}.

Os mecanismos da ação cardiotoxicidade da COC são extremamente complexos e estão apenas parcialmente comprovados, e o exato mecanismo pelo qual ocorre ainda não está totalmente elucidado. Dos resultados experimentais, infere-se que os mecanismos básicos consistem de um sinergismo das ações adrenomiméticas (inibição da recaptação de catecolaminas) e anestésicas (bloqueio dos canais de Na⁺)^{14,51,103,127,152}.

Os neurotransmissores liberados nos nervos simpáticos cardíacos atuam nos receptores α e β adrenérgicos desencadeando uma série de respostas celulares. Ativam os β adrenoreceptores tipo 1 e 2, a quinase protéica e a adenilato ciclase, aumentando a formação do AMP cíclico (adenosina monofosfato)^{14,127}. A estimulação dos α receptores ativa a fosfolipase C, aumentando o inositol trifosfato^{14,127}. Em virtude da fosforilação de várias proteínas, inclusive dos canais de cálcio, há aumento do Ca²⁺ intracelular, o que provoca despolarização da membrana cardíaca, geração do potencial de ação e extrasístole^{14,127,152}. A norcocaína e o CE também apresentam esta propriedade, enquanto a BE e a EME não parecem fazê-lo¹⁵².

Como anestésico local, a COC inibe o influxo de sódio nas células cardíacas, prejudicando assim a condução do impulso nervoso e criando

substrato ideal para a ação da norepinefrina, o que gera taquicardia e eventualmente fibrilação ventricular¹⁴. Essa ação adrenérgica é corroborada pela estimulação central do hipotálamo e medula que, além da taquicardia, originam constrição vascular periférica e subseqüentes elevação da pressão sangüínea e freqüência do pulso, verificadas na intoxicação por COC^{14,117,136}.

VOLVOW *et al.* (1992), após estudar a distribuição da COC e mostrar que as adrenais figuram entre os órgãos que mais concentram o fármaco, discutem as razões dos efeitos cronotrópicos no coração. Afirmam que eles talvez se devam não apenas aos mecanismos centrais, como também à liberação de catecolaminas das adrenais. Este fato poderia explicar por que os efeitos cronotrópicos persistem na intoxicação cocaínica, mesmo quando os níveis plasmáticos decaem. Ou seja, os efeitos seriam causados pelos altos níveis plasmáticos de epinefrina. Além do mais, como não há acúmulo significativo de COC no coração humano, os achados sugerem que o fármaco pode afetar o miocárdio diretamente, seja por sua interação com os receptores adrenérgicos das células do tecido cardíaco, seja por suas propriedades locais ao interferir na condutância das membranas nestes sítios.

Há, ainda, referências de que a COC interage com receptores muscarínicos colinérgicos e glutaminérgicos^{56,59,145}.

Estudos têm demonstrado que, similarmente ao que acontece nos nervos adrenérgicos, a COC interfere no transporte de monoaminas (serotonina e norepinefrina) na placenta. O fato está relacionado com as complicações que ocorrem nesta barreira durante a gestação¹²⁰.

Foi demonstrado também que a BE é um agente de vasoconstrição cérebro-vascular. Ainda que menos potente que a serotonina, é mais potente

que a COC e a ecgonina. A norcocaína não apresenta esse efeito e o EME apresenta propriedades vasodilatadoras⁹⁸.

A hepatotoxicidade relacionada ao uso de cocaína deve-se, como foi citado anteriormente, aos seus produtos de biotransformação, a N-hidroxinorcocaína, cuja oxidação posterior resulta no radical nítróido de norcocaína, que, suspeita-se, converte-se no íon nitrosônio, comprovadamente eletrofílico^{17,18}. Considera-se, assim, que ocorra bioativação da cocaína, uma vez que os produtos resultantes apresentam a propriedade de se ligarem covalentemente às proteínas celulares. Dois mecanismos são evocados para explicar os efeitos citotóxicos: a lipoperoxidação e a interação covalente dos intermediários reativos com proteínas^{17,115}. Há também a possibilidade de estes produtos exercerem toxicidade no SNC, onde aparecem em teores apreciáveis^{12,31}.

2.5 Tolerância, dependência e síndrome de abstinência

Com o uso de doses repetidas de COC há o desenvolvimento de tolerância aos seus efeitos comportamentais, com diminuição dos efeitos psicológicos e fisiológicos⁵³. Entretanto, para os efeitos cardiovasculares, instala-se apenas tolerância parcial. Essa dissociação entre o desenvolvimento de tolerância aos efeitos centrais e aos cardiovasculares pode explicar a ocorrência da cardiotoxicidade durante a intoxicação recreacional^{11,136}.

No intuito de estabelecer a ocorrência do fenômeno de tolerância em paradigma de auto-administração, EMMET-OGLESBY et al (1993), delinearam experimento com ratos e demonstraram haver tolerância aos efeitos da COC, em exposição crônica. Os experimentos de KATZ et al (1993), mostram que os valores de DE 50 variam de 13,3 a 21,7 mg/kg, o que expressa o desenvolvimento de tolerância, ainda que modesta, quando

se compara a COC com outros estimulantes centrais, como, por exemplo os anfetamínicos. Enquanto farmacodependentes podem tolerar até 5,0 g de COC na forma cloridrato, por dia¹⁰⁸, a estimativa de dose letal mínima, para um indivíduo adulto seria de aproximadamente 1,2 g³¹. Fumadores de base livre reportam uso de quantidades que excedem 1g, considerada letal para indivíduo adulto.

O mecanismo pelo qual ocorre tolerância aos efeitos psicológicos da COC não está ainda estabelecido. A não-ocorrência de tolerância cruzada com outro inibidor da recaptura de dopamina, o GBR 12909, sugere mecanismos diferentes de ação. Da mesma forma, não foi demonstrado haver tolerância cruzada com a *d*-anfetamina, apomorfina ou com agonistas seletivos de receptores dopaminérgicos D1 e D2⁸².

À semelhança do que ocorre com os efeitos subjetivos, parece haver tolerância aos efeitos cardiovasculares e o mecanismo hipotético pode relacionar-se com envolvimento de receptores α -2 pré-sinápticos¹³⁶.

Após administração repetida e intermitente de doses recreacionais de COC, parece também ocorrer tolerância reversa aos efeitos cardiovasculares e convulsivantes. Manifesta-se pelo aumento da resposta e sensibilização aos efeitos da cocaína^{31,100}. Há duas possíveis explicações para o fato: 1) a excitação aumentada decorre da diminuição na biossíntese de serotonina, o que leva à potencialização da ação excitatória da DA; 2) o aumento da suscetibilidade a aparecimento de convulsões, sem que haja alteração dos níveis sanguíneos e cerebrais da COC ("*kindling*" farmacológico), em doses consideradas recreacionais, também ocorrem após o uso crônico e parecem envolver características genéticas^{31,100}.

O alto potencial de abuso verificado na farmacodependência da COC explica-se por sua poderosa capacidade de produzir reforço positivo (efeito desejado), devida à potenciação da neurotransmissão dopaminérgica

dos neurônios mesocorticais e mesolímbicos, gerando assim o comportamento compulsivo da busca pelo fármaco^{11,31,88}.

Como já foi referido, na intoxicação cocaínica há acúmulo dos neurotransmissores com conseqüente indução dos receptores pré-sinápticos, decorrente do mecanismo de auto-regulação e subseqüente depleção desses neurotransmissores nas sinapses⁸⁸. Com a retirada da COC, é freqüente ocorrer estado de prostração, que persiste por várias horas. Pode ser acompanhado de franca depressão, fadiga, letargia, insônia, hiperfagia e, por vezes, sensação de abandono e choro profuso. A compulsão pelo uso é a característica mais proeminente e perturbadora e o que estimula o forte desejo e conseqüente abuso¹¹⁹.

Embora reconhecida como um dos fármacos com maior potencial gerador de farmacodependência, a aceitação da neuroadaptação ainda encontra contra-argumentos, pois não há aparecimento de síndrome que possa, caracteristicamente, configurar abstinência. Ocorre, porém, depleção de neuroreceptores^{31,88} e indução de receptores causada por mecanismos de auto-regulação com hiperplasia de sua densidade na fenda sináptica¹¹⁹, fenômenos esses que caracterizam claramente a neuroadaptação.

Há evidências de que os padrões de farmacodependência envolvidos no abuso do *crack* sejam mais proeminentes, com manifestação de grande compulsão para uso repetido e contínuo da droga. Com efeito, esta forma da COC apresenta os elementos ideais para o desenvolvimento do fenômeno: em termos toxicocinéticos, o *crack* tem a propriedade de atingir a corrente sangüínea e o SNC rapidamente; em termos toxicodinâmicos, apresenta a propriedade de, uma vez atingido o sítio-alvo, produzir efeitos prazerosos. Esses são elementos extras nas já significativas propriedades de reforço da COC. Os efeitos rápidos, obtidos com o uso do *crack*, duram poucos minutos. O usuário refere sentir efeitos euforizantes muito intensos,

freqüentemente seguidos de depressão que, por ser tão desagradável, leva à reutilização. Além disso, 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 de COC. Por isso, o ato de fumar é considerado um componente particular do reforço, associado ao uso compulsivo e mais intenso, contribuindo para acelerar o desenvolvimento da dependência^{31,88,112,135}.

2.6 Espectro dos efeitos tóxicos decorrentes do uso abusivo

O uso abusivo de COC traz como consequência o aparecimento de efeitos tóxicos, cuja intensidade varia de acordo com as condições de exposição, ou seja: quantidade auto-administrada, freqüência e tempo de uso e via de introdução no organismo. A suscetibilidade do organismo exposto é fator preponderante, com ocorrência muito freqüentemente de intoxicações agudas.

Os achados de VOLKOW *et al.* (1992), relativos à distribuição de COC em humanos, mostram que há acúmulo significativo de COC no SNC, coração, rins, fígado e adrenais, não ocorrendo, porém, acúmulo nos pulmões, cujos parâmetros cinéticos são muito similares aos observados no plasma. Esses achados podem ser relacionados à expressão da toxicidade em cada um destes órgãos e embasam a coleta de material *post mortem* para a análise toxicológica com finalidade forense.

Devido à diversidade dos mecanismos de ação, os distúrbios decorrentes do uso crônico da COC são de natureza diversa, ressaltando-se os respiratórios, cardiovasculares, hepáticos e os de ordem psiquiátrica, dentre outros.

Efeitos psiquiátricos

Os efeitos subjetivos buscados na auto-administração incluem, preponderantemente, a euforia causada pela estimulação do sistema dopaminérgico¹¹⁹, que independe dos diferentes tipos de absorção. As diferenças residem apenas no tempo necessário para o aparecimento do efeito e na intensidade dos mesmos^{35,34,117}.

A euforia que se segue ao uso de COC é intensa e ocorre em bases previsíveis. É acompanhada de sensação de aumento de energia, vigília e autoconfiança, com comportamento grandiloqüente. Além disso, promove a sensação de supressão de medo e pânico, o que aumenta a euforia. As funções da memória nos processos de julgamento se tornam prejudicadas e o usuário aparenta confusão mental. Pode ocorrer agitação, convulsão e comportamento violento com paranóia,^{105,119,128}.

Após a utilização de doses recreacionais de COC, a habilidade de dirigir fica seriamente afetada por comportamentos imprudentes e agressivos, associados ao senso de poder e atitudes bizarras. A síndrome psiquiátrica varia da euforia ou disforia à psicose esquizofrênica. Ocorre profunda alteração de humor, muitas vezes acompanhada de idéias paranóides, agitação, irritabilidade e depressão, o que reforça o uso contínuo do fármaco^{31,119,135}.

Há ocorrência de manifestações auditivas e visuais psicóticas e de desilusão paranóica, o que pode levar, em alguns casos, a comportamento suicida ou homicida. Anormalidades de humor e comportamentais, normalmente observadas em farmacodependentes de COC, são similares às de pacientes com depressão e esquizofrenia, nos quais se identificou diminuição dos níveis de serotonina cerebrais¹¹⁹.

A utilização de pequenas doses aumenta a libido e os prazeres sexuais pelo retardamento da ejaculação e o uso crônico eventualmente

culmina em impotência sexual ou frigidez. A disfunção sexual é a causa mais freqüente de busca de ajuda médica¹¹⁹.

Efeitos tóxicos no sistema respiratório

Os distúrbios respiratórios estão diretamente relacionados com a via de administração. Assim, a aspiração freqüente, da forma de cloridrato, promove hiperemia reativa da mucosa nasal, com aparecimento de rinite, devido à vasoconstrição³¹.

Os danos respiratórios mais importantes decorrentes do hábito de fumar *crack* são conhecidos como “pulmões de *crack*”. Entre os efeitos inclui-se o aparecimento de bronqueolite obstrutiva, infiltrados e granulomas pulmonares, broncoespasmos, dispnéia, tosse, opacidades pulmonares e rinorréia de líquido pleural^{106,135}.

A aspiração e inalação dos adulterantes pode provocar deposição desses compostos nos seios etmoidais, levando ao aparecimento de sinusite. Quando o adulterante é o talco, pode levar à fibrose pulmonar¹¹⁹. Dependendo da procedência da forma básica utilizada, outros compostos são passíveis de inalação. A pasta de coca, por exemplo, além dos alcalóides da planta, apresenta resíduos de querosene, gasolina, chumbo e manganês⁴⁷.

Efeitos tóxicos nos sistemas cérebro e cardiovascular

Os efeitos no sistema vascular independem da via de administração pela qual se dá a exposição¹²⁷.

A capacidade que a COC apresenta de aumentar a freqüência cardíaca e a pressão sistólica, bem como a sobrecarga cardíaca pela vasoconstrição periférica^{14,35,117,127}, resultam num aumento da demanda cardíaca de oxigênio. Aumenta também a resistência vascular da coronária,

reduzindo o aporte de sangue para o miocárdio^{14,127}, já foi demonstrada a sua ação como pró-coagulante, aumentando a agregação plaquetária¹²⁷. A combinação desses efeitos pode resultar em eventos isquêmicos cardíacos, como infarto do miocárdio ou *angina pectoris*^{14,127}.

A taquicardia resulta tanto da ação periférica, por aumento da estimulação dos receptores β -adrenérgicos no miocárdio, como por estimulação central hipotalâmica. Os experimentos mostram que o limiar de fibrilação ventricular é diminuído na estimulação cardíaca simpática. Parece explicar este fato o desequilíbrio homeostático do cálcio intracelular, que contribuiria para o início e manutenção da fibrilação ventricular^{14,25,127,152}, com comprometimento ainda maior na já comprometida condução do impulso nervoso, devido ao bloqueio dos canais de sódio^{14,127}. O coração pode responder à intensa estimulação ventricular ectópica com taquicardia, fibrilação ventricular e parada cardíaca³¹. Cita-se também aparecimento de miocardite cardiomiopatia e endocardites, essas últimas relacionadas à via intravenosa⁸¹.

A hipertensão decorrente da estimulação adrenérgica é apontada como o principal fator na patogênese do infarto ou da hemorragia cerebral, por causar vasoconstrição ou vasoespasmo principalmente em adulto jovem, e cujo desenvolvimento parece estar associado a anormalidades cérebro-vasculares, incluindo aneurismas^{90,98}. A literatura refere que o acidente vascular cerebral (AVC) pode ser isquêmico ou hemorrágico, e sua patogênese parece ter relação com a forma de uso⁹⁰. Como já foi citado, a COC e seus produtos de biotransformação, à exceção do EME, são vasoconstritores, e atribui-se parcialmente à BE a redução do fluxo que provoca a cefaléia relacionada ao uso de COC⁹⁸. Além da cocaína e produtos de biotransformação, os níveis de serotonina (sabidamente um

potente vasoconstritor para artérias de médio e grosso calibre) e norepinefrina também estão aumentados na intoxicação cocaínica⁹⁸.

Segundo MARLEY et al (1991), o aparecimento das convulsões *kindling*-induzidas relaciona-se a disfunção e falência cardíaca, e é determinado geneticamente. Os autores sugerem que as mortes por COC atribuídas à cardiotoxicidade são, na verdade, resultantes das convulsões induzidas pelo fármaco. Essa afirmação é preocupante, porque já se sabe que a sensibilização aos efeitos da COC (*kindling* farmacológico) desenvolve-se na administração crônica e ocorre, como já vimos, em doses recreacionais.

Efeitos hepatotóxicos

Os produtos de biotransformação resultantes da bioativação oxidativa hepática (N-hidroxinorcocaína, nitróxido de norcocaína e íon nitrosônico), apresentam o potencial de se ligar covalentemente a proteínas celulares resultando no desenvolvimento de necrose hepática^{16,17,18,19,85,124}. Embora persistam divergências sobre as comprovações da relação direta de causa e efeito para os danos hepáticos associados a esses produtos, há crescentes evidências clínicas do efeito hepatotóxico. Já foram referidos aumentos de aspartato aminotransferase e de bilirrubina bem como necrose de parênquima hepático¹⁷.

Experimentos em ratos e camundongos revelam que, após exposição aguda à COC, evidenciou-se dano hepático por aumento significativo dos níveis de transaminase e degeneração gordurosa do hepatócito, acompanhada de necrose parenquimal¹⁷.

Toxicidade perinatal

Grande número dos “bebês da cocaína” exibem evidências de retardamento do crescimento intra-uterino, depressão relativa aos comportamentos interativos, padrões alterados de sono, excitação, irritabilidade, tremor, aumento do tônus muscular e dos reflexos e disfunção visual^{4,28,62,119,137,140,147}.

A benzoilecgonina se relaciona à neurotoxicidade observada em neonatos que caracteriza-se por por neuro-excitação⁸⁶. Uma possível explicação para isso poderia ser o fato de que, enquanto a barreira hematoencefálica se configura como tal em adultos, dado o caráter polar da BE, o mesmo não ocorre com o recém-nascido pois ainda não a tem desenvolvida. Esse dado possibilita ainda inferir que a BE pode ter importante papel nos casos de isquemias e hemorragias cerebrais em recém-nascidos^{31,62}.

2.7 A interação cocaína / etanol

O uso concomitante da COC e etanol é muito freqüente. Figura em praticamente todas as estatísticas a respeito como sendo a associação mais comum^{25,43,49,50,52,57,60,77,78,103,104,143}.

O motivo mais freqüentemente referido para explicar essa associação é a intensificação dos efeitos, causada pela expressão da toxicidade da cocaína que, portanto, pode ser aumentada pelo etanol. Embora alguns autores postulem que a potencialização da COC e etanol se deva à toxicidade do CE^{66,122}, é preciso considerar outros fatores cinéticos da interação. Isso porque, como se sabe, o etanol inibe a biotransformação da COC, o que aumentaria as concentrações plasmáticas do fármaco, com o conseqüente aumento da biodisponibilidade e efeito tóxico^{43,104,117,124}.

FARRÉ *et al.* (1993) e PEREZ-REYES *et al.* (1992), estudando tal interação sob o ponto de vista cinético e da natureza do efeito, realizaram experimentos em que a COC, por via intranasal, e o etanol, por via oral, foram administrados a indivíduos na forma de “simples cego” (apenas um dos fármacos era substituído por placebo). Ambos os fármacos estavam em doses compatíveis com as utilizadas recreacionalmente. Os autores constataram que o etanol, administrado em primeiro lugar, aumenta significativamente a AUC da COC. Quando se combina este achado ao fato, verificado nestes experimentos, de que não se modificou a meia-vida de eliminação da cocaína, pode-se deduzir que há maior concentração da mesma em condições de agir. Por si só, isso pode ser responsável pelos efeitos aumentados da COC produzidos pelo etanol. Verificou-se também que na interação com etanol, é menor o tempo para se atingir o pico máximo de concentração plasmática de COC, o que poderia ser explicado, pelo menos na forma de administração do experimentos (etanol precedendo à COC), pela vasodilatação provocada pelo álcool etílico. A absorção do etanol nos dois experimentos não foi modificada pela COC.

Experimento semelhante, conduzido por PEREZ-REYES *et al.* (1994a), alterando-se as condições da administração da COC para 30 min antes da administração de etanol, não aumentou significativamente as concentrações plasmáticas da COC. Segundo o autor, isso mostra a influência da ordem de administração na interação entre os fármacos. Todavia, devido à meia-vida relativamente baixa da cocaína, o tempo de 30 min delineado no experimento pode ser considerado longo para se estudar esta interação.

Outro achado importante na associação cocaína/etanol é a constatação de que os teores de NCOC são por vezes maiores que o dobro na interação, quando comparados à COC administrada isoladamente^{19,50}.

Como já citamos, o etanol é farmacologicamente ativo, podendo portanto potencializar a ação central da COC; além disso, sua biotransformação gera compostos reativos que apresentam o potencial de se ligarem covalentemente a proteínas celulares, resultando no desenvolvimento de necrose hepática. Esse efeito é frequentemente relacionado à potencialização da hepatotoxicidade da COC, previsivelmente aumentada pela presença de etanol, um conhecido hepatotóxico^{16,17,18,19,50,124}.

As referências por parte dos usuários de haver intensificação ou prolongamento dos efeitos buscados com a associação COC/etanol poderia ser explicada pelo aparecimento de CE, cujos mecanismos de ação e equipotência são semelhantes aos do precursor^{19,59,77}. Alega-se também que a combinação dos dois fármacos constitui uma maneira de evitar os sintomas de disforia⁷⁷ e os ansiogênicos decorrentes da abstinência à COC, frequentemente acompanhados de cefaléia^{43,98}.

Essa cefaléia poderia ser explicada pela diminuição dos teores de BE que promove vasoconstrição, relacionada com as severas enxaquecas espasmódicas^{43,98,129}. ROBERTS *et al.* (1993), referem que o pré-tratamento com etanol em animais aos quais foi administrada COC, diminuiu pela metade os teores de BE, enquanto o pico de concentração hepática da COC, EME e NCOC aumentou de 2 a 3 vezes.

Quanto à natureza do efeito, constata-se significativo aumento dos efeitos subjetivos relacionados à euforia e bem-estar na associação dos dois fármacos^{50,145}. Os voluntários desses experimentos referem o desenvolvimento mais acentuado da euforia, relacionada à COC, e a diminuição da sensação do grau de intoxicação alcoólica. Essa combinação, adicionalmente, parece produzir um perfil do efeito que, além de mais pronunciado, apresentou avaliação qualitativamente superior por parte dos voluntários que referiram sensação de diferenciado bem-estar. Assim, é

presumível que a associação seria mais passível de abuso do que a utilização do etanol ou COC separadamente⁵⁰, intensificando, portanto, o potencial de abuso dessa “mistura”.

A interação COC/etanol produz também aumento significativo na frequência cardíaca e na resistência vascular sistêmica^{50,145}. A magnitude dos efeitos cardíacos e na pressão arterial implicam aumento de risco de complicações cardiovasculares, o que de fato se observa ocorrer na associação entre os dois xenobióticos, quando comparado com os referidos à COC como fármaco único⁵². HENNING *et al.* (1994), demonstraram que a COC associada ao etanol produz uma depressão da contração ventricular e relaxamento que excede à soma aritmética dos efeitos da COC e do etanol em separado.

Considera-se que a mortalidade e a morbidade aumentam quando esses dois compostos^{52,130} são administrados concomitantemente, havendo citação de que tal uso faz crescer em até 18 vezes o risco de morte súbita associada à COC⁹¹.

HIME *et al.*(1991), referem que, em um estudo epidemiológico realizado em casos positivos para COC, houve um aumento de 21,5 vezes na incidência de morte súbita em pessoas com doenças cardíacas quando COC e etanol estavam associados, comparativamente àqueles onde a COC aparecia como único agente. Esse risco dramaticamente aumentado, segundo os autores, poderia estar sendo mediado, pelo menos em parte, pelo CE, ou ser causado, conforme postula REGAN (1990) pela potencialização dos efeitos produzidos pelo etanol, sabidamente cardiotoxico^{52,65,122}.

Nossa experiência no STTF revela que o etanol ocorre em aproximadamente 56% dos casos de óbito por cocaína, à semelhança do referido por BUNN *et al.* (1992), que citam ocorrência em 62% das mortes

por cocaína havidas no ano de 1992, na Flórida, e significativamente maior que os 33% referidos por TARDIFF *et al.* (1989).

O aumento dos efeitos da COC quando administrada concomitantemente com o etanol pode ser relacionado ao aumento dos níveis plasmáticos observados na interação. Entretanto, as mudanças observadas são menores do que aquelas esperadas em bases que consideram a soma dos níveis plasmáticos de NCOC e CE, já que a condição de interação praticamente dobra os níveis desses produtos⁵⁰.

2.7.1 Toxicidade do cocaetileno

O cocaetileno é equivalente à COC na inibição do [³H]GBR12395⁷⁷ e [³H]mazindol⁵⁹ na recaptação da DA. Conseqüentemente, é equipotente na inibição da recaptação da DA nos *synaptosomes*, promovendo, portanto, mesmo padrão de aumento da concentração de DA no *nucleus acumbens* após sua administração^{20,59,75,77,104,149}. IYER *et al* (1995) demonstraram essa hipótese em primatas não-humanos, a partir da constatação de que tanto a COC com o CE aumentaram em cerca de 4 vezes os teores de DA nos 5 a 10 minutos seguintes à administração intravenosa. Em estudos comportamentais que comparam a equipotência da COC e CE, demonstrou-se que o CE substitui completamente, e de forma dose-dependente, a COC, com DE₅₀ maior que a do precursor, sendo portanto menos potente¹⁴⁹.

Os efeitos euforizantes reportados por indivíduos que receberam doses equimolares de COC e CE são indistinguíveis, embora mais tardios, na administração do CE¹⁰³. Estudos realizados com doses equivalentes de COC e CE intravenosamente, mostraram que em humanos o CE é menos potente que a COC no que diz

respeito aos efeitos subjetivos, embora as concentrações dos dois toxicantes tenham sido indistintas enquanto persistiu o efeito estudado¹¹⁸.

Alguns estudos citam que o CE é consideravelmente menos potente que a COC em sua ação no nível de serotonina e norepinefrina, parecendo, portanto, ser agonista mais seletivo da DA que a COC^{20,25,59,73,75,130}. MEEHAN et al (1995), referem que o CE induz significativamente a convulsões por mecanismos neuroreguladores, o que torna possível se supor que produz efeitos letais. Este dado não encontra embasamento teórico quando se tenta explicar que a propriedade convulsivogênica da COC seja atribuível à sua ação serotoninérgica, uma vez que o CE não se mostrou equipotente à COC neste efeito. Estudos em camundongos revelam que a COC e o CE são equipotentes na indução de convulsão, passível de ocorrer em doses que variam de 55 a 80 mg/Kg administrados intraperitonealmente⁸³.

O CE produz também efeitos psicomotores estimulantes em camundongos, qualitativamente similares aos verificados com a COC, porém com potência aproximadamente 4 vezes menor^{83,149} e, nos estudos de auto-administração em macacos⁷⁷ é equipotente à COC, o que atesta seu potencial de abuso.

O CE é mais potente como bloqueador dos canais de sódio do que a COC, produzindo uma hiperpolarização significativamente maior que a correspondente à COC¹⁵², o que contribui para o distúrbio da condução cardíaca. Parece, também, ser mais potente que a COC como indutor de efeitos inotrópicos negativos em miócitos isolados¹⁵².

A exemplo da COC, o CE apresenta semelhança estrutural com a atropina e, portanto, funciona como antagonista competitivo nos receptores muscarínicos⁵⁹. Além disso há evidências de que os efeitos aditivos decorrentes do bloqueio dos receptores muscarínicos e estimulação simpática, que sabidamente ocorre quando da administração da cocaína, podem levar à exacerbação desses efeitos^{32,59}.

Também à semelhança da COC, o CE produz aumento de todas as medidas cardiovasculares. Aumenta a pressão sistólica e a frequência cardíaca; em relação ao aumento da pressão diastólica, entretanto, apresenta menor potência que a COC¹⁰³. PEREZ-REYES *et al.* (1994b), em experimento com humanos aos quais foram administradas doses equivalentes de COC e CE intravenosamente, verificaram que o aumento da frequência cardíaca provocada pelo CE é da ordem de 45% inferior à induzida pela COC.

Estudos demonstram que o CE é equipotente à COC na produção de radicais livres, gerados durante a ação de enzimas P₄₅₀. Ambos induzem à formação maciça de espécies reativas de oxigênio NADPH dependentes, em homogeneizados de cultura de hepatócitos e suspensão de fração microssômica hepática. Há evidências também de que é similar ao da COC o potencial do CE de induzir necrose de hepatócitos através de mecanismos oxidativos¹⁸.

A toxicidade aguda do CE, segundo HEARN *et al.* (1991b), quando comparada à da COC, em ratos, mostrou ser 1,5 vez mais potente que o precursor na mediação da letalidade. Para as duas substâncias, a letalidade seria aditiva. Nesses experimentos, o CE apresentou DL₅₀ por via intraperitoneal, em camundongos de 60,7 e 63,8 mg/kg, respectivamente em fêmeas e machos; sob as mesmas

condições, a DL₅₀ para a COC foi de 93,0 mg/kg para ambos os sexos. Nos experimentos de KATZ *et al.* (1992), estabeleceu-se que a DL₅₀ para o CE, para a via intraperitoneal, está entre 70 a 100 mg/Kg, o que corresponde a cerca de 85% da COC.

SCHECHTER *et al.* (1995), conduziram experimentos em que demonstraram que o índice de letalidade é aumentado pela administração concomitante de etanol a doses de baixa letalidade da COC. Assim, doses que produziam 10% de morte em camundongos machos e 20% em fêmeas passaram a produzir, respectivamente, letalidade de 80 e 100% dos animais quando co-administradas com etanol em doses não-produtoras de letalidade. Nesse experimento, a DL₅₀ do CE foi determinada como sendo de respectivamente 67,21 e 64,27mg/kg em machos e fêmeas pela via intraperitoneal. O CE foi considerado estatisticamente mais potente que a COC na mediação da letalidade, cuja DL₅₀ determinada nas mesmas condições foi de 101,55 mg/kg para machos e 90,0 mg/kg para fêmeas. No mesmo experimento, o etanol se mostrou francamente menos potente que os dois toxicantes, fornecendo DL₅₀ de 9,71 e 9,45 mg/kg, respectivamente, para camundongos machos e fêmeas.

Do exposto fica claro que a interação cocaína/etanol apresenta potencial de aumento de toxicidade, inclusive letalidade. Isso pode ser explicado de três maneiras: 1) formação de cocaetileno, mais letal¹³⁰; 2) aumento das concentrações de COC circulante e, portanto, efeitos prolongados¹²⁴; 3) potencialização dos efeitos do etanol¹²².

Embora às vezes haja divergências quanto à causa preponderante do aumento da letalidade, há um consenso entre os autores de que este fenômeno ocorre e deve ser investigado. Integra essa investigação a quantificação do CE sempre que detectado. Óbvio

está, portanto, que os dados experimentais oriundos de casos clínicos e forenses podem contribuir, como postulam alguns autores^{66,130}, para a elucidação do papel desse toxicante na mortalidade e morbidade associadas ao abuso concomitante da COC e do etanol.

2.8 Fluidos e tecidos utilizados na caracterização da exposição humana à cocaína

A determinação simultânea da COC, CE e seus produtos de biotransformação é de suma importância na caracterização da intoxicação, quer do ponto de vista clínico quer forense. Muitas vezes, a exigüidade de um fluido exige que outros sejam utilizados para que se caracterize a exposição com propriedade. Obviamente, os conhecimentos da disposição cinética e o objetivo da análise orientam a escolha da amostra biológica a ser utilizada.

A urina constitui amostra de eleição nos casos em que se deseja verificar o uso de COC. Aproximadamente 80% da dose de COC utilizada é excretada como EME e BE, o que faz com que a análise desses dois produtos na urina seja conduta de eleição nos programas de verificação de uso. CONE *et al.* (1995), referem que, em experimento em que foram ministrados 42 mg de *crack*, a análise de COC, em metodologia cujo limite de detecção era de 1ng/mL, mostrou que, apesar das concentrações diminuírem rapidamente, a mesma foi detectada até 40 horas após o uso. Há referências, entretanto, de que alguns usuários crônicos que interromperam o uso de COC e continuaram a excretá-la na urina por até 15 dias, em concentrações que excederam 10 ng/mL, presumivelmente, devido à liberação do agente do tecido adiposo³⁴. No mesmo experimento de CONE (1995), o limite de detecção para os demais produtos de biotransformação presentes na urina ficou ao redor de 3 a 6 ng/mL. A BE e o EME, embora

com padrões de eliminação diferentes nas primeiras 24 horas, foram detectados até 72 horas após o uso. O produto de pirólise da COC, a metilecgonidina, apareceu na urina em baixas concentrações (5 a 27 ng/mL) imediatamente após o uso, e permaneceu detectável durante 28 h. Da mesma forma, a norcoína e a benzoilnorecgonina, presentes nas concentrações de 5 a 27 ng/mL e 3 a 16 ng/mL, também foram detectáveis até 28 horas após o uso. BURKE *et al.* (1990), referem a eliminação urinária da BE em níveis ao redor de 300ng/mL por 120 horas ou mais, após a última auto-administração, em usuários que integravam programa de verificação de uso.

O plasma é a amostra utilizada nos estudos de disposição cinética e o sangue total constitui amostra *post mortem* de eleição no estabelecimento da *causa mortis* por superdosagem de COC. A relação plasma/sangue, determinada nos experimentos de SUKBUNTERING *et al.* (1996), ficou entre 0,99 e 1,03 para a faixa de concentração de 100 a 1500ng/mL, e pH entre 7,2 e 7,6. Após o uso recreacional, os teores máximos de COC no plasma variam, dependendo da via de administração, entre 40 e 900 ng/mL^{31,35,70}, e decaem rapidamente devido à curta meia-vida (15 a 120 minutos)^{35,37,64}.

A BE aparece no plasma após tempos que variam entre 15 e 30 min, com ocorrência de pico máximo de concentração entre 1 e 4 horas dependendo da via de administração. Decai muito mais lentamente que a COC^{35,37}, sendo por esta razão considerada o analito predominante nesta matriz, principalmente em períodos mais prolongados⁶⁴.

O EME aparece no plasma em quantidades aproximadamente 8 vezes menores que a COC e requer métodos com limites de detecção relativamente baixos para que possa ser detectado^{36,84}. Em experimento realizado por CONE (1995), mesmo utilizando metodologia com limite de

detecção de aproximadamente 1ng/mL não houve aparecimento de EME no plasma de 5 entre 6 voluntários, até 12 horas após administração de COC de respectivamente 25 mg por via intravenosa, 32 mg por via intranasal e 42 mg de base livre por via respiratória; no único voluntário onde foi detectado, seu aparecimento se deu 2 horas após a administração unicamente pela via intranasal com concentração máxima de pico de 7 ng/mL.

Nos experimentos de MILLER *et al.* (1994), o cocaetileno também aparece no plasma após uso da COC em associação com o etanol, em concentrações inferiores a 5% das referentes à COC. Valores de até 15,6 e 18,5% do precursor nas concentrações plasmáticas de pico foram atingidos para doses de respectivamente 1,25 e 1,9 mg/kg de COC pela via intranasal, nos experimentos realizados por PEREZ-REYES *et al.* (1992), e ficaram ao redor de 15%, nos experimentos de McCANCE-KATZ *et al.* (1993).

Outros produtos de biotransformação, como por exemplo a norcocaína, norbenzoilecgonina, ecgonina, normalmente não integram as análises de rotina. Restringem-se às pesquisas na área de cinética e investigação de mecanismos de ação.

A saliva constitui fluido importante, dado que apresenta concentrações da ordem de três vezes àquelas correspondentes ao sangue^{31,36}. Com base na equação de Handerson-Hasselbalch, quando a saliva apresenta pH de 6,8, a razão da concentração saliva/plasma é da ordem de 3,8¹⁴⁴. CONE *et al.* (1994), referem que as concentrações de BE encontradas na saliva foram menores, enquanto que as de EME foram maiores do que as correspondentes ao plasma. Há referências também à detecção de CE na saliva de animais de experimentação, em concentração da ordem de 1,3 da correspondente plasmática¹⁰.

Nos últimos anos, o cabelo tem sido apontado como matriz útil para verificação de exposições progressas^{13,64,133}, inclusive em neonatos de mães

usuárias⁸⁷. Estima-se que após a utilização de dose única de COC, esta pode ser detectada neste fânero até 8 meses após⁶⁴. Segundo HENDERSON *et al.* (1996), porém, as variações interindividuais e a falta de conhecimento do mecanismo de incorporação da COC ao fio de cabelo não possibilitam que a análise neste material possa inferir sobre dose, tempo e frequência de uso. A análise da COC, do CE e de produtos de biotransformação presentes nos pêlos constitui um desafio ao toxicologista devido às características dessa matriz que, por ser composta principalmente de proteínas, requer tratamento químico bastante crítico na extração. Além disso, a ainda escassa informação sobre os mecanismos de incorporação e a disposição cinética neste fânero dificulta a interpretação do achado^{13,36}. A COC é o fármaco que ocorre em maior concentração no cabelo, seguida da BE, do EME e do CE^{64,133}, sendo que a relação entre os teores de COC/BE seria de aproximadamente 8⁸⁴.

O conhecimento da ocorrência de COC na secreção láctea orienta a análise do fármaco e demais produtos de biotransformação no leite. Como já foi citado, o coeficiente de partição leite/sangue é de aproximadamente 20, o que significa que os teores ingeridos pelos recém-nascidos submetidos a esta forma de exposição podem ser relativamente altos. DICKSON *et al.* (1994), baseados no intervalo de concentrações de cocaína relacionadas a estados de euforia, e considerando que a exposição se dá na forma de dose única elevada, posto que a secreção láctea concentra a COC, inferiram que os níveis sanguíneos no recém-nascido podem atingir valores por vezes relacionados com intoxicação aguda. Há também evidências de que o CE seja secretado no leite⁴⁵.

O mecônio, bem como tecidos e cabelos⁸⁷ de recém-nascidos de mães com suspeita de exposição à COC, também são utilizados para análise da COC e demais produtos nos programas que objetivam o delineamento da

exposição intra-uterina. Enquanto sangue e urina de recém-nascidos refletem exposição recente, o mecônio é considerado um marcador de exposições remotas^{86,92}. Segundo LEWIS *et al.* (1995), o mecônio seria o fluido mais indicado para análise porque há acúmulo da COC, e eventualmente de outras drogas, relativo à última metade da gestação, onde ficam ligadas aos fragmentos de célula dessa matriz, o que efetivamente retarda a difusão. LEWIS *et al.* (1994), referem o achado de CE em 31,6% dos 361 casos positivos para COC e BE em mecônio, em concentrações da ordem de 18% das relativas à COC e 13% às de BE. Estas são superiores àquelas encontradas na urina (15 e 3% , respectivamente da concentração de CE e de BE encontrada em mecônio), o que revela que o CE acumula mais neste fluido do que na urina. O CE serve também como indicador da exposição materna ao etanol e propicia investigações epidemiológicas relativas à associação, que em termos, por exemplo, de estudos neurocomportamentais, podem apresentar padrões diferentes daqueles relativos à exposição apenas à COC.

O sangue total, juntamente com as vísceras, são as amostras mais utilizadas em análises toxicológicas com finalidade forense, mormente no estabelecimento da *causa mortis* por COC.

HEARN *et al.*(1991a), estabeleceram que há diferenças entre as concentrações de COC encontradas quando da coleta no local do óbito e daquelas reveladas por ocasião da autópsia. Ainda mais, os resultados dos experimentos indicaram que os teores de COC diminuíram no sangue coletado da veia subclávia, enquanto os correspondentes à cavidade cardíaca, aorta e veia femoral aumentaram durante o intervalo entre óbito e autópsia. A explicação poderia ser a liberação *post mortem* dos sítios de armazenamento, fato corroborado pela constatação experimental de que as concentrações do humor vítreo foram diferentes, para o mesmo cadáver

humano, quando a coleta dos olhos foi realizada em intervalos diferentes. Isso torna muito improvável que a diferença seja anterior ao óbito⁶⁰ QUATREHOMME *et al.*, (1994), comprovaram a existência de “cinética *post mortem*” em sangue, fígado e rim de ratos e idealizaram um modelo para estudar esta redistribuição para alguns fármacos de interesse médico-legal.

A COC se acumula no cérebro, fígado e rins onde os teores são iguais ou superiores aos do sangue^{23,60,119,145}.

O conhecimento de que a concentração cerebral excede em várias vezes a sangüínea, orienta a análise *post mortem* em tecido cerebral^{35,119,145}. Devido ao alto teor lipídico e baixo teor em enzimas com capacidade para biotransformar a COC, esta matriz provê um meio mais estável que o sangue^{23,60}. Apresenta porém os inconvenientes de não propiciar comparações com estudos *in vivo*, não ser amostra universalmente disponível e ainda ser sua extração, bastante complexa.

O fígado também constitui matriz útil. Os experimentos de VOLKOW *et al.* (1992), estimam que a concentração da COC e produtos de bitransformação no fígado, após injeção intravenosa, é da ordem de 20-22% de toda a dose. Embora alguns autores refiram que, nos achados *post mortem*, os teores neste órgão sejam da ordem de 20 vezes dos correspondentes ao sangue^{119,145}, não é o que observamos em nossa prática profissional. À semelhança de outros autores, nossa prática, mostra que, em média, os teores de COC e BE estão por volta de 1,5 vez acima dos verificados no sangue total¹⁰⁸. Uma possível explicação para este fato poderia ser a alta concentração de enzimas neste órgão com possibilidade de degradação *post mortem* e formação de BE, EME e CE. Não encontramos na literatura consultada qualquer referência específica a respeito da formação *post mortem* de BE ou EME no fígado. MORYIA *et al.* (1996),

referem que há perda de COC da ordem de 25% após a 1ª hora quando houve aumento dos teores de CE da ordem de 2 vezes da inicial. Esses autores referem que a formação *post mortem* de cocaetilenol depende das concentrações de COC e etanol e também da temperatura do cadáver. Concluem que, devido às perdas e formação *post mortem* dos dois analitos, o fígado não constitui espécime indicado na determinação dos mesmos.

O humor vítreo constitui matriz relativamente simples em termos analíticos, quando comparado ao sangue *post mortem*, e seu uso vem sendo indicado na análise de vários xenobióticos de interesse forense, principalmente nos casos de análise em corpos em decomposição. Isso se deve ao fato de se encontrar isolado em compartimento relativamente protegido da invasão de microorganismos e, assim, constitui amostra privilegiada em relação aos fenômenos de putrefação^{94,95}. Em termos anatômicos, o humor vítreo se localiza numa região não muito vascularizada (na cavidade posterior do olho, entre o cristalino e a retina). A passagem de xenobióticos para o humor vítreo dá-se por simples difusão através da barreira lipídica entre este fluido e o sangue^{94,95}. As correlações das concentrações de COC entre humor vítreo e sangue não estão ainda estabelecidas, nem tampouco os fenômenos de distribuição *post mortem*. Por ora sua aplicação fica mais restrita à caracterização deste fármaco nos casos de putrefação⁵⁵.

A análise de COC em tecidos em decomposição é factível^{55,99}, embora em bases teóricas pudesse ser esperado o contrário, pois, como já abordamos, o caráter éster da COC lhe confere labilidade e pode degradar rapidamente por mecanismos enzimáticos ou espontâneos³¹. A interpretação do achado, por parte dos patologistas e toxicologistas forenses, deve ser feita com cautela, sendo que a negatividade não exclui a intoxicação, pois a velocidade da degradação vai depender de inúmeros fatores, como

interrupção dos processos de degradação enzimática, pH, temperatura, possibilidade de formar complexos com outros compostos mais resistentes à degradação etc.

2.9 A cocaína como agente da *causa mortis*

Segundo a classificação internacional de doenças, é considerada a causa básica do óbito “(a) a doença ou lesão que iniciou a sucessão de eventos mórbidos que levou diretamente à morte, ou (b) as circunstâncias do acidente ou violência que produziu a lesão fatal”⁸⁹.

A cocaína encontra-se classificada na CID-10 (10ª Classificação Internacional Estatística de Doenças)¹¹⁴, como agente externo de mortalidade e morbidade, sob os códigos, respectivamente, X42.; X62.;Y12.;Y.48.3, caso o óbito tenha ocorrido acidentalmente, com propósitos suicidas, “não determinado”ou por efeito adverso decorrente de uso terapêutico. Nesse contexto, é considerada como agente de morbidade nos casos em que os achados resultantes das investigações forenses concluem que o óbito foi causado pela COC como único agente ou em combinação com outro⁴⁹.

Considera-se que a morte ocorreu por COC nos casos onde foi encontrada no sangue, urina ou qualquer outro tecido, durante a análise *post mortem*, e onde não haja evidências de óbito por trauma, causas “naturais” e outros xenobióticos⁴⁹. Os achados de necrópsia, em função de sua inespecificidade, conferem às análises laboratoriais especial importância na elucidação da *causa mortis* por este toxicante. A interpretação adequada do resultado analítico encontrado requer conhecimentos dos fenômenos cinéticos do fármaco, patologias relacionadas com o óbito, bem como dos mecanismos que as desencadearam.

2.9.1 Efeitos tóxicos relacionados à letalidade

As causas mais freqüentes da mortalidade associadas à COC incluem infarto do miocárdio, arritmias ventriculares e acidente vascular-cerebral^{103,128}. Podem ocorrer, porém, outras manifestações, que incluem estimulação central profunda com psicoses, convulsões, disfunção respiratória, ou mesmo hiperpirexia severa³¹.

Os efeitos letais da COC são produzidos através de mecanismos complexos que incluem sítios de ação centrais e periféricos. Pelo que já foi exposto, fica claro que o CE tem o potencial de funcionar *per se* como agente de efeitos aditivos. Entretanto, necessita de mais investigações⁶¹ a contribuição dos mecanismos centrais e periféricos na toxicidade combinada da COC e do CE.

Estudos dos efeitos letais no SNC produzidos pela COC, em ratos, indicam que os antagonistas de receptor D1, como por exemplo SCH23390, protegem contra a morte induzida pela COC, enquanto os antagonistas de D2, como o haloperidol, não se mostraram efetivos em bloquear a letalidade^{59,61}. Esses mecanismos, como já abordamos, também são oriundos da presença de CE, evidenciando, dessa forma, o suposto mecanismo de ação.

Estima-se que a dose letal mínima da COC cloridrato para um indivíduo adulto seria de 1,2 g^{31,108}. No entanto, há referências de morte em indivíduos suscetíveis com doses tão baixas quanto 30 mg do xenobiótico utilizado via mucosas¹⁰⁸.

2.9.2 Letalidade e achados de necrópsia

Estudos epidemiológicos revelam que o óbito atribuído à toxicidade da COC podem ser agrupados em, pelo menos, três categorias, baseadas nos achados laboratoriais e fatores circunstanciais. A primeira se refere à “clássica” *overdose* por COC, fácil de ser reconhecida por seus teores sangüíneos relativamente altos, ou seja, acima de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ ^{108,128}. A segunda refere-se aos casos em que, embora os teores não sejam equivalentemente altos (se encontram por volta de 400 a 1000 ng/mL), a sintomatologia que precedeu o óbito (convulsões, comportamento bizarro, elevação da temperatura corpórea etc) ou os achados evidentes de necrópsia, facilitam a caracterização. A terceira, e mais freqüente categoria, é a chamada “toxicidade de dose baixa”, em que, mesmo nos casos onde as evidências sugerem a COC para a causa do óbito, as concentrações sangüíneas se encontram na mesma faixa de concentração que as apresentadas por usuários. RUTTEMBERG *et al.* (1991), sugerem que sejam quatro as categorias, pelo desdobramento da segunda categoria intermediária em duas, a saber: aquelas em que a doença cardiovascular contribuiu para o óbito; e aquelas em que ocorreu delírio *ante-mortem* (gritos, hipertermia, pupilas dilatadas, paranóia, comportamento bizarro, força inesperada).

Com o advento do hábito de fumar *crack*, os níveis sangüíneos relacionados com o óbito diminuíram¹²⁸. ESCOBEDO *et al.* (1991), referem que numa averiguação sobre teores de COC relacionados ao óbito, foram menores os relativos àqueles casos em que houve administração de base livre ou *crack*, comparados aos advindos da utilização da COC na forma de cloridrato. Este fato pode ser explicado pela constatação de que, nesta forma de uso, o fármaco é

introduzido no organismo na forma livre e, portanto, com imediata passagem pelas barreiras lipídicas. Assim, a velocidade com que atinge o sítio de ação, de 5 a 10 segundos (mais rapidamente até que por via intravenosa), é indicativa de que a correspondência com o compartimento central se dá na relação de 1:1. Se o CE também for encontrado, sua toxicidade deve ser considerada, o que adiciona um outro elemento à interpretação do achado¹²⁸.

Como já abordamos, há também possibilidade de ocorrerem mudanças nas concentrações no intervalo *post mortem*. Isso orienta a conduta óbvia de que a coleta deve ser realizada assim que possível e, ainda, a necessidade de citar o sítio de coleta para propiciar a comparação. Em nosso meio, assim como em outras partes do mundo, o mais comum é se coletar sangue da cavidade cardíaca. A degradação *in vitro* deve ser evitada pela adição de inibidor enzimático em quantidades apropriadas. Um outro fator muito importante a ser levado em consideração é a exatidão da metodologia utilizada, pois, caso esta não tenha sido gerada nos níveis de excelência necessários, configura-se outro elemento de incerteza na interpretação do achado^{30,128}.

Assim como em qualquer investigação de letalidade, é muito importante o histórico das circunstâncias da morte. Depoimentos de testemunhas referindo agitação, convulsão, comportamento bizarro e violento, com paranóia, morte ocorrida em atividade sexual, morte súbita e inesperada em indivíduo jovem e saudável, dor aguda no peito etc. podem indicar intoxicação cocaínica^{119,128,135}. Também devem ser considerados os achados no local do óbito, como presença do sal, *crack* ou qualquer parafernália que indique uso de droga ou tentativa de socorro. Assim, presença de toalhas molhadas, banho

gelado, imersão do corpo em água, podem indicar tentativas de dirimir a hiperpirexia que ocorre e pode permanecer até horas após a morte^{11,128}.

Alguns achados de necrópsia também constituem dados importantes. Entre eles, temos: marcas de mordidas nos lábios ou língua, sugerindo que houve convulsão, morte aparentemente natural pela ruptura de aneurisma, infarto cerebral, ruptura de aorta, isquemia e infarto do miocárdio ou hipertensão maligna em pessoas jovens^{11,119,128}.

KARCH *et al.* (1991), referem que a overdose de COC pode parecer morte natural, com os seguintes achados anátomo-patológicos: espasmo coronário, constrição arterial coronariana, necrose de contração em bandas (consta ser o achado mais importante), miocardiopatia de dilatação, miocardite linfocítica e arteriosclerose coronariana.

2.9.3 Teores sangüíneos de COC, BE, EME e CE em casos *postmortem*

HIME, *et al.* (1991), reportam que há casos onde os teores de COC não se enquadram àqueles normalmente associados a *causa mortis*. Lançam, então, a hipótese de que os efeitos aditivos do CE podem ter contribuído para a letalidade verificada. Tentando interpretar os achados *post mortem* desses casos, associa-os às circunstâncias que envolvem o óbito. Assim, acredita que poderia ter havido um efeito aditivo do CE presente nos casos em questão, ou ainda interação letal em nível da natureza do efeito, uma vez que nos casos estudados havia por ocasião do óbito associação com atividade sexual, que implica em estresse cardiovascular.

ESCOBEDO *et al.* (1991), referem que os resultados obtidos em averiguação dos teores de COC relacionados à *overdose* foram significativamente maiores (média 2,8 µg/mL) quando a COC ocorreu como fármaco único do que aqueles onde a intoxicação se deu concomitantemente com outros, inclusive o etanol (média 0,9 µg/mL). Segundo o autor, este fato poderia ser explicado pela potencialização quanto aos efeitos cardiotoxicos produzidos pelo etanol, ou pela toxicidade que, como já vimos, alguns autores atribuem ao CE⁶⁶. Os níveis limítrofes encontrados neste trabalho, entretanto, estão anormalmente altos (17,80 e 49,70 µg/mL) e, embora o autor tenha referido a exclusão dos casos de *body packing*, estes valores se situam além daqueles relacionados com esta síndrome, segundo atestam nossos achados no STTF.

Por outro lado, a referência de que o etanol inibe a biotransformação da COC, elevando suas concentrações *in vitro*^{43,124} e *in vivo*^{103,105,117}, leva, como já citamos, a controvérsias sobre se, de fato, a expressão da toxicidade se dá pelo CE *per se* ou se pelo aumento dos teores de COC.

Em adição à intervariabilidade individual em relação ao metabolismo e à suscetibilidade individual à toxicidade da COC, há, como já foi abordado, possibilidade de hidrólise *post mortem*, que ocorre: entre o horário do óbito e a coleta (duração imprevisível), durante a coleta por ocasião da autópsia, ou *in vitro* após a coleta, durante o transporte ao laboratório e durante a estocagem, antes da análise toxicológica^{60,71,72}.

ISENCHEMIDT *et al.* (1992b) estabeleceram que há possibilidade de se inferir sobre os teores de COC por ocasião do óbito através dos conhecimentos dos teores de COC e EME presentes

no sangue *post mortem*. A inferência se embasa no estudo da estabilidade da COC *in vitro*, realizada pelos mesmos autores. Baseiam-se em cálculos matemáticos e atribuem meias-vidas médias de 7,2 e 110 horas para COC *in vitro*, quando estocada sem preservação a 25 e 4°C, respectivamente, o que corresponde às constantes de hidrólise $k_1=0,0963/h$, quando da estocagem a 25°C e $k_2=0,0063$ a 4°C. O cálculo do valor preditivo da concentração *perimortem* é realizado através da soma das concentrações de COC e EME (em μM), obtendo-se assim a concentração equivalente molar da COC que, por conversão, resultaria no valor estimado. Como os próprios autores postulam, os fenômenos *post mortem* passíveis de ocorrer, como, por exemplo, redistribuição associada à lise celular, seriam uma limitação à aplicação deste modelo matemático.

HEARN *et al.* (1991a), referem que as diferenças nas concentrações que demonstraram ser sítio-dependentes seriam, portanto, resultado dos fenômenos de liberação de locais de armazenamento e hidrólise. Dependendo do fenômeno que preponderar, poderia haver aumento ou diminuição dos teores encontrados.

Os teores de COC nos achados de ESCOBEDO *et al.* (1991), em averiguação de óbito, forneceram média de 0,3 $\mu g/mL$ (n=14) naqueles casos onde houve auto-administração de base livre ou *crack*. Tal média foi significativamente menor do que naqueles casos que advieram da utilização da COC na forma de cloridrato (média de 1,3 $\mu g/mL$ pela via intranasal, em 39 casos).

São ainda escassos os artigos que dispõem sobre esses resultados em casos *post mortem*, especialmente os relativos aos

quatro analitos. A Tabela II mostra os valores de COC e CE citados por alguns autores.

TABELA II - Concentrações de COC e CE encontradas em sangue humano *post mortem*

COC (ng/mL)	CE (ng/mL)	n	referências
30 - 1400	30 - 530	5	66
91 - 4370	73 - 1447*	7	77

n número de casos analisados

* em 4 casos os valores de CE excederam os de COC

A presença de adulterantes e diluentes na droga de rua pode, inevitavelmente, complicar os achados clínicos e toxicológicos. Entretanto, embora efeitos adversos mais sérios, ou até mesmo letais, não sejam referidos como oriundos dos contaminantes, devem de alguma forma potencializar os relativos à COC.

Os fatos acima expostos indicam as dificuldades de interpretação dos níveis encontrados em material proveniente de autópsia, principalmente naqueles em que os teores são considerados “baixos” e houve concomitante uso de etanol. O significado da presença do etanol nas concentrações *post mortem* de COC (e demais produtos a ela relacionados) necessitam de investigações que possibilitem a interpretação inequívoca do achado.

3 - OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO

De acordo com as considerações feitas ao tema, a título de introdução, são complexas as situações envolvidas na exposição humana à cocaína. A interpretação do resultado analítico - fator preponderante no estabelecimento da *causa mortis* - é portanto, a integração dos conhecimentos toxicológicos que permeiam a exposição humana à COC, como fármaco único ou na interação com o etanol.

O número relativamente baixo de informações na literatura em relação aos achados *post mortem* da COC, EME, BE e principalmente CE, bem como as observações coletadas ao longo dos anos de efetivo exercício em Toxicologia Forense nos levaram a delinear objetivos, cuja consecução, contribuisse para a compreensão dos fenômenos que ocorrem na intoxicação letal e, conseqüentemente, elucidação da interpretação dos dados analíticos, com vistas ao inequívoco estabelecimento da *causa mortis*. São eles:

Objetivos gerais

Analisar as concentrações sangüíneas de COC, BE, EME e CE em amostras de sangue de indivíduos que foram a óbito em decorrência de intoxicação por cocaína, associada ou não ao etanol, com vistas a compará-las e estabelecer seu significado na elucidação das concentrações relacionadas à letalidade, nos casos onde há envolvimento forense.

Específicos

- estabelecimento das concentrações de COC, BE, EME e CE nos casos onde houve interação ou não com etanol
- estabelecimento da correlação das concentrações de COC e CE;
- estabelecimento da correlação entre as concentrações de CE e etanol;
- estabelecimento da correlação BE/COC na interação ou não de COC com etanol;
- verificação do papel da EME nas intoxicações letais.

Para se atingir tais objetivos elaborou-se o seguinte plano de trabalho:

- validação do método de quantificação de COC, BE, EME e CE em sangue total por extração em fase sólida e detecção por cromatografia gasosa acoplada a detector seletivo de massas (CG/MS) tecnologia *Ion trap*;
- determinação por CG/MS de COC, BE, EME e CE, em amostras de sangue total provenientes de casos de intoxicação letal pela cocaína;
- estudo estatístico dos resultados.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Casuística

Foram investigados 54 casos constituídos por amostras de sangue provenientes de cadáveres humanos, não hospitalizados previamente, necropsiados no Instituto Médico Legal do Estado de São Paulo-sede e que tiveram como indicação de *causa mortis* a intoxicação por cocaína.

Os espécimes selecionados para estudo foram distribuídos, de acordo com a eventual indicação de interação com etanol ou não, nos grupos abaixo relacionados:

- Grupo 1 - constituído por 18 amostras que apresentaram resultados de análise positivos para COC e etanol, segundo metodologia utilizada no Serviço Técnico de Toxicologia Forense (STTF) do IML, e que, portanto, indicam ter havido interação entre os dois xenobióticos;

- Grupo 2 - constituído por 36 amostras que apresentaram resultados de análise positivos para COC, não tendo sido evidenciada a presença do etanol, indicando, em bases hipotéticas, a não-interação entre os dois agentes.

4.2 Metodologia analítica

4.2.1 Método proposto para análise de cocaína, benzoilecgonina, éster metilecgonina e cocaetileno em sangue total

- Soluções-padrão, reagentes e solventes

As soluções-padrão de cocaína-COC (*Merck*), benzoilecgonina-BE (*Radian Corporation*), éster metilecgonina-EME (*Radian Corporation*) e cocaetileno-CE (*Radian Corporation*) foram preparadas em metanol grau cromatografia (*Merck*). As soluções-estoque dos quatro analitos na concentração de 100 ng/ μL como base livre, foram diluídas para obtenção de soluções de trabalho de respectivamente 10, 1,0 e 0,1 ng/ μL .

As soluções-padrão dos respectivos isótopos deuterados (*Radian Corporation*)*, respectivamente [N-metil $^2\text{H}_3$] cocaína -COCD₃, [N-metil $^2\text{H}_3$] benzoilecgonina -BED₃, [N-metil $^2\text{H}_3$] éster metilecgonina -EMED₃ e [N-metil $^2\text{H}_3$] cocaetileno -CED₃, (Figuras 4, 5, 6 e 7..) foram preparadas em metanol grau cromatográfico (*Merck*). As concentrações das soluções-estoque foram de 10 ng/ μL e utilizaram-se soluções de trabalho na concentração de 2,5 ng/ μL .

O tampão fosfato 0,1 M foi obtido da seguinte maneira: Pesar 13,61 g de KH_2PO_4 (fosfato de potássio monobásico) (*Quimibras*) e dissolver em 900 mL de água. Ajustar o pH a 6,0 ($\pm 0,1$) com KOH (*Quimibras*)

* As soluções-padrão de EME, BE, CE e os padrões deuterados de COC, BE, EME e CE, todos da *Radian Corporation* foram gentilmente cedidos pelo *Center for Human Toxicology - University of Utah*.

Utilizou-se o agente de derivação N-metil-N-(tercio-butildimetilsilil) trifluoracetamida - MTBSTFA (*Pierce*).

O ácido clorídrico, diclorometano, isopropanol, hidróxido de amônio, bem como os demais solventes empregados, foram grau p.a. da *Merck*, excetuando-se os especificados de forma diferente.

Todas as soluções foram preparadas com água desionizada, destilada e purificada em *Milli-Q Plus*.

• Tratamento das amostras

Às amostras de sangue total (2 mL), foram adicionados os padrões internos deuterados, respectivamente COCD3, EMED3, BED3 CED3 de modo a se obter a concentração de 250 ng/mL. Após 10 min de repouso, juntaram-se 2 mL de tampão fosfato 0,1M, pH 6,0 e, procedeu-se à precipitação protéica com 4 mL de solução de sulfato de zinco *Ecibra 1N* (5,0 g de Zn SO₄ em 100 mL de água - adicionar 30mL de metanol a 70 mL desta solução). Após agitação em “vortex” por 30 seg., as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm/min (1900 g) durante 10 min Após filtração, as amostras foram submetidas à extração em fase sólida, segundo especificações do fabricante* :

Extração em fase sólida

◆ *Condicionamento da coluna*

Posicionar a coluna (*Bond Elut Certify-Varian Sample Preparation Products*) e o controlador de fluxo (*stopcock*) no equipamento de extração SPE-10 (J.T. Baker) acoplado à bomba de vácuo (General Electric). Com um

* *Varian Samples Preparation Products- Método para extração de cocaína e derivados em Bond Elut Certify-Varian SPP. Harbor City, California, USA*

fluxo menor que 2 mL/min, passar pela coluna 2 mL de metanol, 2 mL de tampão fosfato pH 6,0, tomando o cuidado para que não haja o secamento da coluna em nenhuma destas etapas, o que, se porventura ocorrer, implica a repetição de todo o processo.

◆ *Passagem da amostra*

Verter o filtrado, obtido conforme descrito em tratamento da amostra, para a coluna, observando o fluxo de escoamento inferior a 2 mL/min

◆ *Lavagem da coluna*

Transferir seqüencialmente 6 mL de água destilada, 3,0 mL de ácido clorídrico 0,1 N e promover a secagem da coluna por 5 min a 10 mm Hg de pressão. A seguir lavar com 9,0 mL de metanol.

◆ *Eluição*

Eluir o extrato com 4 mL da mistura diclorometano-álcool isopropílico (80:20) a 2% NH₄OH (de preparo diário), utilizando apenas a força da gravidade, e recolher o eluato em bequer afunilado de 5 mL, previamente silanizado (solução a 5 % de diclorometilsilano_(Sigma) em tolueno). Evaporar à secura, em capela, a 55°C e sob fluxo de N₂.

Derivação

O resíduo foi retomado com 100 μL de metanol e após agitação em *vortex* por 15 seg. foi transferido para um microfrasco descartável de 100 μL e novamente levado à secura a 55° C em capela e sob fluxo de N_2 . Após o esfriamento, foram adicionados ao resíduo 25 μL de N-metil-N-(tert-butildimetilsilil) trifluoracetamida (MTBSTFA) (*Pierce*). Após a adição do agente procedeu-se à derivação em estufa a 60° C por 10 min. Uma vez resfriados, os microfrascos foram posicionados no amostrador automático e 1 μL injetado no cromatógrafo. O fluxograma do procedimento de extração é mostrado na Figura 3.

• Análise cromatográfica

Foi empregado um cromatógrafo a gás *Varian* modelo Star 3400 CX, acoplado a detector seletivo de massas *Saturn 3*, tecnologia *Ion trap* com amostrador automático *Varian* modelo 8200 CX, microfrascos (*Hewlet Packard*) de 100 μL e insersor do tipo *splitless*. A separação foi obtida em coluna cromatográfica capilar DB5 *J & W Scientific* 5% fenil - 95% metilsilicone, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de fase. Utilizou-se para a cromatografia o gás Hélio *White Martins, DIG-SP*, fluxo de 1 mL/min (12 psi de pressão na entrada da coluna), como gás de arraste.

Condições cromatográficas

- temperatura do injetor: 250° C;
- temperatura do *transfer line*: 260° C;
- temperatura do detector de massas : 250° C;
- programação de aquecimento do forno:

temperatura inicial de 70° C por 1 min;
aumentar 15° C por minuto até 280 ° C;
permanecer nesta temperatura por 6 minutos.

Condições do detector de massa e da aquisição dos dados

- modo de operação por impacto de eletrons (EI), *full SCAN*
(*Reconstruction Ion Chromatogram*);
- faixa de aquisição: 50 - 410 unidades de massa atômica (a.m.u.);
- início da aquisição dos dados em 6,5 minutos após a injeção.

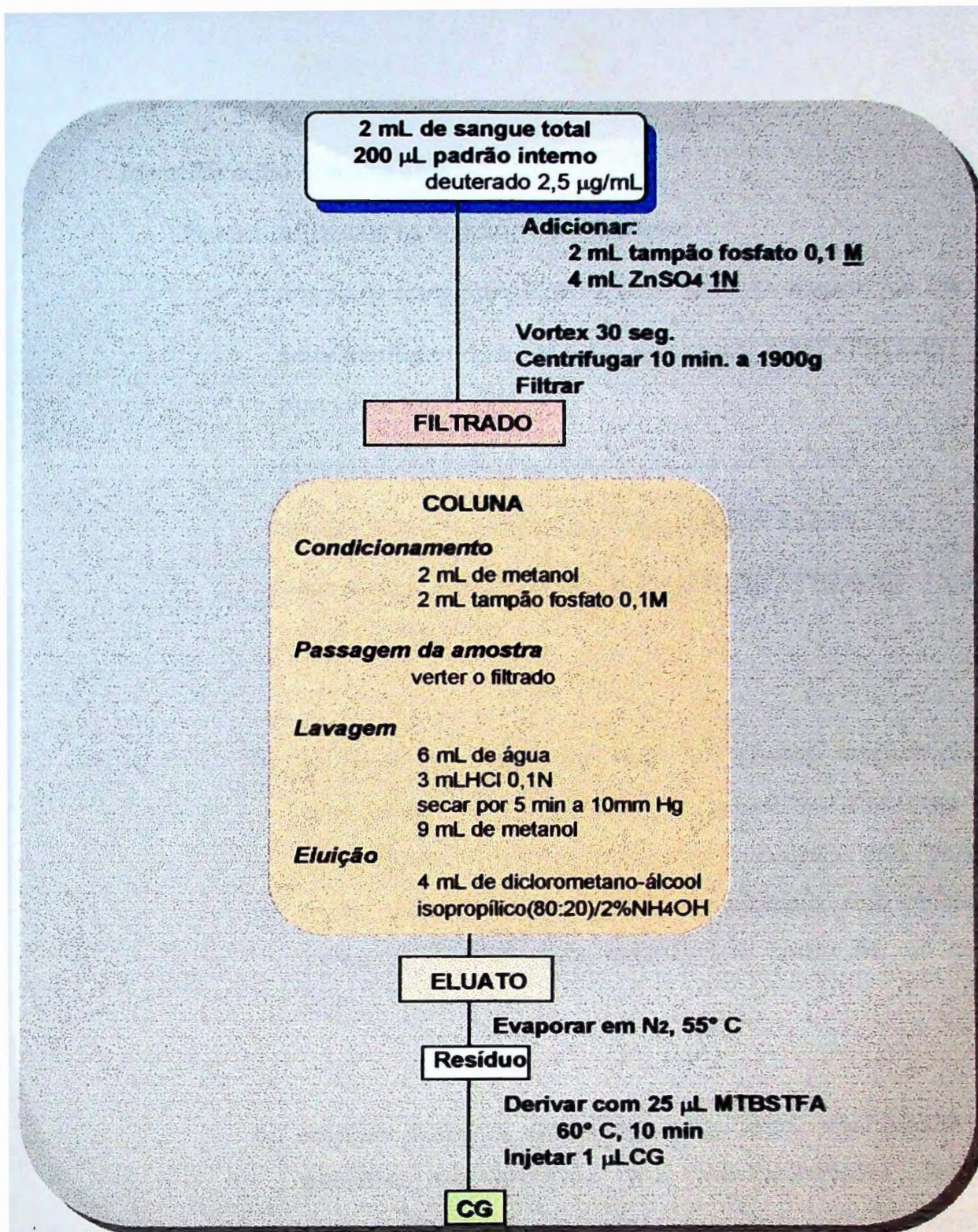


FIGURA 3 - Fluxograma do procedimento analítico usado na determinação da cocaína e produtos de biotransformação em amostras de sangue total

Identificação dos analitos

Foram utilizados os seguintes parâmetros:

a) tempo de retenção (*SCAN*), com variação menor que 1%

éster metilecgonina D0 e D3 derivados (EME-TBDMS): 11,27 min (*SCAN 857/856*)

cocaína D0 e D3 : 14,36 min (*SCAN 1094/1093*)

cocaetileno D0 e D3 : 15,08 min (*SCAN 1120/1119*)

benzoilecgonina D0 e D3 derivados (BE-TBDMS): 16,41 min (*SCAN 1250/1249*);

b) pesquisa do espectro em bibliotecas específicas que acompanham o *software* do equipamento (*Nisti* com 75000 compostos) e outra, gerada pelo usuários, que permite a comparação dos analitos após a derivação, com obtenção de índice de similaridade estabelecido como de, no mínimo, 90%;

c) relação entre a abundância dos íons qualificadores dos padrões, normatizados aos correspondentes deuterados, determinadas nos calibradores e controles (QCs) e calculadas segundo estatística apresentada por BODOR *et al.*(1990):

éster metilecgonina D0 e D3 derivados (EME-TBDMS): m/z 82/85; 282/285 e 256/259;

cocaína D0 e D3 : m/z 82/85; 182/185 e 303/306;

cocaetileno D0 e D3 : 82/85; 196/199 e 317/320;

benzoilecgonina D0 e D3 derivados (BE-TBDMS): m/z 282/285; 346/349 e 403/406.

As condições cromatográficas, as relativas à aquisição dos dados e o processamento dos espectros de massa foram respectivamente monitorados e processados num microcomputador modelo PC 486 214S-Super VGA Grid, tendo sido utilizado como *software* a versão Saturn5.2.

4.2.2 Validação do método proposto

4.2.2.1 Especificidade

A especificidade foi estabelecida através da determinação de seis diferentes *pools*³⁰ de sangues “branco”, previamente analisados quanto à presença de cocaína pela metodologia utilizada no STTF-IML sede²⁹. Procedeu-se também à verificação de possíveis interferentes endógenos para os quatro analitos em questão e respectivos deuterados.

4.2.2.2. Preparação da curva de calibração

As curvas de calibração foram preparadas através da adição das soluções de trabalho referidas em 4.2.1 de modo a se obterem concentrações de 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750 , 1000 e 2000ng/mL de COC, BE, EME e CE e dos respectivos padrões internos deuterados na concentração de 250ng/mL de sangue total (sangue “branco”), proveniente

de cadáveres humanos necropsiados no IML e cujo resultado analítico obtido pela metodologia preconizada no STTF²⁹ foi a não detecção da COC e demais analitos. Cada um dos calibradores assim obtidos e em triplicata sofreu extração e análise cromatográfica, segundo o indicado em 4.2.1.

A linearidade, definida como a capacidade do método de gerar resultados proporcionais da espécie em estudo, foi avaliada através do coeficiente de determinação (r^2) da curva obtida pela projeção das concentrações de cada um dos analitos (ng/mL) no eixo das abscissas e das relações de áreas (D0/D3) referentes aos íons quantificadores de cada um dos analitos e dos respectivos íons deuterados (82/85 para EME-TBDMS; 182/185 para COC; 196/199 para CE e 282/285 para BE-TBDMS), correspondentes aos diferentes calibradores. O intervalo dinâmico (faixa linear utilizável) para cada um dos analitos foi obtido através da remoção de calibradores altos (acima de 3000 ng/mL) até que o coeficiente de determinação obtido (r^2) fosse maior que 0,98³⁰.

4.2.2.3 Parâmetros de confiança do método

Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) foi estabelecido como sendo a menor concentração, calculada através da curva de calibração (4.2.2.2), na qual foi possível obter tempos de

retenção com variação menor que 1% e relações aceitáveis entre os íons qualificadores e índice de similaridade acima de 90% (item 4.2.1).

O limite de quantificação (LQ) do método foi calculado, também utilizando os resultados obtidos na curva de calibração (item 4.2.2.2), onde a relação dos íons quantificadores foi analisada em quintuplicata para os quatro analitos. Foi considerado como limite de quantificação, a menor concentração na qual, além de se obter a relação aceitável dos íons qualificadores, a imprecisão (expressa pelo coeficiente de variação) foi inferior a 20%²⁹.

Imprecisão e exatidão

Os ensaios para a determinação da imprecisão e exatidão intra-testes foram realizados em amostras de controle (QCs) de 100, 250 e 700 ng/mL para os quatro analitos, preparadas com diferentes soluções de trabalho adicionadas a cinco amostras (n=5) de sangue “branco” e analisadas na mesma seqüência.

Para a determinação da imprecisão e exatidão interensaios, utilizou-se o mesmo critério, ou seja, o cálculo da concentração média dos QCs, desta vez em triplicata, obtido através das respectivas curvas de calibração e em seis ensaios realizados em diferentes dias³⁰.

A imprecisão foi calculada através do coeficiente de variação -CV (desvio padrão relativo) - e considerou-se a

exatidão como a porcentagem do erro sistemático, expresso pela tendenciosidade (diferença entre o valor real e o valor obtido)³⁰.

Recuperação

Calculou-se recuperação comparando-se a relação média de áreas dos íons quantificadores dos quatro analitos, obtidas, respectivamente, após submeterem-se, ou não, os adicionados nas concentrações correspondentes aos QCs baixo, médio e alto ao processo de extração analítico. Os respectivos padrões internos deuterados foram adicionados a todas as amostras na fase anterior à extração e comparou-se a relação de áreas daquelas onde os analitos foram adicionados anteriormente à extração (n=5) com aquelas provenientes de extratos onde apenas o padrão interno foi adicionado previamente, enquanto os analitos foram adicionados imediatamente antes da análise cromatográfica (n=5) e que, portanto, significaram 100% de extração³⁰.

4.3 Determinação de cocaína, benzoilecgonina, éster metilecgonina e cocaetileno em sangue total nas amostras selecionadas para estudo.

As amostras de sangue selecionadas em 4.1 e referidas como G1 e G2 foram submetidas à análise para determinação de cocaína e produtos de biotransformação, conforme metodologia validada em 4.2.2.

4.4 Determinação de etanol em sangue total nas amostras selecionadas para estudo

As amostras referidas em 4.1 foram submetidas à metodologia utilizada no STTF, metodologia esta reconhecida e validada. Trata-se de técnica que utiliza separação do etanol por *head-space* com posterior quantificação por cromatografia gasosa acoplada a detector por ionização em chama (CG/DIC) e utilização do *n*-propanol como padrão interno.

4.5 Análise estatística dos resultados

Para a análise dos resultados foram utilizados testes paramétricos, levando-se em consideração a natureza das distribuições dos valores das características observadas (variáveis).

As variáveis consideradas nestas análises foram COC (concentrações encontradas de cocaína), CE (concentrações encontradas de cocaetileno), EME (concentrações encontradas de éster metilecgonina), BE (concentrações encontradas de benzoilecgonina), BE/COC (relação das concentrações encontradas de benzoilecgonina relativas às de cocaína) e etanol. A possibilidade da estimativa dos teores de cocaína (COC+EME) na hora do óbito foi realizada através da soma das concentrações micromolares de EME e COC remanescentes, expressa pela correspondente concentração de COC em ng/mL, segundo o preconizado por ISENSCHMID *et al.*(1992b).

As correlações entre as variáveis etanol, CE, COC, EME e BE para o grupo que apresentou CE positivo - G1 foram calculadas através dos coeficientes de correlação linear de Pearson²⁷. A rejeição da hipótese de correlação nula foi considerada no nível de significância de 1% (resultado baseado em tabela de DIXON *et al.* (1969).

O estudo do efeito do fator *Grupo*, sobre as variáveis COC, BE, EME e BE/COC individualmente, foi realizado através de Análise de Variância (ANOVA) Univariada¹¹³ e o efeito do fator *Grupo* sobre as variáveis COC, BE e EME conjuntamente foi feito através da Análise (MANOVA), utilizando-se o critério λ de *Wilks*⁸⁰. Para ambos os testes, o nível de significância foi fixado como 5 % ($\alpha=0,05$).

Os testes foram realizados com auxílio dos pacotes estatísticos SAS[®] versão 6.0 e SPSS[®] versão 5.0.

5 - RESULTADOS

5.1 Metodologia analítica

5.1.1 Identificação dos analitos

As Figuras 4, 5, 6 e 7 mostram os espectros de massa, respectivamente da cocaína, cocaetileno e *térciobutilsilil* derivados da benzoilecgonina e éster metilecgonina, com os correspondentes deuterados e principais sítios de fragmentação.

A Tabela III, mostra o resultado da média dos valores das relações entre os íons qualificadores da cocaína-COC, cocaetileno- CE e *térciobutilsilil* derivados da benzoilecgonina-BE-TBDMS e éster metilecgonina-EME-TBDMS, normalizadas em relação aos respectivos deuterados e coeficientes de variação.

5.1.2 Validação do método proposto

5.1.2.1 Especificidade

As Figuras 8 e 8A mostram, o cromatograma de sangue “branco”enriquecido com 250 ng de cocaína, derivados e respectivos isótopos deuterados, por mililitro de sangue.

5.1.2.2. Curvas de calibração

As representações gráficas das curvas de calibração obtida para a faixa de concentração de 10 a 2000ng de cocaína, cocaetileno, benzoilecgonina e éster metilecgonina com 250ng dos respectivos padrões internos deuterados, para cada mL de sangue estão expressas nas Figuras 9, 10, 11 e 12.

As Tabelas IV, V, VI e VII mostram as variações nos parâmetros estatísticos das curvas de calibração, respectivamente da cocaína, cocaetileno, benzoilecgonina e éster metilecgonina, realizadas em 3 dias diferentes.

5.1.2.3 Parâmetros de confiança do método

Os parâmetros de confiança do método validado (limite de detecção- LD e de quantificação- LQ, imprecisão, exatidão e recuperação) respectivamente, para determinação de cocaína, cocaetileno, benzoilecgonina e éster metilecgonina estão indicados nas Tabelas VIII, IX, X e XI.

5.2 Determinação de cocaína, benzoilecgonina, éster metilecgonina e cocaetileno em sangue total nas amostras selecionadas para estudo.

As Tabelas XII e XIII mostram os valores de cocaína e produtos de biotransformação, dos grupos onde houve ou não interação com etanol, respectivamente G1 e G2.

A Figura 13 elucida a comparação da disposição de cocaína e produtos de biotransformação, segundo resultado expresso nas Tabelas XII e XIII, respectivamente dos grupos G1 e G2.

5.3 Determinação de etanol em sangue total nas amostras selecionadas para estudo.

Os resultados das dosagens alcoólicas referentes aos casos selecionados para estudo estão apresentados nas Tabelas XII e XIII

5.4 Análise estatística dos resultados

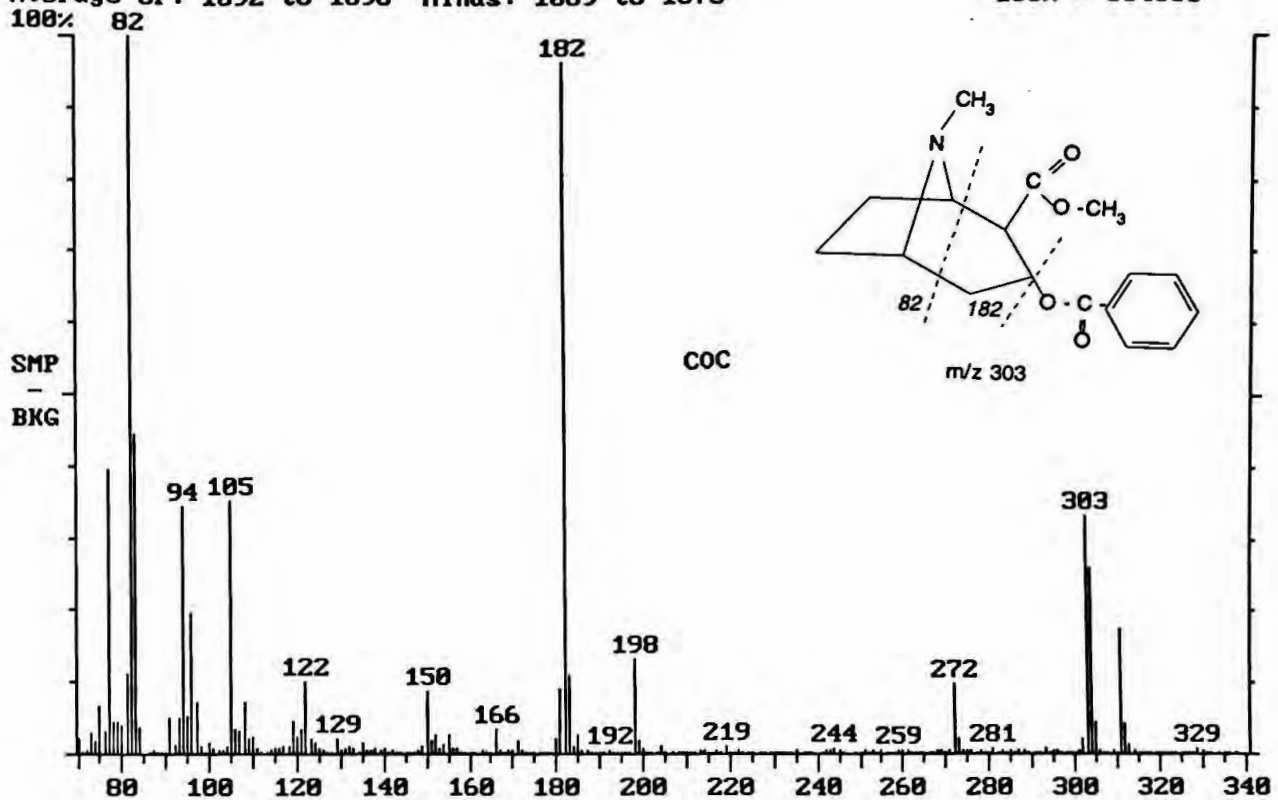
As estimativas do valor médio e erro padrão das quatro variáveis para os grupos G1 e G2 estão na Tabela XIV. A distribuição das variáveis COC, EME e BE estão expressas nas Figuras 14 e 15.

A Tabela XV mostra os valores dos coeficientes de correlação linear de Pearson para as combinações duas a duas das variáveis etanol, CE, COC, EME e BE para as amostras do G1, sendo que os valores que apresentam (*) são aqueles que rejeitariam a hipótese de correlação nula a um nível de significância de 1%, conforme explicitado em 4.5.

A Tabela XVI lista os resultados obtidos pela técnica de Análise de Variância (ANOVA) Univariada, nível de significância de 5%, conforme descrito em 4.5. As Tabelas XVII e XVIII mostram algumas estatísticas descritivas, respectivamente, das relação entre a concentração de BE e COC (BE/COC), e a soma dos valores equimolares entre COC e EME (COC+EME) com e sem a presença de cocaetileno.

A Análise de Variância Multivariada (MANOVA) utilizando-se o critério de λ de *Wilks* com nível de significância de 5 %⁸⁰ forneceu o nível descritivo 0,0163 ($p=0,0163$).

Comment: Curva 23/5/96 met IMLe IMLFULL
 Average of: 1092 to 1096 Minus: 1069 to 1073
 100% = 504006



78

Comment: Curva 23/5/96 met IMLe IMLFULL
 Average of: 1091 to 1095 Minus: 1069 to 1073
 100% = 582668

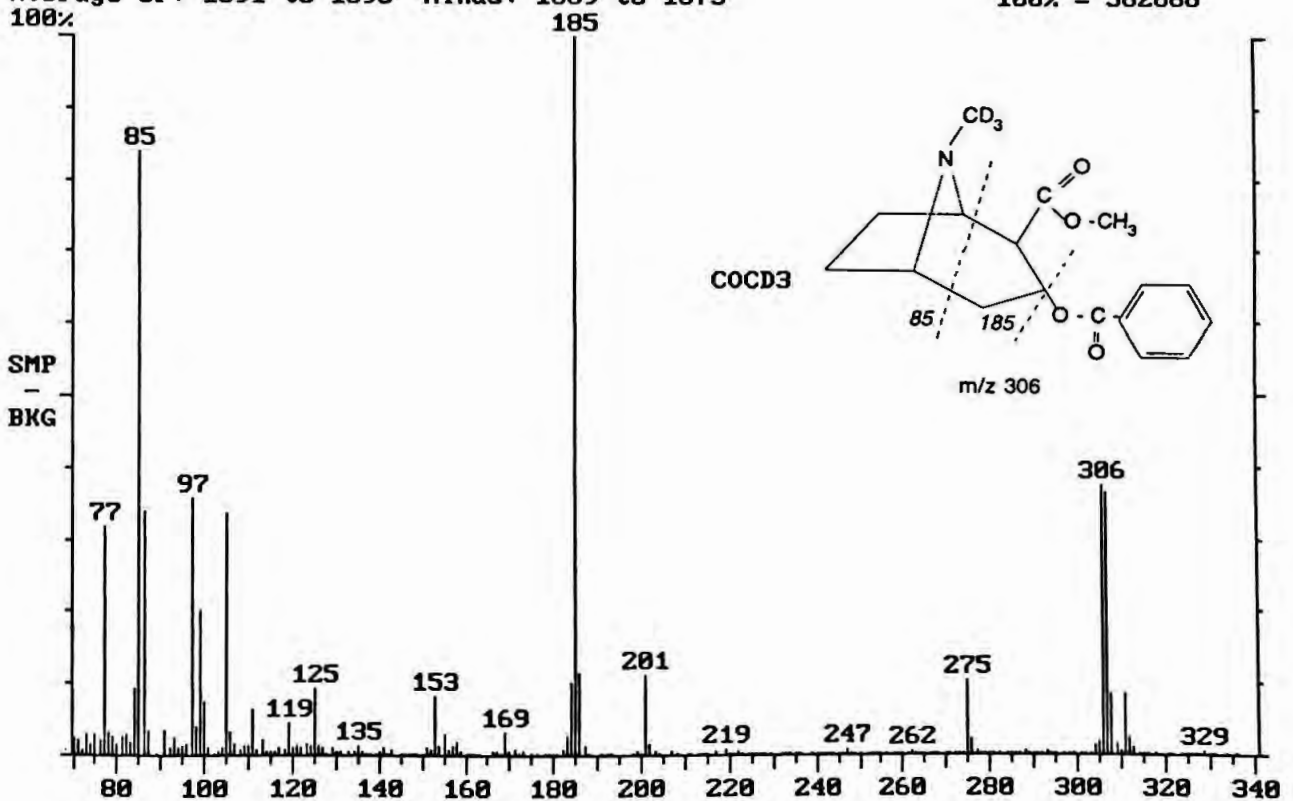
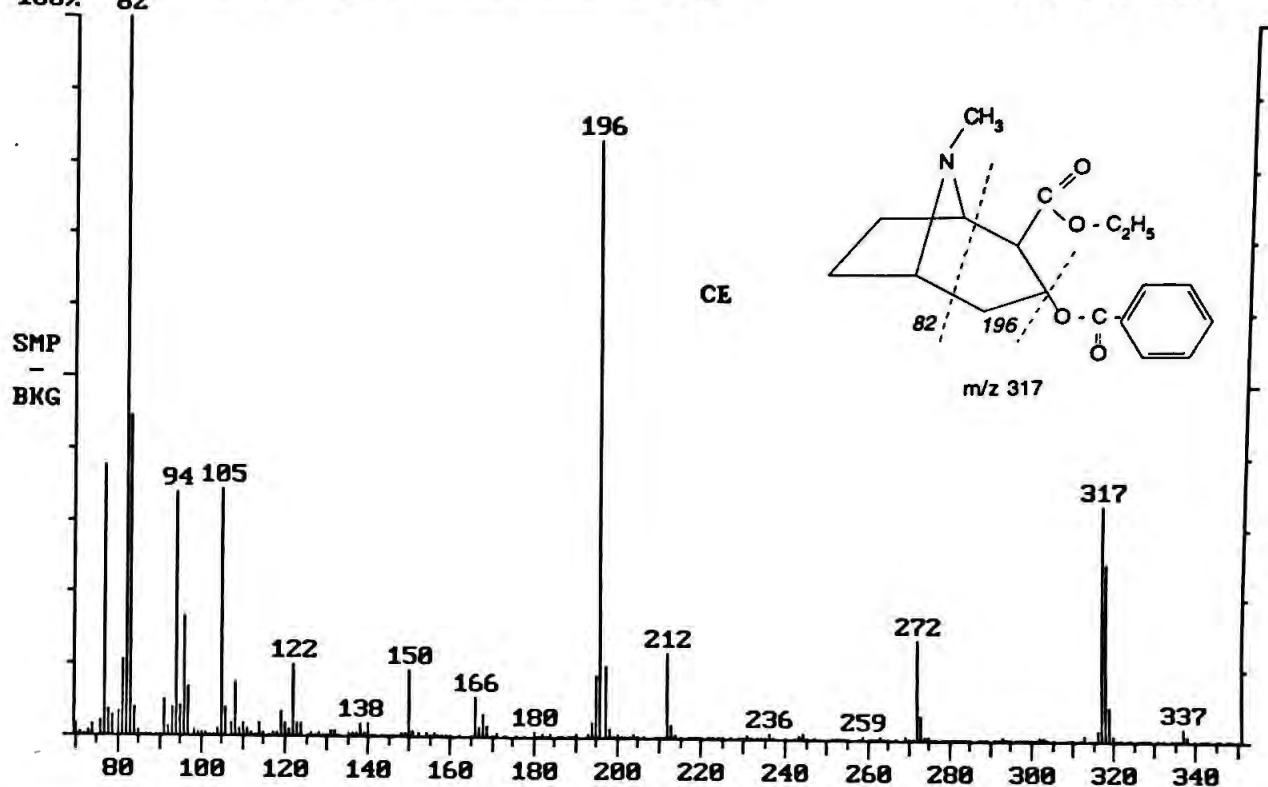


FIGURA 4 - Espectros de massa da cocaína -COCD0 e cocaína deuterada COCD3 , com os principais sítios de fragmentação

Comment: Curva 23/5/96 met IMLe IMLFULL
Average of: 1116 to 1120 Minus: 1131 to 1135
100% 82

100% = 262785

79



Comment: Curva 23/5/96 met IMLe IMLFULL
Average of: 1118 to 1122 Minus: 1133 to 1137
100% 85

100% = 594172

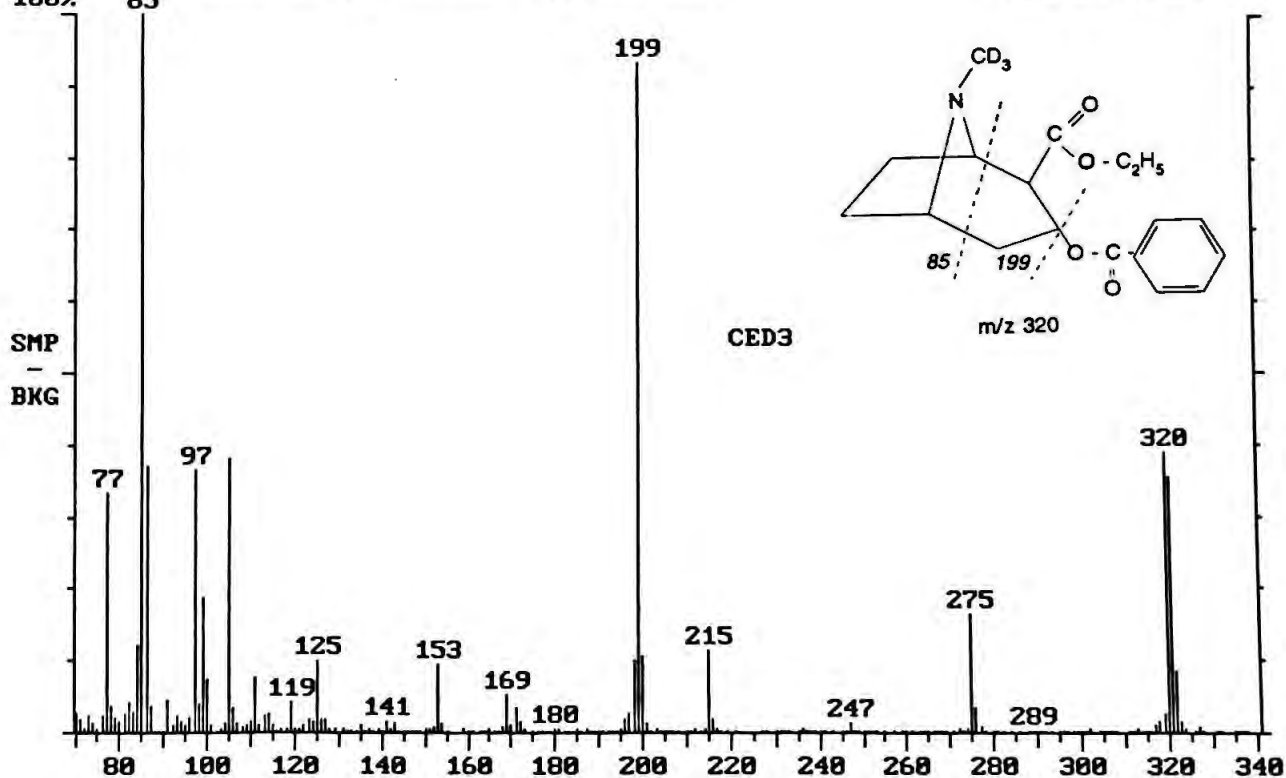
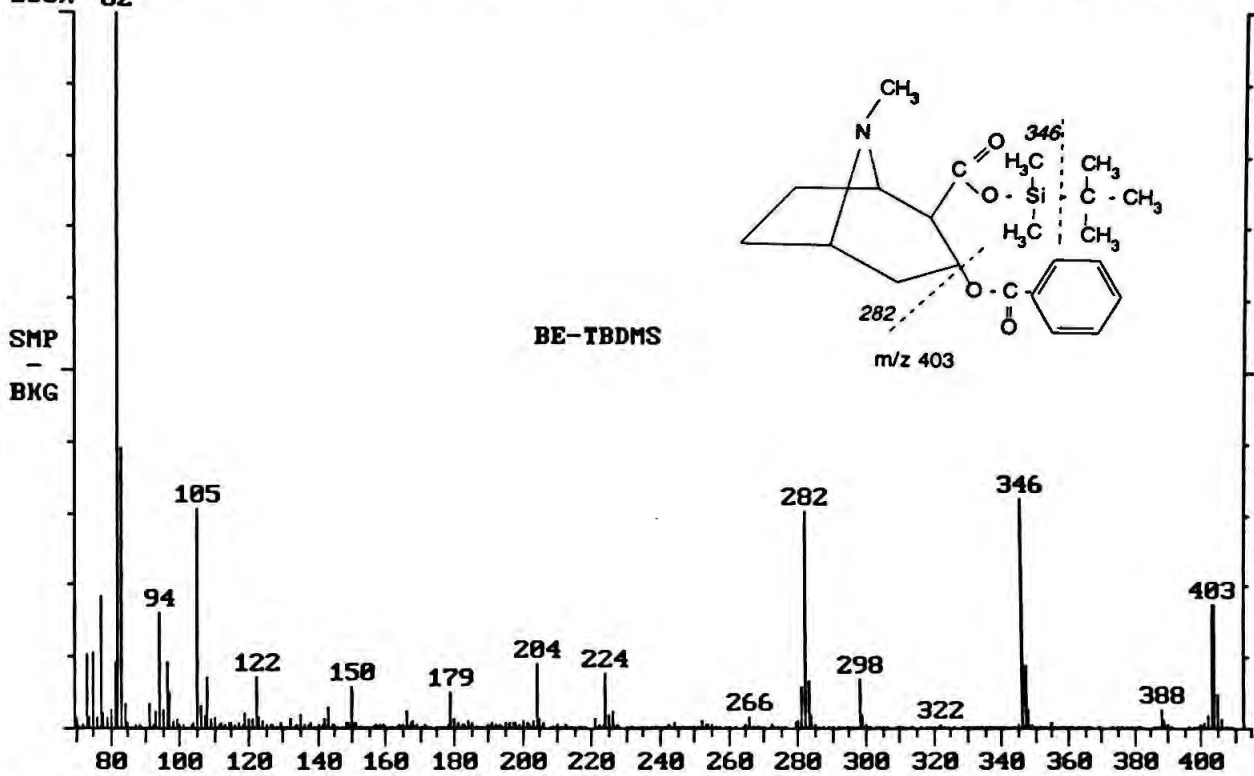


FIGURA 5 - Espectros de massa da cocaetileno -CED0 e cocaetileno deuterado CED3 , com os principais sítios de fragmentação

Comment: Curva 23/5/96 met IMLe IMLFULL
Average of: 1255 to 1259 Minus: 1279 to 1283
100% 82

100% = 465170



Comment: Curva 23/5/96 met IMLe IMLFULL
Average of: 1245 to 1249 Minus: 1224 to 1228
100% 85

100% = 232008

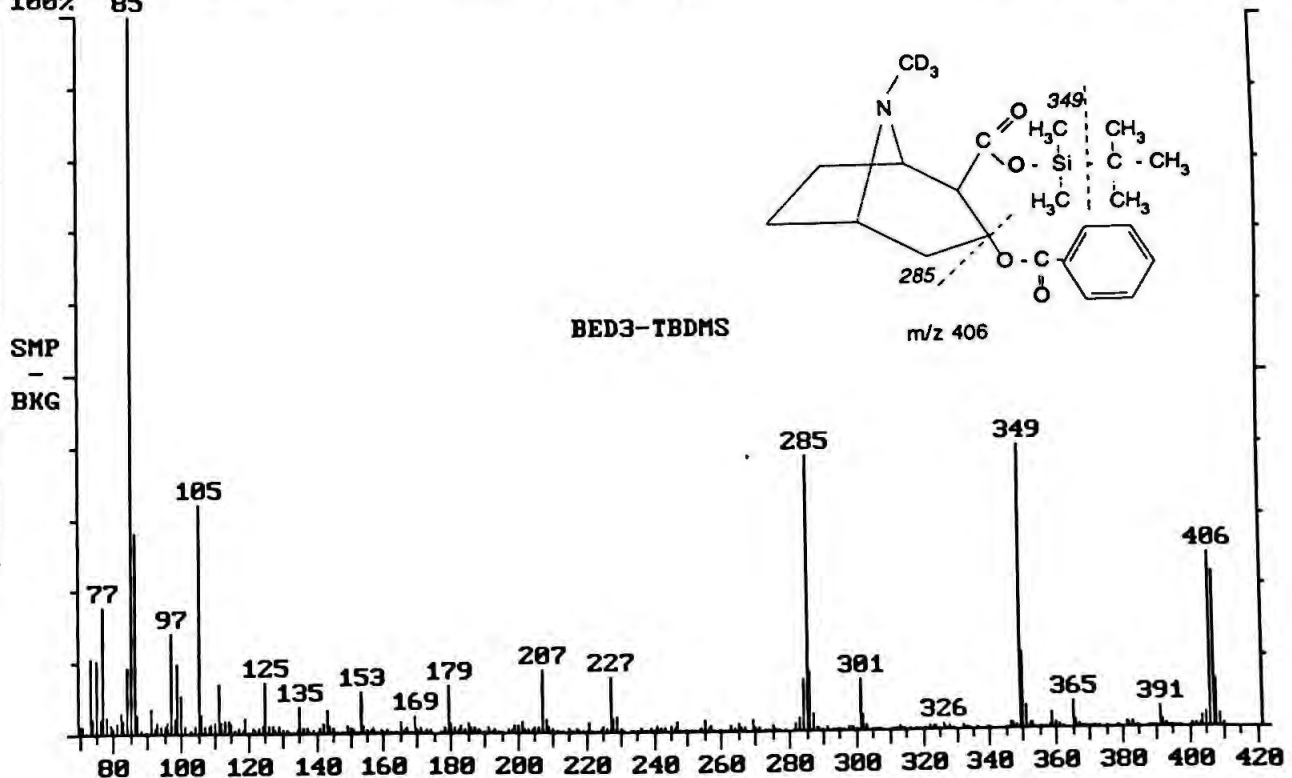
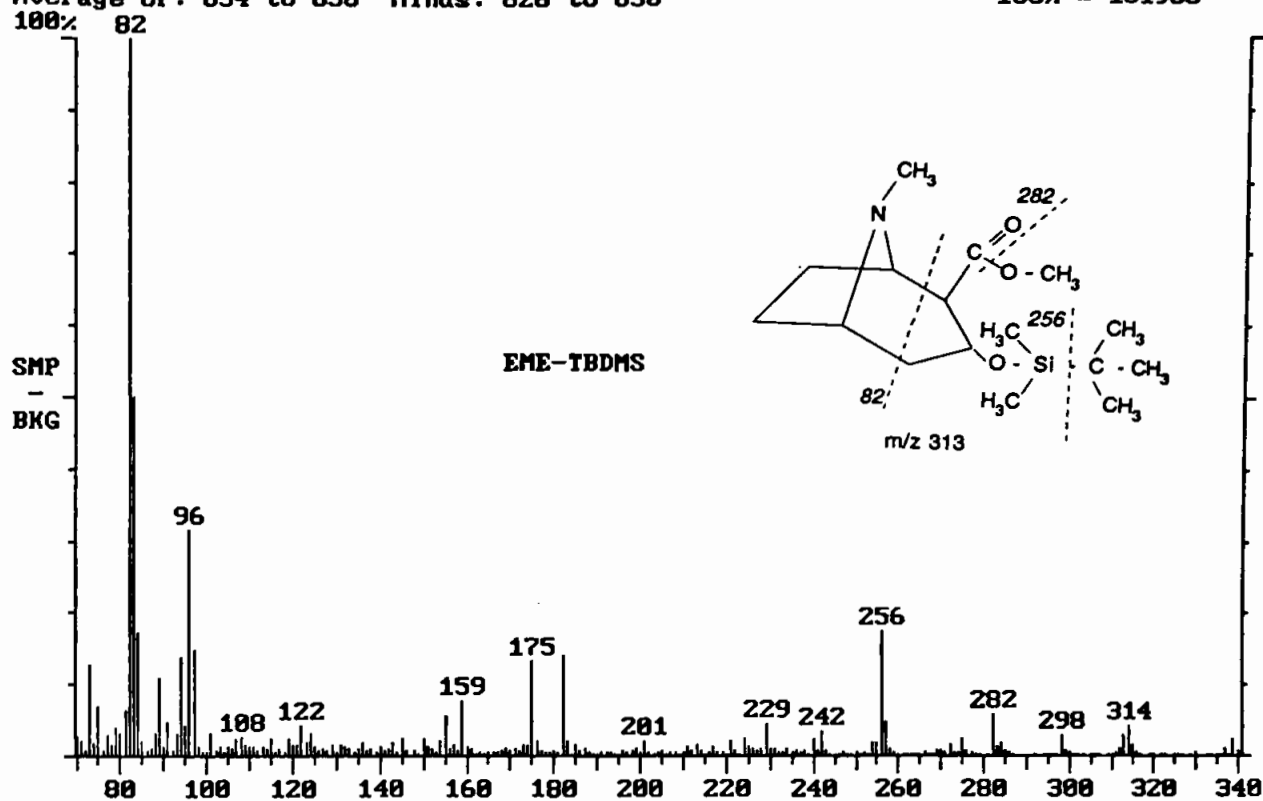


FIGURA 6 - Espectros de massa da benzoilecgonina -BED0 e benzoilecgonina deuterada -BED3 obtidos após derivação com MTBSTFA, com os principais sítios de fragmentação

Comment: Curva 23/5/96 met IMLe IMLFULL
 Average of: 854 to 858 Minus: 826 to 830
 100%

100% = 131983

81



Comment: Curva 23/5/96 met IMLe IMLFULL
 Average of: 855 to 859 Minus: 827 to 831
 100%

100% = 157157

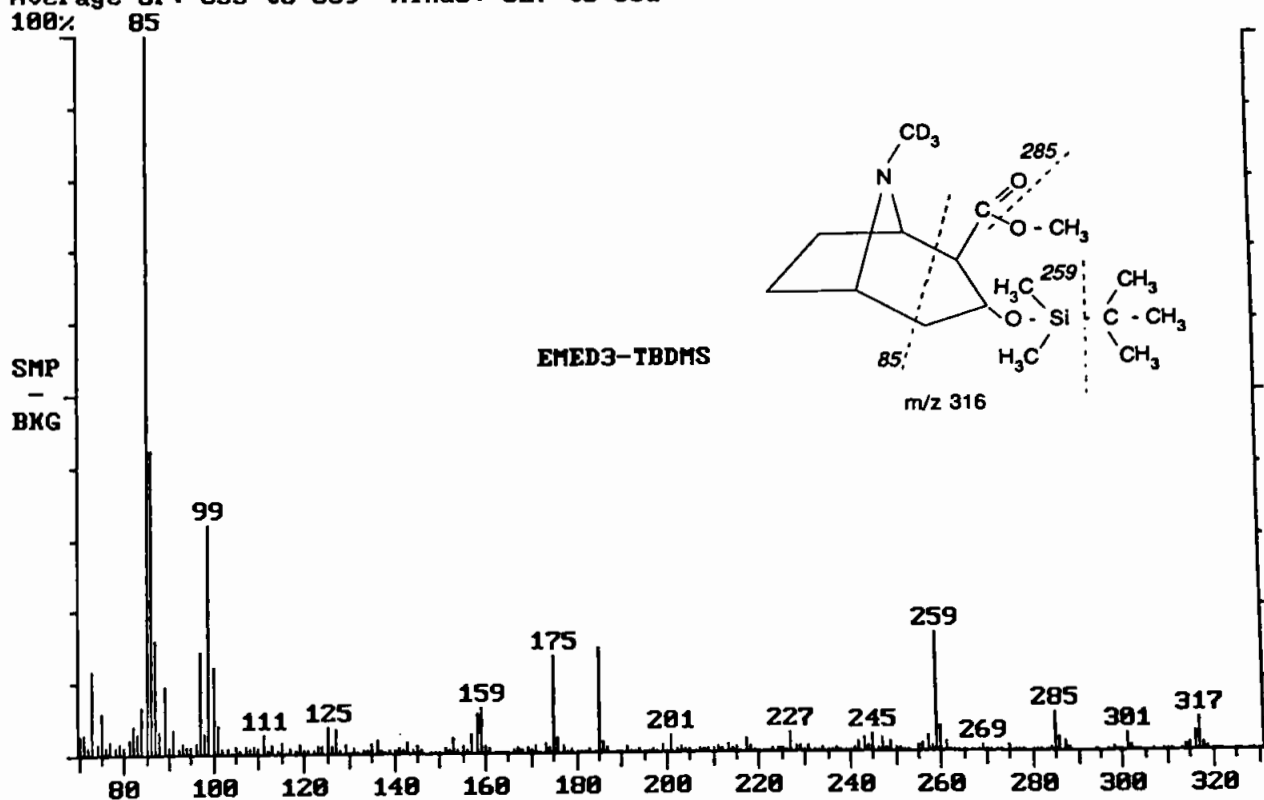


FIGURA 7 - Espectros de massa do éster metilegonina -EMED0 e do éster metilegonina deuterado -EMED3 obtidos após derivação com MTBSTFA, com os principais sítios de fragmentação

TABELA III - Normalização das abundâncias dos íons qualificadores para EME-TBDMS, COC, CE e BE-TBDMS em relação aos correspondentes deuterados

	EME-TBDMS			COC		
	<u>m/z 82/282</u> m/z 85/285	<u>m/z 82/256</u> m/z 85/259	<u>m/z 282/256</u> m/z 285/259	<u>m/z 82/182</u> m/z 85/185	<u>m/z 182/303</u> m/z 185/306	<u>m/z 82/303</u> m/z 85/306
n	102	102	102	102	102	102
Média	1,06	0,91	0,95	1,16	1,16	1,15
Desvio Padrão	0,15	0,12	0,11	0,12	0,14	0,18
CV%	14,18	13,25	12,10	10,39	12,23	15,22
variação	0,88 - 1,32	0,84 - 1,48	0,86 - 1,28	0,98 - 1,26	0,99 - 1,25	0,98 - 1,48

	CE			BE-TBDMS		
	<u>m/z 82/196</u> m/z 85/199	<u>m/z 196/317</u> m/z 199/320	<u>m/z 82/317</u> m/z 85/320	<u>m/z 282/346</u> m/z 285/349	<u>m/z 346/403</u> m/z 349/406	<u>m/z 282/403</u> m/z 285/406
n	102	102	102	102	102	102
Média	1,00	1,14	1,20	1,04	1,06	1,01
Desvio Padrão	0,23	0,24	0,25	0,12	0,15	0,18
CV%	17,95	21,00	20,81	11,59	13,96	18,33
variação	0,78 - 1,64	0,86 - 1,58	0,86 - 1,62	0,94 - 1,32	0,98 - 1,36	0,98 - 1,48

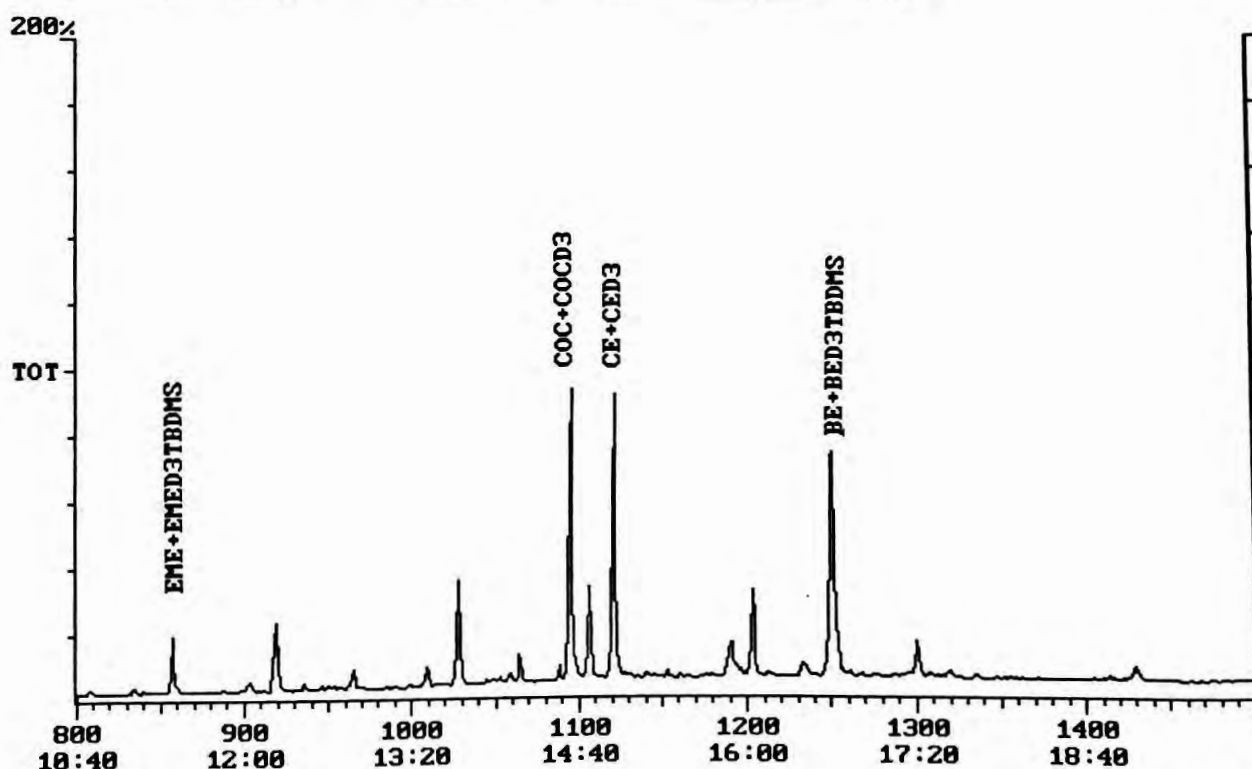
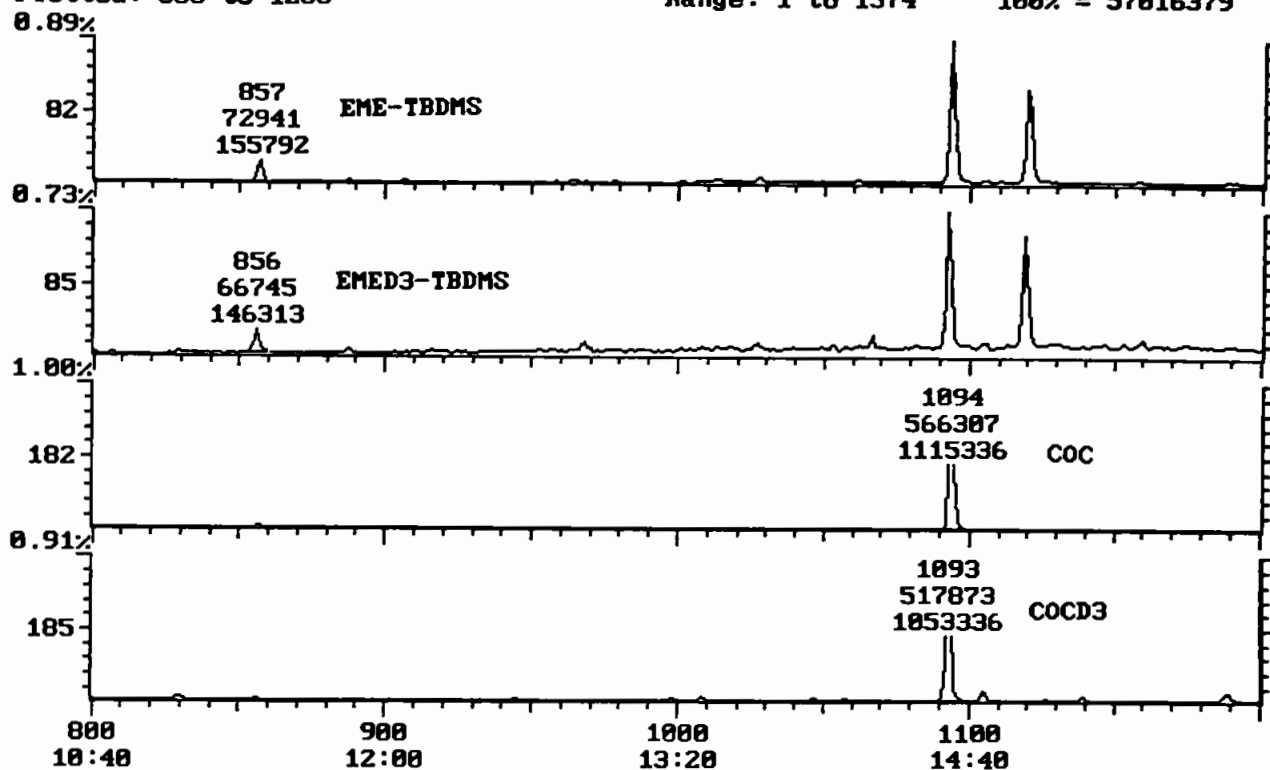


FIGURA 8 - Cromatograma de sangue "branco" enriquecido com 250 ng/mL de EME, COC, CE, e BE, com 250ng/mL dos respectivos padrões internos deuterados

Comment: Curva 23/5/96 met IML e IMLFUL (A=*)
 Scan: 1200 Seg: 1 Group: 0 Retention: 16:00 RIC: 1029249 Masses: 50-410
 Plotted: 800 to 1200 Range: 1 to 1574 100% = 57016379



Comment: Curva 23/5/96 met IML e IMLFUL (A=*)
 Scan: 1253 Seg: 1 Group: 0 Retention: 16:42 RIC: 1526307 Masses: 50-410
 Plotted: 1000 to 1500 Range: 1 to 1574 100% = 57016379

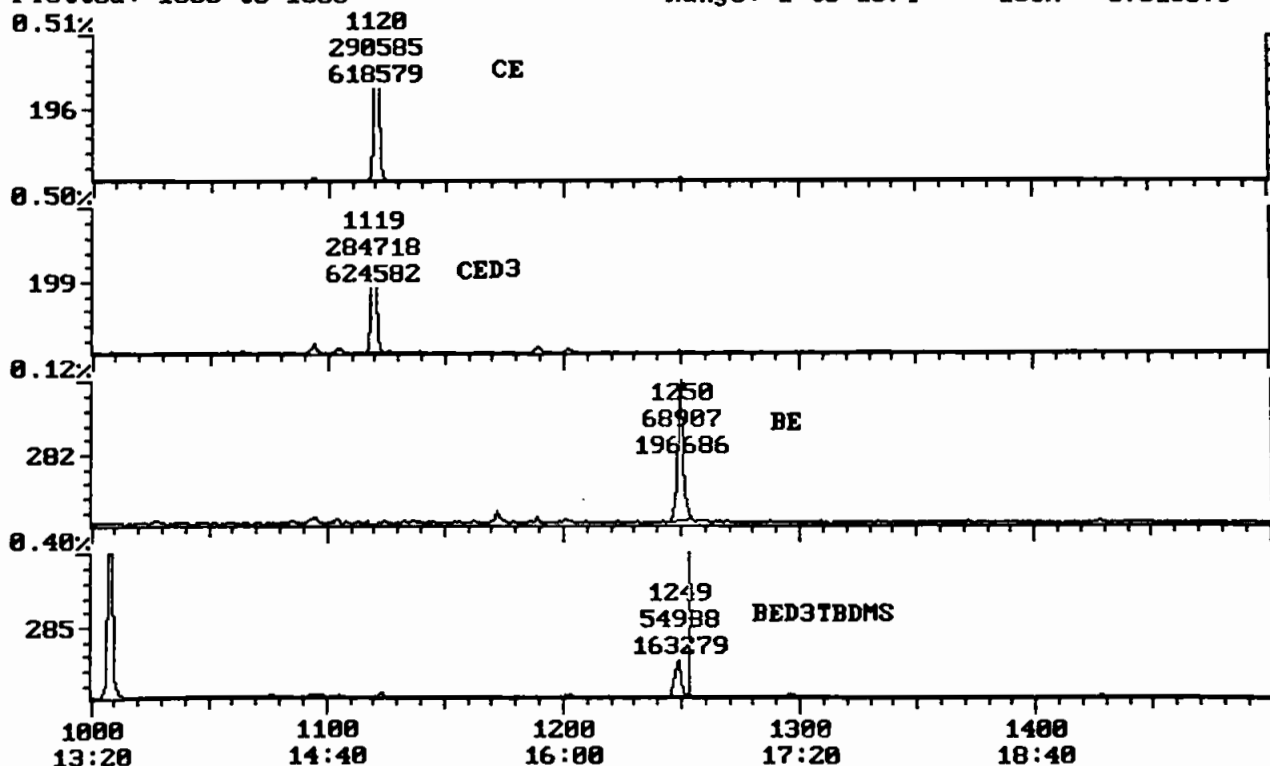


FIGURA 8A - Cromatograma de sangue "branco" enriquecido com 250 ng/mL de EME, COC, CE, e BE com 250ng/mL dos respectivos padrões internos deuterados (*Reconstructed ion chromatogram*)

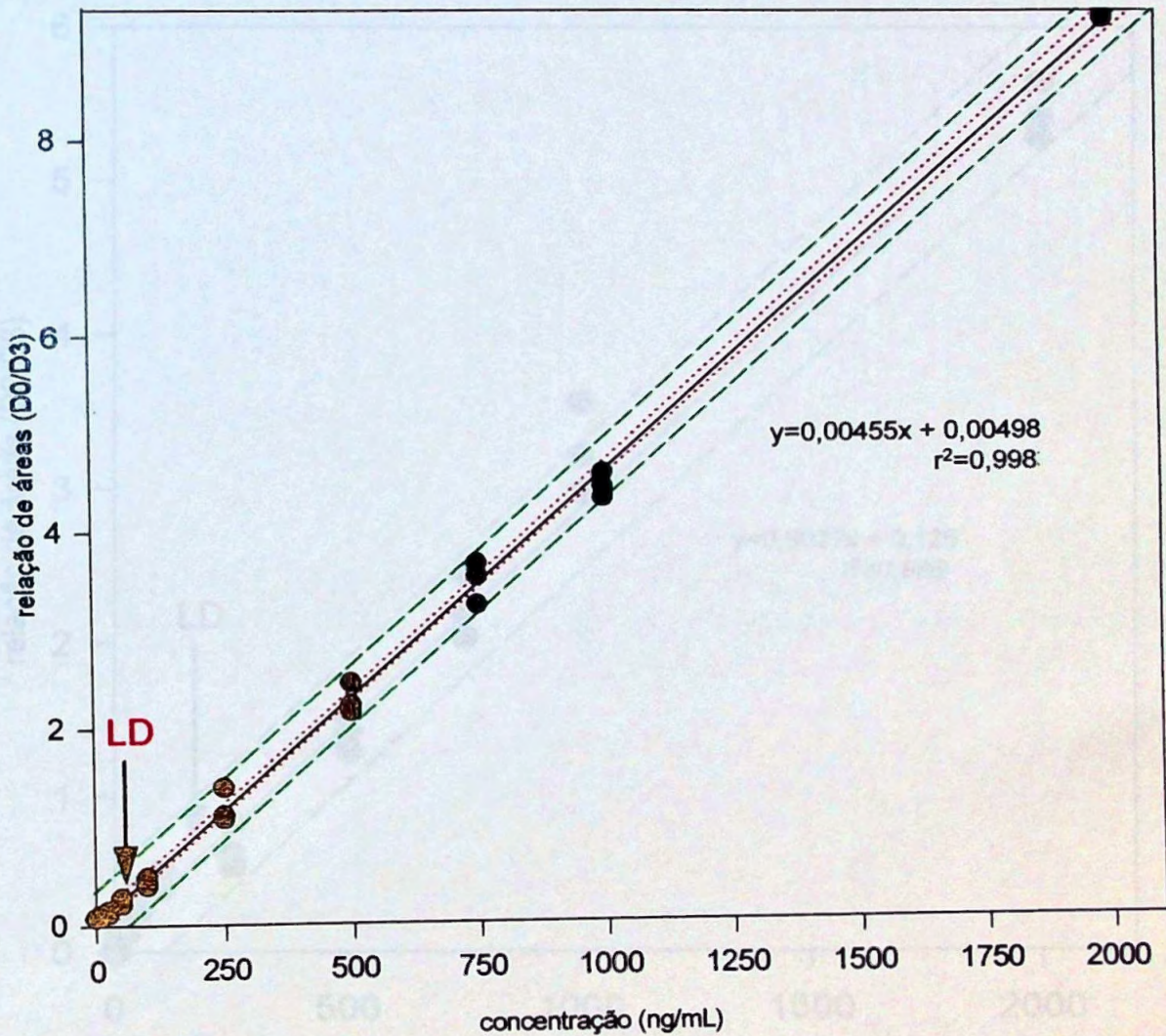


FIGURA 9 - Representação gráfica da curva de calibração obtida para faixa de concentração de 10 a 2000ng/mL de COC e 250ng/mL de COCD3

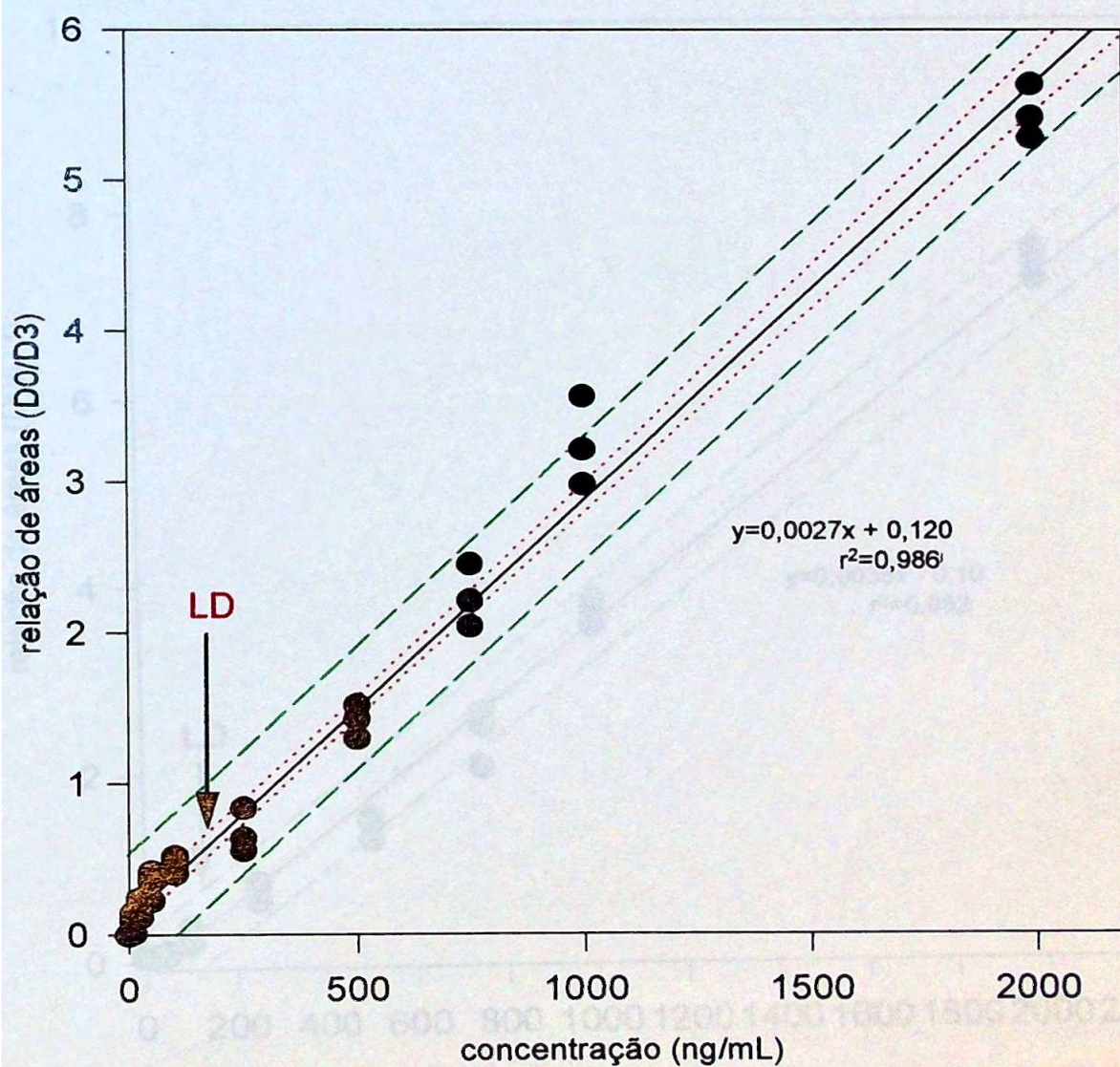


FIGURA 10 - Representação gráfica da curva de calibração obtida para faixa de concentração de 10 a 2000 ng/mL de CE e 250ng/mL de CED3

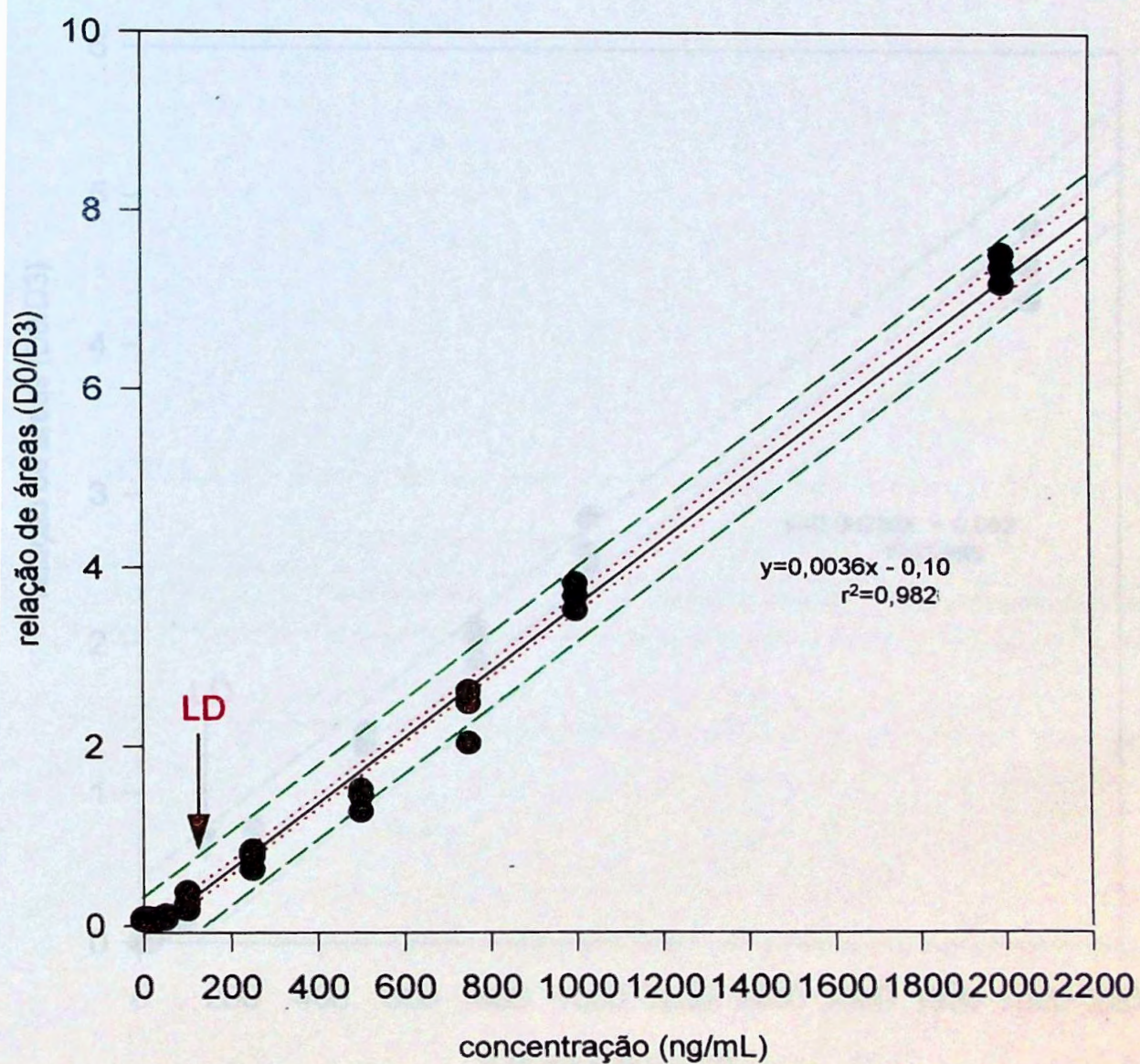


FIGURA 11 - Representação gráfica da curva de calibração obtida para faixa de concentração de 10 a 2000ng/mL de BE e 250ng/mL de BED3.

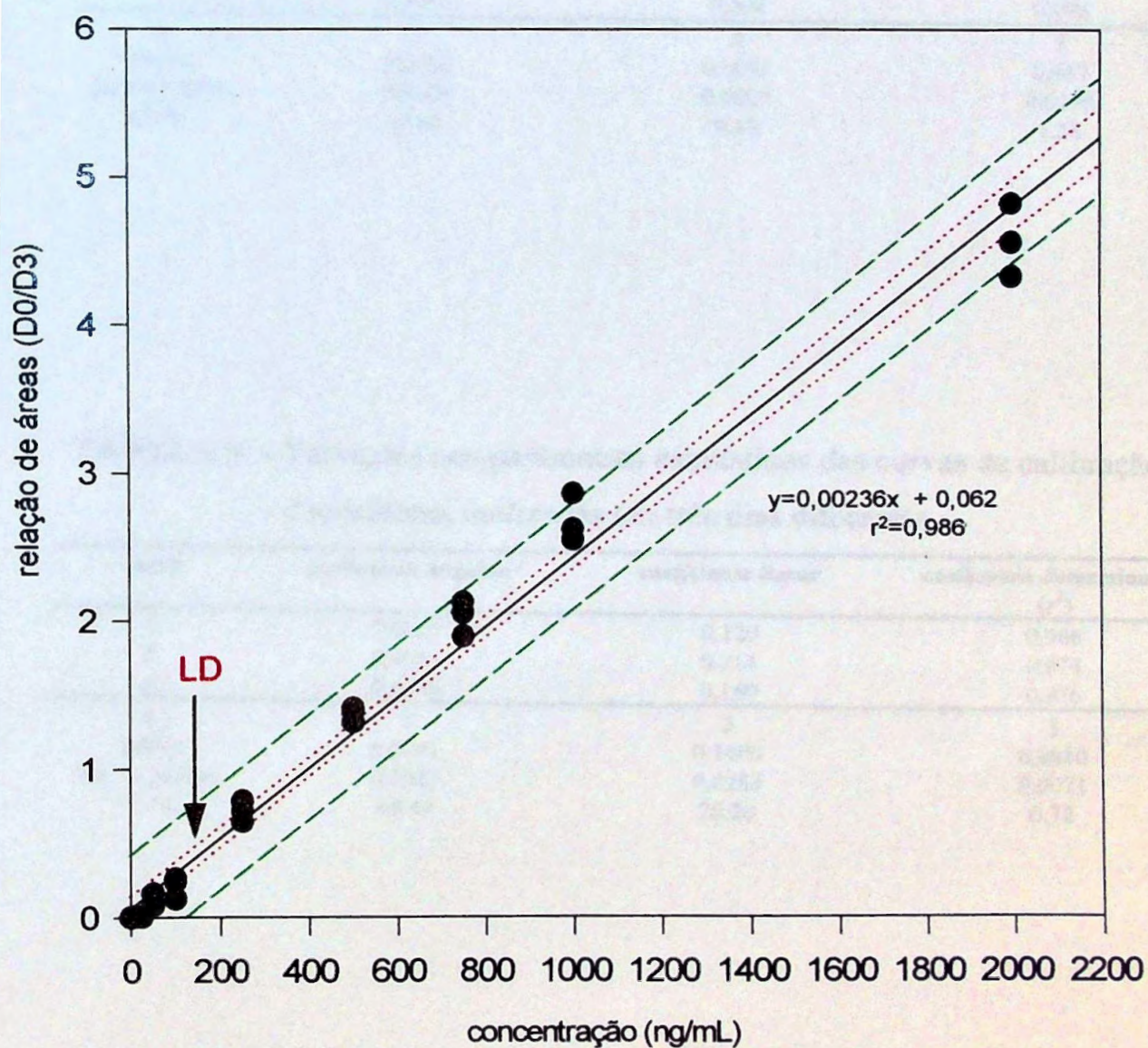


FIGURA 12 - Representação gráfica da curva de calibração obtida para faixa de concentração de 10 a 2000ng/mL de EME e 250ng/mL de EMED3

TABELA IV - Variações nos parâmetros estatísticos das curvas de calibração da cocaína, realizadas em 3 dias diferentes

curva	coeficiente angular	coeficiente linear	coeficiente determinação (r^2)
1	0,0043	0,007	0,998
2	0,0045	0,005	0,998
3	0,0054	0,008	0,976
n	3	3	3
média	0,0048	0,0075	0,987
desvio padrão	0,0008	0,0007	0,0156
CV%	16,04	9,43	1,58

TABELA V - Variações nos parâmetros estatísticos das curvas de calibração do cocaetileno, realizadas em três dias diferentes

curva	coeficiente angular	coeficiente linear	coeficiente determinação (r^2)
1	0,0027	0,120	0,986
2	0,0064	0,214	0,974
3	0,0056	0,160	0,976
n	3	3	3
média	0,0041	0,1400	0,9810
desvio padrão	0,0021	0,0283	0,0071
CV%	49,41	20,20	0,72

TABELA VI - Variações nos parâmetros estatísticos das curvas de calibração da benzoilecgonina, realizadas em três dias diferentes

curva	coeficiente angular	coeficiente linear	coeficiente determinação (r ²)
1	0,0036	-0,10	0,982
2	0,0078	-0,12	0,978
3	0,0054	-0,18	0,981
n	3	3	3
média	0,0045	-0,14	0,9810
desvio padrão	0,0013	0,0566	0,0007
CV%	28,28	40,41	0,07

TABELA VII - Variações nos parâmetros estatísticos das curvas de calibração do éster metilecgonina, realizadas em três dias diferentes

curva	coeficiente angular	coeficiente linear	coeficiente determinação (r ²)
1	0,00236	0,062	0,986
2	0,00484	0,095	0,980
3	0,00326	0,126	0,972
n	3	3	3
média	0,00281	0,0940	0,9790
desvio padrão	0,0006	0,0453	0,0099
CV%	22,65	48,14	1,01

TABELA VIII - Parâmetros de confiança do método proposto para determinação de cocaína em sangue total

parâmetro			
LQ (ng/mL)	50,0		
LD (ng/mL)	25,0		
intervalo dinâmico (ng/mL)	25,0 - 3500,0 $r^2 \leq 0,98$		
	QC1	QC2	QC3
exatidão (%)	75	90	98
imprecisão intra-ensaio (CV %)	12	9	8
imprecisão interensaio (CV %)	18	18	14
recuperação (%)	60	68	75

LQ Limite de quantificação, LD Limite de detecção, r^2 coeficiente de determinação, CV coeficiente de variação QC1 100 ng/mL, QC2 250 ng/mL e QC3 700 ng/mL.

TABELA IX - Parâmetros de confiança do método proposto para a determinação de cocaetileno em sangue total

parâmetro			
LQ (ng/mL)	50,0		
LD (ng/mL)	25,0		
intervalo dinâmico (ng/mL)	25,0 - 3500,0 $r^2 \leq 0,98$		
	QC1	QC2	QC3
exatidão (%)	70	85	93
imprecisão intra-ensaio (CV %)	16	12	10
imprecisão interensaio (CV %)	19	18	16
recuperação (%)	60	65	78

LQ Limite de quantificação, LD Limite de detecção, r^2 coeficiente de determinação, CV coeficiente de variação QC1 100 ng/mL, QC2 250 ng/mL e QC3 700 ng/mL.

TABELA X - Parâmetros de confiança do método proposto para a determinação de benzoilecgonina em sangue total

parâmetro																				
LQ (ng/mL)	100,0																			
LD (ng/mL)	50,0																			
intervalo dinâmico (ng/mL)	50,0 - 3500,0 $r^2 \leq 0,98$																			
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>QC1</th> <th>QC2</th> <th>QC3</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>exatidão (%)</td> <td>65</td> <td>72</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>imprecisão intra-ensaio (CV %)</td> <td>19</td> <td>18</td> <td>12</td> </tr> <tr> <td>imprecisão interensaio (CV %)</td> <td>20</td> <td>18</td> <td>14</td> </tr> <tr> <td>recuperação (%)</td> <td>60</td> <td>65</td> <td>70</td> </tr> </tbody> </table>	QC1	QC2	QC3	exatidão (%)	65	72	90	imprecisão intra-ensaio (CV %)	19	18	12	imprecisão interensaio (CV %)	20	18	14	recuperação (%)	60	65	70
QC1	QC2	QC3																		
exatidão (%)	65	72	90																	
imprecisão intra-ensaio (CV %)	19	18	12																	
imprecisão interensaio (CV %)	20	18	14																	
recuperação (%)	60	65	70																	

LQ Limite de quantificação, LD Limite de detecção, r^2 coeficiente de determinação, CV coeficiente de variação QC1 100 ng/mL, QC2 250 ng/mL e QC3 700 ng/mL.

TABELA XI - Parâmetros de confiança do método proposto para a determinação de éster metilecgonina em sangue total.

parâmetro																				
LQ (ng/mL)	100,0																			
LD (ng/mL)	50,0																			
intervalo dinâmico (ng/mL)	50,0 - 3500,0 $r^2 \leq 0,98$																			
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>QC1</th> <th>QC2</th> <th>QC3</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>exatidão (%)</td> <td>68</td> <td>80</td> <td>89</td> </tr> <tr> <td>imprecisão intra-ensaio (CV %)</td> <td>19</td> <td>16</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>imprecisão interensaio (CV %)</td> <td>20</td> <td>17</td> <td>18</td> </tr> <tr> <td>recuperação (%)</td> <td>40</td> <td>58</td> <td>68</td> </tr> </tbody> </table>	QC1	QC2	QC3	exatidão (%)	68	80	89	imprecisão intra-ensaio (CV %)	19	16	15	imprecisão interensaio (CV %)	20	17	18	recuperação (%)	40	58	68
QC1	QC2	QC3																		
exatidão (%)	68	80	89																	
imprecisão intra-ensaio (CV %)	19	16	15																	
imprecisão interensaio (CV %)	20	17	18																	
recuperação (%)	40	58	68																	

LQ Limite de quantificação, LD Limite de detecção, r^2 coeficiente de determinação, CV coeficiente de variação QC1 100 ng/mL, QC2 250 ng/mL e QC3 700 ng/mL.

TABELA XII - Concentrações de etanol (g/L) cocaína, cocaetileno, benzoilecgonina e éster metilecgonina (ng/mL) encontrados nos casos onde houve interação da cocaína com etanol (Grupo 1)

caso	Álcool etílico	COC	CE	EME	BE	Rel. BE/COC	Rel. COC+EME
11	0,3	1180,9	991,67	1726,11	1443,53	1,22	3770,06
13	nd	1348,75	1389,47	2826,19	4056,98	3,01	5588,03
14	1,5	155,51	110,26	317,3	332,47	2,14	631,46
15	1,1	256,96	110,34	648,24	626,72	2,44	1229,32
20	0,4	3546,21	2063,47	1305,62	2518,3	0,71	5504,64
21	2,4	769,43	538,24	2981,59	1856,54	2,41	5241,81
25	6,5	1276,54	912,94	3564,78	1854,88	1,45	6623,71
26	1,6	2154,41	730,77	2381,49	3696,0	1,72	5726,64 ^c
28	2,5	1208,75	208,98	984,44	1034,84	0,86	2685,41
33	0,4	172,27	170,19	488,16	453,92	2,63	904,51
35	nd	789,43	410,88	2143,28	1244,96	1,58	4004,35
37	2,8	3143,88	1038,96	2784,24	2283,84	0,73	7320,24
41	0,9	2282,83	1393,59	3636,52	2835,8	1,24	7737,61
42	0,29	194,6	126,8	556,28	542,58	2,79	1029,02
43	0,4	2124,56	1246,56	2528,76	2654,12	1,25	5917,70
44	1,8	94,1	177,95	346,6	278,44	2,96	614,00
46	2,7	239,27	137,05	450,07	470,54	1,97	914,37
53	1,2	931,62	783,24	1360,48	1292,98	1,39	2972,34

nd não detectado

TABELA XIII - Concentrações de etanol (g/L), cocaína, benzoilecgonina e éster metilecgonina (ng/mL) encontrados nos casos onde não houve evidências da interação com etanol (Grupo 2)

caso	Álcool etílico	COC	EME	BE	Rel. BE/COC	Rel. EME+COC
1	nd	2168,26	2268,24	2348,25	1,08	5570,62
2	nd	4534,52	2760,87	3584,12	0,79	8675,83
3	nd	1124,08	3029,76	2968,26	2,64	5668,72
4	nd	1157,88	2199,56	3658,26	3,16	4457,22
5	nd	150,62	399,67	486,23	3,23	750,12
6	0,6	624,16	1856,25	2586,32	4,14	3408,53
7	nd	339,79	1526,56	1235,87	3,64	2629,63
8	nd	3486,41	1707,56	4263,48	1,22	6047,75
9	0,7	130,34	898,36	932,87	7,16	1477,88
10	nd	708,28	1967,43	1871,02	2,64	3659,42
12	nd	166,68	488,96	526,46	3,16	900,12
16	nd	200,18	556,28	1274,97	6,37	1034,60
17	nd	362,10	981,14	974,81	2,69	1833,81
18	nd	1154,96	1867,43	2417,18	2,09	4106,10
19	nd	283,94	981,14	998,66	3,52	1755,65
22	nd	198,20	846,24	756,24	3,82	1467,56
23	0,5	462,61	1308,05	2256,25	4,88	2275,73
24	nd	177,85	711,81	718,40	4,04	1245,56
27	nd	233,68	677,67	638,42	2,73	1250,18
29	nd	473,77	1322,55	2115,42	4,47	2457,59
30	0,6	892,54	2081,23	2942,92	3,30	4014,38
31	nd	272,77	852,17	1202,93	4,41	1551,02
32	nd	189,02	450,07	428,36	2,27	864,12
34	0,4	1208,75	1208,75	1256,02	1,04	3021,87
36	nd	183,43	525,94	536,57	2,93	972,34
38	nd	1489,97	1736,61	2257,62	1,52	4094,88
39	nd	138,76	541,43	533,38	3,84	950,90
40	nd	194,60	525,94	470,54	2,42	983,51
45	0,5	362,00	991,47	938,79	2,59	1849,20
47	nd	791,47	2327,5	2038,04	2,58	4282,72
48	nd	192,12	339,77	655,70	3,41	701,77
49	nd	875,79	1057,01	1535,64	1,75	2461,30
50	nd	184,53	306,27	392,50	2,13	643,93
51	nd	898,12	2777,76	2475,65	2,76	5064,76
52	nd	875,79	2057,01	1929,32	2,20	3961,30
54	nd	1043,29	2195,03	2895,93	2,78	4335,83

nd não detectado

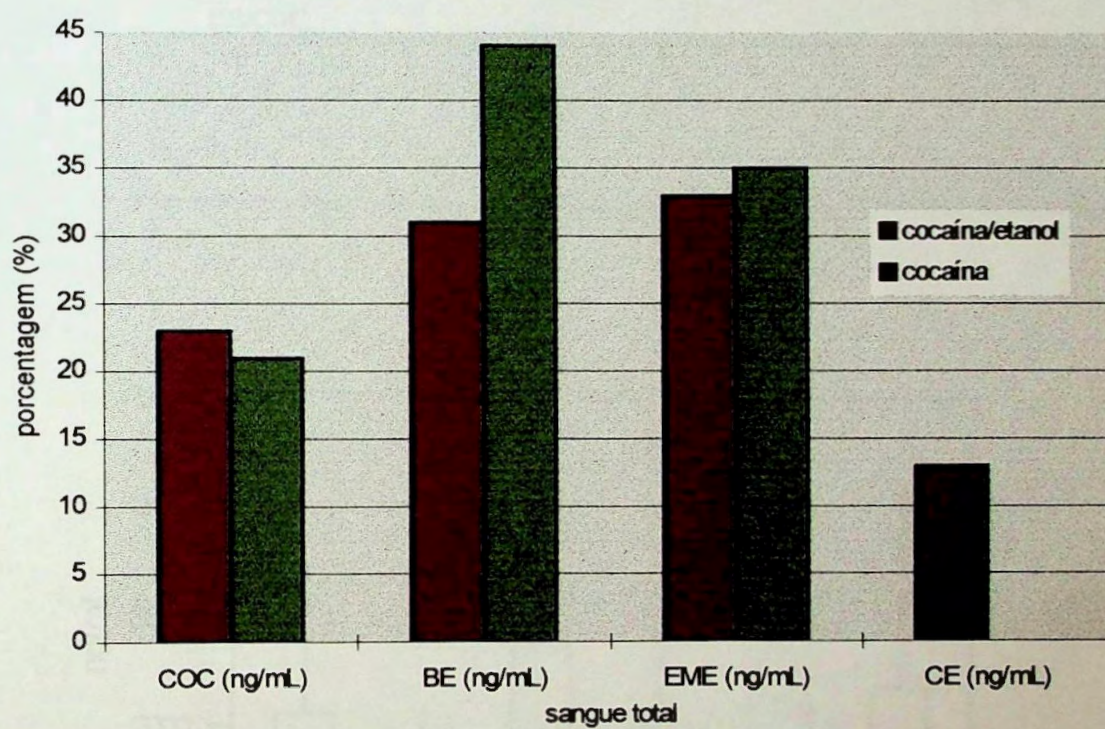


FIGURA 13 - Disposição de cocaína e produtos de biotransformação em sangue total nos casos de interação ou não com etanol

TABELA XIV - Estimativa do valor médio de concentração e erro padrão das quatro variáveis separadas por grupos G1 e G2

Grupo	Variável	Estimativa (ng/mL)	
		Valor médio	Erro padrão
G1	COC	1215,00	248,30
	EME	1723,90	271,91
	BE	1637,64	274,50
	BE/COC	1,80	0,18
G2	COC	775,87	155,61
	EME	1342,51	131,36
	BE	1641,71	176,51
	BE/COC	3,04	0,23

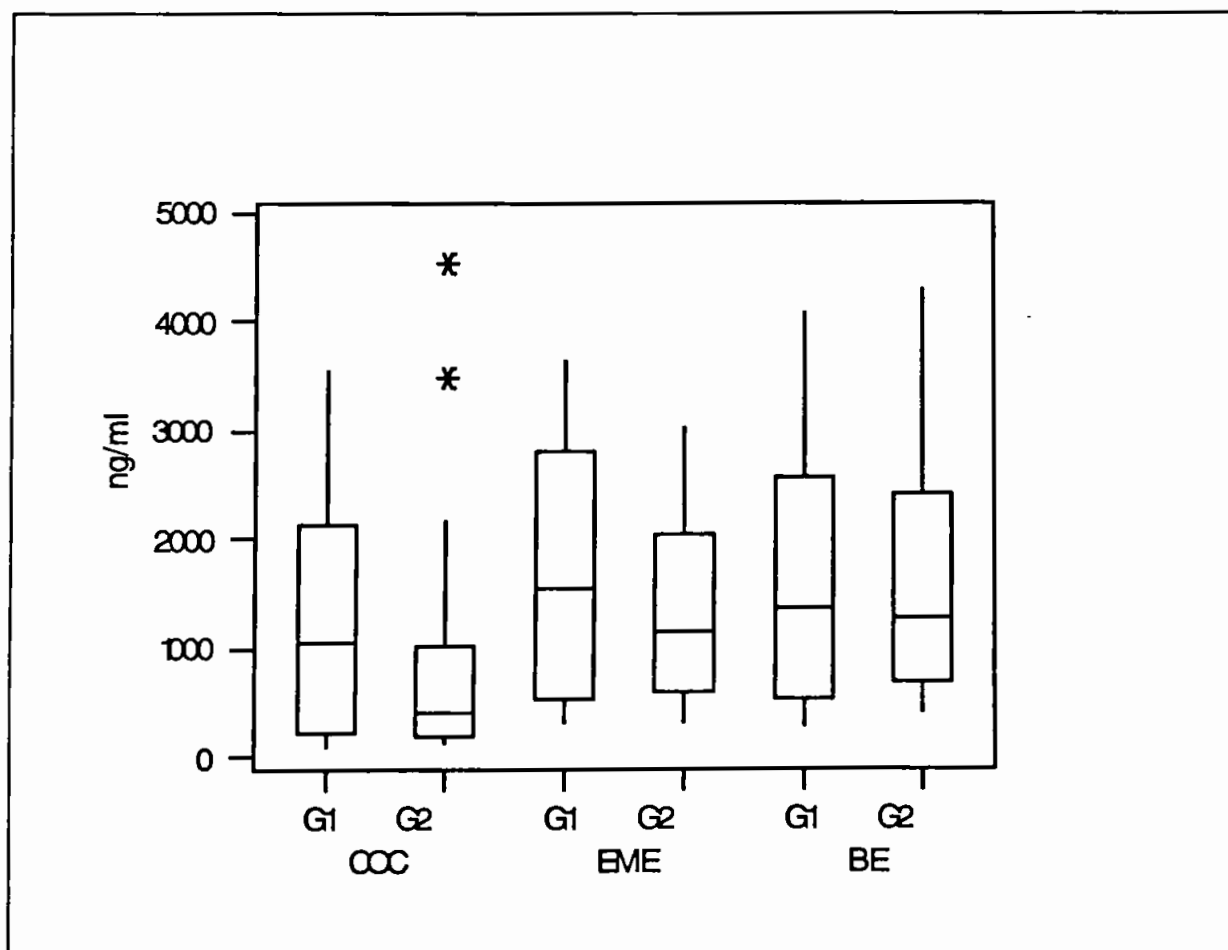


FIGURA 14 - Representação gráfica (*boxplot*) da distribuição das concentrações de COC, BE e EME nos grupos G1 e G2

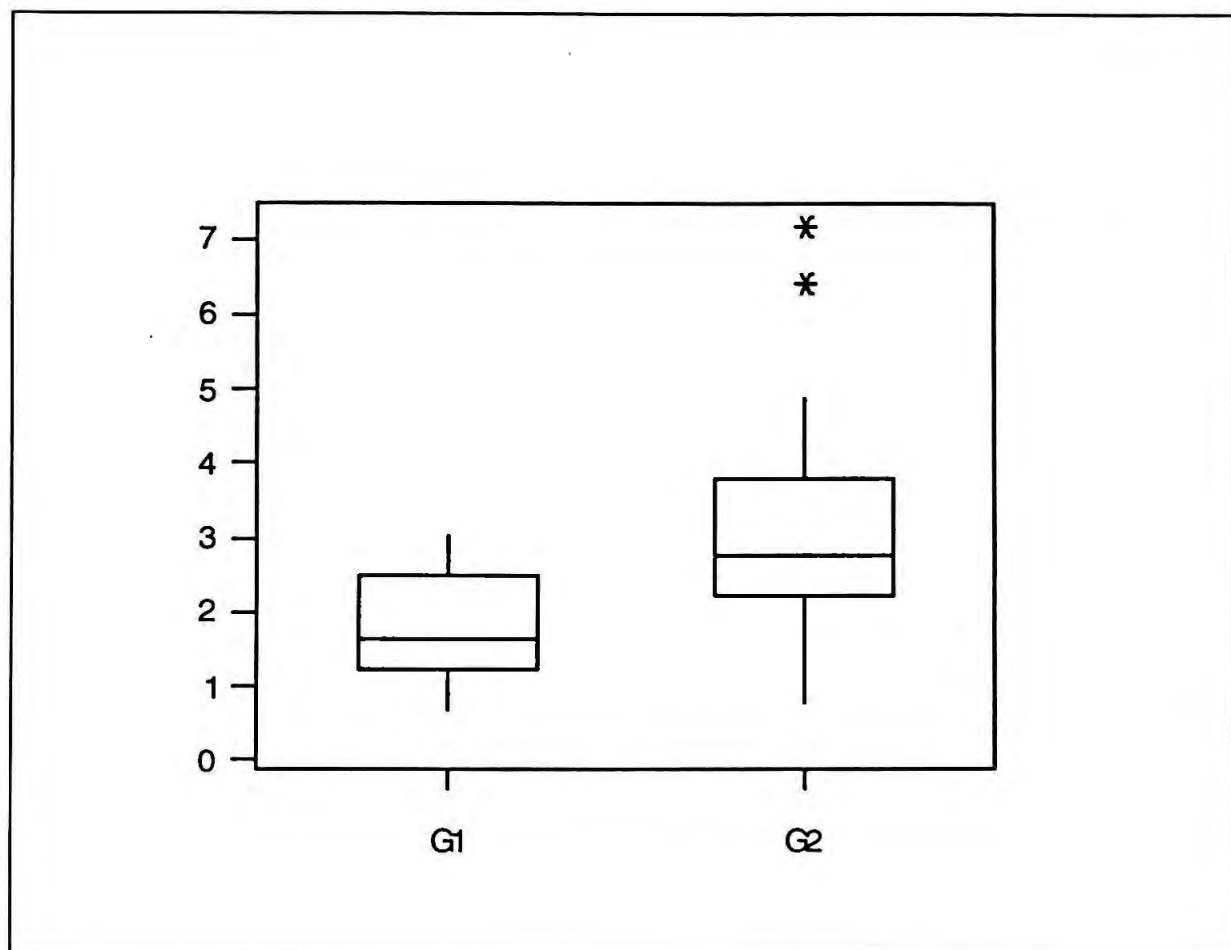


FIGURA 15 - Representação gráfica (*boxplot*) da distribuição das relações das concentrações de BE/COC

TABELA XV - Coeficientes de correlação linear de Pearson para a combinação da variável etanol, CE, COC, EME e BE nas amostras com CE positivo

	ETANOL	CE	COC	EME	BE
Etanol	1				
CE	-0,127	1			
COC	0,004	0,858*	1		
EME	0,279	0,618*	0,575*	1	
BE	-0,083	0,779*	0,734*	0,768*	1

(*) rejeitam a hipótese de correlação nula a um nível de significância de 1%

TABELA XVI - Resultados obtidos pela técnica de Análise de Variância (ANOVA) Univariada para as quatro variáveis ($\alpha=0,05$)

Variável	Nível descritivo (<i>p</i>)	Interpretação
COC	0,1246	os grupos têm o mesmo efeito
EME	0,1586	os grupos têm o mesmo efeito
BE	0,9898	os grupos têm o mesmo efeito
BE/COC	0,0008	os grupos têm efeitos diferentes

Tabela XVII - Estatísticas descritivas da variável BE/COC nas amostras *com e sem* a presença de cocaetilenos

Grupo	N	Média	Desvio padrão	Mediana	Min	Máx.	LIC ($\alpha=0,05$)
G1	18	1.80	0.74	1.65	0.71	3.01	1,68-2,45
G2	36	3.04	1.36	2.77	0.79	7.16	2,79-3,65

LIC Limite do intervalo de confiança

**TABELA XVIII - Estatísticas descritivas da variável COC+EME nas amostras
com e sem a presença de cocaetileno**

Grupo	N	Média	Desvio padrão	Mediana	Min	Máx.	LIC ($\alpha=0,05$)
G1	18	3800,84	2490,05	3887,21	614,00	7737,61	2650,52-4951,17
G2	36	2789,63	1911,80	2366,67	643,93	8675,83	2165,12-3414,13

LIC Limite do intervalo de confiança

6 - DISCUSSÃO

De acordo com os objetivos do trabalho, as amostras foram selecionadas através do histórico de não hospitalização e intervalo entre o evento do óbito e a entrada do material no Laboratório do Serviço Técnico de Toxicologia Forense do IML-sede.

Obedeceu-se ao critério da procedência para assegurar o menor tempo possível entre o evento do óbito e a preservação do sangue, que foi efetuada através da inibição da colinesterase plasmática (EC 3.1.1.8)^{69,76,138,139,148}, também conhecida como pseudocolinesterase e que é responsável pela hidrólise da COC -COC a éster metilecgonina -EME que ocorre *in vitro* e intracorporeamente *post mortem*^{31,71}. Foi utilizado como inibidor o fluoreto de sódio (NaF) que é também efetivo para promover a inibição da carboxilesterase, que catalisa a biotransformação da COC à BE e sua transesterificação a CE na presença de etanol⁴². Para o armazenamento das amostras a serem analisadas, obedeceu-se ao protocolo de normas do IML-sede, que utiliza o NaF na concentração de 2,5 mg/mL^{21,31,41} para aquela finalidade, com conservação a 4°C.

O critério de escolha dos casos de acordo com o local da necrópsia visou diminuir ao máximo a possibilidade de hidrólise da COC *in vitro* devido ao tempo gasto para a chegada da amostra ao Laboratório. A opção por amostras provenientes de indivíduos não-hospitalizados objetivou, por motivos óbvios, evitar a introdução de outros elementos na já tão conflitante relação entre as concentrações sanguíneas e a *causa mortis*.

Obedecidos esses dois critérios, os casos foram analisados indistintamente e a numeração atribuída aos mesmos seguiu a ordem cronológica de entrada no laboratório.

Todos os casos foram submetidos à metodologia preconizada no IML-sede para análise de COC e etanol e os grupos foram constituídos de acordo com o resultado das análises para esses dois xenobióticos. Além da COC e do etanol, todas as amostras foram submetidas à triagem para substâncias voláteis e demais substâncias orgânicas de caráter básico, ácido e neutro.

Por esse critério, originalmente o Grupo 1 (G1) continha 22 amostras, enquanto o Grupo 2 (G2), 32. A constatação posterior de que 2 casos do G2 indicavam a presença de CE e, da mesma forma, 6 casos do G1 não apresentavam CE em quantidades mensuráveis, levou-nos à re-estruturação dos dois grupos. Assim, utilizamos como referencial a presença do produto de interação, uma vez que este trabalho objetivou estabelecer comparações entre os teores de COC relacionados a óbito, na interação, ou não, com etanol. Assumimos, portanto, o CE como um “biomarcador” dessa interação.

O estudo foi realizado com amostras de indivíduos de ambos os sexos e idades variáveis entre 14 e 38 anos. O número de casos pertencentes ao sexo masculino ocorreu numa porcentagem de 81,5%, contra 18,5% do sexo feminino. A Figura 16 mostra o histograma da distribuição dos casos em relação ao sexo e à faixa etária. À semelhança do que ocorre em outras partes do mundo, verificou-se prevalência do sexo masculino neste tipo de intoxicação^{8,49,79}.

Embora os dados relativos à idade não tenham sido abordados estatisticamente, a observação descritiva mostra que 81,4% dos casos encontravam-se abaixo de 30 anos, o que pode evidenciar uma prevalência desse padrão de uso entre indivíduos jovens^{8,49,93,135}. Esse fato está em consonância com as investigações sobre o uso de *crack* na cidade de São Paulo, as quais apontam como usuários indivíduos abaixo de 30 anos e do sexo masculino¹¹².

O histórico de óbito, porquanto um dado de máxima importância neste tipo de investigação, é, via de regra, de difícil obtenção, dadas as falhas do

sistema de trabalho vigente entre nós. Assim, os dados que acompanham um cadáver quase sempre omitem informações por vezes valiosas e mesmo determinantes para a elucidação da *causa mortis*. Normalmente, o médico legista compila os dados disponíveis e fornece breves informações sobre os achados da necrópsia. Referências sobre a possível via de administração, que poderiam incluir marcas de injeção intravenosa recente, não ocorreram em nossa casuística, embora alguns deles tenham citado achados testemunhais que referiam o encontro da parafernália relativa a esta forma de uso na cena do óbito. Assumimos, em nosso trabalho, que a via de administração era desconhecida, salvo os casos expressos de uso de *crack*, sem que se tenha tentado, porém, uma associação com os níveis letais, devido à imprecisão dos demais históricos. As Tabelas XIX e XX mostram os dados constantes das requisições de análise dos casos relativos, respectivamente aos grupos G1 e G2.

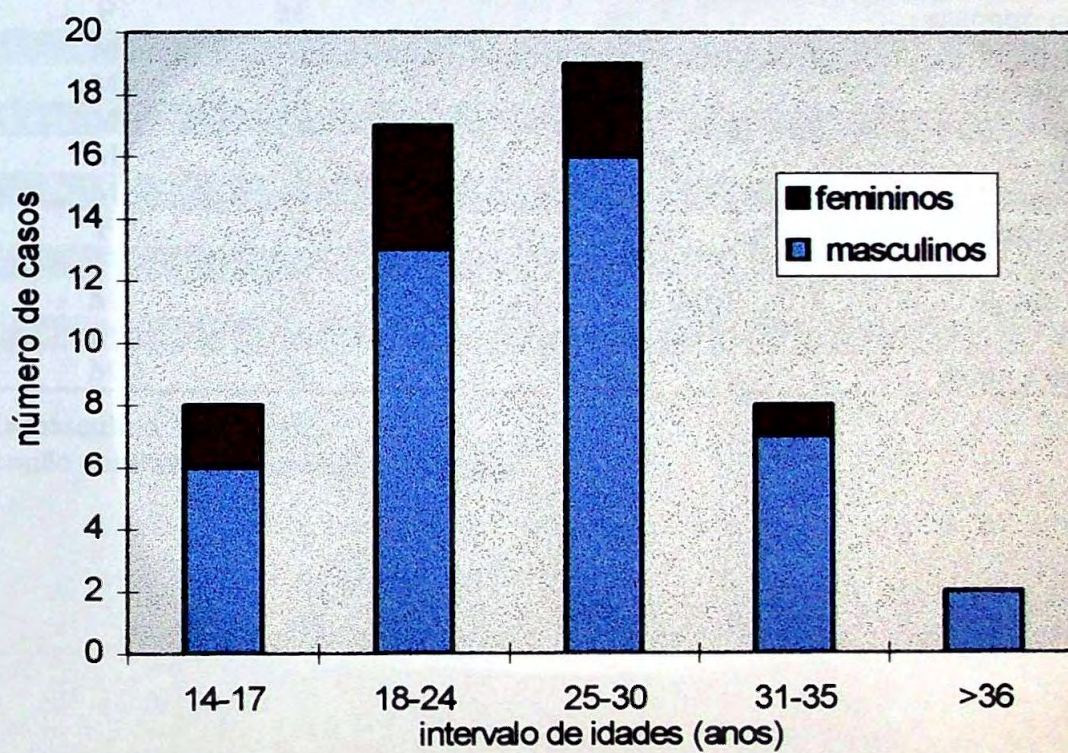


FIGURA 16 - Distribuição dos casos dos Grupos 1 e 2 por sexo e idade

TABELA XIX - Características dos cadáveres cujas amostras evidenciaram a interação COC/etanol

caso	sexo	idade	histórico	observação
11	M	26	nc	usuário de drogas
13	M	30	nc	usuário de drogas
14	M	26	<i>overdose</i>	uso de <i>crack</i>
15	M	27	usuário de "drogas"	morte a esclarecer
20	M	29	<i>overdose</i>	-
21	M	22	<i>overdose</i> de entorpecentes	encontro de seringa
25	M	25	nc	-
26	F	28	nc	encontro de cadáver
28	M	30	nc	-
33	M	27	<i>overdose</i>	uso de <i>crack</i>
35	M	38	<i>overdose</i>	-
37	M	18	<i>overdose</i>	-
41	M	14	nc	-
42	F	17	<i>overdose</i>	encontro de seringa
43	F	24	<i>overdose</i>	-
44	M	17	<i>overdose</i> de COC	uso de <i>crack</i>
46	M	34	intoxicação	-
53	M	26	nc	morte a esclarecer

M=masculino F=feminino

nc=não constava na requisição de exame

TABELA XX - Características dos cadáveres cujas amostras não apresentaram evidências de interação COC/etanol

caso	sexo	idade	histórico	observação
1	M	27	<i>overdose</i> de COC	-
2	M	28	nc	morte indeteminada
3	M	17	<i>overdose</i> de entorpecentes	-
4	M	17	<i>overdose</i> de COC	-
5	M	18	nc	morte a esclarecer
6	M	30	uso de drogas	-
7	M	28	morte súbita em toxicômano	infarto como CPO
8	F	31	nc	encontro de cadáver em motel
9	M	24	mal súbito	edema pulmonar
10	M	23	nc	ausência de lesões traumáticas
12	F	25	nc	morte a esclarecer
16	M	19	<i>overdose</i>	uso de <i>crack</i>
17	M	32	nc	suspeita de suicídio
18	M	17	nc	morte a esclarecer
19	F	25	<i>overdose</i>	uso de <i>crack</i>
22	F	18	<i>overdose</i>	uso de <i>crack</i>
23	M	30	nc	encontro de cadáver em motel
24	M	32	<i>overdose</i>	uso de <i>crack</i>
27	M	33	nc	usuário de "drogas"
29	M	26	<i>overdose</i>	-
30	F	18	<i>overdose</i> de COC	-
31	F	15	<i>overdose</i> de COC	uso de <i>crack</i>
32	M	34	<i>overdose</i>	-
34	M	32	nc	usuário de "drogas" injetáveis
36	M	24	<i>overdose</i>	uso de <i>crack</i>
38	M	19	nc	morte suspeita
39	M	19	<i>overdose</i> de COC	uso de <i>crack</i>
40	M	20	nc	morte a esclarecer
45	M	15	nc	-
47	M	38	<i>overdose</i>	encontro de seringa
48	M	24	<i>overdose</i>	-
49	M	54	nc	-
50	F	24	<i>overdose</i>	uso de <i>crack</i>
51	M	20	nc	morte a esclarecer
52	M	26	<i>overdose</i>	-
54	M	21	<i>overdose</i>	-

M=masculino F=feminino
nc=não constava na requisição de exame

As soluções-padrão dos quatro analitos foram preparadas em metanol. É prática comum utilizar-se, além do metanol, a acetonitrila como dissolvente. Desaconselha-se, todavia, o uso do etanol no preparo das soluções de COC, uma vez que pode haver formação de CE *in vitro*⁹, como artefato. As soluções dos respectivos análogos isotópicos deuterados, utilizados como padrão interno, também por esse motivo, foram preparadas em metanol.

As soluções de trabalho utilizadas para o preparo dos calibradores e controles (QCs) foram oriundas da mesma solução-estoque. Embora esta não seja prática preconizada em validação de métodos toxicológicos, de acordo com os princípios do “Controle de Qualidade”, foi imperativo que o fizéssemos por não dispormos de diferentes soluções-estoque dada a dificuldade de obtenção de tais padrões. Embora tenham sido utilizadas as mesmas soluções-estoque, usamos diferentes soluções de trabalho e ainda o preparo dos QCs foi realizado por outro analista, para simular, o mais possível, as situações das amostras autênticas, uma vez que não dispunhamos das mesmas certificadas.

Tanto os calibradores quanto os QCs foram preparados no mesmo dia da realização das análises, sendo que também se adotou para os controles a prática de preservar os adicionados pela adição do fluoreto de sódio a 2,5 mg/mL^{21,41}.

A utilização dos análogos isotópicos deuterados correspondentes a cada um dos analitos investigados, sempre que possível, deve ser prática adotada, uma vez que assegura a obtenção de melhores resultados analíticos^{15,34,54} pois apresenta as mesmas propriedades do isótopo correspondente.

Dependendo da finalidade de uso do análogo isotópico, podem-se utilizar os deutérios em diferentes grupos da molécula. Em experimento delineado para investigar a incorporação de COC isotopicamente marcada em cabelo, HENDERSON *et al.*(1996), utilizaram COC pentadeuterada no grupamento benzoil da molécula, uma vez que o estudo visava estabelecer a conversão da COC a BE, com conseqüente manutenção deste grupamento. Nos

casos em que se aplicam os análogos deuterados como padrão interno, a não ser que se objetive o conhecimento exato dos fenômenos que ocorrem no processo de extração, é indiferente a localização destes átomos, posto que o que ocorrer com o analito, se dará também com o análogo. Geralmente, como aconteceu em nosso caso, utiliza-se para este fim a COC trideuterada no grupo N-metil, que permanece intacto nos principais produtos de biotransformação analisados na verificação de uso de CO. Pelo mesmo motivo, utilizam-se BE, EME e CE também trideuterados no mesmo grupamento (Figuras 4,5,6 e 7).

Além de possibilitar a aferição exata do processo extrator e resposta cromatográfica, há ainda a possibilidade de se utilizar o método de diluição isotópica como critério de estabelecimento de positividade, através da normalização da abundância dos íons qualificadores aos correspondentes deuterados. Esse processo foi proposto por BODOR *et al* (1990), no sentido de reduzir a variabilidade das medidas realizadas pelo método tradicional no qual verifica-se a relação de íons apenas do composto em questão. A utilização do algoritmo de normalização promove valores mais próximos entre os padrões (calibradores) e os controles. Supõe-se que esta conduta reduza em até 3 vezes a variação obtida pelo critério tradicional de se estabelecer relação aceitável entre as abundâncias dos íons calibradores¹⁵ e é recomendado em análises de drogas de abuso por espectrometria de massa em material biológico⁵⁴. A possível explicação para este fato é que, através da normalização, podem-se corrigir variações, causadas, por exemplo, por fatores relacionados à fonte de íons no momento do bombardeamento e que pode, por exemplo, promover estabilidade diferenciada (às vezes anormalmente alta) para o íon molecular¹⁵. Esse tipo de variabilidade, por constituir fato circunstancial, não se reproduz. A normalização, entretanto, pelo correspondente íon deuterado, faz com que este, na verdade, funcione como um indicador do processo de fragmentação. Daí ser esse método especialmente útil quando se trata da análise no modo de impacto eletrônico (EI).

As variações obtidas através da análise das amostras em estudo de COC, CE e derivados de BE e éster metilecgonina foram aceitáveis quando comparadas às obtidas pela análise dos calibradores e controles. A análise da variação das abundâncias (Tabela III) mostra que a maior ocorreu para o CE, sendo que para o mesmo analito, as variações maiores se observaram quando se enfocou o íon molecular.

A escolha dos íons qualificadores teve, portanto, que obedecer não só aos critérios de abundância e a devida correspondência com o análogo deuterado, como também à menor variação observada no estudo da normalização (Tabela III). Assim, por exemplo, embora o íon m/z 105 (grupo benzofla) seja mais abundante no espectro da COC ou CE do que os respectivos íons moleculares, não foi escolhido como qualificador por não haver o correspondente deuterado nos padrões internos utilizados.

Assim como para qualquer outro fármaco orgânico fixo, a extração da COC e seus derivados da matriz biológica é etapa fundamental na análise toxicológica. Se a análise objetiva a detecção de apenas um analito, a extração pode ser elaborada segundo as características desse analito, com exclusão de todos os demais. Porém, como é o nosso caso, quando as características cinéticas do xenobiótico orientam a análise do precursor e seus produtos de biotransformação, a extração deve contemplar compostos com características físico-químicas diferentes. Assim, enquanto a COC e o CE são bases lipofílicas, o EME e a BE são relativamente polares, sendo a BE um composto anfotérico. Conseqüentemente, a extração simultânea desses compostos é procedimento de difícil otimização.

Nos últimos anos, a extração em fase sólida (SPE) vem se tornando muito utilizada nos laboratórios de Toxicologia Forense como ferramenta importante na análise das mais variadas matrizes.

Dentre as inúmeras vantagens da SPE em relação à extração líquido-líquido, podemos citar o menor tempo de execução das análises, a não-

exposição do analista a quantidades substanciais de solventes (e conseqüentemente menor quantidade de solvente a ser descartado), a não-formação de emulsão, menor quantidade de solvente a ser evaporado, maior recuperação, mormente nos casos onde a técnica de detecção requer extratos “limpos” e que, portanto, necessitam de uma etapa extra de purificação¹³². Observa-se que a maior aplicação da SPE tem-se limitado à extração de fármacos de plasma, soro e urina⁹⁵ e, mais recentemente, mecônio, devido ao grande interesse dos estudos sobre a exposição intra-uterina^{1,91,92}. São bem conhecidas as dificuldades relacionadas com a extração de sangue total por esta técnica, pois os eritrócitos tendem a entupir a coluna. Por esta razão, a SPE não é largamente utilizada nos Laboratórios de Toxicologia Forense, onde o sangue total é amostra que ocorre com maior freqüência, principalmente nas investigações de *causa mortis*. Assim, são esparsas e recentes as publicações que descrevem esta técnica para este tipo de matriz^{1,39,92,132}.

Destes dados infere-se que o sangue deve ser tratado antes que se proceda à sua extração na coluna. O tratamento mais comum é o de se remover as proteínas por precipitação, o que pode se dar por vários agentes, como metanol, acetonitrila e sulfato de zinco em metanol, entre outros. O tratamento com ultra-som também é referido como processo de remoção de proteínas. Nossa opção pelo sulfato de zinco em metanol como desproteinizante protêico deveu-se à exequibilidade de sua utilização, bem como à nossa experiência anterior no uso combinado deste agente e SPE em análises de COC em plasma³⁹, durante nossa estadia nos Laboratórios do *Center for Human Toxicology* da *University of Utah*.

As amostras de sangue analisadas segundo procedimento apresentado na Figura 3 foram extraídas em duas etapas. A primeira (separação), realizada nas dependências dos Laboratórios do STTF, constava da precipitação da amostra, tamponada em pH 6,0, com sulfato de zinco em metanol e posterior centrifugação. Os filtrados eram então, transportados para o Departamento de

Controle e Pesquisas Antidopagem do Jockey Club de São Paulo, onde eram submetidos a SPE, ou seja, passagem pela coluna de fase sólida com utilização do referido equipamento de extração (4.2.1). Essas duas operações foram sempre realizadas no mesmo dia para cada amostra, visando a minimização das inevitáveis perdas. Frequentemente ocorria entupimento da coluna, mesmo após este processo, e a amostra, então, ficava inviabilizada. Este fato pode ser explicado pelo excesso de íons de zinco no sobrenadante e à presença de hidróxido de potássio do tampão fosfato causarem a precipitação do hidróxido, o que bloquearia a coluna³⁹. Esta etapa demonstrou ser aquela que contribuiu com a perda mais significativa dos analitos.

A coluna *Bond Elut Certify* é uma coluna de extração com base de sílica gel, que contém grupos octil e ácido benzeno sulfônico. Apresenta mecanismos de retenção não-polar e de troca catiônica através de seus grupos. É indicada para extração de fármacos de amostras biológicas e é muito utilizada na análise de COC e de produtos de biotransformação de várias matrizes orgânicas, pois propicia a extração concomitante daqueles que apresentam caráter básico, como da BE, que apresenta caráter anfotérico^{1,2,23,39,92,151} e apresenta a vantagem de ser efetiva também para outras substâncias utilizadas como fármacos de abuso. A extração na coluna, à semelhança do que referem outros autores^{1,2,92,151} seguiu o preconizado pelos fabricantes, sem que tenhamos efetivado a eluição final com etapa sobressalente. Esta etapa consta da passagem de solvente em pH duas unidades acima do pKa do(s) analito(s). Este procedimento, na verdade, mostrou diminuir o rendimento da extração, o que poderia ser explicado pelo fato da COC, BE e EME serem instáveis em condições alcalinas: a COC e BE se convertem, respectivamente em BE e ecgonina, enquanto o EME sofre isomerização a pseudo-éster metilecgonina³⁴. O CE também teve menor recuperação por este procedimento e, embora não tenhamos encontrado explicações para este fato na literatura consultada, poderíamos inferir, em bases

teóricas, que também ocorre hidrólise alcalina, dada sua semelhança estrutural com a COC.

A recuperação da COC e CE e BE foram semelhantes em nossos experimentos, e ficaram entre 60 e 78% (Tabelas VIII, IX, X), considerados satisfatórios se levarmos em consideração as condições analíticas. O EME, por sua vez (Tabela X), teve rendimento menor de extração, porém ainda compatíveis com os objetivos propostos. São poucos os achados na literatura pertinente, sobre esta forma particular de extração. Há referências ao uso da *Bond Elut certify* na extração da COC e produtos de biotransformação em urina certificada liofilizada com rendimento de 76 a 96% para COC e BE³⁴; MATSUBARA *et al.* (1984), estabelecem que a extração do EME deve ser realizada separadamente para promover recuperação satisfatória; ADERJAN *et al.* (1993), referem recuperação de respectivamente, 86 e 75% para COC e BE de sangue total após extração em colunas *Bond Elut*.

A exatidão do método, entretanto, foi considerada satisfatória para todos os analitos na faixa considerada “quantificável”, ficando em média dentro da faixa dos 20% (momento para os valores situados na faixa de letalidade), geralmente aceitável em análises toxicológicas com finalidade forenses. Corroborar para este fato a precisão, também considerada satisfatória para os três controles e que, seguramente, foi obtida graças ao uso de análogos isotópicos como padrão-interno.

COC e CE não possuem grupos funcionais passíveis de derivação e os métodos que objetivam a análise apenas desses dois xenobióticos, não necessitam desta etapa prévia à cromatografia. O EME, embora apresente volatilidade satisfatória para ser cromatografado, apresenta grupos que podem ser derivados, melhorando sensivelmente seu comportamento cromatográfico. A BE, por sua vez, devido à sua polaridade, necessita da derivação para ser analisada por cromatografia gasosa. A derivação tem ainda o importante papel em CG/MS de tornar único o espectro de massa do composto.

Há referências sobre se proceder à derivação da BE antes do processo de extração, com posterior extração do correspondente composto alquilado^{34,54}. Além da alquilação, cujas reações incluem a formação de metil², propil³, pentafluor-*n*-propil^{1,2,34,151} ou hexafluoroisopropil³⁴, ésteres da BE, a derivação desse produto de biotransformação pode ocorrer por silanização^{39,92}.

ZHANG *et al* (1990), utilizaram o 1,1,1,3,3,3 hexafluor-2-propanol e o anidrido pentafluor propiônico (HFIP-PFPA) respectivamente como agente de derivação do grupo carboxílico da BE e da hidroxila do EME.

A introdução de grupos trimetilsilil através do tratamento com BSA [bis(trimetilsilil) acetamida] ou BSTFA bis(trimetilsilil) trifluoracetamida^{34,37,144} é referida como sendo uma das mais comuns. Esses dois agentes se mostraram efetivos na análise concomitante de EME e BE devido ao aumento de volatilidade que promovem, apresentando, porém, a desvantagem dos produtos formados serem facilmente hidrolisados. O ester *t*-butildimetilsilil de BE é menos sujeito à hidrólise do que o ester trimetilsilil e pode ser obtido pelo tratamento da BE extraída com o MTBSTFA (N-metil-N-*t*-butildimetilsilil trifluoracetamida)^{39,58,144}.

O MTBSTFA possibilita tanto a derivação do grupo ester (da BE) quanto da hidroxila (do EME) (Figuras 4, 5, 6 e 7). Os íons gerados da fragmentação da BE-TBDMS e EME-TBDMS, respectivamente, *t*-butildimetilsilil derivados da BE e EME, apresentam alto peso molecular, e a simplicidade do processo (60°C por 10min) torna-o exequível na rotina laboratorial.

Estudos prévios por nós realizados com HFIP-PFPA, BSTFA e MTBSTFA indicaram que, além da estabilidade satisfatória apresentada pelos derivados, em comparação com os outros agentes, a derivação com MTBSTFA forneceu boa resolução entre os quatro analitos e espectros de massa característicos e reproduzíveis. Além disto, a COC e o CE presentes nos extratos não foram afetados pela derivação.

A coluna DB5 mostrou-se eficaz na separação dos analitos e foram considerados satisfatórios os tempos de retenção obtidos: 11,27; 14,36; 15,08 e 16,41 min, respectivamente para EME-TBDMS, COC, CE e BE-TBDMS. A temperatura de 250°C utilizada no injetor foi satisfatória para volatilizar os produtos estudados e não apresentou evidências de degradação térmica da COC com conseqüente aparecimento de metilecgonidina (pico monitorado via m/z 155) como artefato, o que, de acordo com CONE *et al.* (1994), pode ocorrer a temperaturas altas.

A tecnologia *Quadrupolo-Ion trap* foi utilizada em nosso trabalho e mostrou-se eficaz e compatível com os objetivos propostos. Essa tecnologia constitui uma variação do filtro de massa quadrupolar, pois também se baseia na geração de um campo elétrico formado por potenciais DC (potencial contínuo) e RF (rádio-frequência) aplicados numa câmara. Ao invés de os íons se moverem por esta câmara, ficam retidos, “trapeados”. Conforme a variação das voltagens DC e RF, determinados íons são expulsos e detectados por uma eletromultiplicadora. A otimização adequada desses parâmetros foi feita através de programa automático de ajuste (*set up*), o qual otimiza os tempos de ionização em cada varredura analítica (AGC). Esse fato, aliado à não-ocorrência de perdas de íons devida à eventual ineficiência de transmissão no espaço, uma vez que os mesmos se encontram confinados, conferem a esta técnica alta sensibilidade⁶⁸. Além da sensibilidade adequada, apresenta a vantagem de fornecer, no modo EI (impacto de elétrons), o espectro total da molécula em baixas concentrações, importante como *fingerprint* na determinação inequívoca de substâncias em Toxicologia Forense^{40,68,151}.

O modo EI na metodologia utilizada mostrou-se satisfatório na quantificação de concentrações de interesse deste trabalho, isto é, aquelas relativas às intoxicações agudas e letais.

Os íons quantificadores foram selecionados baseando-se na abundância dos mesmos, principalmente nos calibradores mais baixos. Assim, embora a

monitorização do íon m/z 303 para a COC tenha sido efetiva e com resposta linear em intervalo dinâmico significativo, o mesmo não ocorreu nas concentrações menores, onde a imprecisão foi maior em função da baixa intensidade do sinal. À semelhança do observado por outros autores³⁴, a monitorização do íon 182 para COC permitiu a determinação de concentrações menores do que as observadas para o íon 303.

Foram realizados alguns experimentos no modo CG/MS/MS (disponível no equipamento utilizado). Os processos de fragmentação monitorados foram: $182 \rightarrow 82$, $182 \rightarrow 82$, $196 \rightarrow 82$ e $282 \rightarrow 82$ respectivamente, como íons precursores e resultantes (*parent e daughter ions*) do EME-TBDMS, COC, CE e BE-TBDMS. Problemas relativos à similaridade do padrão de cisão das substâncias deuteradas em relação aos análogos isotópicos, bem como nossa limitação de tempo e de possibilidade de uso do equipamento não propiciaram o completo estabelecimento desta técnica e conseqüentemente, validação metodológica na análise da COC e seus produtos de biotransformação. Os ensaios preliminares, no entanto, indicaram aumento de sensibilidade da ordem de 10 vezes em relação ao modo CG/MS.

Ao utilizarmos calibradores nas concentrações além de 2000 ng/mL o r^2 (coeficiente de determinação), porquanto se mantivesse $<0,98$ até 3500 ng/mL, fazia com que houvesse muito gasto de padrões (de difícil obtenção) a cada repetição da curva, uma vez que não foi usada “curva histórica”.

Quando a quantificação da amostra excedeu o intervalo dinâmico da curva de calibração, procedeu-se à diluição da mesma com amostra de sangue “branco” (diluição na matriz) de tal maneira que a quantificação pudesse ser interpolada no intervalo estudado. O resultado assim obtido foi multiplicado pelo fator de diluição.

Embora atentássemos para o fato de ser o ponto central da curva de calibração a concentração de 1000 ng/mL, o que indica que o padrão interno

devesse ser usado nesta concentração³⁰, não pudemos assim proceder dado que dispúnhamos de pouca quantidade de padrões para realizar o trabalho.

Além disso, a análise de variação dos parâmetros estatísticos, apresentada nas tabelas IV, V, VI e VII, elucida o fato da contra-indicação da assim chamada “curva histórica” sempre que a análise priorizar a exatidão.

O LD foi calculado de forma empírica⁵ e o valor de 50ng/mL para EME e BE e 25ng/mL para COC e CE refere-se àquelas concentrações em que foi possível obterem-se os mesmos tempos de retenção, relações aceitáveis entre os íons qualificadores e índice de similaridade acima de 90%. Se optássemos pela técnica de cálculo clássico de LD, através da qual usa-se o critério de se considerar como sendo a menor concentração, que se difere do sinal do “branco” com 99% de confiança, aquela relativa à concentração cuja correspondente variável independente (y) seja a referente à soma do sinal gerado pelo branco (y_b) acrescido de 3 desvios-padrão correspondente a esta medida), o LD, por exemplo para a COC, seria de 2 ng/mL. Na verdade, o critério que escolhemos permite que, apropriadamente, consideremos este valor como “limite de identificação” uma vez que cumpre os critérios pré-estabelecidos para atestar a positividade da amostra.

Da mesma forma, optamos por considerar como LQ a concentração em que houve a relação correta dos íons qualificadores, índice de similaridade superior a 90% e $CV < 20\%$. Se, entretanto, calcularmos o LQ pelo método que considera como sendo a concentração correspondente ao y_b acrescido de 10 desvios esse valor passa de 50 ng/mL para 10 ng/mL. Nessa concentração, porém, embora se encontrem os fragmentos mais abundantes, sua relação não se configura como satisfatória, e, ainda o índice de similaridade é menor que 90%. HIME *et al.*(1991), referem LD de 5 ng/mL para COC em análise de 1 mL de sangue total por *Ion trap* com relação sinal/ruído (S/N) de 300 para o íon molecular. Esses valores em relação ao S/N correspondem àqueles que obtivemos apenas nos ensaios por MS/MS.

Embora os achados de HEARN *et al* (1991a), tenham mostrado diferenças entre os diferentes sítios de coleta. o sangue da cavidade cardíaca é a amostra mais comumente utilizada não apenas entre nós, como mundialmente. Indica-se como sítio anatômico de eleição a veia emoral. A execução desta prática, porém, requereria um trabalho adicional nas autópsias. De acordo com os autores mencionados, os teores de COC nas amostras colhidas da veia femoral, similarmente ao que ocorre com aquela obtida da cavidade cardíaca, aumentam durante o intervalo entre o óbito e a coleta.

Assim, para a COC e demais xenobióticos que possam ter seus teores eventualmente modificados, é conveniente que o sítio de coleta seja citado nos resultados. Uma vez que o sangue da cavidade cardíaca é o mais utilizado, e a coleta, via de regra, se dá durante a necrópsia, e não no local de óbito, o padrão de comparação de resultados seria nesta situação, ou seja, sangue de cavidade cardíaca colhido na necrópsia.

Em 33% dos casos estudados, os altos teores encontrados (acima de 1000 ng/ mL de sangue) poderiam integrar o chamado óbito “clássico” por *overdose*. Nos demais houve uma incidência de 50% para concentrações entre 400 e 1000 ng/mL e 50% que comporiam as assim chamadas “toxicidade das doses baixas”, onde as concentrações (abaixo de 400 ng/mL) são semelhantes às recreacionais, porém os fatores circunstanciais, históricos e/ou achados de necrópsia sugerem a intoxicação cocaínica.

ESCOBEDO *et al.* (1991), referem que os resultados obtidos em averiguação dos teores de COC relacionados à *overdose* sugerem que, quando esta ocorreu pelo uso de base livre ou *crack*, os teores encontrados foram menores do que aqueles que advieram da utilização da COC na forma de cloridrato. Em nossa casuística, 80% das amostras não referiram a via pela qual ocorreu a exposição. Houve 8 (dos 36) casos em G2, contra 3 (dos 18) em G1 que indicaram o uso de *crack*. Nestes, a média de concentração de COC foi de, respectivamente, 205 e 141 ng/mL, ou seja, menor no grupo onde houve uso de

crack, corroborando serem menores os teores de COC nos casos em que houve a utilização da COC na forma básica⁴⁹. A forma pela qual ocorre a intoxicação deve ser variável controlada nos estudos de estabelecimento dos teores relacionados ao óbito. Infelizmente, em nosso sistema vigente, essa informação constitui um dado praticamente inexeqüível.

As concentrações de EME após exposição recreacional a COC, quando analisadas *in vivo*, são da ordem de 5% das correspondentes a BE⁷⁰ e mesmo quando se utiliza métodos com significativo LD, não se constata sua presença no plasma³⁵, o que talvez explique por que há apenas um pequeno número de artigos que aborda a análise deste analito em plasma^{35,70}, soro¹⁵⁰ e sangue total^{70,72}. Algumas análises que realizamos em número restrito de amostras de sangue de indivíduos vivos, provenientes da Clínica Médica do IML-sede, não detectaram EME nos casos onde a COC estava presente na concentração média de aproximadamente 112 ng/mL.

Esses dados de biotransformação e o conhecimento, inclusive constatado em nosso trabalho, de que os teores de EME por vezes suplantam os correspondentes a BE quando se trata de sangue total *post mortem*, mesmo nos casos onde a amostra é imediatamente preservada após a coleta, permitem inferir que ocorre a transformação após o óbito intracorporeamente e/ou *in vitro*, o que pode ser importante na elucidação da *causa mortis* por COC. Há ainda referências sobre a transformação *post mortem* de COC em CE em fígados de ratos intoxicados com etanol¹¹⁰.

Como já foi citado, ISENSCHMID *et al.* (1992b), discutem a possibilidade de predição dos teores de COC no momento do óbito, baseada nos teores de EME encontrados e que seriam resultantes da hidrólise *post mortem*, uma vez que este produto apresenta teores muito baixos e até não-mensuráveis em plasma *in vivo*^{35,72,84}. Esta hidrólise poderia, portanto, ocorrer no intervalo *post mortem* até a devida preservação do sangue.

Assim, ao seguirmos o preconizado por estes autores, constatamos que a média dos valores da soma dos teores micromolares de COC e EME expressos como COC e que seriam, portanto os valores “preditivos” desta por ocasião do óbito (Tabela XVIII) foram de 3800 e 2790 ng/mL, respectivamente para o G1 e G2. Portanto, absolutamente compatíveis com os valores relacionáveis à chamada *overdose* “clássica”. Embora este recurso tenha sua validade, dados os critérios que permearam os experimentos citados, assume que todo o EME é oriundo da COC inalterada na hora do óbito. Para que este fato seja efetivamente assumido, seriam necessários mais dados sobre os teores de EME em situações de intoxicação aguda, quando os parâmetros cinéticos estão alterados e que poderiam, eventualmente, apresentar teores sanguíneos significativos de EME numa situação *in vivo*. Outro ponto a ser considerado, como já vimos, seria o estudo da redistribuição *post mortem*, sobre a qual são ainda escassos os trabalhos na literatura.

A Figura 13 mostra o histograma das concentrações encontradas em termos da relação entre os quatro analitos (Tabelas XII e XIII). A comparação com os valores plasmáticos nas intoxicações recreacionais⁸⁴ mostra que as relações entre os mesmos são substancialmente diferentes: a relação EME/COC é de aproximadamente 0,12 para as intoxicações em indivíduos vivos contra 1,5 para a mesma relação observada em nossa pesquisa.

A relação EME/COC nos grupos G1 e G2, foram de respectivamente 1,4 e 1,7, o que pode ser indicativo de formação *post mortem* pois, seria de se esperar que a relação, *in vivo*, em G1 fosse maior que em G2, dada a presença do etanol, que sabidamente desloca a biotransformação das outras vias, com conseqüente aumento dos produtos delas resultantes¹²⁴. Em função destes achados e das constatações, já citadas, sobre as possibilidades de modificações das concentrações de COC (dependendo do intervalo decorrido do óbito^{60,110}, temperatura¹¹⁰, sítio de coleta⁶⁰, outras possibilidades enzimáticas *post mortem*¹¹⁰ e redistribuição devida à “cinética *post mortem*”¹²¹), entendemos que

a proposição de ISENSCHMID *et al.* (1992b), deve ser utilizada apenas como um dado a mais na interpretação da *causa mortis*.

Em nossa casuística, a média dos valores de CE foi de 50% da referente à de COC (696 ng/mL para CE, e 1215 ng/mL para COC). Estes valores estão em concordância com os encontrados por BAILEY *et al.* (1993), em amostras de plasma provenientes de pacientes politraumatizados, e por WU *et al.* (1992a), em soro proveniente de pacientes com suspeita de intoxicação. MILLER *et al.* (1994), em experimento com camundongos aos quais foram administrados COC e etanol, referem que os teores de CE plasmáticos não excederam 5% dos referentes a COC.

Em apenas 1 dos 18 casos por nós estudados no Grupo 1, a concentração de CE excedeu à de COC e em 2 deles, não houve detecção de etanol. O CE não foi detectado em 5 casos onde a análise foi positiva para etanol e COC, razão pela qual estes casos foram enquadrados no Grupo 2.

As explicações para a não-deteção de etanol e presença de CE poderiam ser: 1) o tempo decorrido entre a ingestão e a eliminação ser *antemortem* e diferenciado em relação à absorção da COC; 2) a quantidade de etanol ingerida ser pequena; 3) os padrões cinéticos de eliminação serem diferenciados para os dois agentes; 4) o limite de detecção- LD (*cut off*) do método de dosagem de etanol não ser suficientemente baixo. Por outro lado, a positividade do etanol e não-deteção de CE poderia ter justificativa no LD do método do CE validado, ou, ainda, ser devido a problemas como, por exemplo, variações interindividuais de função enzimática ou outros de natureza idiossincrática. Cabe ressaltar, porém, que a média de concentração para etanol nestes casos foi de 0,5 g/L (0,4-0,7), valores estes correspondentes aos mais baixos da série relativa ao Grupo 1 e consideravelmente menor que a média de 1,5 g/L observada neste grupo.

As médias de concentração e os respectivos erros-padrão para os três analitos estudados - COC, BE, EME (variáveis) mostrados à Tabela XIV -, bem

como a distribuição dos teores de cada um deles nos dois grupos estudados, realizada através do “desenho esquemático dos 5 pontos” (*boxplot*)²⁷ (Figura 14), mostram que essas variáveis têm distribuição assimétrica com maior variabilidade no grupo G1. Isto significa que a faixa relacionada à intoxicação supostamente letal é muito ampla e explica a dificuldade de se estabelecer o que se considerar como sendo “*overdose* por COC”.

A variável BE/COC (relação da concentração de BE relativa à de COC) foi introduzida para medir a influência da via de biotransformação da COC à BE pelas carboxilesterases. Essa relação, cujas estatísticas descritivas estão na Tabela XVII, apresentam maior variabilidade em G2 (Figura 15). O LIC (limite do intervalo de confiança), mostra claramente a diferença dos 2 grupos e a possibilidade que esta variável apresenta de discriminá-los.

A variável COC+EME (soma das concentrações micromolares de COC e EME, expressas como COC) foi estudada na tentativa de adequar o modelo proposto por ISENSCHMID *at al.* (1992b), às nossas amostras e acrescentar um outro elemento à difícil interpretação do achado laboratorial, principalmente naqueles casos onde os teores são semelhantes a valores encontrados *in vivo*, e as evidências de necrópsia não são elucidativas. As estatísticas descritivas, expressas à Tabela VIII, revelam que o menor valor preditivo encontrado nos dois grupos, 614 ng/mL, é mais sugestivo de *overdose* que a correspondente concentração de COC, 94 ng/mL.

A análise da Tabela XV mostra que existe correlação positiva estatisticamente significativa entre as concentrações de COC com as respectivas concentrações de CE ($r=0,858$, $p<0,01$). Segundo BAILEY (1993), essa correlação era de se esperar, pois as concentrações de CE são etanol-cocaína dependentes e o etanol está sempre presente em concentração molar excessiva, ficando portanto a COC como o agente limitante da reação.

Da mesma forma, houve correlação positiva e estatisticamente significativa entre os teores de COC e os teores de BE ($r=0,734$, $p<0,01$) e

EME ($r=0,575$, $p<0,01$). Estas correlações significativas das concentrações do precursor e cada um de seus produtos de biotransformação ou transesterificação estudados, mostram no caso em questão que a saturação das vias metabólicas demora a ocorrer mesmo em situações de intoxicação aguda.

A Tabela XV também elucida que não há correlação entre os teores de etanol encontrados e as variáveis, inclusive o CE, cujas concentrações mostram correlação com as do precursor. Este dado não corrobora o conhecimento teórico de que, na presença de altas concentrações de etanol, a formação de CE aumenta de 3,5 vezes em relação à BE²⁴.

O efeito do fator *Grupo* sobre as variáveis individualmente foi estudado através de “Análise de Variância (ANOVA)”. O resultado deste estudo (Tabela XVI) mostra que as médias das variáveis COC, EME e BE não são estatisticamente diferentes, à exceção da relação BE/COC que, conforme Tabela XVI, é significativamente maior ($p=0,0008$) nos casos onde não houve interação com etanol. Esse fato pode ser explicado por haver competição pela via de biotransformação que, como já foi citado anteriormente, é a via das carboxilesterases hepáticas que biotransforma a COC à BE e que é também responsável pela transesterificação do CE^{19,56,59}. O nível descritivo (p) obtido para a Análise de Variância de (COC+EME) foi de 0,104 e, portanto, não evidenciou diferença entre os grupos.

Uma outra abordagem estatística efetuada foi a “Análise de Variância Multivariada (MANOVA)”. Esta técnica permite que se considere todas as variáveis simultaneamente na comparação dos dois grupos. A hipótese nula neste caso seria a suposição de que o comportamento em termos das médias do grupo G1, onde houve interação com etanol, é o mesmo que de G2, onde não ocorreu interação, no que tange à observação das três variáveis. Observando-se os dados sob este prisma testa-se se o vetor das médias do G1 é diferente de G2. O teste λ de Wilks forneceu o nível descritivo de 0,0163 ($p=0,0163$), menor, portanto, do que 0,05 (nível de significância estabelecido) o

que conseqüentemente mostra que há diferença entre os grupos, quando observados desta maneira.

A constatação de que a análise de variância univariada (ANOVA) não apontou diferenças significativas, enquanto a multivariada (MANOVA) o fez, permite afirmar que a análise em separado de cada um dos analitos - COC, BE e EME -, não é suficiente para discriminar os dois grupos. Para que a diferença seja evidenciada, é necessário que sejam observados todos os analitos concomitantemente.

Este achado tem sentido à luz dos conhecimentos da cinética do fármaco que, devido à longa e extensa biotransformação, determinada também por características individuais, determina as diferentes velocidades para cada via que, se analisada individualmente não é discriminante para atestar diferenças. No entanto, a somatória dos fatores envolvidos e anteriormente descritos, quando compõem um todo, evidencia as diferenças de disposição cinética provocada pela interação da COC com o etanol.

7 - CONCLUSÕES

De acordo com os resultados experimentais obtidos no presente trabalho, podemos concluir que:

- o método analítico validado é satisfatório para a determinação das concentrações de cocaína, benzoilecgonina, éster metilecgonina e cocaetileno nas concentrações relacionadas ao óbito, com ou sem interação com o etanol;
- há correlação positiva entre as concentrações de COC e as de CE;
- não há correlação entre as concentrações de CE e as de etanol;
- a relação entre as concentrações BE/COC é significativamente maior na intoxicação por COC como fármaco único do que na interação COC/etanol;
- COC, BE e EME analisados em separado, não são suficientes para discriminar os dois grupos. Para que as diferenças de disposição cinética provocadas pela interação com o etanol sejam evidenciadas, é necessário que sejam observadas as três variáveis concomitantemente;
- a predição dos teores de cocaína, por ocasião do óbito através da soma das concentrações molares de COC e EME encontradas pode ser uma indicação de ter ocorrido *overdose*.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (*)

- 1 ABUSADA, G.M., ABUKHAI AF, I.K., ALFORD, D.D., VINZON-BAUTISTA, I., PRAMANIK, A.K., ANSARI, N.A., MANNO, J.E., MANNO, B.R. Solid-phase extraction and GC/MS quantitation of cocaine, ecgonine methyl ester, benzoylecgonine, and cocaethylene from meconium, whole blood, and plasma. *J. Anal. Toxicol., Niles*, v.17, p.353-8, 1993.
- 2 ADERJAN, R.E., SCHMITT, G., WU, M., MEYER, C. Determination of cocaine and benzoylecgonine by derivatization with iodomethane-d3 or PFPA/HFIP in human blood and urine using GC/MS (EI or PCI mode). *J. Anal. Toxicol., Niles*, v.17, p.51-5, 1993.
- 3 AMBRE, J.J., CONNELLY, T.J., RUO, T.A kinetic model of benzoylecgonine disposition after cocaine administration in humans. *J. Anal. Toxicol., Niles*, v.15, p.17-20, 1991.
- 4 APPLE, F.S., ROE, S.J. Cocaine-associated fetal death in utero. *J. Anal. Toxicol., Niles*, v. 14, p.259-60, 1990.
- 5 ARMBRUSTER, D.A., TILLMAN, M.D., HUBBS, L.M. Limit of detection (LOD)/limit of quantitation (LOQ): comparison of the empirical and the statistical methods exemplified with GC-MS assays of abused drugs. *Clin. Chem., Winston Salem*, v.40, p.1233-8, 1994.
- 6 BAILEY, D.N. Cocaine and cocaethylene binding in human serum. *Am. J. Clin. Pathol., New York*, v.104, p.180-6, 1995a.
- 7 BAILEY, D.N. Cocapropylene (propylcocaine) formation by human liver in vitro. *J. Anal. Toxicol., Niles*, v.19, p.1-4, 1995b.

(*)* De acordo com a norma NBR6023/89 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI), 1995.

- 8 BAILEY, D.N. Plasma cocaethylene concentrations in patients treated in the emergency room or trauma unit. **Am. J. Clin. Pathol.**, New York, v.99, p.123-7, 1993.
- 9 BAILEY, D.N. Studies of cocaethylene (ethylcocaine) formation by human tissues in vitro. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.18, p.13-5, 1994.
- 10 BARBIERI, E.J., DiGREGORIO, J., FERKO, A.P., RUCH, E.K. Rat cocaethylene and benzoylecgonine concentrations in plasma and parotid saliva after the administration of cocaethylene. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v. 18, p.60-1, 1994.
- 11 BENEWITZ, N.L. Clinical pharmacology and toxicology of cocaine. **Pharmacol. Toxicol.**, Amsterdam, v.72, p.3-12, 1993.
- 12 BENUCK, M., REITH, M.E.A., SERSHEN, H., WIENER, H. Oxidative metabolism of cocaine: comparison of brain and liver. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, New York, v.190, p.7-13, 1989.
- 13 BERMEJO, A.M., STRANO ROSSI, S. Hair and urine analysis: relative distribution of drugs and their metabolites. **Forensic Sci. Int.**, Lausanne, v.70, p.203-10, 1995.
- 14 BILLMAN, G.E. Mechanisms responsible for the cardiotoxic effects of cocaine. **FASEB J.**, Bethesda, v.4, p.2469-75, 1990.
- 15 BODOR, G., ROGGEMAN, R., TURK, J. Variations in abundance of the molecular ion of the derivatized cocaine metabolite benzoylecgonine. **Clin. Chem.**, Winston Salem, v.36, p.742-7, 1990.
- 16 BOELSTERLI, U.A., ATANASOSKI, S., GOLDLIN, C. Ethanol-induced enhancement of cocaine bioactivation and irreversible protein binding: evidence against a role of cytochrome P-450IIE1. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, Baltimore, v.15, p.779-84, 1991.

- 17 BOELSTERLI, U.A., GOLDLIN, C. Biomechanisms of cocaine-induced hepatocyte injury mediated by the formation of reactive metabolites. **Arch. Toxicol.**, Berlin, v.65, p.351-60, 1991.
- 18 BOELSTERLI, U.A., WOLF, A., GOLDLIN, C. Oxygen free radical production mediated by cocaine and its ethanol-derived metabolite, cocaethylene, in rat hepatocytes. **Hepatology**, Baltimore, v.18, p.1154-61, 1993.
- 19 BOYER, C.S., PETERSEN, D.R. Enzymatic basis for the transesterification of cocaine in the presence of ethanol: evidence for the participation of microsomal carboxylesterases. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Baltimore, v.260, p.939-946, 1992.
- 20 BRADBERRY, C.W., NOBILETTI, J.B., ELSWORTH, J.D., MURPHY, B., JATLOW, P., ROTH, R.H. Cocaine and cocaethylene: microdialysis comparison of brain drug levels and effects on dopamine and serotonin. **J. Neurochem.**, New York, v.60, p.1429-35, 1993.
- 21 BROGAN, W.C., KEMP, P.M., BOST, R.O., GLAMANN, D.B., LANGE, R.A., HILLS, L.D. Collection and handling of clinical blood samples to assure the accurate measurement of cocaine concentration. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.16, p.152-4, 1992.
- 22 BROWNE, S., MOORE, C., NEGRUSZ, A., TEBBETT, I., COVERT, R., DUSICK, A. Detection of cocaine, norcocaine, and cocaethylene in the meconium of premature neonates. **J. Forensic Sci.**, Philadelphia, v.39, p.1515-9, 1994.
- 23 BROWNE, S.P., MOORE, C.M., SCHEURER, J., TEBBETT, I.R., LOGAN, B.K. A rapid method for the determination of cocaine in brain tissue. **J. Forensic Sci.**, Philadelphia, v.36, p.1662-5, 1991.
- 24 BRZEZINSKI, M.R., ABRAHAM, T.L., STONE, C.L., DEAN, R.A., BOSRON, W.F. Purification and characterization of a human liver cocaine carboxylesterase that catalyzes the production of benzoylecgonine and the formation of cocaethylene from alcohol and cocaine. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v.48, p.1747-55, 1994.

- 25 BUNN, W.H., GIANNINI, A.J. Cardiovascular complications of cocaine abuse. *Am. Fam. Physician*, Kansas City, v.46, p.769-73, 1992.
- 26 BURKE, W.M., NARSIPUR, V.R., DHOPESEH, V., VANDEGRIFT, B., MAANY, I. Prolonged presence of metabolite in urine after compulsive cocaine use. *J. Clin. Psychiatry*, Memphis, v.51, p.145-8, 1990.
- 27 BUSSAB, W.O., MORETTIN, P.A. *Estatística básica*. 4.ed. São Paulo: Atual, 1990.
- 28 CALHOUN, B.C., WATSON, P.T., FACOG, M. The cost of maternal cocaine buse. I.Perinatal cost. *Obstet. Gynecol.*, New York, v.78, p.731-5, 1991.
- 29 CHASIN, A.A.M. *Diagnóstico laboratorial da intoxicação aguda por cocaína: aspecto forense*. São Paulo, 1990. 109p. [Dissertação de Mestrado-Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP]
- 30 CHASIN, A.A.M., CHASIN, M., SALVADORI, M. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo*, São Paulo, v.30, n.2, p.49-53, 1994.
- 31 CHASIN, A.A.M., MÍDIO, A.F. Aspecto toxicológico da overdose de cocaína. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo*, São Paulo, v.27, n.1, p.1-27, 1994.
- 32 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, v.38, p.318-24, 1985.
- 33 CLARK, G.D., ROSENZWEIG, I.B., RAISYS, V.A., CALLAHAN, C.M., GRANT, T.M., STREISSGUTH, A.P. The analysis of cocaine and benzoylecgonine in meconium. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.16, p.261-3, 1992.
- 34 CODY, J.T., FOLTZ, R.L. GC/MS analysis of body fluids for drugs of abuse. In: YINON, J., ed. *Forensic applications of mass spectrometry*. Boca Raton: CRC Press, 1995. p.1-59.

- 35 CONE, E.J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cocaine. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.19, p.459-78, 1995.
- 36 CONE, E.J., DARWIN, W.D. Rapid assay of cocaine, opiates and metabolites by GC/MS. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.580, p.43-61, 1992.
- 37 CONE, E.J., HILLSGROVE, M., DARWIN, W.D. Simultaneous measurement of cocaine, cocaethylene, their metabolites, and "crack" pyrolysis products by GC/MS. **Clin. Chem.**, Winston Salem, v.40, p.1299-1305, 1994.
- 38 CONE, E.J., KATO, K., HILLSGROVE, M. Cocaine excretion in the semen of drug users. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v. 20, p.139-40, 1996.
- 39 CROUCH, D.J., ALBURGES, M.E., SPANBAUER, A.C., ROLLINS, D.E., MOODY, D.E., CHASIN, A.A.M. Analysis of cocaine and its metabolites from biological specimens using solid-phase extraction and positive ion chemical ionization mass spectrometry. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.19, p.352-8, 1995.
- 40 CURCURUTO, O., GUIDUGLI, F., TRALDI, P., STURARO, A., TAGLIARO, F., MARIGO, M. Ion-trap mass spectrometry applications in forensic sciences. 1. Identification of morphine and cocaine in hair extracts of drug addicts. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, London, v.6, p.434-7, 1992.
- 41 DAWLING, S., ESSEX, E.G., WARD, N., WIDDOP, B. Gas chromatographic measurement of cocaine in serum, plasma and whole blood. **Ann. Clin. Biochem.**, London, v.27, p.478-481, 1990.
- 42 DEAN, R.A., CHRISTIAN, C.D., SAMPLE, R.H.B., BOSRON, W.F. Human liver cocaine esterases: ethanol-mediated formation of ethylcocaine. **FASEB J**, Bethesda, v.5, p.2735-9, 1991.

- 43 DEAN, R.A., HARPER, E.T., DUMAUAL, N., DTOECKEL, D.A., BOSRON, W.F. Effects of ethanol on cocaine metabolism: formation of cocaethylene and norcocaethylene. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, New York, v.117, p.1-8, 1992.
- 44 DEAN, R.A., ZHANG, J., BRZEZINSKI, M.R., BOSRON, W. Tissue distribution of cocaine methyl esterase and ethyl transferase activities: correlation with carboxylesterase protein. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Baltimore, v.275, p.966-71, 1995.
- 45 DICKSON, P.H., LIND, A., STUDTS, P., NIPPER, H.C., MAKOID, M., THERKILDSEN, D. The routine analysis of breast milk for drugs of abuse in a clinical toxicology laboratory. **J. Forensic Sci.**, Philadelphia, v.39, p.207-14, 1994.
- 46 DIXON, W.J., MASSEY Jr., F.J. **Introduction to statistical analysis**. New York: McGraw-Hill, 1969.
- 47 ELSOHLY, M.A., BRENNEISEN, R., JONES, A.B. Coca paste: chemical analysis and smoking experiments. **J. Forensic Sci.**, Philadelphia, v.36, p.93-103, 1991.
- 48 EMMET-OGLESBY, M.W., PELTIER, R.L., DEPOOTERE, R.Y., PICKERING, C.L., HOOPER, M.L., GONG, Y.H., LANE, J.D. Tolerance to self-administration of cocaine in rats: time course and dose-response determination using a multi-dose method. **Drug Alcohol Depend.**, Lausanne, v.32, p.247-56, 1993.
- 49 ESCOBEDO, L.G., RUTTENBER, A.J., AGOCS, M.M., ANDA, R.F., WETLI, C.V. Emerging patterns of cocaine use and the epidemic of cocaine overdose deaths in Dade-County, Florida. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, Chicago, v.115, p.900-5, 1991.
- 50 FARRE, M., DELATORRE, R., LLORENTE, M., LAMAS, X., UGENA, B., SEGURA, J., CAMI, J. Alcohol and cocaine interactions in humans. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Baltimore, v.266, p.1364-73, 1993.
-

- 51 FLEMING, J.A., BYCK, R., BARASH, P.G. Pharmacology and therapeutic applications of cocaine. **Anesthesiology**, Philadelphia, v.73, p.518-31, 1990.
- 52 FOLTIN, R.W., FISCHMAN, M.W. Ethanol and cocaine interactions in humans: cardiovascular consequences. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, Phoenix, v.31, p.877-83, 1988.
- 53 FOLTIN, R.W., FISCHMAN, M.W. Smoked and intravenous cocaine in humans: acute tolerance, cardiovascular and subjective effects. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Baltimore, v.257, p.247-61, 1991.
- 54 FOLTZ, R.L., FENTYMAN, A.F., FOLTZ, R.B. **GC/MS assays for abused drugs in body fluids**. Washington: US Department of Health and Human Services; Rockville: National Institute on Drug Abuse, 1980. 202p. [NIDA Research Monograph, n.32]
- 55 GARCIA FERNANDÉZ, J.C., PATINO, C.M., FANEGO, H.V., GARCÍA, M.R., MARZANO, B.M., GUINLE, A.E. Consideraciones acerca del empleo del humor vitreo para la determinación *post mortem* de alcohol etílico y drogas de uso ilícito. **Med. Forense Argent.**, Buenos Aires, v.14, n.33, p.2-7, 1994.
- 56 GATLEY, S.J. Activities of the enantiomers of cocaine and some related compounds as substrates and inhibitors of plasma butyrylcholinesterase. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v.41, p.1249-54, 1991.
- 57 GRANT, B.F., HARFORD, T.C. Concurrent and simultaneous use of alcohol with cocaine: results of national survey. **Drug Alcohol Depend.**, Lausanne, v.25, p.97-104, 1990.
- 58 HARKEY, M.R., HENDERSON, G.L., ZHOU, C. Simultaneous quantitation of cocaine and its major metabolites in human hair by gas chromatography/chemical ionization mass spectrometry. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.15, p.260-5, 1991.
-

- 59 HEARN, W.L., FLYNN, D.D., HIME, G.W., ROSE, S., COFINO, J.C., MANTERO-ATIENZA, E., WETLI, C.V., MASH, D.C. Cocaethylene: a unique cocaine metabolite displays high affinity for the dopamine transporter. **J. Neurochem.**, New York, v.56, p.698-701, 1991.
- 60 HEARN, W.L., KERAN, E.E., WEI, H., HIME, G. Site-dependent postmortem changes in blood cocaine concentrations. **J. Forensic Sci.**, Philadelphia, v.36, p.673-84, 1991a.
- 61 HEARN, W.L., ROSE, S., WAGNER, J., CIARLEGLIO, A., MASH, D.C. Cocaethylene is more potent than cocaine in mediating lethality. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, Phoenix, v.39, p.531-3, 1991b.
- 62 HEIER, L.A., CARPANZANO, C.R., MAST, J., BRILL, P.W., WINCHESTER P., DECK, M.D.F. Maternal cocaine abuse: the spectrum of radiologic abnormalities in the neonatal CNS. **Am. J. Roentgenol.**, New York, v.157, p.1105-10, 1991.
- 63 HEITH, A.M., MORSE, C.R., TSUJITA, T., VOLPACELLI, S.A., FLOOD, J.G., LAPOSATA, M. Fatty acid ethyl ester synthase catalyzes the esterification of ethanol to cocaine. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v.208, p.549-54, 1995.
- 64 HENDERSON, G.L., HARKEY, M.R., ZHOU, C., JONES, R.T., JACOB, P. Incorporation of isotopically labeled cocaine and metabolites into human hair. 1.Dose-response relationships. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.20, p.1-12, 1996.
- 65 HENNING, R.J., WILSON, L.D., GLAUSER, J.M. Cocaine plus ethanol is more cardiotoxic than cocaine or ethanol alone. **Crit. Care Med.**, Baltimore, v.22, p.1896-906, 1994.
- 66 HIME, G.W., HEARN, W.L., ROSE, S., COFINO, J. Analysis of cocaine and cocaethylene in blood and tissues by GC-NPD and GC-Ion trap mass spectrometry. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.15, p.241-5, 1991.

- 67 HOFFMAN, R.S., HENRY, G.C., WAX, P.M., WEISMAN, R.S., HOWLAND, M.A., GOLDFRANK, L.R. Decreased plasma cholinesterase activity enhances cocaine toxicity in mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Baltimore, v.263, p.698-702, 1992.
- 68 HUSTON, C.K. Manipulation of ion trap parameters to maximize compound-specific information in gas chromatographic mass spectrometric analyses. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.606, p.203-9, 1992.
- 69 INABA, T. Cocaine: pharmacokinetics and biotransformation in man. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, Ottawa, v.67, p.1154-7, 1989.
- 70 ISENSCHMID, D.S., FISCHMAN, M.W., FOLTIN, R.W., CAPLAN, Y.H. Concentration of cocaine and metabolites in plasma of humans following intravenous administration and smoking cocaine. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.16, p.311-4, 1992a.
- 71 ISENSCHMID, D.S., LEVINE, B.S., CAPLAN, Y.H. A comprehensive study of the stability of cocaine and its metabolites. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.13, p.250-6, 1989.
- 72 ISENSCHMID, D.S., LEVINE, B.S., CAPLAN, Y.H. The role of ecgonine methyl ester in the interpretation of cocaine concentrations in *postmortem* blood. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.16, p.319-24, 1992b.
- 73 IYER, R.N., NOBILETTI, J.B., JATLOW, P.I., BRADBERRY, C.W. Cocaine and cocaethylene: effects on extracellular dopamine in the primate. **Psychopharmacology**, Berlin, v.120, p.150-5, 1995.
- 74 JACOB III, P., LEWIS, E.R., ELIAS-BAKER, B.A., JONES, R.T. A pyrolysis product, anhydroecgonine methyl ester (methylecgonidine), is in the urine of cocaine smokers. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.14, p.353-7, 1990.
- 75 JATLOW, P. Cocaethylene: pharmacologic activity and clinical significance. **Ther. Drug Monit.**, New York, v.15, p.533-6, 1993.
-

- 76 JATLOW, P., BARASH, P.G., VANDYKE, C., RADDING, J., BYCK, R. Cocaine and succinylcholine sensitivity: a new caution. *Anesth. Analg.*, New York, v.58, p.235-8, 1979.
- 77 JATLOW, P., ELSWORTH, J.D., BRADBERRY, C.W., WINGER, G., TAYLOR, J.R., RUSSELL, R., ROTH, R.H. Cocaethylene: a neuropharmacologically active metabolite associated with concurrent cocaine-ethanol ingestion. *Life Sci.*, Elmsford, v.48, p.1787-94, 1991.
- 78 JEFFCOAT, A.R., PEREZ-REYES, M., HILL, J.M., SADLER, B.M., COOK, C.E. Cocaine disposition in humans after intravenous injection, nasal insufflation (snorting), or smoking. *Drug Metab. Dispos.*, Baltimore, v.17, p.153-9, 1989.
- 79 JERI, F.R. Coca-paste smoking in some Latin American countries: a severe and unabated form of addiction. *Bull. Narc.*, New York, v. 26, n.2, p.15-31, 1984.
- 80 JOHNSON, R.A., WICHERN, D.W., eds. **Applied multivariate statistical analysis**. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1988. 607p.
- 81 KARCH, S.B. Cocaine and the heart: clinical and pathological correlations. *Adv. Biosci.*, Oxford, v.80, p.211-8, 1991.
- 82 KATZ, J.L., GRIFFITHS, J.W., SHARPE, L.G., DE SOUZA, E.B., WITKIN, J.M. Cocaine tolerance and cross-tolerance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Baltimore, v.264, p.183-92, 1993.
- 83 KATZ, J.L., TERRY, P., WITKIN, J.M. Comparative behavioral pharmacology and toxicology of cocaine and its ethanol-derived metabolite, cocaine ethyl-ester (cocaethylene). *Life Sci.*, Elmsford, v.50, p.1351-61, 1992.
- 84 KLAASSEN, C.D. **Casarett, Doull's toxicology: the basic science of poisons**. New York: McGraw-Hill, 1996. p. 91,118,951.

- 85 KLOSS, M.W., ROSEN, G.M., RAUCKMAN, E.J. N-demethylation of cocaine to norcocaine. Evidence for participation by cytochrome P-450 and FAD-containing monooxygenase. **Mol. Pharmacol.**, New York, v.23, p.482-5, 1983.
- 86 KONKOL, R.J., MURPHEY, L.J., FERRIERO, D.M., DEMPSEY, D.A., OLSEN, G.D. Cocaine metabolites in the neonate: potential for toxicity. **J. Child Neurol.**, St. Louis, v.9, p.242-8, 1994.
- 87 KOREN, G. Measurement of drugs in neonatal hair, a window to fetal exposure. **Forensic Sci. Int.**, Lausanne, v.70, p.77-82, 1995.
- 88 KUCHAR, M.J., RITZ, M.C., BOJA, W. The dopamine hypothesis of the reinforcing properties of cocaine. **Trends NeuroSci.**, Amsterdam, v.14, p.299-302, 1991.
- 89 LAURENTI, R., JORGE, M.H.P.M. **O atestado de óbito**. São Paulo: Centro Brasileiro de Classificação de Doenças; Faculdade de Saúde Pública/USP, 1983. 77p. [Série Divulgação, n.1].
- 90 LEVINE, S.R., BRUST, J.C.M., FUTRELL, N., BRASS, L.M., BLAKE, D., FAYAD, P., SCHULTZ, L.R., MILLIKAN, C.H., HO, K-L., WELCH, K.M.A. A comparative study of the cerebrovascular complications of cocaine: alkaloidal versus hydrochloride: a review. **Neurology**, Minneapolis, v.41, p.1173-7, 1991
- 91 LEWIS, D.E., MOORE, C.M., LEIKIN, J. B. Cocaethylene in meconium specimens. **J. Toxicol. Clin. Toxicol.**, New York, v.32, p.697-703, 1994.
- 92 LEWIS, D.E., MOORE, C.M., LEIKIN, J.B., KOLLER, A. Meconium analysis for cocaine: a validation study and comparison with paired urine analysis. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.19, p.148-50, 1995.
- 93 LI, L., SMIALEK, J.E. Observations on drug abuse deaths in the state of Maryland. **J. Forensic Sci.**, Philadelphia, v.41, p. 106-9, 1996.

- 94 LIMA, I.V. **Humor vítreo em toxicologia forense: determinação de álcool etílico em cadáveres de morte traumática e em estado de putrefação.** São Paulo, 1996. 96p. [Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP].
- 95 LOGAN, B.K., STAFFORD, D.T. High-performance liquid chromatography with column switching for the determination of cocaine and benzoylecgonine concentrations in vitreous humor. **J. Forensic Sci.**, Philadelphia, v.35, p.1303-9, 1990.
- 96 LÓPEZ-ARTÓGUEZ, M., CAMEÁN, A., REPETTO, M. Unequivocal identification of several common adulterants and diluents in street samples of cocaine by infrared spectroscopy. **J. Forensic Sci.**, Philadelphia, v.40, p.602-10, 1995.
- 97 LUKAS, S., SHOLAR, M., KOURI, E., FUKUZAKO, H., MENDELSON, J. Marijuana smoking increases plasma cocaine levels and subjective reports of euphoria in male volunteers. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, Phoenix, v.48, p.715-21, 1994.
- 98 MADDEN, J.A., POWERS, R.H. Effect of cocaine and cocaine metabolites on cerebral arteries in vitro. **Life Sci.**, Elmsford, v.47, p.1109-14, 1990.
- 99 MANHOFF, D.T., HOOD, I., CAPUTO, F., PERRY, J., ROSEN, S., MIRCHANDANI, H.G. Cocaine in decomposed human remains. **J. Forensic Sci.**, Philadelphia, v.36, p.1732-5, 1991.
- 100 MARLEY, R.J., WITKIN, J.M., GOLDBERG, S.R. Genetic factors influence changes in sensitivity to the convulsant properties of cocaine following chronic treatment. **Brain Res.**, Amsterdam, v.542, p.1-7, 1991.
- 101 MARTIN, B.R., LUE, L.P., BONI, J. Pyrolysis and volatilization of cocaine. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.13, p.158-62 1989.

- 102 MATSUBARA, K., MASEDA, C., FUKUI, Y. Quantitation of cocaine, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester by GC-CI-SIM after Extrelut™ extraction. **Forensic Sci. Int.**, Lausanne, v.26, p.181-92, 1984.
- 103 McCANCE, E.F., PRICE, L.H., KOSTEN, T.R., JATLOW, P.I. Cocaethylene: pharmacology, physiology and behavioral effects in humans. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Baltimore, v.274, p.215-23, 1995.
- 104 McCANCEKATZ, E.F., PRICE, L.H., MCDUGLE, C.J., KOSTEN, T.R., BLACK, J.E., JATLOW, P.I. Concurrent cocaine-ethanol ingestion in humans: pharmacology, physiology, behavior, and the role of cocaethylene. **Psychopharmacology**, Berlin, v.111, p.39-46, 1993.
- 105 MEEHAN, S.M., SCHECHTER, M.D. Premorbid behaviors produced by cocaine, ethanol and cocaethylene in the mouse. **Gen. Pharmacol.**, Oxford, v.26, p.99-106, 1995.
- 106 MILLER, N.S. The pharmacology of cocaine. In: MILLER, N.S., ed. **The pharmacology alcohol and drug of abuse and addiction**. New York: Springer-Verlag, 1991.
- 107 MILLER, S.R., SALO, A.L., BOGGAN, W.O., PATRICK, K.S. Determination of plasma cocaine and ethylcocaine (cocaethylene) in mice using GC/MS and deuterated internal standards. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v.656, p.335-41, 1994.
- 108 MOFFAT, A.C. **Clarke's isolation and identification of drugs**. 2.ed. London: Pharmaceutical Press, 1986. p.489-90.
- 109 MOORE, C.M., BROWN, S., NEGRUSZ, A., TEBBETT, I., MEYER, W., JAIN, L. Determination of cocaine and its major metabolite, benzoylecgonine, in amniotic fluid, umbilical cord blood, umbilical cord tissue, and neonatal urine: a case study. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.17, p.62, 1993.

- 110 MORIYA, F., HASHIMOTO, Y. The effect of postmortem interval on the concentrations of cocaine and cocaethylene in blood and tissues: an experiment using rats. **J. Forensic Sci.**, Philadelphia, v.41, p.129-33, 1996.
- 111 NAKAHARA, Y., ISHIGAMI, A. Inhalation efficiency of free-base cocaine by pyrolysis of 'crack' and cocaine hydrochloride. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.15, p.105-9, 1991.
- 112 NAPPO, S.A., GALDURÓZ, J.C., NOTTO, A.R. Uso do "crack" em São Paulo: fenômeno emergente? **Rev. ABP-APAL**, São Paulo, v.16, n.2, p. 75-83, 1994.
- 113 NETER, J., WASSERMAN, W., NACHTSHIM, C.J., KUTNER, M.H. **Applied linear statistical model**. 4.ed. 1966.
- 114 ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE **Classificação estatística internacional de doenças e problemas relacionados à saúde: CID-10**, São Paulo: EDUSP,1995. v. 1, p.1039, 1043, 1051, 1062.
- 115 PELLINEN, P., HONKAKOSKI, P., STENBACK, F., NIEMITZ, M., ALHAVA, E., PELKONEN, O., LANG, M. A., PASANEN, M. Cocaine N-demethylation and the metabolism-related hepatotoxicity can be prevented by cytochrome P450 3A inhibitors. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v.270, p.35-43, 1994.
- 116 PEREZ-REYES, M. The order of drug administration: its effects on the interaction between cocaine and ethanol. **Life Sci.**, Elmsford, v.55, p.541-50, 1994a.
- 117 PEREZ-REYES, M., JEFFCOAT, A.R. Ethanol/cocaine interaction cocaine and cocaethylene plasma concentrations and their relationship to subjective and cardiovascular effects. **Life Sci.**, Elmsford, v.51, p.553-63, 1992.
- 118 PEREZ-REYES, M., JEFFCOAT, A.R., MYERS, M., SIHLER, K., COOK, C.E. Comparison in humans of the potency and pharmacokinetics of intravenously injected cocaethylene and cocaine. **Psychopharmacology**, Berlin, v.116, p.428-32, 1994b.
-

- 119 PRAKASH, A., DAS, G. Cocaine and the nervous system.
Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol., Munich, v.31, p.575-81, 1993.
- 120 PRASAD, P.D., LEIBACH, F.H., MAHESH, V.B., GANAPATHY, V. Human placenta as a target organ for cocaine action: interaction of cocaine with the placental serotonin transporter. **Placenta**, Eastbourne, v.15, p.267-78, 1994.
- 121 QUATREHOMME, G., BOURRET, F., LIAO, Z., OLLIER, A. An experimental methodology for the study of postmortem changes in toxic concentrations of drugs, using secobarbital as an example.
J. Forensic Sci., Philadelphia, v.39, p.1300-4, 1994.
- 122 REGAN, T.J. Alcohol and the cardiovascular system. **JAMA J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.264, p.377-81, 1990.
- 123 RIPPLE, M.G., GOLDBERGER, B.A., CAPLAN, Y.H., BLITZER, M., SCHWARTZ, S. Detection of cocaine and its metabolites in human amniotic fluid. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.16, p.328-31, 1992.
- 124 ROBERTS, S.M., HARBISON, R.D., JAMES, R.C. Inhibition by ethanol of the metabolism of cocaine to benzoylecgonine and ecgonine methyl ester in mouse and human liver. **Drug Metab. Dispos.**, Baltimore, v.21, p.537-41, 1993.
- 125 ROBINSON, S.E., ENTERS, E.K., JACKSON, G.F., CHINCHILLI, V.M., MAHER, J.R., MCDOWELL, K.P., ALLEN, H.M., GUO, H. Maternal and fetal brain and plasma levels of cocaine and benzoylecgonine after acute or chronic maternal intravenous administration of cocaine. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Baltimore, v.271, p.1234-9. 1994.
- 126 ROE, D.A., LITTLE, B.B., BAWDON, R.E., GILSTRAP, L.C. Metabolism of cocaine by human placentas implications for fetal exposure. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v.163, p.715-8, 1990.

- 127 RUMP, A.F.E., THEISOHN, M., KLAUS, W. The pathophysiology of cocaine cardiotoxicity. *Forensic Sci. Int.*, Lausanne, v.71, p.103-15, 1995.
- 128 RUTTEMBERG, A.J., SWEENEY, P.A., MENDLEI, J.M., WETLI, C.V. Preliminary findings of an epidemiologic study of cocaine-related deaths, Dade County, Florida, 1978-1985. In: SCHOBER, S.E., SCHADE, C.P., eds. *The epidemiology of cocaine use and abuse*. Washington: US Department of Health and Human Services; Rockville: National Institute on Drug Abuse, 1991. p 12-8. [NIDA Research Monograph Series, n.110]
- 129 SATEL S.L., GAWIN, F.H. Migrainelike headache and cocaine use. *JAMA J. Am. Med. Assoc.*, Chicago, v.261, p.2995-6, 1989.
- 130 SCHECHTER, M.D., MEEHAN, S.M. The lethal effects of ethanol and cocaine and their combination in mice: implications for cocaethylene formation. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Phoenix, v.52, 245-8, 1995.
- 131 SCHENKER, S., YANG, Y., JOHNSON, R.F., DOWNING, J.W., SCHENKEN, R.S., HENDERSON, G.I., KING, T.S. The transfer of cocaine and its metabolites across the term human placenta. *Clin. Pharmacol. Ther.*, St. Louis, v.53, p.329-39, 1993.
- 132 SCHEURER, J., MOORE, C.M. Solid-phase extraction of drugs from biological tissues: a review. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.16, p.264-9, 1992.
- 133 SELAVKA, C.M., RIEDERS, F. The determination of cocaine in hair: a review. *Forensic Sci. Int.*, Lausanne, v.70, p.155-64, 1995.
- 134 SIMONE, C., DEREWLANY, L.O., OSKAMP, M., JOHNSON, D., KNIE, B., KOREN, G. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity in the human term placenta: implications for fetal cocaine exposure. *J. Lab. Clin. Med.*, St. Louis, v.123, p.400-6, 1994.

- 135 SMART, R.G. Crack cocaine use: a review of prevalence and adverse effects. **Am. J. Drug Alcohol Abuse**, New York, v.17, p.13-26, 1991.
- 136 SMITH, T.L., CALLAHAN, M., WILLIAMS, D., DWORKIN, S.I. Tachyphylaxis in cardiovascular responses to cocaine in conscious rats. **J. Cardiovas. Pharmacol.**, New York, v.21, p.272-8, 1993.
- 137 SNODGRASS, S.R. Cocaine babies: a result of multiple teratogenic influences. **J. Child Neurol.**, St. Louis, v.9, p.227-33, 1994.
- 138 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, v.25, p.464-8, 1979.
- 139 STEWART, D.J., INABA, T., TANG, B.K., KALOW, W. Hydrolysis of cocaine in human plasma by cholinesterase. **Life Sci.**, Elmsford, v.20, p.1557-64, 1977.
- 140 STURNER, W.Q., SWEENEY, K., CALLERY, R.T., HALEY, N.R. Cocaine babies: the scourge of the '90s. **J. Forensic Sci.**, Philadelphia, v.36, p.34-9, 1991.
- 141 SUKBUNTHERING, J., MARTIN, K.D., PAK, Y., MAYERSOHN, M. Characterization of the properties of cocaine in blood: blood clearance, blood to plasma ratio, and plasma protein binding. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 85, p.567-71, 1996.
- 142 TARDIFF, K., GROSS, E., WU, J., STAJIC, M., MILLMAN, R. Analysis of cocaine-positive fatalities. **J. Forensic Sci.**, Philadelphia, v.34, p.53-63, 1989.
- 143 TARDIFF, K., MARZUK, P.M., LEON, A.C., HIRSCH, C.S., STAJIC, M., PORTERA, L., HARTWELL, N. Cocaine, opiates, and ethanol in homicides in New York City: 1990 and 1991. **J. Forensic Sci.**, Philadelphia, v.40, n.3, p.387-90, 1995.

- 144 THOMPSON, W.C., DASGUPTA, A. Confirmation and quantitation of cocaine, benzoylecgonine, ecgonine methyl ester, and cocaethylene by gas chromatography/mass spectrometry: use of microwave irradiation for rapid preparation of trimethylsilyl and t-butyl dimethylsilyl derivatives. **Am. J. Clin. Pathol.**, New York, v.104, p.187-92, 1995.
- 145 VOLKOW, N.D., FOWLER, J.S., WOLF, A.P., WANG, G.J., LOGAN, J., MACGREGOR, R., DEWEY, S.L., SCHLYER, D., HITZEMANN, R. Distribution and kinetics of carbon-11-cocaine in the human body measured with PET. **J. Nucl. Med.**, New York, v.33, p.521-5, 1992.
- 146 WESSON, R. D., WAHBURN, P. Currents patterns of drug abuse that involve smoking .In: CHIANG, N.C., HAWKS, R.L., eds. **Research findingsd on smoking of abused substances**. Washington: US Department of Health and Human Services; Rockville: National Institute on Drug Abuse, 1990.p 5-11. [NIDA Research Monograph Series, n.99]
- 147 WIGGINS, R.C. Pharmacokinetics of cocaine in pregnancy and effects on fetal maturation. **Clin. Pharmacokinet.**, Auckland, v.22, p.85-93, 1992.
- 148 WILLIAMS, F.M. Clinical significance of esterases in man. **Clin. Pharmacokinet.**, Auckland, v.10, p.392-403, 1985.
- 149 WOODWARD, J.J., MANSBACH, R., IVY, F.C., BALSTER, R.L. Cocaethylene inhibits dopamine uptake and produces cocaine-like actions in drug discrimination studies. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v.197, p.235-6, 1991.
- 150 WU, A.H.B., ONIGBINDE, T.A., JOHNSON, K.G., WIMBISH, G.H. Alcohol-specific cocaine metabolites in serum and urine of hospitalized patients. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.16, p.132-6, 1992a.
- 151 WU, A.H.B., ONIGBINDE, T.A., WONG, S.S., JOHNSON, K.G. Evaluation of full-scanning GC/ion trap MS analysis of NIDA drugs-of-abuse urine testing in urine. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.16, p.202-6, 1992b.

AD 11011118

- 152 XU, Y.Q., CRUMB Jr., W., CLARKSON, C.W. Cocaethylene, a metabolite of cocaine and ethanol, is a potent blocker of cardiac sodium channels. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Baltimore, v.271, p.319-25, 1994.
- 153 ZHANG, J.Y., FOLTZ, R.L. Cocaine metabolism in man: identification of four previously unreported cocaine metabolites in human urine. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.14, p.201-5, 1990.
-