

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

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

Avaliação do uso do suor como matriz biológica para
verificar a exposição à cocaína associada ou não à
ingestão de bebida alcoólica

Maria José Damas Follador

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Ovandir Alves Silva

São Paulo

2004

DEDALUS - Acervo - CQ



30100010333

Ficha Catalográfica

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

F667a Follador, Maria José Damas
Avaliação do uso do suor como matriz biológica para verificar a exposição à cocaína associada ou não a ingestão de bebida alcoólica / Maria José Damas Follador. -- São Paulo Paulo, 2004.
93p

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Silva, Ovandir Alves

I. Cocaína : Toxicologia 2. Toxicologia social 3. Droga de abuso : Medicina J. T. II. Silva, Ovandir Alves, orientador.

615.9523214 CDD

Maria José Damas Follador

Avaliação do uso do suor como matriz biológica para verificar a
exposição à cocaína associada ou não à ingestão de bebida
alcoólica

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Ovandir Alves Silva
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, 17 de setembro de 2004.

**A Deus, pela força, orientação, proteção,
saúde e oportunidades que me deu.**

Aos meus pais
José Damas e Maria de Lourdes (*in memorium*),
pela vida, ensinamentos, coragem
e formação que me deram.

Ao meu marido **Wilson** e meu filho **Daniel**,
grandes paixões da minha vida,
grandes companheiros,
pelo estímulo constante,
compreensão, paciência e
participação ativa neste trabalho.

Ao Prof Ovandir,
pela gentileza, paciência, compreensão
e principalmente pela oportunidade de
poder aprender com a sua experiência
e a sua sabedoria.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Maurício Yonamine, pela amizade, paciência, disposição permanente e essencial orientação nos aspectos analíticos deste trabalho.

À Dra. Regina Lúcia, pelo apoio e incentivo à realização deste trabalho, além dos preciosos comentários e orientações no exame de qualificação.

À Dra. Ana Cecília, pelas sugestões no exame de qualificação que muito contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

Ao Jefferson, Lúcia, Fátima, Silze, Eleny, diretores e equipes de enfermagem das Clínicas Vila São José e Vila Serena, pelo apoio para a coleta de amostras, imprescindível para a realização deste trabalho.

Ao Comitê de Ética e Pesquisa desta Faculdade, pela aprovação deste estudo.

Aos funcionários do LAT-USP, especialmente à Carmem, Alessandro e Ângelo pelo apoio à realização deste trabalho.

A todos os colegas do curso de pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas pela convivência e troca de conhecimentos, especialmente à Paula, Cláudia Esteban, Nádia, Edna, Denise, Jadson e Bismark.

À Chefia do Centro Médico da Polícia Militar do Estado de São Paulo, pelo apoio e reconhecimento do meu trabalho.

Ao meu chefe, Dr. Alfredo Mendrone Jr., pelo apoio, compreensão e amizade.

Ao meu amigo Maurício A. R. B. Miranda, pela confiança, amizade e por ter me despertado a estudar Toxicologia.

A todos os colegas e auxiliares do HPM que colaboraram com a realização deste trabalho, em especial ao Cap Ferreira, Ten Maranhão, Ten Ribeiro, Sgt Mendonça, Sgt Moacir, Sgt Pedro, Sgt Eliane, Sgt Lima, Cb Mariano, Cb Sá, Cb Macedo, Cb Rebouças, Sd Ernesto, Sd Jarbas e funcionários civis Luiz Ricciulli e Joana D'Arc.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DA COCAÍNA	08
2.1 Origem e características	08
2.2 Toxicocinética	09
2.3 Efeitos tóxicos	14
2.4 Tolerância e Síndrome de Abstinência	15
3. SUOR COMO MATRIZ BIOLÓGICA PARA ANÁLISE TOXICOLÓGICA	17
3.1 Características físico-químicas do suor	17
3.2 Mecanismos de incorporação de fármacos no suor	20
3.3 Análise toxicológica do suor	22
3.3.1 Coleta de amostra	22
3.3.2 Extração dos analitos	24
3.3.3 Reações de derivação química	25
3.3.4 Identificação da cocaína e cocaetileno	25
4. OBJETIVOS E PLANO DE TRABALHO	27
5. MATERIAL E MÉTODOS	29
5.1 Material	29
5.1.1 Soluções-padrão	29
5.1.2 Reagentes e outros materiais	29
5.1.3 Equipamentos e acessórios	31
5.1.4 Amostras de suor	31

5.1.4.1 Amostras de referência negativa	31
5.1.4.2 Amostras de referência positiva	32
5.1.4.3 Amostras de pacientes	32
5.1.5 Amostras de urina	32
5.2 Métodos	33
5.2.1 Padronização do método para detecção de cocaína e cocaetileno em amostras de suor	33
5.2.1.1 Coleta de suor	33
5.2.1.2 Extração e identificação da cocaína e cocaetileno nas amostras de suor.	33
5.2.2 Validação do método para detecção de cocaína e cocaetileno em amostras de suor	38
5.2.2.1 Recuperação	38
5.2.2.2 Precisão intra e interensaio	39
5.2.2.3 Limite de detecção (LD)	39
5.2.2.4 Estabilidade	40
5.2.3. Aplicação do método para detecção de cocaína e cocaetileno em amostras de suor de pacientes.	40
5.2.3.1. Aplicação do questionário	40
5.2.3.2. Coleta de suor	41
5.2.3.3. Análise das amostras de suor	41
5.2.4. Aplicação do método de enzimaensaio (EMIT) em amostras de urina de pacientes.	42
6. RESULTADOS	43
6.1. Padronização do método	43
6.1.1 Coleta de suor	43

6.1.2 Extração e identificação da cocaína e cocaetileno nas amostras de suor	43
6.2. Validação do método	46
6.2.1 Recuperação	46
6.2.2. Precisão	46
6.2.3. Limite de detecção	47
6.2.4. Estabilidade	47
6.3 Amostras de pacientes	48
6.3.1. Amostras de suor	48
6.3.2. Amostras de urina	49
7. DISCUSSÃO	56
8. CONCLUSÕES	70
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

ANEXOS

Anexo 1: Carta de aceite do Comitê de Ética	83
Anexo 2: Procedimento de aplicação do adesivo	84
Anexo 3: Procedimento de retirada do adesivo	87
Anexo 4: Esclarecimento do pesquisador	88
Anexo 5: Consentimento livre e esclarecido	90
Anexo 6: Questionário	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Biotransformação da cocaína	11
Figura 2: Diagrama da anatomia da pele e do tecido subcutâneo	19
Figura 3: Dispositivo comercial para SPME	35
Figura 4: Seqüência da metodologia de forma esquemática	37
Figura 5: Adesivo coletor aplicado no braço.	44
Figura 6: Perfil cromatográfico obtido com a análise de uma amostra de referência negativa	45
Figura 7: Perfil cromatográfico obtido com a análise de uma amostra de referência positiva	45
Figura 8: Perfil cromatográfico obtido com a análise da primeira amostra de suor do paciente n ^o 8.	49

TABELAS

Tabela 1: Resultados obtidos com a validação do método	50
Tabela 2: Relatos dos pacientes e resultados obtidos com as análises das amostras de suor e urina.....	51
Tabela 3: Resultados obtidos com as análises das amostras de suor e urina de pacientes que não admitiram o uso de cocaína.....	54
Tabela 4: Períodos de detecção.....	54
Tabela 5: Concordância entre relatos dos pacientes e resultados obtidos com pesquisa de cocaína no suor.....	55
Tabela 6: Concordância entre relatos dos pacientes e resultados obtidos com pesquisa de cocaetileno no suor.	55

RESUMO

Foi desenvolvido um método para detecção de cocaína e cocaetileno (produto da associação de cocaína e etanol) no suor. Amostras de suor foram coletadas por meio de adesivos PharmChek®. O método se baseou na eluição da cocaína e cocaetileno incorporados no adesivo com tampão acetato, extração dos analitos por microextração em fase sólida (SPME) e identificação por espectrometria de massa associada à cromatografia em fase gasosa (GC/MS). O método foi validado e aplicado em pacientes internados para tratamento da dependência à cocaína. Foram coletadas amostras de urina dos mesmos pacientes para pesquisar benzoilecgonina por enzimaensaio. Cocaína e cocaetileno foram detectados nas amostras de suor até dez dias e oito dias, respectivamente, após a última exposição. Benzoilecgonina foi detectada nas amostras de urina até 4 dias. A concordância entre o relato dos pacientes e os resultados das análises do suor foi de 94% para a cocaína e cocaetileno.

ABSTRACT

A method was developed to detect cocaine and cocaethylene (product of the association between cocaine and ethanol) in sweat. Sweat samples were collected by means of a sweat patch device supplied by PharmChek™. The method was based on the elution of de cocaine and cocaethylene incorporated in the patch with acetate buffer, extraction of the analytes by solid-phase microextraction (SPME) and identification by mass spectrometry associated with gas chromatography (GC-MS). The method was validated and applied in inpatients in treatment to dependence to cocaine. Urine samples were collected from the same inpatients to search benzoyilecgonine by enzyme immunoassay. Cocaine and cocaethylene were detected in sweat samples untill ten days and eight days, respectively, after the last exposure. Benzoyilecgonine was detected in urine samples untill four days. The agreement between the inpatients reports and the sweat analysis results was about 94% for cocaine and cocaethylene.

1. INTRODUÇÃO

As políticas de combate ao narcotráfico no mundo ainda não obtiveram o sucesso desejado, pois o que se observa é que as drogas ilícitas estão cada vez mais disponíveis e o número de usuários tem aumentado significativamente. Surgem novas drogas de abuso de origem sintética, com produção menos ostensiva do que as de origem natural e formas de distribuição mais sofisticadas.

O consumo de drogas ilícitas atinge 4,2% da população mundial e as complicações médicas e sociais causadas pelo consumo destas substâncias, são hoje bem conhecidas e consideradas um problema de saúde e segurança pública (LARANJEIRA *et al.*, 2003).

Existem diferenças regionais no padrão de abuso de drogas de país para país e mesmo dentro de um mesmo país, mas o impacto do abuso de drogas tem sido universalmente negativo na saúde, na segurança dos indivíduos e na estrutura social de todas as nações (CONE, 2001).

O Brasil não é produtor de cocaína, mas os grandes produtores são seus vizinhos: Bolívia, Colômbia e Peru. Por outro lado, estes países não têm a rede de indústrias químicas que o Brasil possui, propiciando a este último o tráfico de produtos químicos utilizados na extração da cocaína. A rentabilidade do comércio de cocaína é muito superior ao de outras atividades econômicas (UNODC, 2003).

Segundo a Organização das Nações Unidas contra Drogas e Crimes (UNODC), o Brasil deixou de ser considerado apenas o maior corredor de tráfico de drogas do mundo, para ser reconhecido também como um país de consumo médio, onde o mercado interno está ativo e em expansão.

No relatório do UNODC divulgado em dezembro de 2003, foram apresentados alguns dados extremamente preocupantes. O abuso e o

tráfico de drogas seriam responsáveis por grande parte dos trinta mil homicídios praticados por ano no Brasil, e para cada assassinato, outras vinte a quarenta pessoas seriam feridas e hospitalizadas. O narcotráfico também empregaria mais de vinte mil entregadores, os chamados "aviõezinhos", sendo na maioria jovens de dez a dezesseis anos, protegidos pelo Estatuto da Criança e do Adolescente do Brasil, que receberiam salários de trezentos a quinhentos dólares, muito mais do que provavelmente obteriam num emprego formal.

Vários estudos com a finalidade de verificar o uso de drogas no Brasil foram realizados pelo CEBRID (Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas) em caráter nacional, entre 1987 e 2001. Observou-se uma tendência de aumento estatisticamente significativa do uso freqüente de drogas (seis ou mais vezes nos últimos trinta dias). Para as cinco substâncias psicoativas mais utilizadas (maconha, ansiolíticos, solventes, anfetamínicos e cocaína), houve aumento significativo do uso de quatro. Apenas o uso de solventes não aumentou no período estudado.

A cocaína se expandiu em nosso cotidiano nos últimos vinte anos e hoje atinge todos os estratos sociais. No levantamento domiciliar realizado para estudar o uso de drogas psicotrópicas no Brasil nas 107 maiores cidades do país, o uso de cocaína na vida atinge 2,3% da população, o uso no último ano atinge 0,4% e o uso no último mês atinge 0,2% da população (CARLINI et al., 2001). Entre as maiores cidades do Estado de São Paulo, o uso de cocaína na vida atinge 2,1% da população, sendo a terceira substância ilícita mais utilizada, atrás dos solventes (2,7%) e da maconha (6,6%) (CEBRID, 1999).

No levantamento realizado pelo CEBRID no período de 1988 a 1999, foram analisadas 726.429 internações em hospitais e clínicas psiquiátricas do Brasil, das quais a cocaína e seus derivados foram responsáveis por 0,8% delas em 1988 e 4,6% em 1999, revelando um significativo aumento (CEBRID, 2001).

As altas taxas de mortalidade entre usuários de drogas de abuso estão relacionadas a numerosos fatores tais como complicações devido ao uso da droga (exemplo: *AIDS*), *overdose*, suicídio, acidentes e homicídios. No Brasil, são poucos os dados sobre a mortalidade da cocaína. Num estudo de 294 usuários de cocaína, freqüentando serviços de atendimento em São Paulo, 43% relataram que já tiveram uma *overdose* por cocaína. A última *overdose* ocorreu em 58% dos usuários pela via pulmonar (*crack*), em 23% pela via endovenosa e 18% pela via intranasal. Além disso, 56% dos usuários já presenciaram outra pessoa ter tido uma *overdose* por cocaína (FERRI & DUNN, 1999).

Um levantamento das apreensões e padrões de uso de cocaína em São Paulo no período de 1993 a 1997 detectou um aumento de 24,5% no número de casos de óbitos relacionados à *overdose* de cocaína, enquanto o número de apreensões de *crack*/cocaína em termos relativos aumentou 101,9% sendo que o número de apreensões específicas de *crack* aumentou 850,5% com relação ao número total de casos recebidos pelo Instituto Médico Legal de São Paulo (CHASIN, CARVALHO, PEDROSO, 1999).

As diferentes formas de apresentação e diluição da cocaína permitem uma variedade de preços que atende a população de praticamente qualquer poder aquisitivo. O fácil acesso ao *crack* deve-se principalmente ao baixo preço e à preferência dos traficantes de algumas regiões do país, por comercializar esta forma que instala a farmacodependência rapidamente. O usuário se torna comprador assíduo e gera maior lucro em curto prazo (CHASIN & SILVA, 2003).

Um estudo sobre o perfil sociodemográfico dos dependentes de cocaína, realizado em alguns hospitais psiquiátricos da região metropolitana de São Paulo, encontrou maior índice de usuários de *crack* (38,4%) e pequena prevalência de usuários de drogas injetáveis (1,6%). Os usuários de *crack* apresentavam pior condição socioeconômica (baixa escolaridade, freqüentemente desempregados, haviam morado nas ruas) e maior envolvimento com a violência e a criminalidade (FERREIRA *et al.*, 2003).

Outra explicação para o aumento da utilização de *crack* seria o reconhecimento pelos usuários dos riscos de transmissão do HIV e de outras doenças graves, que podem ocorrer com o uso da via intravenosa. O segmento dos usuários de drogas injetáveis (UDI), desde os anos oitenta ocupa posição de destaque entre os casos de AIDS por transmissão sanguínea. Atualmente, devido ao rigoroso controle do sangue e hemoderivados, 99% dos casos de AIDS por transmissão sanguínea são atribuídos ao compartilhamento de seringas e agulhas entre os UDI (BRITO, CASTILHO, SZWARCWALD, 2001).

Um estudo realizado com usuários de drogas não injetáveis demonstrou que a prevalência da soropositividade para o HIV também é elevada neste grupo, com valores em torno de 16%. A explicação para este índice está na contaminação por via sexual. As situações mais comuns de exposição ao HIV são as relações sexuais sem a proteção de preservativos, por dinheiro ou em troca da própria droga e o comportamento promíscuo sob o efeito de substância psicoativa, muitas vezes com usuários de drogas injetáveis (PECHANSKY, DIEMEN, GENRO, 2001).

Estima-se que 50% a 90% dos usuários de cocaína associam a ingestão de bebida alcoólica, referindo que a interação aumenta e/ou prolonga a euforia e reduz os efeitos desagradáveis posteriores ao uso. Essa interação gera um produto de transesterificação, o cocaetileno, que de acordo com pesquisas recentes, mostrou-se mais potente e com maior expressão de toxicidade aguda que a própria cocaína. (CHASIN & MÍDIO, 1997).

Para uma redução eficaz do abuso de drogas seria necessário restringir conjuntamente a produção, a distribuição e o consumo. Já se mencionou anteriormente que a repressão ao tráfico, não tem sido suficiente para impedir a progressão dos indicadores de consumo, portanto seria apropriado incrementar as medidas de restrição ao consumo por meio da prevenção.

O abuso às drogas causa preocupação porque provoca acidentes, gera violência e pode evoluir para o desenvolvimento da dependência. Neste caso, é importante a identificação precoce para aumentar as possibilidades de tratamento efetivo.

A análise toxicológica de fluidos biológicos tem papel fundamental nos programas de prevenção, no tratamento e na pesquisa deste tipo de dependência, constituindo o método mais seguro de se comprovar a exposição humana à droga (SILVA & ODO, 1999). A aplicação destas análises nos tratamentos, desde que realizadas dentro de um protocolo médico adequado, tende a aumentar a adesão e conseqüentemente a efetividade do tratamento.

Atualmente a urina é a matriz biológica de escolha para se verificar a exposição a drogas de abuso e tem sido amplamente utilizada em programas de prevenção e controle do uso de drogas no ambiente de trabalho (HUESTIS & CONE, 1998; SILVA & YONAMINE, 2000; CONE, 2001; KIDWELL *et al.*, 2003), em clínicas de tratamento e recuperação e também na justiça criminal (GUIMARÃES, 1998; HUESTIS *et al.*, 1999; PRESTON *et al.*, 1999).

O consumo de substâncias psicoativas no local de trabalho pode ser responsável por danos não só ao indivíduo, como aos colegas de trabalho, ao empregador e ao público em geral; representando custos financeiros e sociais à empresa e à sociedade. Uma das alternativas para diminuir o impacto negativo que o uso de drogas provoca na saúde do usuário e no ambiente onde trabalha é a implantação de um programa de prevenção e de dissuasão ao uso de drogas no ambiente de trabalho.

Nos Estados Unidos da América, a implantação de programas com esta finalidade teve início em 1983 no setor de transportes. Em 1987, o governo americano implantou o *Drug Free Federal Workplace Program* com exames toxicológicos utilizando a urina como amostra biológica, para funcionários civis e militares de instituições federais. Devido aos resultados

favoráveis, diversas empresas de vários segmentos de atividades passaram a realizar exames toxicológicos para detecção de drogas de abuso, inseridos em programas de prevenção e recuperação de usuários. Atualmente, cerca de trinta milhões de trabalhadores americanos (aproximadamente um terço da força laboral do país) são examinados por ano, por meio de análises para verificar o uso de drogas (SILVA, 1999).

No Brasil, várias empresas já incluem exames toxicológicos em seus programas de prevenção ao consumo de drogas. O Laboratório de Análises Toxicológicas (LAT) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas / USP atende várias empresas de todo o território nacional para a realização de exames toxicológicos utilizando a urina como amostra biológica. As empresas são de pequeno, médio e grande porte, principalmente do setor de transportes, mas também de prestação de serviços e de segurança patrimonial.

Embora a urina seja a matriz biológica de escolha nos referidos programas do mundo inteiro, sabe-se que a maioria das drogas de abuso não são detectáveis nesta amostra após dois a três dias a partir de uma única exposição. Assim, para monitorar o consumo de drogas de abuso a longo prazo, no caso de clínicas de recuperação ou justiça criminal, se faz necessário coletar várias amostras de urina, de acordo com a meia-vida das substâncias em questão. Desta forma, a análise da urina deve ser realizada com uma frequência mínima de duas a três vezes por semana para ser efetiva, gerando a necessidade de várias análises, com dificuldades operacionais e maior custo (HUESTIS *et al.*, 1999; PRESTON *et al.*, 1999; CONE, 2001; KIDWELL *et al.*, 2003).

O estudo de matrizes biológicas alternativas e de novos métodos para a comprovação dessa exposição aumenta as chances de se obter algum sucesso nessa luta contra as drogas de abuso e seus efeitos devastadores. Além da urina, várias matrizes biológicas, incluindo o sangue, cabelo, saliva, mecônio, sêmen, leite materno, tecido cerebral, líquido amniótico, líquido, unha, secreção gordurosa da pele, extrato córneo e suor têm sido utilizadas para verificar a exposição à cocaína (JOSEPH *et al.*, 1998). Cada espécime

apresenta vantagens e desvantagens dependendo da situação, do objetivo que se pretende alcançar, dos meios disponíveis para a análise e dos custos.

Com o atual interesse em estudar amostras biológicas alternativas, este trabalho foi desenvolvido para incrementar a abrangência e a eficácia das análises toxicológicas para drogas de abuso por meio da análise do suor.

2. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DA COCAÍNA

2.1 Origem e características

A cocaína é o principal alcalóide da *Erythroxylum coca*, arbusto nativo em alguns países andinos, especialmente Peru, Bolívia e Colômbia. Existem mais de duzentas espécies conhecidas do gênero *Erythroxylum*, porém apenas três delas (*Erythroxylum coca*, *Erythroxylum novogranatense* e *Erythroxylum truxillense*) contêm quantidades apreciáveis de cocaína, sendo a *Erythroxylum coca* a que apresenta maior porcentagem de cocaína nas folhas: 0,5 a 2,0% (LARINI, 1997).

A primeira fase da extração da cocaína, maceração das folhas com ácidos ou solventes orgânicos para obtenção da pasta de coca, costuma ser realizada próximo das plantações, ocorrendo principalmente na Bolívia, Colômbia e Peru. Os laboratórios de produção normalmente encontram-se próximos a rios ou possuem pistas de pouso clandestinas para propiciar as atividades de posterior tráfico. A pasta de coca constitui a principal forma de tráfico e nos laboratórios de refino, a pasta de coca é utilizada para produzir o crack (pedra) ou o cloridrato de cocaína (pó) (BONO, 1998).

A merla, refugo da extração da cocaína com aparência pastosa, apareceu recentemente em Brasília. Por ser uma droga barata, ganha a preferência dos usuários menores de idade que vivem nas ruas, em substituição à cola de sapateiro (BAUMKARTEN, 2001; GREY, 2004).

No crack e na merla, a cocaína encontra-se na forma de base livre, volatiliza-se quando aquecida (aproximadamente 90°C) permitindo que seus vapores sejam inalados no ato de fumar. A cocaína na forma de pó é hidrossolúvel, não se presta a ser fumada pois se decompõe em

temperaturas elevadas, e é consumida por via intranasal e intravenosa. Raramente a cocaína em pó é encontrada na forma pura, para aumentar o rendimento ela costuma ser diluída com produtos que imitam sua ação farmacológica, cor ou sabor, compondo assim a "droga de rua" cujo teor de cocaína varia de 20 a 70%. São utilizados com essa finalidade outros anestésicos locais (lidocaína, procaína), estimulantes (cafeína, efedrina), quinina, estricnina, manitol, sacarose, pó de mármore, talco, amido, etc. (CHASIN & SILVA, 2003).

2.2 Toxicocinética

A velocidade de absorção e a concentração plasmática máxima alcançadas são dependentes das vias de exposição. A via oral não propicia o abuso de cocaína, porque a absorção é retardada pela ionização da cocaína no meio ácido do estômago e pela demora em atingir o meio menos ácido do intestino delgado, onde a forma não ionizada prevalece e facilita a absorção. A concentração plasmática máxima geralmente ocorre entre 45 e 90 minutos (CAMPOS, 2002).

As principais vias de exposição são a intranasal e intravenosa para a forma de cloridrato de cocaína, e a via pulmonar para a forma de base: crack ou merla (SILVA & ODO, 1999).

Com o advento do crack (1992 no Brasil) e da AIDS, os padrões de uso da cocaína mudaram, sendo que a via intravenosa tem sido substituída pela via pulmonar, que apresenta velocidade de absorção, pico de concentração plasmática, duração e intensidade de efeitos equivalentes ou maiores e com menor risco de transmissão de doenças infecto-contagiosas. A via pulmonar apresenta uma velocidade de absorção efetiva devido à

vasta superfície da mucosa pulmonar e sua rica vascularização; o início da ação ocorre entre um e dois minutos (LEITE, 1999).

A utilização da cocaína por via intranasal apresenta menor velocidade de absorção devido à ação vasoconstrictora da substância sobre a mucosa nasal. O resultado disso são teores plasmáticos menores por um tempo mais prolongado. A concentração plasmática máxima ocorre em média após trinta minutos e depende da técnica de aspiração do pó e características individuais do usuário (CAMPOS, 2002; YONAMINE, 2000).

A cocaína liga-se a proteínas plasmáticas, apresenta velocidade de distribuição relativamente alta, e devido ao seu caráter lipofílico atravessa prontamente as membranas (inclusive das barreiras hematoencefálica e placentária) e pode ser seqüestrada pelos adipócitos acumulando-se no tecido gorduroso (LEVISKY *et al.*, 2000).

A biotransformação da cocaína é bastante extensa (Figura 1), apenas pequenas quantidades da substância são excretadas na urina na forma inalterada.

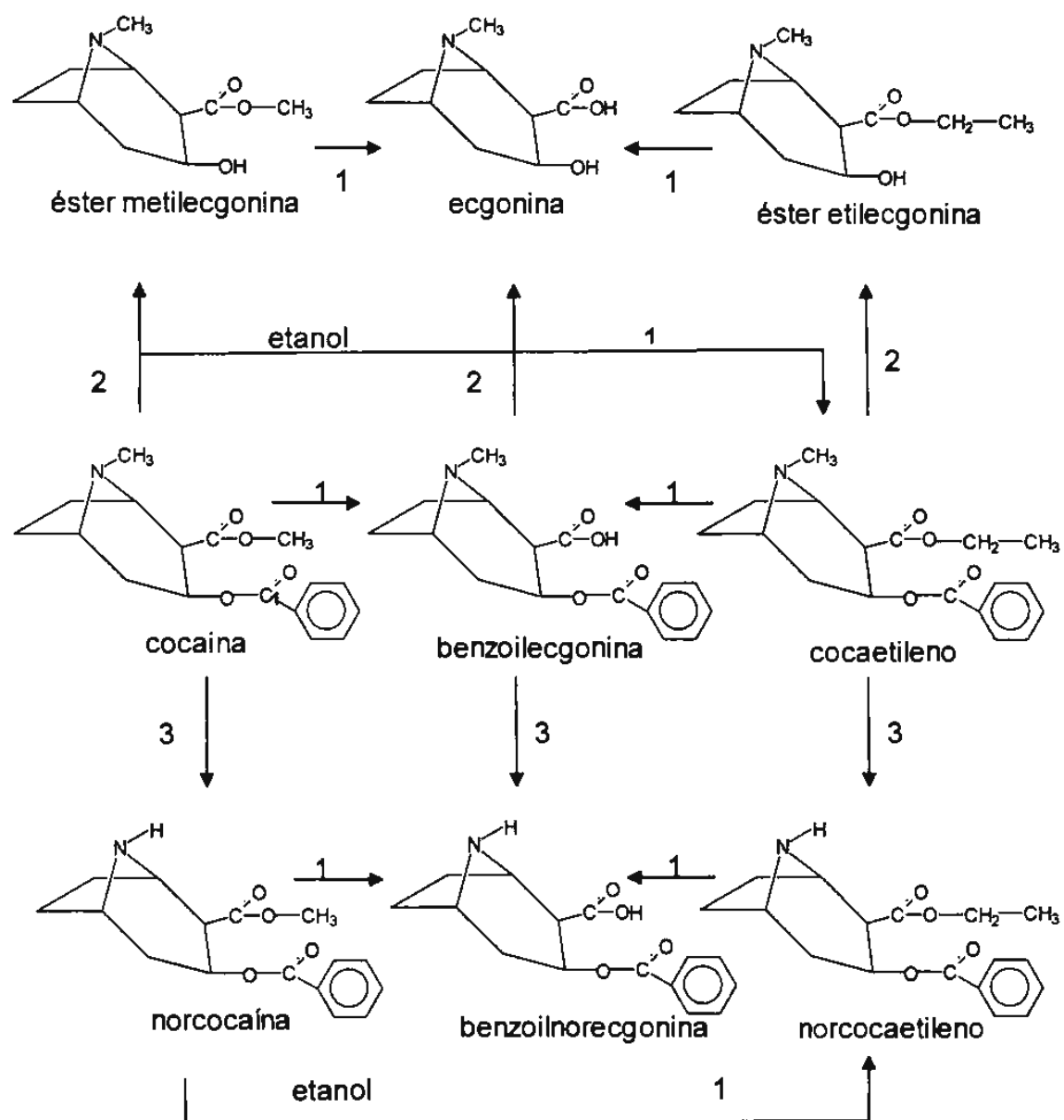


Figura 1: Produtos de biotransformação e transesterificação da cocaína:

1 → carboxilesterases; 2 → colinesterases; 3 → enzimas P-450

(CHASIN & MÍDIO, 1997)

O cocaetileno ou etilbenzoilecgonina é uma substância resultante da transesterificação etílica em que o grupo 2-carboximetil da cocaína é transformado em 2-carboxietil na presença de etanol. Esta reação é mediada por carboxilesterases, envolvidas também na biotransformação da cocaína a benzoilecgonina. O cocaetileno, dado sua semelhança estrutural com a cocaína, segue os mesmos padrões cinéticos que o precursor, sendo considerado por alguns autores como um produto de biotransformação da cocaína, por outros como produto resultante da interação do fármaco com etanol e ainda como aduto desses dois fármacos, podendo funcionar como um biomarcador da exposição associada de cocaína e etanol (CHASIN & MÍDIO, 1997).

O modelo farmacocinético mais utilizado para a cocaína é o monocompartimental, apesar de haver controvérsias sobre o mesmo e também sobre os tempos de meia-vida plasmática de eliminação ($t_{1/2}$) da cocaína. Os parâmetros cinéticos variam de acordo com a via de administração: para a via intranasal, a maioria dos trabalhos refere um $t_{1/2}$ entre 50 e 78 minutos; para a via pulmonar um $t_{1/2}$ entre 38 a 58 minutos e para a via intravenosa entre 40 e 67 minutos. Para ao cocaetileno, estudos demonstraram um $t_{1/2}$ entre 138 e 155 minutos (CHASIN & SILVA, 2003).

Apesar do tempo de meia vida curto da cocaína (30 a 80 min) e longo da benzoilecgonina (4 a 11 h), o principal analito encontrado no suor é a cocaína que aparece em pouco tempo (0,5 a 2,5 h) após uma única dose, independente da via de exposição, e continua aumentando por 24 horas, quando ocorre a concentração máxima. Esta demora em atingir a concentração máxima, principalmente quando comparada com o tempo para atingir a concentração máxima no sangue (poucos minutos), não deve ser uma surpresa considerando a jornada que o analito tem que percorrer para alcançar a pele. A cocaína é estável em contato com a pele (BURNS & BASELT, 1995).

Os produtos de biotransformação da cocaína, ecgonina metilester, benzoilecgonina e cocaetileno, podem ser identificados em pequenas quantidades no suor, somente após a administração de grandes doses do fármaco, porque os mesmos não se difundem através das membranas tão bem quanto a substância inalterada (BURNS & BASELT, 1995; CONE, 1994; HUESTIS *et al.*, 1999).

A difusão passiva do sangue para os tecidos é o principal mecanismo do aparecimento de fármacos no suor. O coeficiente de partição óleo-água e o pKa da cocaína favorecem esse tipo de transporte, devido ao seu caráter lipofílico (KIDWELL, HOLLAND, ATHANASELIS, 1998).

A eliminação da cocaína ocorre predominantemente pela via urinária e depende de sua biotransformação, uma vez que menos de 10% da quantidade consumida é excretada na sua forma inalterada (SILVA & ODO, 1999).

O suor pode ser considerado uma via secundária de excreção, cuja característica principal é a proporção inferior a 10% na quantidade de produtos de biotransformação (BURNS & BASELT, 1995; HUESTIS *et al.*, 1999), situação oposta à da excreção urinária.

Alguns autores administraram doses conhecidas de cocaína a voluntários e determinaram a concentração da mesma no adesivo coletor. Os resultados deste estudo indicaram que a cocaína em dose única pôde ser detectada no suor até sete dias após a administração, mas houve uma grande variabilidade intra e inter indivíduos, e a relação dose-concentração no suor não pôde ser demonstrada (BURNS & BASELT, 1995; CONE *et al.*, 1994; HUESTIS *et al.*, 1999).

2.3 Efeitos tóxicos

A cocaína possui múltiplas ações periféricas e centrais: é um potente anestésico local com propriedades vasoconstrictoras e também um estimulante do SNC. Seus efeitos agudos produzem um quadro de euforia com aumento do estado de vigília, sensação de bem estar, autoconfiança elevada, aceleração do pensamento e sintomas físicos da natureza autonômica, tais como: aumento da frequência cardíaca, aumento da temperatura corpórea, aumento da frequência respiratória, sudorese, tremor leve de extremidades, espasmos musculares, tiques e midríase (LARINI, 1997).

Não há um consenso sobre qual a dose de cocaína necessária para desencadear problemas sérios à saúde ou mesmo à vida do usuário. Laranjeira *et al.* (2003) relatam acreditar que o consumo ao redor de 2 a 4 mg/Kg ocasione uma redução discreta do fluxo coronariano e um aumento da mesma magnitude na frequência cardíaca e na pressão arterial.

A via de administração escolhida pode ocasionar efeitos tóxicos específicos (LARANJEIRA *et al.*, 2003):

O aparelho cardiovascular é afetado pelo abuso por qualquer via de administração, podendo ocorrer hipertensão, arritmias cardíacas, isquemia do miocárdio, infarto agudo do miocárdio, cardiomiopatias, dissecação ou ruptura da aorta e pela via endovenosa pode ocorrer também a endocardite bacteriana. O Sistema Nervoso Central também pode ser afetado pelo abuso por qualquer via de administração, podendo ocorrer cefaléias, convulsões, acidente vascular cerebral, hemorragia intracraniana, hemorragia subaracnóidea e pela via endovenosa pode ocorrer aneurisma micótico.

O aparelho respiratório é obviamente mais afetado quando se utiliza a via pulmonar, podendo ocorrer broncopneumonias, hemorragia pulmonar,

edema pulmonar, pneumotórax, asma, bronquite, depósito de resíduos e pela via endovenosa pode ocorrer embolia pulmonar.

A administração pela via intranasal provoca efeitos tóxicos principalmente no nariz e garganta, que seriam rinite, sinusite, necrose do septo nasal e laringite. Nos aparelhos digestivo e excretor, os efeitos tóxicos são menos freqüentes.

2.4 Tolerância e Síndrome de Abstinência

A tolerância aos efeitos da cocaína, ou seja, a diminuição dos efeitos eufóricos e fisiológicos com a mesma dose, parece ocorrer em usuários crônicos após consumo de altas doses, mas é considerada modesta quando comparada à que ocorre com outros estimulantes. Leite (1999) relata que indivíduos com uso intenso de cocaína descrevem consumo de doses que seriam letais ao usuário ocasional.

A retirada da cocaína após o uso a longo prazo pode resultar em depressão, fadiga, irritabilidade, perda do desejo sexual ou impotência, tremores, dores musculares, distúrbios da fome, mudanças do EEG e dos padrões de sono. Estes sintomas, segundo alguns autores, configuram a síndrome de abstinência; entretanto há outros que não aceitam essa síndrome (CHASIN & SILVA, 2003).

A tolerância e a síndrome de abstinência são sintomas fisiológicos importantes no diagnóstico da dependência, porém não são os únicos. Segundo o manual "Usuários de Substâncias Psicoativas: abordagem, diagnóstico e tratamento", elaborado pelo Conselho Regional de Medicina do Estado de São Paulo (CREMESP) em conjunto com a Associação Médica

Brasileira (AMB), um diagnóstico definitivo de dependência deve usualmente ser feito somente se três ou mais dos seguintes requisitos (CID-10) tiverem sido vivenciados ou exibidos em algum momento do ano anterior:

- um forte desejo ou senso de compulsão para consumir a substância;
- dificuldades em controlar o comportamento de consumir a substância em termos de seu início, término e níveis de consumo;
- um estado de abstinência fisiológico quando o uso da substância cessou ou foi reduzido, como evidenciado por: síndrome de abstinência para a substância ou o uso da mesma substância (ou de uma intimamente relacionada) com a intenção de aliviar ou evitar sintomas de abstinência;
- evidência de tolerância, de tal forma que doses crescentes da substância psicoativa são requeridas para alcançar efeitos originalmente produzidos por doses mais baixas;
- abandono progressivo de prazeres e interesses alternativos em favor do uso da substância psicoativa, aumento da quantidade de tempo necessária para se recuperar de seus efeitos;
- persistência no uso da substância, a despeito de evidência clara de conseqüências manifestamente nocivas. Esforços claros devem ser feitos para determinar se o usuário estava realmente consciente da natureza e extensão do dano.

3. SUOR COMO MATRIZ BIOLÓGICA PARA ANÁLISE TOXICOLÓGICA

3.1 Características físico-químicas do suor

A secreção de suor é um mecanismo homeostático importante para a manutenção da temperatura do corpo humano numa estreita faixa fisiológica. Em temperatura ambiente acima de 31° C, seguindo a estimulação do nervo simpático, o suor é secretado para a superfície da pele e evapora para abaixar a temperatura do corpo (HUESTIS & CONE, 1998).

Existe o suor imperceptível (300 a 700 mL/dia) produzido por todo o corpo e o suor perceptível que é secretado ativamente durante uma situação de tensão psicológica ou exercício físico podendo chegar em 2 a 4 L/h (KIDWELL, HOLLAND, ATHANASELIS, 1998).

Assim sendo, a sudorese depende não apenas da temperatura ambiente e do nível de atividade física, mas também do estado emocional e de características individuais.

Aproximadamente 50% do volume de suor é gerado pelo tronco do corpo, 25% pelas pernas e os 25% restantes pela cabeça e extremidades superiores (CONE *et al.*, 1994).

O suor é composto de água (99%) e o soluto mais concentrado é o cloreto de sódio. O suor também contém albumina, gamaglobulinas, resíduos, traços de elementos químicos, fármacos e várias outras substâncias encontradas no sangue. O pH médio do suor, para indivíduos em repouso é 5,8. Contudo, em temperatura ambiente superior a 31°C e após exercício físico, a produção e o pH do suor aumentam, podendo este último chegar em 6,1 a 6,7 (HUESTIS *et al.*, 1999).

As glândulas sudoríparas são estruturas tubulares que consistem em duas partes, uma porção enovelada profunda que secreta o suor e uma porção condutora que passa por intermédio da derme. A maior parte do suor é produzido por glândulas écrinas localizadas na camada transdérmica da maioria da superfície da pele. Um outro tipo de glândula sudorípara é a glândula apócrina, maior, que secreta uma substância mais viscosa e localiza-se em regiões restritas como a pele das axilas, região pubiana e ânus (GUYTON, 1977).

As glândulas sudoríparas freqüentemente desenvolvem-se em associação com folículos pilosos (cabelos, pelos) e algumas vezes desembocam diretamente nos folículos pilosos (LEVISKY *et al.*, 2000).

A figura 2 mostra um diagrama com a anatomia da pele e do tecido subcutâneo.

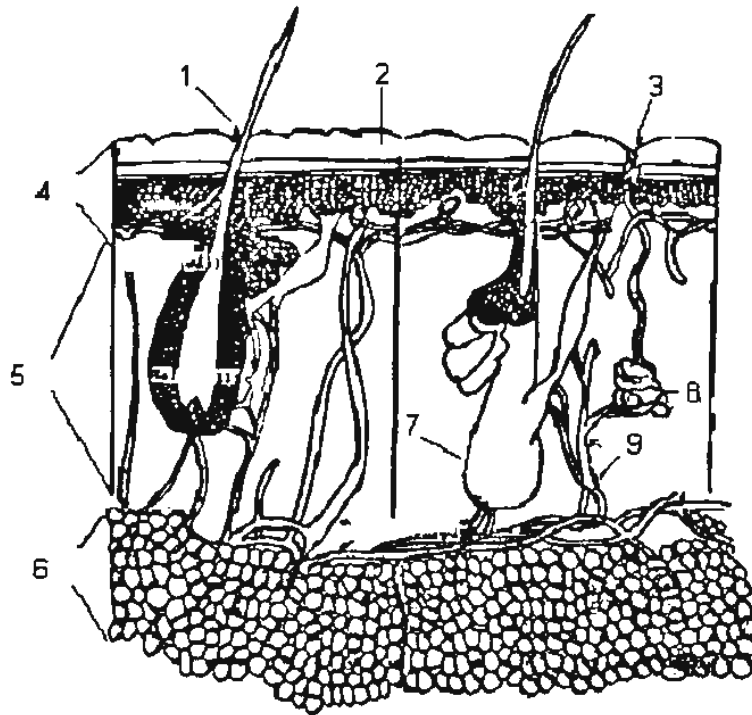


Figura 2: Diagrama da anatomia da pele e tecido subcutâneo (LEVISKY *et al.*, 2000):

- 1- secreção de glândula sebácea;
- 2 - extrato córneo;
- 3 – suor;
- 4 – epiderme;
- 5 – derme;
- 6 - tecido adiposo;
- 7 - folículo piloso;
- 8 – glândula sudorípara;
- 9 – capilares sanguíneos.

3.2 Mecanismos de incorporação de fármacos no suor

Vários mecanismos de incorporação de fármacos no suor já foram sugeridos e, embora não totalmente esclarecidos, parecem demonstrar que as substâncias estão presentes no suor como resultado de vários processos, onde a difusão passiva e a migração transdérmica são os mais importantes até o momento (HUESTIS *et al.*, 1999).

A difusão passiva de fármacos do sangue para o suor é favorecida para as substâncias básicas e lipossolúveis. Substâncias de caráter básico não ionizadas difundem-se para o suor e se tornam ionizadas como resultado do pH baixo deste fluido biológico. Estas substâncias podem se acumular no suor quando comparadas ao sangue devido à diferença de pH entre estas duas matrizes. A razão da excreção de substâncias básicas no suor é pH dependente (CONE *et al.*, 1994).

A migração transdérmica é a passagem de substâncias do fluido intersticial para a superfície da pele, onde seria dissolvida pelo suor. Algumas substâncias podem migrar (difundir passivamente) pelas camadas dérmica e epidérmica da pele, baseado nas propriedades físico-químicas e nas condições fisiológicas e patológicas da pele, até o extrato córneo. O coeficiente de partição óleo-água e a constante pKa da cocaína parecem favoráveis para difusão por meio das membranas adjacentes das glândulas sudoríparas (HUESTIS & CONE, 1998).

As múltiplas barreiras que precisam ser ultrapassadas para alcançar o exterior (gordura subcutânea, derme, epiderme e extrato córneo) são os fatores limitantes para a migração transdérmica de substâncias para a superfície da pele. Além disso, o extrato córneo contém estruturas que podem funcionar como desvios de difusão, os folículos pilosos, os dutos de suor e o extrato córneo inquebrável. A afinidade da substância pelo extrato córneo e a relativa hidratação dessa camada seriam críticas para a migração

transdérmica, e é possível que a pele sirva como um depósito para substâncias que exibam afinidade por essa camada.

A passagem de substâncias na direção oposta, do meio exterior para o interior da pele, parece ser bem lenta. A estreita justaposição das células da epiderme forma uma barreira protetora efetiva, porém substâncias lipossolúveis podem atravessar essa barreira e atingir a circulação, como é o caso da nicotina, fentanil e fenciclidina. Devem ser mencionados alguns fatores que afetam a permeabilidade da pele, tais como hidratação, temperatura, idade, variações regionais e lesões (CONE *et al.*, 1994).

O suor constitui uma das formas com que as drogas de abuso podem atingir os cabelos (KIDWELL, HOLLAND, ATHANASELIS, 1998). Conforme mencionado anteriormente, os folículos pilosos humanos têm glândulas sudoríparas associadas, com dutos desembocando nos folículos e na superfície da pele (CONE *et al.*, 1994; KIDWELL *et al.*, 1998). O estudo da disposição de drogas de abuso no suor, secreção gordurosa da pele, extrato córneo e cabelo é importante porque mecanismos complexos podem ocorrer na transferência destas substâncias entre matrizes. A pele e o cabelo estão constantemente expostos ao suor e à secreção gordurosa da pele, e substâncias presentes nessas secreções podem contaminar a pele e o cabelo, ou o contrário. A relação entre a disposição de drogas nestas diferentes matrizes ainda não foi bem definida (JOSEPH *et al.*, 1998).

3.3 Análise toxicológica do suor

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

3.3.1 Coleta de amostra

Vários métodos foram desenvolvidos para a coleta do suor, incluindo o uso de gaze, algodão e papel de filtro para absorvê-lo. A aplicação de calor ou de substâncias químicas (ex: pilocarpina) também foi utilizada para aumentar a produção de suor. Os diferentes métodos já permitiram a identificação de substâncias lícitas e ilícitas no suor, incluindo o álcool, anfetamina, cocaína, heroína, morfina, metadona, metanfetamina e fenciclidina. (HUESTIS *et al.*, 1999).

O método que se mostrou mais adequado para a coleta de amostras por períodos prolongados, foi o uso do adesivo coletor. Os primeiros adesivos coletores projetados (1980) eram oclusivos, ou seja, não permitiam o escape de qualquer gás ou vapor para o meio ambiente, o que teoricamente tinha a vantagem de permitir a determinação da concentração do analito, já que todo o volume de suor era recolhido ali. Uma área de coleta de 10 cm² podia recolher 1 mL de suor em quatro dias de uso, com o indivíduo em estado de repouso. Esse tipo de coletor gerou problemas porque as peles hidratadas sofriam alteração do pH, da colonização de bactérias e do transporte característico da pele; resultando em irritação após um único dia de uso (BURNS & BASELT, 1995).

Os adesivos coletores avançaram significativamente. Os utilizados neste estudo (PharmaChek Sweat Patch), foram aprovados nos Estados Unidos pelo Food and Drug Administration (FDA), não são oclusivos, o que significa que gases e vapores escapam para o meio ambiente, e podem ser usados durante cinco a dez dias, sendo o suor coletado e concentrado na

almofada de celulose absorvente (HUESTIS *et al.*, 1999; PHARMCHEM, 1999).

A camada adesiva externa é composta de um filme transparente fino de poliuretano (medindo 6 cm x 7 cm), que permite que o oxigênio, gás carbônico e vapor de água escapem para o meio ambiente, mas previne o escape de constituintes não voláteis e moléculas maiores presentes no suor, que excedem o tamanho do poro da membrana plástica. Ele previne também o transporte inverso, impedindo que água e outras moléculas externas penetrem no sistema (KIDWELL *et al.*, 1998; PRESTON *et al.*, 1999).

Conseqüentemente, após um período de vários dias, os solutos presentes no suor vão saturar a almofada absorvente (que mede 5 cm x 3 cm), concentrando-se vagarosamente e não ocorrendo proliferação de bactérias ou irritação da pele (CONE *et al.*, 1994).

A camada intermediária é constituída de um tecido fino de celulose, colado no adesivo (PHARMCHEM, 1999).

Os adesivos coletores são identificados com um código alfanumérico que deve ser registrado em documento apropriado de identificação do usuário. Caso um adesivo coletor seja descolado da pele, não existe a possibilidade de uma nova aderência do mesmo adesivo, garantindo a segurança da relação adesivo-paciente (PHARMCHEM, 1999; PRESTON *et al.*, 1999).

Dois novos adesivos coletores estão sendo estudados para acelerar a coleção de suor: o Hand-held Fast Patch (aplicados na palma da mão) e o Torso Fast Patch (aplicados no abdômen ou nas laterais do tronco). Ambos empregam uma estimulação da produção do suor pelo calor, e uma almofada de absorção de maior tamanho. O suor é coletado durante trinta minutos em várias oportunidades, após a administração da droga (HUESTIS *et al.*, 1999).

Para aplicação forense, a quantidade de matriz biológica que pode ser coletada é extremamente importante porque é necessário preservar uma parte desta matriz para reteste ou contraprova (KIDWELL, HOLLAND, ATHANASELIS, 1998). No caso dos adesivos coletores, a sugestão é que se aplique no mínimo dois adesivos por indivíduo (na mesma região).

3.3.2 Extração dos analitos

A primeira etapa da análise compreende a eluição dos analitos incorporados nas almofadas absorventes por meio de soluções-tampão. No levantamento bibliográfico realizado, a solução mais freqüentemente citada foi a mistura de tampão acetato 0,2M (pH=5.0) com metanol na proporção de 25:75 (SPIEHLER *et al.*, 1996; PRESTON *et al.*, 1999; MOODY & CHEVER, 2001). Huestis *et al.* (1999) usaram apenas o tampão acetato 0,5M (pH=4,0); Cone *et al.* (1994) usaram Triton X-100, 0,1% em tampão acetato 0,2M; e Kidwell & Smith (2001) usaram HCl 0,1M.

O tempo de contato da almofada absorvente com o eluente variou de poucos minutos a duas horas, entre os trabalhos estudados, e alguns autores recomendaram agitar o sistema, almofadas absorventes e tampão eluidor (CONE *et al.*, 1994 e PRESTON *et al.*, 1999).

Após a eluição é necessário extrair os analitos da solução obtida e a extração em fase sólida (SPE) tem sido a técnica de escolha para esta finalidade (CONE *et al.*, 1994; HUESTIS *et al.*, 1999; KIDWELL & SMITH, 2001).

3.3.3 Reações de derivação química

Alguns métodos foram descritos para a derivação química das substâncias extraídas, consecutiva à extração em fase sólida. No método padronizado por Huestis *et al.* (1999), os eluatos foram evaporados até a secura sob fluxo de nitrogênio a 40°C e foram realizadas duas etapas consecutivas de derivação, a primeira utilizando N-metil-N-(tert.-butildimetilsilil) trifluoroacetamida (MTBSTFA) + 1% tert.-butildimetilclorosilano (TBDMCS) e a seguinte utilizando N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) + 1% trimetilclorosilano (TMCS). Spiehler *et al.* (1996) utilizaram hexafluoroisopropanol e anidrido pentafluoropropiônico para a derivação, e Kidwell *et al.* (2003) anidrido acético e pentafluoropropanol.

3.3.4 Identificação da cocaína e cocaetileno

Várias técnicas são citadas na literatura científica para identificação de cocaína e seus produtos de biotransformação no suor: enzimaímunoensaio (SPIEHLER *et al.*, 1996; PRESTON *et al.*, 1999; MOODY & CHEEVER, 2001; KIDWELL *et al.*, 2003), radioímunoensaio (MOODY & CHEEVER, 2001) e espectrometria de massa associada à cromatografia em fase gasosa – GC/MS (CONE *et al.*, 1994; SPIEHLER *et al.*, 1996; HUESTIS *et al.*, 1999; PRSTON *et al.*, 1999; KIDWELL *et al.*, 2003).

Os limites de detecção de cocaína no suor, encontrados nos métodos descritos na literatura variaram entre 1,0 e 5,0 ng/mL: Cone *et al.* (1994) chegaram a um valor de 1 ng / adesivo coletor = 2,5 ng / mL ; Burns & Baselt (1995) chegaram a 1 ng / mL; Huestis *et al.* (1999) chegaram a 1,25

ng/adesivo coletor= 3,1ng/mL ; Preston *et al.* (1999) chegaram a 3 ng / mL; Kidwell & Smith (2001) chegaram a 2 ng/adesivo coletor = 5,0 ng / mL e Kidwell *et al.* (2003) chegaram a 4 ng/mL.

No levantamento bibliográfico elaborado para o presente estudo, não foram encontradas referências relativas a identificação de cocaetileno no suor.

4. OBJETIVOS E PLANO DE TRABALHO

O objetivo principal do trabalho foi desenvolver um método analítico para avaliar a utilização do suor como matriz biológica na identificação da exposição à cocaína, associada ou não à ingestão de bebida alcoólica.

Como objetivo secundário ficou estabelecido que amostras de urina provenientes da mesma população seriam analisadas para comparar os resultados quanto ao período de detecção.

Visando alcançar os objetivos citados, foi elaborado o seguinte plano de trabalho:

- Estudo da origem do suor, suas principais características e os mecanismos de incorporação de cocaína e/ou seus produtos de biotransformação nesta secreção.
- Levantamento bibliográfico sobre as técnicas existentes para a coleta de suor, extração e identificação da cocaína e/ou seus produtos de biotransformação nesta matriz.
- Avaliação da técnica de coleta de suor por intermédio do uso do adesivo coletor PharmChek®.
- Padronização e validação das técnicas de eluição dos analitos da almofada absorvente de suor, microextração em fase sólida (SPME) e identificação da cocaína e/ou seus produtos de biotransformação.
- Coleta de amostras de suor e urina de pacientes internados em clínicas para tratamento da dependência a drogas de abuso, usuários de cocaína em abstinência.

- Aplicação do método validado nas amostras de suor fornecidas pelos usuários de cocaína em abstinência.
- Análise das amostras de urina por meio de enzimaímmunoensaio.
- Interpretação dos resultados obtidos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Material

5.1.1 Soluções-Padrão

Soluções padrão de cocaína e cocaína-d₃, cocaetileno e cocaetileno-d₃ na concentração de 1 mg/mL em acetonitrila, adquiridas da Radian International.

A partir destas soluções padrão, foram preparadas soluções de trabalho na concentração de 1 µg/mL de cada substância, em acetonitrila.

Estas soluções foram armazenadas a -20°C, quando não estavam sendo utilizadas.

5.1.2 Reagentes e outros materiais

- Acetato de sódio, bicarbonato de sódio e carbonato de potássio em grau p.a. da Merck;

- Tampão acetato 0,2 M, pH 5,0: 27,216g de acetato de sódio foram dissolvidos em 900 mL de água destilada. O pH foi ajustado com HCl 1 M e o volume completado para 1L;

- Tampão Sólido: o bicarbonato de sódio e o carbonato de potássio foram misturados, na proporção de 2:1;

- Reagentes para análise de benzoilecgonina na urina por meio de enzimaímmunoensaio (EMIT), marca Syva / Dade Behring, para utilização no equipamento ETS Plus;

- Calibradores e controles para Drogas de Abuso, marca Syva / Dade Behring, para utilização no equipamento ETS Plus;

- Dispositivo de micro-extração em fase sólida, equipado com fibra de polidimetilsiloxano de 100 μ m (Supelco);

- Kit de aplicação do dispositivo de coleta de suor (PharmChek® Sweat Patch –PHARMCHEM Laboratories, INC - CA) composto por:

- Adesivos coletores;
- Lenços umedecidos em álcool isopropílico para limpeza da pele;
- Pinça plástica individual para manipulação da almofada absorvente;
- Saco plástico para acondicionamento individual da almofada absorvente, com tira de selagem à prova de violação e área para identificação da amostra;
- Luvas plásticas para procedimentos;

- Frascos plásticos coletores de urina;

- Tubo plástico para centrifugação com reservatório para eluato;

- Pipetas automáticas com volume reguláveis (várias marcas e fabricantes);

- Vidrarias;

- Pinça metálica;
- Unidade filtrante descartável com porosidade de 0,22 μm (Millex);
- Fita indicadora de pH (Merck).

5.1.3 Equipamentos e Acessórios

- Centrífuga comum (Hettich);
- Balança analítica (Sartorius);
- Analisador de enzimaensaio automatizado ETS Plus (Syva / Dade Behring);
- Equipamento de cromatografia em fase gasosa modelo 6890 com detector seletivo de massa modelo 5972 e coluna capilar de sílica fundida HP-5MS com as dimensões de 30m x 0,25mm x 0,25 μm (Agilent).

5.1.4 Amostras de suor

5.1.4.1 Amostras de Referência Negativa

Foram obtidas com a aplicação de adesivos coletores em voluntários adultos não usuários de cocaína.

5.1.4.2 Amostras de Referência Positiva

Foram obtidas pela adição de 25 μ L e 125 μ L das soluções-padrão de trabalho de cocaína e cocaetilo (1 μ g/mL) às amostras de referência negativa.

5.1.4.3 Amostras de pacientes

Foram obtidas com a aplicação de adesivos coletores em pacientes internados nas Clínicas Vila São José e Vila Serena para tratamento da dependência à cocaína.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEP – FCF/USP) conforme Anexo 1.

5.1.5 Amostras de urina

Foram obtidas amostras de urina dos mesmos pacientes internados nas clínicas citadas, no primeiro dia do uso de cada adesivo coletor.

5.2 Métodos

5.2.1 Padronização do método para detecção de cocaína e cocaetileno em amostras de suor

5.2.1.1 Coleta de suor

Para a coleta do suor foi utilizada a técnica já padronizada do adesivo coletor PharmChek®.

Para estabelecer a melhor região do corpo para a aplicação do adesivo, foram testadas as duas regiões indicadas pelo fabricante (PHARMACHEM, 1999): a região dorsal inferior e a região do músculo deltóide (parte superior do braço).

5.2.1.2 Extração e identificação da cocaína e cocaetileno nas amostras de suor

Foram realizados experimentos com amostras de referência positiva na concentração de 25 ng / adesivo coletor.

A eluição baseou-se no método descrito por Huestis *et al.* (1999). A almofada absorvente foi retirada do saco plástico individual com o auxílio de uma pinça e transferida para um béquer de 10 mL limpo e seco. Foram adicionados 2,5 mL do Tampão Acetato 0,2 M – pH 5,0, os quais foram imediatamente absorvidos pela almofada. Após quinze minutos, a almofada foi transferida para um tubo plástico de centrifugação (com reservatório para o eluato) e centrifugado a 300g durante 10 minutos para obtenção do eluato.

Foi investigada a possibilidade de extração da cocaína e cocaetileno deste eluato, por microextração em fase sólida (SPME) tomando como base os estudos realizados por Snow (2000), Lord & Pawliszyn (2000), Theodoridis *et al.* (2000) e Ulrich (2000).

O dispositivo básico para SPME (Figura 3) tem a forma de uma seringa modificada, contendo uma fibra de sílica fundida recoberta por um fino filme de polímero sorvente que quando em contato com a amostra adsorve os analitos em condições adequadas de extração.

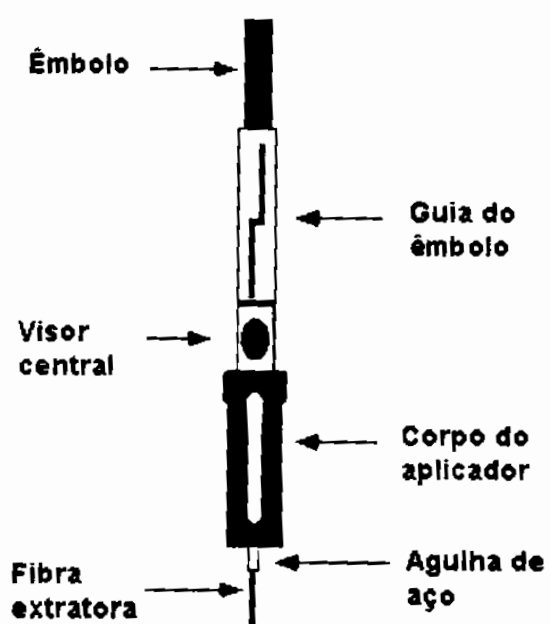


Figura 3: Dispositivo comercial para SPME

O eluato foi filtrado por uma membrana de 0,22 μm e transferido para um *vial* de 4ml. O pH foi elevado para a faixa situada entre 9 e 10 adicionando-se 30mg de tampão sólido (NaHCO_3 : K_2CO_3 razão 2:1). A seguir, foram adicionados 25 μL das soluções de trabalho dos padrões internos deuterados Cocaína-d3 e Cocaetileno-d3. Desta mistura foram extraídos a cocaína e o cocaetileno por intermédio da técnica de microextração em fase sólida (SPME) com a imersão da fibra na solução durante vinte minutos sob agitação magnética.

Em seguida, a fibra de microextração foi retraída pelo dispositivo e transferida para o injetor do cromatógrafo a gás, onde foi novamente exposta durante vinte minutos. Os analitos foram termicamente desorvidos e carregados pelo gás de arraste para a coluna cromatográfica. Posteriormente a cocaína e o cocaetileno foram identificados por intermédio da espectrometria de massa associada à cromatografia em fase gasosa.

As condições de operação do equipamento foram padronizadas tomando como base o método desenvolvido por Toledo *et al.* (2003) para determinação de cocaína e cocaetileno no cabelo:

- Gás de arraste: Hélio a um fluxo constante de 0,6mL/min
- Temperatura do injetor: 250°C
- Temperatura da interface: 250°C
- Programação da Temperatura do Forno: 150°C (2 minutos);
15°C/min até 220°C; 20°C/min até 250°C (5 minutos).
- Monitoramento seletivo de íons (SIM):
- cocaína: 182, 272, 303; cocaína-d3: 185, 306;
- cocaetileno: 196, 272, 317; cocaetileno-d3: 199, 320.

A seqüência completa do método padronizado, incluindo as etapas de eluição, extração e identificação da cocaína e cocaetileno; está representada na figura 4.



Figura 4: Seqüência da metodologia de forma esquemática

5.2.2 Validação do método para detecção de cocaína e cocaetileno em amostras de suor

As amostras de suor utilizadas na validação do método padronizado foram as amostras de referência positiva citadas no item 5.1.4.2.

A validação do método foi realizada estabelecendo valores de recuperação, precisão intra e interensaio, limite de detecção e estabilidade.

5.2.2.1 Recuperação

Os estudos de recuperação para cocaína e cocaetileno foram realizados levando em consideração a possível perda dos mesmos por retenção na almofada absorvente.

Foram empreendidas duas séries distintas de amostras para cada concentração, denominadas de Série A e Série B. As Séries A, consistindo de seis replicatas para cada concentração, foram preparadas a partir das amostras de referência positiva (item 5.1.4.2), seguindo-se da metodologia padronizada no item 5.2.12. As Séries B, também consistindo de seis replicatas para cada concentração, foram preparadas adicionando-se 25 μ L e 125 μ L das soluções padrão de trabalho (cocaína e cocaetileno, conforme item 5.1.1) em 2,5 mL de tampão acetato, objetivando as mesmas concentrações finais (25 e 125 ng/adesivo coletor) e passaram diretamente para a microextração em fase sólida e em seguida para a identificação no GC/MS.

A recuperação absoluta foi avaliada por comparação da resposta média obtida para a Série A (padrões adicionados ao adesivo coletor) e para a Série B (padrões adicionados diretamente ao tampão acetato).

5.2.2.2 Precisão intra e interensaio

Os estudos de precisão do método foram realizados levando em consideração as variações intra e interensaio.

Para avaliar a precisão intra-ensaio, foram feitas análises em sextuplicata, num mesmo dia, das amostras de referência positiva nas duas concentrações citadas para cocaína e cocaetileno, de acordo com o método padronizado (item 5.2.1.2).

A precisão interensaio foi avaliada da mesma forma, porém em três diferentes dias. As análises foram realizadas em sextuplicata para cada dia, de acordo com o método padronizado (item 5.2.1.2).

Foram calculados os coeficientes de variação (CV) para cada substância, para a determinação da precisão intra-ensaio e interensaio.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

5.2.2.3 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção foi determinado por um método empírico que consiste em analisar uma série de amostras de suor contendo quantidades decrescentes do analito (ARMBRUSTER, TILLMAN, HUBBS., 1994).

O limite de detecção foi a menor concentração que apresentou um coeficiente de variação (CV) que não excedeu 20%. O limite de detecção deve satisfazer também dois critérios de aceite de qualificação pré-determinados, que são o tempo de retenção a 1% dos padrões e a razão entre os íons a 20% dos padrões. Abaixo do limite de detecção os resultados falham ao encontrar esses critérios (NEEDLERMAN & ROMBERG, 1990; PEAT & DAVIS, 1998).

5.2.2.4 Estabilidade

A estabilidade dos analitos em almofadas absorventes contendo 10 ng de cocaína/ml ou 25 ng de cocaína/adesivo coletor e a mesma concentração de cocaetileno, foi avaliada durante sete dias à temperatura ambiente e durante quatorze dias a 4°C. Os testes de estabilidade foram realizados em triplicatas.

5.2.3 Aplicação do método para detecção de cocaína e cocaetileno em amostras de suor de pacientes

5.2.3.1 Aplicação do questionário

Os pacientes que forneceram amostras, foram previamente esclarecidos sobre os objetivos e condições do estudo (Anexo 4), assinaram um termo de consentimento (Anexo 5), e responderam a um questionário

(Anexo 6) sobre a via de utilização da cocaína, tempo e frequência de uso, quantidade utilizada e uso associado à ingestão de bebida alcoólica.

Os códigos alfanuméricos dos adesivos coletores utilizados foram registrados nos questionários respondidos pelos respectivos pacientes.

Os critérios de inclusão dos pacientes no estudo foram: ser maior de 21 anos; não ter histórico de alergia a adesivos de qualquer tipo de curativo; não ter excesso de pêlo no local da aplicação do adesivo coletor e não apresentar qualquer tipo de lesão no mesmo local.

5.2.3.2 Coleta de suor

A aplicação e a retirada dos adesivos coletores de suor foram realizadas pelos funcionários das equipes de enfermagem das Clínicas, após treinamento adequado, conforme indicado nos Anexos 2 e 3.

Após a retirada, quando a almofada absorvente não pôde ser encaminhada para análise no mesmo dia, ela foi conservada à temperatura de 4°C até o momento da realização da análise.

5.2.3.3 Análise das amostras de suor

Foram analisadas 32 amostras de suor de 17 usuários de cocaína em abstinência, pacientes das clínicas para recuperação e tratamento de

dependentes de drogas, de acordo com o método padronizado no item 5.2.1.2 e esquematizado na figura 5.

5.2.4 Aplicação do método de enzimaímunoensaio (EMIT) em amostras de urina de pacientes

Assim como na coleta das amostras de suor, os responsáveis pela coleta das amostras de urina foram os funcionários da equipe de enfermagem das Clínicas.

Os frascos contendo urina (comuns) foram identificados e armazenados a 4°C até o momento do envio das amostras para a análise.

Foram analisadas 34 amostras dos mesmos 17 usuários de cocaína em abstinência

O método empregado para análise de urina, enzimaímunoensaio automatizado, é um método validado e amplamente utilizado para este tipo de análise (DADE BEHRING, 2002). O valor de referência (*cut off*) para cocaína é de 300 ng/mL.

6. RESULTADOS

6.1 Padronização do método

6.1.1 Coleta de suor

A região do corpo que se mostrou mais adequada para aplicação do adesivo coletor foi a parte superior do braço, região do músculo deltóide (Figura 5).

6.1.2 Extração e identificação da cocaína e cocaetileno nas amostras de suor

Nas figuras 6 e 7 estão representados os cromatogramas obtidos com a análise de amostras de referência negativa e positiva, utilizando como padrões internos os padrões deuterados de cocaína e cocaetileno. O tempo de retenção da cocaína foi 11,7 e do cocaetileno foi 12,3.



Figura 5: Adesivo coletor aplicado na região do músculo deltóide (PHARMCHEM, 1999)

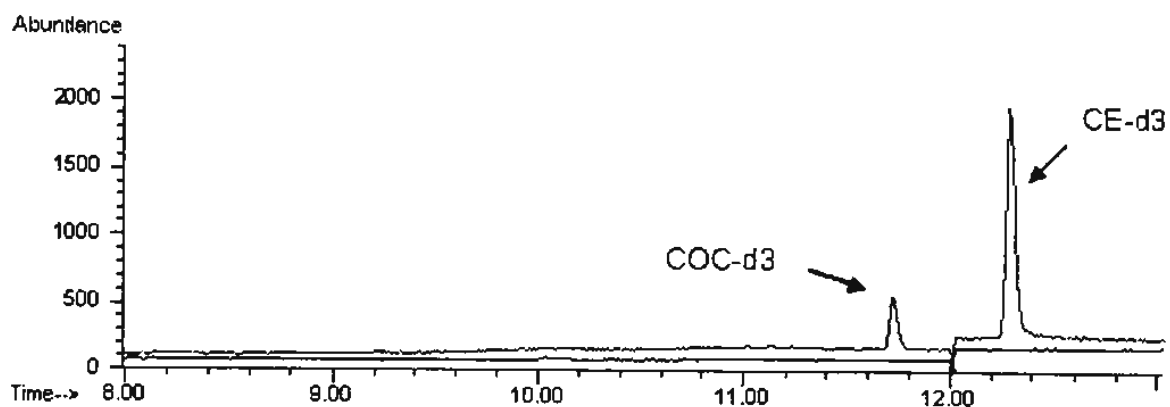


Figura 6: Perfil cromatográfico obtido com a análise de uma amostra de referência negativa, adicionada dos padrões internos (COC-d3 e CE-d3, cocaína e cocaetileno deuterados).

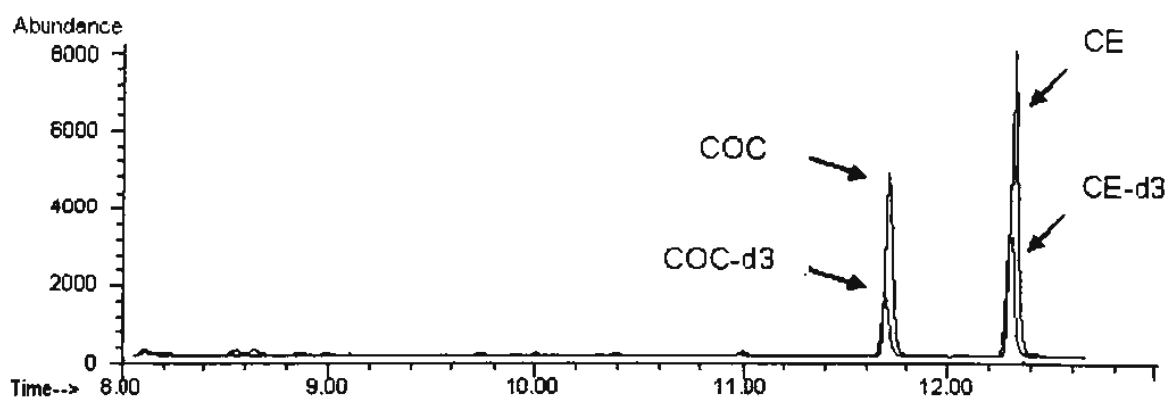


Figura 7: Perfil cromatográfico obtido com a análise de uma amostra de referência positiva (COC = cocaína, CE = cocaetileno), adicionada dos padrões internos (COC-d3 e CE-d3 = cocaína e cocaetileno deuterados).

6.2 Validação do método

6.2.1 Recuperação

Os estudos de recuperação com a concentração de 10 ng/mL ou 25 ng/adesivo coletor (valor de *cut off*) não indicaram perda significativa de analitos, principalmente por retenção na almofada absorvente. As médias de recuperação para cocaína e cocaetileno foram de 103% e 97%, respectivamente.

Na concentração de 50 ng/mL ou 125 ng/adesivo coletor as médias de recuperação para cocaína e cocaetileno foram de 58% e 50% respectivamente.

6.2.2 Precisão

Os coeficientes de variação (CV) obtidos no estudo de precisão intra-ensaio para cocaína e cocaetileno, na concentração de 10 ng/mL ou 25 ng/adesivo coletor, foram 6,9 e 7,0%, respectivamente. Os coeficientes de variação (CV) obtidos para a precisão interensaio na mesma concentração foram 3,6% para cocaína e 2,0% para cocaetileno.

Os coeficientes de variação (CV) obtidos no estudo de precisão intra-ensaio para cocaína e cocaetileno, na concentração de 50 ng/mL ou 125 ng/adesivo coletor, foram 5,9 e 5,5%, respectivamente. Os coeficientes de

variação (CV) obtidos para a precisão interensaio nesta concentração foram 7,6% para cocaína e 8,6% para cocaetileno.

6.2.3 Limite de detecção

O limite de detecção, determinado pelo método empírico descrito no item 5.2.2.3, foi de 5,0 ng/ml ou 12,5 ng/adeseivo coletor para ambos os analitos.

6.2.4 Estabilidade

Não foi observada perda significativa de cocaína (<2%) após estocagem das amostras de suor nas respectivas almofadas coletoras, conservadas em temperatura ambiente por sete dias e a 4°C por 14 dias. Para o cocaetileno foi observada uma perda de aproximadamente 17% no 5º dia de conservação em temperatura ambiente e no 14º dia em temperatura de 4°C.

Estes resultados estão sintetizados na Tabela 1.

6.3 Amostras de pacientes

As análises foram realizadas no Laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (LAT - FCF/USP).

Os resultados obtidos com as análises das amostras de suor e urina estão relacionados nas Tabelas 2 (pacientes que relataram o consumo de cocaína) e 3 (pacientes que não relataram o consumo de cocaína, mas a equipe clínica solicitou a análise).

Na Tabela 2 estão também relacionados os relatos dos pacientes estudados, no que se refere à via de exposição, quantidade de substância consumida, associação com bebida alcoólica, tempo e frequência de uso.

6.3.1 Amostras de suor

Das amostras analisadas (n=32), 19 apresentaram resultado positivo.

A Figura 8 mostra um exemplo de cromatograma, obtido com a análise da primeira amostra de suor do paciente nº 8.

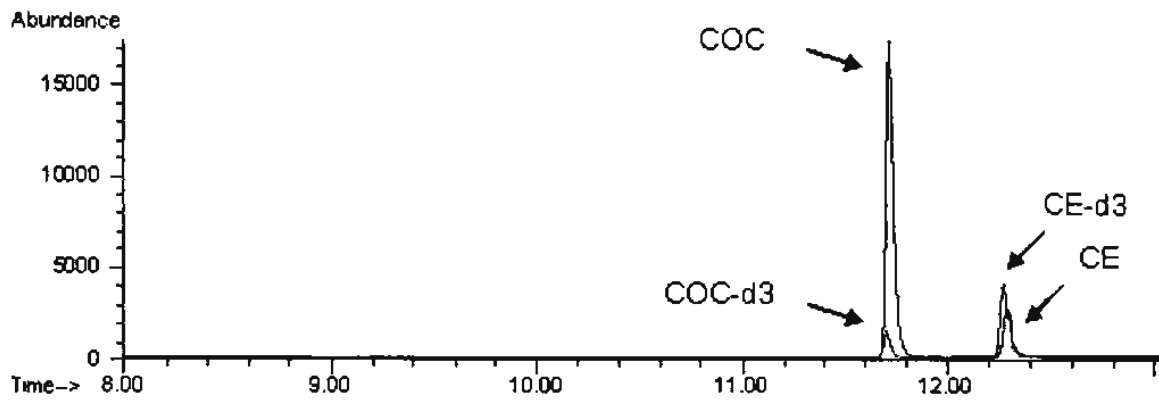


Figura 8: Perfil cromatográfico obtido com a análise da primeira amostra de suor do paciente n° 8.

6.3.2 Amostras de urina

Das amostras analisadas (n=34), 5 apresentaram resultado positivo.

Tabela 1: Resultados obtidos com a validação do método

	COCAÍNA	COCAETILENO
RECUPERAÇÃO (%)		
25 ng/adeseivo coletor	103	97
125 ng/adeseivo coletor	58	50
PRECISÃO INTRA-ENSAIO (CV%)		
25 ng/adeseivo coletor	6,9	7,0
125 ng/adeseivo coletor	5,9	5,5
PRECISÃO INTERENSAIO (CV%)		
25 ng/adeseivo coletor	3,6	2,0
125 ng/adeseivo coletor	7,6	8,6
ESTABILIDADE		
Temperatura ambiente (7 dias)	< 2%	20%
4° C (14 dias)	< 2%	17%
LIMITE DE DETECÇÃO	12,5 ng / adesivo coletor	12,5 ng / adesivo coletor

Tabela 2: Relatos dos pacientes e respectivos resultados obtidos com as análises das amostras de suor e urina

PACIENTES	VIA DE EXPOSIÇÃO	RELATO DA QUANTIDADE DE COCAÍNA	FREQUÊNCIA	TEMPO	ASSOCIAÇÃO DE BEBIDA ALCOÓLICA	PERÍODO DE USO DO ADESIVO	PERÍODO DE ABSTINÊNCIA	ADESIVOS USADOS		RESULTADO	
								ADESIVOS	USADOS	SUOR	URINA
1	IN	"pouco"	eventual	6 meses	sim	7 dias	20 dias	1		ND	ND
2	PULM	algumas pedras	diária	3 anos	não	7 dias	5 dias	1º		COC	ND
							12 dias	2º		ND	ND
							19 dias	3º		ND	ND
3	IN	2 ou 3 carreiras	pouca	1 ano	sim	7 dias	10 dias	1º		ND	ND
							17 dias	2º		ND	ND
4	PULM	1 ou 2 pedras	2-3 x /semana	2 meses	não	5 dias	7 dias	1		COC	ND
5	IN	5g	2 x /semana	2 meses	não	4 dias	1 dia	1º		COC	BE
							5 dias	2º		COC	ND
							9 dias	3º		PA	ND

LEGENDA: IN = intranasal; IV = intravenosa; PULM = pulmonar; ND = não detectado; PA = perda da amostra;
COC = cocaína; CE = cocaetileno; BE = benzoilecgonina

Continuação da Tabela 2: Relatos dos pacientes e respectivos resultados obtidos com as análises das amostras de suor e urina

PACIENTES	VIA DE EXPOSIÇÃO	RELATO DA QUANTIDADE DE COCAÍNA	FREQUÊNCIA	TEMPO	ASSOCIAÇÃO DE BEBIDA ALCOÓLICA	PERÍODO DE USO DO ADESIVO	PERÍODO DE ABSTINÊNCIA	ADESIVOS USADOS		RESULTADO	
								SUOR	URINA	SUOR	URINA
6	PULM	6 pedras	3 x / semana	15 dias	não	4 dias	4 dias	1º	COC	ND	ND
								2º	COC	ND	ND
7	IN	"bastante"	1-2 x / semana	1 mês	sim	4 dias	11 dias	1º	ND	ND	ND
							15 dias	2º	ND	ND	
							19 dias	3º	ND	ND	
8	IN	3g	diária	3 meses	sim	6 dias	2 dias	1º	COC/CE	BE	BE
							8 dias	2º	COC/CE	ND	
							14 dias	3º	PA	ND	
9	IV e IN	1g	2-3 x / semana	1 ano	sim	6 dias	2 dias	1º	COC	ND	
							8 dias	2º	CE	ND	
10	IN	2g	2 x / semana	1 ano	sim	6 dias	1/2 dia	1º	COC	BE	
							6 dias	2º	ND	ND	

LEGENDA: IN = intranasal; IV = intravenosa; PULM = pulmonar; ND = não detectado; PA = perda de amostra; COC = cocaína; CE = cocaetileno; BE = benzoilecgonina

Continuação da Tabela 2: Relatos dos pacientes e respectivos resultados obtidos com as análises das amostras de suor e urina

PACIENTES	VIA DE EXPOSIÇÃO	RELATO DA QUANTIDADE DE COCAÍNA	FREQUÊNCIA	TEMPO	ASSOCIAÇÃO DE BEBIDA ALCOÓLICA	PERÍODO DE USO DO ADESIVO	PERÍODO DE ABSTINÊNCIA	ADESIVOS USADOS	RESULTADO	RESULTADO
									SUOR	URINA
11	PULM + IN	1 mg	semanal	10 anos	não	6 dias	4 dias 10 dias	1º 2º	COC COC	ND ND
12	IN	7 papelotes	2-3 x /semana	1 ano	sim	6 dias	3 dias	1	COC/CE	BE
13	PULM	15 pedras	1/semana	2 meses	sim	1 dia 3 dias	4 dias 6 dias	1º 2º	COC/CE COC/CE	BE ND
14	PULM + IN	1 a 2 pedras ou 1 a 2 papelotes	diária	4 meses	não	5 dias	7 dias	1	COC	ND

LEGENDA: IN = intranasal; IV = intravenosa; PULM = pulmonar; ND = não detectado; PA = perda de amostra;
COC = cocaína; CE = cocaetileno; BE = benzoilecgonina

Tabela 3: Resultados obtidos com as análises solicitadas pela equipe clínica, das amostras de suor e urina de pacientes que não admitiram o uso de cocaína.

PACIENTES	PERÍODO DE USO DO ADESIVO	ADESIVOS USADOS	RESULTADO SUOR	RESULTADO URINA
15	3 dias	1º	ND	ND
	4 dias	2º	ND	ND
16	4 dias	1º	ND	ND
		2º	ND	ND
17	4 dias	1º	COC	ND
		2º	COC	ND

LEGENDA: COC = cocaína; ND = não detectado

Tabela 4: Períodos de detecção

SUBSTÂNCIA / MATRIZ BIOLÓGICA	PERÍODO DE DETECÇÃO	PERÍODO DE VERIFICAÇÃO
Cocaína / suor	Até 10 dias	16 dias
Cocaetileno / suor	Até 8 dias	14 dias
Benzoilecgonina / urina	Até 4 dias	6 dias

Tabela 5: Concordância entre relatos dos pacientes e resultados obtidos com pesquisa de cocaína no suor.

Nº PACIENTES	RELATOS	ABSTINÊNCIA	RESULTADOS
11	Uso	Até 10 dias	positivo
3	Uso	Mais de 10 dias	negativo
2	Não uso	-	negativo
1	Não uso	-	positivo

Tabela 6: Concordância entre relatos dos pacientes e resultados obtidos com pesquisa de cocaetileno no suor.

Nº PACIENTES	RELATOS	ABSTINÊNCIA	RESULTADOS
4	Uso associado	Até 8 dias	positivo
1	Uso associado	Até 8 dias	negativo
3	Uso associado	Mais de 8 dias	negativo
6	Não uso de álcool	-	negativo

7. DISCUSSÃO

Atualmente existe um grande interesse da comunidade científica especializada em estudar matrizes biológicas alternativas visando incrementar a abrangência e a eficácia das análises toxicológicas para identificar a exposição a drogas de abuso.

Em relação à utilização do suor como matriz biológica, foram encontrados poucos trabalhos na literatura científica internacional (nenhum destes utilizando a microextração em fase sólida) e não foi encontrado qualquer trabalho na literatura nacional.

Algumas questões relativas à análise do suor ainda estão sem respostas, tais como: o período de detecção das substâncias estudadas, a possível influência da contaminação externa, o valor de referência (*cut off*) e a validade da análise para identificar usuário de longo prazo.

Além dos aspectos citados acima, um fator que influenciou a decisão de realizar este estudo foi a perspectiva de poder identificar o consumo de cocaína durante um período de sete dias ou mais, realizando a coleta do suor por meio de adesivos coletores, onde as substâncias eliminadas por esta via de excreção se acumulam nas almofadas absorventes e são estáveis nestas.

Trabalhos publicados na literatura relatam que mesmo que o usuário tenha consumido a substância no primeiro dia de uso do adesivo, a possibilidade de detecção da mesma não será perdida até o final do período especificado pela metodologia empregada (BURNS & BASELT, 1995; KIDWELL, MARSHA, SMITH., 1997; HUESTIS *et al.*, 1999).

Este fato representa uma vantagem comparativamente à urina, que para avaliar o mesmo período (sete dias) exige, de maneira geral, três amostras considerando o tempo de meia-vida de cada fármaco.

A análise do suor pode ser uma ferramenta muito útil na vigilância de indivíduos em tratamentos ambulatoriais para a dependência a drogas de abuso ou em liberdade condicional, que são submetidos a visitas periódicas de acompanhamento (CONE *et al.*, 1994; HUESTIS & CONE, 1998). As visitas para realização de exame toxicológico podem ser menos freqüentes quando comparadas à utilização da urina como matriz biológica.

Além dessa aplicação, a análise do suor apresenta outras, atuais e futuras. Em investigações forenses, possibilita a obtenção de amostras na ausência de espécimes biológicos, por exemplo, por meio do suor impregnado em roupas de acusados ou vítimas, podendo fornecer evidências de uma possível exposição a drogas de abuso (PRESTON *et al.*, 1999).

Observou-se que as curvas de excreção de drogas no suor seguem o mesmo padrão da urina, sugerindo que este poderá ser uma matriz biológica alternativa para controle da dopagem. A análise do suor também poderá ser utilizada para avaliar a adesão do paciente a tratamentos farmacológicos ou prever o período fértil da mulher, monitorando a excreção de esteróides no suor, para prevenir ou promover a gravidez (KIDWELL, HOLLAND, ATHANASELIS., 1998).

O suor apresenta outras vantagens em relação à urina. Uma delas é que a urina pode ser diluída tanto *in vitro* como *in vivo*, o que pode gerar um resultado falso negativo. Tal procedimento é impraticável com a amostra de suor coletada por meio de adesivo coletor. O mesmo vale para outras substâncias que podem ser adicionadas à urina, com a intenção de alterar seu pH e também gerar resultados falso negativos.

A amostra de suor coletada por meio do adesivo coletor, seguindo criteriosamente os procedimentos de aplicação e retirada (Anexos 2 e 3) apresenta baixo risco de ser adulterada sem deixar sinais da violação. A mera observação macroscópica do adesivo coletor permite denunciar

qualquer tentativa de fraude. Neste estudo não foi verificada nenhuma tentativa de adulterar o adesivo coletor.

Outra vantagem do suor é a coleta não invasiva da amostra e com o mínimo de constrangimento, procedimento inevitável na coleta de urina que deve ser supervisionada para evitar os riscos de adulteração citados anteriormente. A aplicação e remoção do adesivo coletor são rápidas e práticas, não exigindo privacidade ou cuidados de segurança extremos.

Comparativamente à análise do cabelo, a análise do suor também apresenta vantagens. O suor apresenta quantidades detectáveis de cocaína mais frequentemente que amostras de cabelo; exige menor tempo de análise (não há necessidade de extensivas lavagens e procedimentos de extração); é adaptável para uso em campo; e a preocupação com interferência de cosméticos é muito menor (KIDWELL, MARSHA, SMITH, 1997). Além disso, o cabelo nem sempre é uma amostra viável porque o indivíduo pode cortá-lo intencionalmente, para evitar o exame.

Uma desvantagem da análise do suor seria o desconforto ocasionado pelo uso do adesivo coletor. Alguns trabalhos publicados na literatura relatam uma certa dificuldade de uso do adesivo coletor, declarando uma porcentagem de perda ou dano em torno de 12% (KIDWELL, HOLLAND, ATHANASELIS, 1998; TAYLOR *et al.*, 1998; WINHUSEN *et al.*, 2002). Neste estudo, a maioria dos voluntários não demonstrou resistência em usar o primeiro adesivo, mas esta aceitação mostrou-se progressivamente reduzida nas tentativas seguintes. Alguns indivíduos relataram desconforto ou irritação, retirando o adesivo antes do prazo.

Uma segunda desvantagem da análise do suor seria o custo, que é maior que o da análise da urina. Taylor *et al.* (1998) declararam um custo total da análise do suor coletado com adesivo coletor cinco vezes maior que a análise de urina. Neste estudo o custo da análise do suor foi ainda onerado pela necessidade de importação do adesivo coletor, que não é fabricado nem comercializado no Brasil.

O desenvolvimento de novas tecnologias em análises toxicológicas para verificar a exposição a drogas de abuso precisa levar em conta as semelhanças e as diferenças no padrão de abuso de drogas de cada país. Apesar de algumas similaridades, as diferenças culturais, sociais e legais criam situações específicas em cada país.

Leis nacionais e locais de cada país fornecem a sustentação para programas de análises toxicológicas que verificam a exposição a drogas de abuso, permitindo ou proibindo determinadas condutas que definem os programas, limitando as circunstâncias que as análises podem ser aplicadas e as ações que os resultados positivos podem gerar. Estatutos locais e nacionais também podem determinar o processo de coleta, manipulação das amostras, procedimento das análises e emissão de resultados.

Atualmente, parece haver uma adequada aceitação das matrizes alternativas pelos estatutos legais da maioria dos países, permitindo uma evolução continuada dessas matrizes, porém poucos países aprovaram legislação específica que fornece a base necessária para o desenvolvimento dessa tecnologia, para o nível de aceitação no sistema judicial como é praticado para o exame toxicológico na urina. O amadurecimento dessas tecnologias irá determinar a sua incorporação em leis da maioria dos países, buscando o avanço e a melhoria dos programas de análises para verificar a exposição a drogas de abuso (CONE, 2001).

Segundo a Pharmchem Laboratories Inc., que fabrica o adesivo coletor utilizado neste estudo e também realiza as análises dos mesmos, esse adesivo coletor e o procedimento técnico para detecção de drogas de abuso no suor, foram aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) e são aceitos como prova de exposição às drogas de abuso pelo sistema judicial norte-americano.

No Brasil, não existe qualquer regulamentação para programas de análises toxicológicas que verificam a exposição a drogas de abuso, nem para matrizes tradicionais e muito menos para matrizes alternativas. Os

laboratórios especializados seguem as regulamentações de entidades internacionais oficiais.

No caso da análise do suor, mesmo estas entidades ainda não têm todos os critérios e métodos padronizados.

A quantificação dos analitos presentes no suor, por exemplo, é uma questão duvidosa. No estudo da fisiologia da transpiração verificou-se que o volume de suor secretado num período de tempo definido é muito variável entre indivíduos e até em um mesmo indivíduo, já que depende de suas atividades diárias, do seu estado emocional e da temperatura ambiente (GUYTON,1977).

No caso de amostras de suor coletadas com adesivo coletor não oclusivo, existe mais uma dificuldade para a quantificação dos analitos que é a impossibilidade de se determinar o volume de suor secretado num período de tempo definido (BURNS & BASELT, 1995; KIDWELL, HOLLAND, ATHANASELIS., 1998; PRESTON *et al.*, 1999).

Para a obtenção desta medida, seria necessária a utilização de adesivos coletores oclusivos que já caíram em desuso, uma vez que provocam freqüentes reações dermatológicas como conseqüência da retenção de umidade, da alteração do pH do meio e da proliferação de bactérias (BURNS & BASELT, 1995).

Pelas razões apresentadas, optou-se por utilizar o adesivo coletor não oclusivo que, em concordância com a informação prestada pelo fabricante, não provocou reações dermatológicas na grande maioria dos participantes do estudo, mas prejudicou a quantificação dos analitos.

Até mesmo o adesivo coletor não oclusivo, que não contém qualquer produto químico na almofada absorvente, eventualmente pode provocar reações alérgicas à cola empregada. O fabricante declara que a ocorrência deste tipo de reação dermatológica é muito rara (PHARMCHEM, 1999). Burns & Baselt (1995) e Cone *et al.* (1994) confirmaram essa declaração.

No presente estudo, um único voluntário entre aproximadamente quarenta que utilizaram o adesivo coletor, apresentou reação dermatológica. Este indivíduo já havia desenvolvido reação alérgica a outro tipo de fita adesiva, mas não lembrou de relatar no questionário prévio a que foi submetido (Anexo 6).

O fabricante do adesivo coletor eleito recomenda a aplicação do mesmo na região dorsal inferior ou na parte superior do braço, região do músculo deltóide, e que o usuário pode levar vida normal enquanto estiver usando o adesivo coletor, podendo inclusive tomar banho de piscina (PHARMCHEM, 1999).

Na literatura, alguns autores relataram a aplicação dos adesivos na região abdominal e dorsal (CONE *et al.*, 1994; PRESTON *et al.*, 1999). Burns & Baselt, (1995) observaram que aplicando os adesivos na região do músculo deltóide, a perda dos mesmos foi menor.

No presente estudo, quando os adesivos coletores foram aplicados na região dorsal inferior, ocorreram alguns descolamentos sem que o usuário tenha percebido. É provável que este fato decorra das condições tropicais do país, que favorecem a sudorese mais intensa e a maior frequência de banhos, incluindo aqueles feitos com imersão (banheira, piscina e outros).

A partir disso, a região do músculo deltóide foi escolhida como a melhor região para aplicação do adesivo coletor, porque o mesmo fica mais visível para o usuário conferir seu estado de conservação, sofre menos o efeito do atrito com as roupas e da flexão do corpo, o efeito da sudorese intensa não prejudica tanto a aderência e na opinião dos usuários o incômodo é menor.

Uma vez definido o local da aplicação, a limpeza da pele foi realizada com os lenços umedecidos em isopropanol para evitar a contaminação por bactérias, fármacos ou qualquer interferente presente na mesma, além de melhorar a aderência do adesivo (PHARMCHEM, 1999).

Na literatura são encontrados trabalhos que discutem a eficiência desta limpeza recomendada pelo fabricante do adesivo coletor e também a impermeabilidade da membrana do mesmo adesivo. Alguns autores demonstraram que a contaminação externa da pele, assim como a contaminação da membrana do adesivo, podem gerar resultados falso-positivos (CROUCH, METCALF, SLAWSON, 2002; KIDWELL *et al.*, 2003; KIDWELL & SMITH, 2001; LEVISKY *et al.*, 2001).

Existe uma grande discussão sobre a possibilidade da análise do suor identificar não apenas o uso, mas também a contaminação externa às drogas de abuso.

Familiares não usuários, inclusive crianças, que convivem com indivíduos usuários de cocaína, foram submetidos a análises para verificar a exposição a drogas e alguns apresentaram resultados positivos em análise de suor, confirmando a contaminação ambiental (SMITH & KIDWELL, 1996).

Kidwell *et al.* (2003) analisaram a persistência de 1 μ g de cocaína aplicado na pele humana, após higiene normal somada à limpeza com isopropanol recomendada pelo fabricante do adesivo coletor. A cocaína permaneceu detectável por até três dias, porém com níveis muito baixos.

Crouch *et al.* (2002) desenvolveram um trabalho no qual concluíram que a limpeza da pele com isopropanol ou sabonete, seguida de outra limpeza com isopropanol foi efetiva para remover 100 ng de cocaína previamente aplicados na pele. Nenhum adesivo coletor, aplicado após este esquema de limpeza, apresentou resultado positivo para cocaína. Os autores concluíram que a limpeza com sabonete e isopropanol foi mais efetiva que a limpeza repetida (duas vezes) com isopropanol.

No presente estudo, as recomendações técnicas do fabricante para a limpeza da pele foram seguidas e os resultados obtidos mostraram-se conforme o esperado.

A aplicabilidade da análise do suor em usuários crônicos também é questionada por alguns pesquisadores, uma vez que não está claro se a cocaína que aparece no adesivo coletor provém de uso atual, uso passado, contaminação externa atual, contaminação externa passada ou uma combinação de todos estes fatores (KIDWELL *et al.*, 2003).

O estudo realizado por Jufer *et al.* (2000) parece ter sido o primeiro a analisar a distribuição e eliminação da cocaína após uma administração a longo prazo. A meia-vida encontrada após exposição intravenosa foi de 0,26 a 3,44 horas; após exposição intranasal foi de 0,55 a 4,79 horas; e após exposição oral foi de 0,78 a 0,9 h. Assim sendo, o autor estabeleceu que a meia vida média da cocaína após exposição crônica é de 1,5 hora.

Existem evidências de que, após exposição crônica, substâncias lipofílicas podem ficar depositadas no tecido adiposo. Levisky *et al.* (2000) demonstraram que surpreendentemente, apesar da cocaína apresentar tendência hidrofílica, ela também se acumula na gordura e na pele. Segundo este autor, o tempo de transporte de substâncias do tecido adiposo para a superfície da pele pode ser relativamente curto ou extremamente longo dependendo da razão de transição entre as camadas, do mecanismo de transporte, do grau de reversibilidade e da magnitude das constantes de equilíbrio. Portanto o uso do adesivo coletor em usuários crônicos não seria indicado, pela possibilidade de indicar falsamente que ocorreu um novo uso.

Este efeito não foi observado neste estudo. O paciente nº 2 relatou em seu questionário, que vinha fazendo uso diário de cocaína há cerca de três anos. Doze dias após o último uso, já não foi detectada cocaína em seu suor.

O período de uso dos adesivos coletores pelos voluntários foi inicialmente definido como sendo de sete dias conforme orientação do fabricante (PHARMCHEM, 1999). Contudo, alguns fatores determinaram a alteração deste prazo: início de descolamento do adesivo, desconforto do paciente, escalas da equipe de enfermagem treinada e eventual desistência

do tratamento por parte do paciente. Esta alteração não interferiu no estudo, pois segundo Burns & Baselt (1995) a concentração máxima de cocaína no suor ocorre vinte e quatro horas após o consumo (BURNS & BASELT, 1995).

O tampão escolhido para eluir os analitos da almofada absorvente foi o tampão acetato 0,5M, proposto por HUESTIS *et al.* em 1999, pela facilidade de aquisição, de preparação e compatibilidade com a fibra de microextração em fase sólida (SPME).

Após alguns experimentos prévios, o tempo de contato desta solução com a almofada absorvente foi definido em quinze minutos sem agitação, seguido da centrifugação a 300g durante dez minutos. Os estudos de recuperação das substâncias analisadas na concentração de 10 ng/mL ou 25 ng/adesivo coletor (valor de referência proposto pelo Substance Abuse and Mental Health Services Administration - SAMHSA), mostraram que não houve perda significativa de analitos por retenção na almofada absorvente, pois os resultados estiveram próximos os de 100%.

Para extrair a cocaína e o cocaetileno do eluato, foi estudada a aplicação da técnica relativamente nova de microextração em fase sólida (SPME). Esta técnica apresenta uma série de vantagens sobre as técnicas convencionais de extração porque não requer a utilização de solvente orgânico, que constitui uma possível fonte de contaminação e gera a necessidade de descarte especial; o procedimento é simples e rápido, com pouca manipulação da amostra; o dispositivo básico é reutilizável, bastando trocar apenas o conjunto fibra e agulha de aço, quando necessário; e a técnica se mostra perfeitamente adequada à posterior análise cromatográfica.

A eficiência da extração depende da partição ou adsorção dos analitos de interesse, entre a fase extratora imobilizada sobre a fibra e a matriz biológica, e o tempo em que a fibra fica em contato com a amostra

(SNOW, 2000; LORD & PAWLISZYN, 2000; THEODORIDIS *et al.*, 2000; ULRICH, 2000).

A fibra é extremamente frágil, razão pela qual ela deve ficar retraída dentro da agulha de aço durante operações que possam danificá-la, tais como a de transporte e a de perfurar o septo do injetor do cromatógrafo.

Nas primeiras análises, foi constatada uma dificuldade de adaptação da SPME à metodologia que estava sendo desenvolvida, porque o mecanismo de exposição da fibra estava sendo danificado com frequência anormal. Após intensa observação, admitiu-se a hipótese de que minúsculas fibras da almofada absorvente estariam se soltando e poderiam estar danificando o dispositivo de SPME. Os eluatos passaram a ser filtrados antes da microextração em fase sólida e a dificuldade foi superada.

Esta fibra, embora apresente um custo elevado no Brasil por se tratar de material importado, é capaz de realizar aproximadamente cem injeções, o que torna sua relação custo-benefício bastante favorável.

Neste estudo, inicialmente foi feita uma tentativa de padronizar a identificação da cocaína por meio da Cromatografia em fase gasosa com detector de Nitrogênio-Fósforo (Farina *et al.*, 2002). Os resultados não foram satisfatórios devido a sensibilidade conseguida para esta identificação.

A Espectrometria de Massa associada à Cromatografia em fase gasosa (GC/MS) foi avaliada posteriormente e apresentou sensibilidade, precisão e exatidão adequadas para esta identificação.

Para a identificação das áreas de cada analito, foram monitorados os íons 182, 272 e 303 para a cocaína e 196, 272 e 317 para o cocaetileno. Os de menor peso molecular são os mais abundantes, mas os de peso molecular médio e alto, apesar de apresentarem menor intensidade, são mais específicos e tendem a apresentar menor ocorrência de interferentes (YONAMINE, 2000).

A não disponibilidade de amostras certificadas, com concentrações conhecidas de cocaína e cocaetileno no suor, dificultou a avaliação de determinados parâmetros de validação como, por exemplo, a recuperação propriamente dita.

Para resolver esta dificuldade foram utilizados no estudo de validação do método, amostras de referência positiva (descritas no item 5.1.4.2) e foram avaliados os itens: recuperação dos analitos da almofada coletora, precisão intra e interensaio, limite de detecção e estabilidade.

Os parâmetros do estudo de validação foram obtidos partindo das concentrações de 25 e 125 ng de cocaína e cocaetileno por adesivo coletor, sendo a primeira concentração equivalente ao valor de referência (*cut off*), proposto pelo Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA) para cocaína no suor.

Como já foi dito anteriormente, na concentração de 25 ng/adesivo coletor (*cut off* proposto pelo SAMHSA) os resultados do estudo da recuperação foram excelentes, em torno de 100%. Na concentração de 125 ng/adesivo coletor esses resultados (em torno de 50%) não foram os esperados, provavelmente devido à alta concentração escolhida para o estudo: cinco vezes a concentração considerada como valor de referência.

O uso do critério "valores de referência" (*cut off*), é prática comum de reportar resultados positivos na área de drogas de abuso, porém esta foi outra dificuldade encontrada neste estudo. Não existe consenso sobre o valor de referência para a detecção de cocaína no suor.

Alguns pesquisadores preconizam um valor de 5 ng/mL para a detecção de cocaína no suor por Espectrometria de Massa associada à Cromatografia em fase gasosa (GC/MS) (PRESTON *et al.*, 1999). A entidade Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA) preconiza um valor de 10 ng/mL ou 25 ng/adesivo coletor. Outros autores sugerem *cut offs* mais elevados (50 ou 70 ng/mL) visando diminuir a

ocorrência de falsos positivos em virtude da contaminação externa (KIDWELL & SMITH, 2001; KIDWELL *et al.*, 2003).

Apesar da substância inalterada ser predominante e estável em amostras de suor (KIDWELL, HOLLAND, ATHANASELIS, 1998), a detecção de produtos de biotransformação poderia aumentar a segurança dos resultados positivos, permitindo distinguir a contaminação ambiental do consumo da substância. Decidiu-se experimentar a extração e detecção da benzoilecgonina, principal produto de biotransformação da cocaína, que devido a sua natureza polar exige um passo adicional na técnica, a derivação, que foi realizada com acetonitrila, piridina e butilclorofornato. Os estudos de recuperação não foram satisfatórios, pois os cromatogramas não apresentaram os resultados esperados devido à presença de vários interferentes.

Estudos encontrados na literatura demonstraram que a quantidade de benzoilecgonina excretada no suor é muito pequena, menor que 10% da quantidade de cocaína (BURNS & BASELT, 1995; HUESTIS *et al.*, 1999). A benzoilecgonina pode estar presente em pequena escala na droga de rua, podendo provocar contaminação externa ou poderia ser produto da degradação da cocaína na pele, pois o suor contém esterases não específicas e outras enzimas que podem degradar a cocaína que se deposita na superfície da pele (KIDWELL, HOLLAND, ATHANASELIS, 1998; KIDWELL & SMITH, 2001; KIDWELL *et al.*, 2003). Por estas razões, somadas à dificuldade analítica, a benzoilecgonina não foi pesquisada nas análises realizadas.

A pesquisa de cocaetilenol no suor foi realizada, apesar da pequena quantidade que é perceptível somente após o consumo de grandes doses de cocaína e álcool (KIDWELL, 1998; HUESTIS *et al.*, 1999), devido ao fato desta associação ser bastante freqüente entre os usuários e também por que esta substância pôde ser analisada da mesma forma que a cocaína.

No presente estudo, dos quatorze pacientes que declararam consumo de cocaína, oito responderam afirmativamente à questão da associação com bebida alcoólica (aproximadamente 57%). Dos cinco pacientes que relataram consumo recente (até oito dias), em quatro foi constatada a presença de cocaetileno no suor representando uma correlação entre relato e resultado de análise da ordem de 80% (Tabela 6).

Foi observado um fato inesperado quando as análises seriadas do paciente nº 9, que declarou o uso associado de cocaína e álcool, foram realizadas: no primeiro adesivo coletor foi constatada apenas a presença de cocaína e no segundo adesivo analisado, foi identificado apenas o cocaetileno (Tabela 2).

Com a aplicação de mais de um adesivo coletor em seqüência foi possível a detecção de cocaína no suor por até dez dias após o último consumo e de cocaetileno por até oito dias (Tabela 4).

Foram analisadas 32 amostras de suor e 34 amostras de urina porque os pacientes no 5 e 8 perderam a terceira amostra de suor. O paciente nº 5 relatou descolamento do adesivo durante banho de piscina e o paciente nº 8 alegando irritação e desconforto retirou e desprezou seu adesivo (Tabela 2).

Os resultados obtidos nas análises das amostras de urina só permitiram comprovar a exposição de cinco pacientes, á cocaína. O período de detecção da benzoilecgonina, principal produto de biotransformação da cocaína presente na urina, foi de no máximo quatro dias após o último episódio de consumo (Tabela 4), próximo do período obtido por Guimarães (1998). No caso do paciente nº 17, que a equipe clínica suspeitou de exposição à cocaína apesar da sua negação, o exame de urina não confirmou a suspeita (Tabela 3).

Foi observada uma grande correlação (aproximadamente 94%) entre o relato dos pacientes e os resultados analíticos. Dos dezessete pacientes estudados: onze declararam uso recente de cocaína e os respectivos

resultados das análises no suor foram positivos; três declararam último uso há mais de dez dias e os resultados foram negativos; três declararam não uso e os resultados foram negativos para dois (Tabela 5). Apenas o resultado do paciente nº 17 (Tabela 3) ficou em desacordo com o seu relato, que negava o consumo da droga. Esta correlação existe, provavelmente, porque os pacientes estavam cientes da realização das análises. Este resultado está muito próximo do encontrado no estudo realizado por Odo (1999).

O questionário foi aplicado visando a obtenção de informações supostamente importantes para a interpretação dos resultados das análises, porém os relatos dos pacientes quanto à quantidade de cocaína consumida e a frequência de uso foram imprecisos, impossibilitando uma correlação com os resultados das análises.

8. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos foi possível concluir que:

- O método desenvolvido e validado demonstrou ser prático e eficiente para detecção de cocaína e cocaetileno no suor.
- Nas amostras de suor, a cocaína foi detectada até dez dias após a última exposição e o cocaetileno até oito dias.
- Nas amostras de urina, a benzoilecgonina foi identificada até quatro dias após a última exposição.
- Foi constatada a presença de cocaetileno no suor em 80% dos pacientes que relataram a associação recente de cocaína e bebida alcoólica (até oito dias).
- Ficou demonstrada uma concordância de 94% entre o relato dos pacientes referente à exposição e os resultados das análises do suor para detecção de cocaína e cocaetileno.
- O suor é uma matriz biológica adequada para verificar a exposição à cocaína, associada ou não à ingestão de bebida alcoólica.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.*, Washington, v.40/47, p.1233-1238, 1994.

ANVISA. Medicamentos. Legislação. Resolução. *Resolução n.391, de 09 de agosto de 1999: anexo III.* Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/391_99.htm. Acesso em: 08 fev. 2003.

BAUMKARTEN, S.T. *O significado da drogadição no contexto da adolescência, da família e da instituição: um estudo sobre usuários e abusadores de merla do Distrito Federal.* Brasília, 2001. Tese de Doutorado – Faculdade de Psicologia – Universidade de Brasília.

BONO, J.P. Criminalistics: introduction to controlled substances. In: KARCH, S.B., ed. *Drug abuse handbook.* Boca Raton: CRC Press, 1998. p.10-14.

BRITO, A.M.; CASTILHO, E.A.; SZWARCOWALD, C.L. AIDS e infecção pelo HIV no Brasil: uma epidemia multifacetada. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Rio de Janeiro, v.34, p.2-18, 2001.

BURNS, M.; BASELT, R.C. Monitoring drug use with a Sweat Patch: an experiment with cocaine. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.19, p.41-48, 1995.

CAMPOS, S.V. *Avaliação da exposição à cocaína da análise toxicológica em unha*. São Paulo, 2002. 120p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

CARLINI, E.A.; GALDURÓZ, J.C.F.; NOTO, A.R.; NAPPO, S.A. *Primeiro levantamento nacional sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: Estudo envolvendo as 107 maiores cidades do país*: 2001. São Paulo: CEBRID, UNIFESP, 2002. 380p.

CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÕES SOBRE DROGAS PSICOTRÓPICAS. *IV Levantamento sobre o uso de drogas entre estudantes de 1º e 2º graus em 10 capitais brasileiras, 1997*. Disponível em: <http://www.cebrid.epm.br/estudantes/index.htm>. Acesso em: 09 abr. 2004.

CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÕES SOBRE DROGAS PSICOTRÓPICAS. *I Levantamento Domiciliar Nacional sobre o uso de drogas psicotrópicas: estudo envolvendo as 24 maiores cidades do Estado de São Paulo, 1999*. Disponível em: <http://www.cebrid.epm.br/levdomiciliar/index.htm>. Acesso em: 09 abr. 2004.

CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÕES SOBRE DROGAS PSICOTRÓPICAS. *Internações decorrentes do uso de psicotrópicos no Brasil: Uma avaliação epidemiológica do período de 1988-1999, 2001*. Disponível em: <http://www.unifesp.br/dpsicobio/boletim/ed44/9.htm>. Acesso em: 31 mai. 2004.

CHASIN, A.A.M.; CARVALHO, D.G.; PEDROZO, M.F.M. Levantamento das apreensões de uso de crack/cocaína em São Paulo no período de 1993 -1997. *Rev. Bras. Toxicol.*, São Paulo, v.12, n.2, p.122, 1999.

CHASIN, A.A.M.; MIDIO, A.F. Exposição humana à cocaína e ao cocaetileno: disposição e parâmetros toxicocinéticos. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo*, São Paulo, v.33, n.1, p.1-12, 1997.

CHASIN, A.A.M.; NASCIMENTO, E.S.; RIBEIRO-NETO, L.M.; SIQUEIRA, M.E.P.B.; ANDRAUS, M.H.; SALVADORI, M.C.; FERNÍCOLA, N.A.G.; GORNI, R. SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. *Rev. Bras. Toxicol.*, São Paulo, v.11, n.1, p.1-6, 1998.

CHASIN, A.A.M.; SILVA, E.S. Estimulantes do sistema nervoso central. In: OGA, S. *Fundamentos de toxicologia*. São Paulo: Atheneu, 2003. p.239-257.

CONE, E.J. Legal, workplace, and treatment drug testing with alternate biological matrices on a global scale. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.121, p.7-15, 2001.

CONE, E.J.; HILLSGROVE, M.J.; JENKINS, A.J.; KEENAN, R.M.; DARWIN, W.D. Sweat testing for heroin, cocaine, and metabolites. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.18, p.298-305, 1994.

CROUCH, D.I.; METCALF, C.L.; SLAWSON, M.H. An assessment of the effectiveness of the PharmChek TM sweat patch skin cleansing procedures. *Bull. Int. Assoc. Forensic Toxicol.*, Newport Beach, v.32, p.5-8, 2002.

DADE BEHRING. Syva® Emit® d.a.u.® Cocaine metabolite assay. Cupertino, 2004 (Package insert).

EREMENKO, A.V.; BAUER, C.G.; MAKOVER, A.; KANNE, B.; BAUMGARTEN, H.; SCHELLER, F.W. The development of a non-competitive immunoenzymometric assay of cocaine. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v.358, p.5-13, 1998.

FARINA, M.; YONAMINE, M.; SILVA, O.A. One-step liquid-liquid extraction of cocaine from urine samples for gas chromatographic analysis. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.3351, p. 1-4, 2002.

FERRI, C.P.; DUNN, J. Overdose por cocaína – uma revisão crítica. *Rev. Bras. Clin. Ter.*, São Paulo, v.25(5), p. 185-191, 1999.

FOLLADOR, M.J.D.; YONAMINE, M.; SILVA, O.A. Detecção de cocaína e cocaetileno em suor por espectrometria de massa associada à cromatografia em fase gasosa (GC/MS). *Rev. Bras. Toxicol.*, São Paulo, v.16, n.1, p.97, 2003.

GRUPO INTERDISCIPLINAR DE ESTUDOS DO ÁLCOOL E DROGAS. Publicações. Drogas. Cocaína. Disponível em: http://www.grea.org.br/publicação/drogas/drogas_cocaina.htm. Acesso em: 09 abr. 2004.

GUIMARÃES, I.M. *Determinação do período de detecção de benzoilecgonina urinária em usuários de cocaína por imunofluorescência polarizada*. São Paulo, 1998. 105p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

GUYTON, A.C. Temperatura corporal, regulação de temperatura e febre. In: _____. *Tratado de fisiologia médica*. Rio de Janeiro: Interamericana, 1977. cap.72, p.841-853.

HUESTIS, M.A.; CONE, E.J. Alternative drugs, specimens and approaches for non-regulated drug testing. In: KARCH, S.B., ed. *Drug abuse handbook*. Boca Raton: CRC Press, 1998. p.799-857.

HUESTIS, M.A.; OYLER, J.M.; CONE, E.J.; WSTADIK, A.T.; SCHOENDORFER, D.; JOSEPH, R.E. Sweat testing for cocaine, codeine and metabolites by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.733, n.1/2, p.247-264, 1999.

JOSEPH, R.E.; OYLER, J.M.; WSTADIK, A.T.; OHUOHA, C.; CONE, E.J. Drug testing with alternative matrices. I. Pharmacological effects and disposition of cocaine and codeine in plasma, sebum, and stratum corneum. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.22, p.6–17, 1998.

JUFER, R.A.; WSTADIK, A.; WALSH, S.L.; LEVINE, B.S.; CONE, E.J. Elimination of cocaine and metabolites in plasma, saliva, and urine following repeated oral administration to human volunteers. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.24, p.467-477, 2000.

KIDWELL, D.A.; HOLLAND, J.C.; ATHANASELIS, S. Testing for drugs of abuse in saliva and sweat. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.713, n.1, p.111-135, 1998.

KIDWELL, D.A.; KIDWELL, J.D.; SHINOHARA, F.; HARPER, C.; ROARTY, K.; BERNADT, K.; McCAULLEY, R.A.; SMITH, F.P. Comparison of daily urine, sweat and skin swabs among cocaine users. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.133, p.63-78, 2003.

KIDWELL, D.A.; MARSHA, A.B.; SMITH, F.P. Cocaine detection in a university population by hair analysis and skin swab testing. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.84, p.75-86, 1997.

KIDWELL, D.A.; SMITH, F.P. Susceptibility of PharmChek™ drugs of abuse patch to environment contamination. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.116, p.89-106, 2001.

LARANJEIRA, R., OLIVEIRA, R.A.; NOBRE, M.R.C.; BERNARDO, W.M., coords. *Usuários de substâncias psicoativas: abordagem, diagnóstico e tratamento*. 2.ed. São Paulo: Conselho Regional de Medicina do Estado de São Paulo/Associação Médica Brasileira, 2003. p. 13-28; 93-106.

LARINI, L. *Toxicologia*. 3.ed. São Paulo: Manole, 1997. p.267-283.

LEITE, M.C. História da cocaína. In: LEITE, M.C.; ANDRADE, A.G. *Cocaína e crack: dos fundamentos ao tratamento*. Porto Alegre: Artes Médicas, 1999. p.15-29.

LEITE, M.C. Abuso e dependência de cocaína. In: LEITE, M.C.; ANDRADE, A.G. *Cocaína e crack: dos fundamentos ao tratamento*. Porto Alegre: Artes Médicas, 1999. p.25-41.

LEVISKY, J.A.; BOWERMAN, D.L.; JENKINS, W.W.; JOHNSON, D.G.; LEVISKY, J.S.; KARCH, S.B. Comparison of urine to sweat patch test result in court ordered testing. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.122, p.65-68, 2001.

LEVISKY, J.A.; BOWERMAN, D.L.; JENKINS, W.W.; KARCH, S.B. Drug deposition in adipose tissue and skin: evidence for an alternative source of positive sweat patch tests. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.110, p.35-46, 2000.

LIU, R.H.; GOLDBERGER, B.A., eds. *Handbook of workplace drug testing*. Washington: AACC Press, 1995. p.812-816.

LOPES, A.L.; VALENTE, A.L.P.; AUGUSTO, F. Microextração em fase sólida. *Analytica*, São Paulo, v.1, p.25-31, 2002.

LORD, H.; PAWLISZYN, J. Microextraction of drugs. *J. Chromatogr., A*, Amsterdam, v.902, p.17-63, 2000.

MOODY, D.E.; CHEEVER M.L. Evaluation of immunoassay for semiquantitative detection of cocaine and metabolites or heroin and metabolites in extracts of sweat patches. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.25, p190-197, 2001.

NATIONAL INSTITUTE OF DRUG ABUSE. Costs to Society. Disponível em <http://www.drugabuse.gov/infobox/costs.html>. Acesso em 09 abril 2004.

NEEDLEMAN, S.B.; ROMBERG, R.W. Limits of linearity and detection for some drugs of abuse. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.14, p.34-38, 1990.

ODO, S.A. *Avaliação da confiabilidade do relato de uso de cocaína em pacientes sob tratamento ambulatorial através da análise toxicológica da urina por imunofluorescência polarizada*. São Paulo, 1999. 92p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

PEAT, M.; DAVIS, A.E. Analytical considerations and approaches for drugs. In: KARCH, S.B., ed. *Drug abuse handbook*. Boca Raton: CRC Press, 1998. p.751-764.

PECHANSKY, F.; DIEMEN, L.V.; GENRO, V. Presença de situações de risco para a transmissão do HIV em usuários de drogas não-injetáveis. *Rev. Psiq. Clin.*, São Paulo, v.28-3, p. 157-159, 2001.

- PHARMCHEM LABORATORIES. Drugs of abuse patch. Haltom, 1999. [Training Manual for the application, removal and transport of the PharmChek® Sweat Patch].
- PRESTON, K.L.; HUESTIS, M.A.; WONG C.J.; UMBRIGHT, A.; GOLDBERGER, B.A.; CONE, E.J. Monitoring cocaine use in substance abuse treatment patients by sweat and urine testing. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.23, p.313-321, 1999.
- SILVA, O.A.; ODO, S.A. Toxicologia da cocaína. In: LEITE, M.C.; ANDRADE, G. *Cocaína e crack: dos fundamentos ao tratamento*. Porto Alegre: Artmed, 1999. p.15-41.
- SILVA, O.A.; YONAMINE, M. Drug abuse among Brazilian workers. In: SYMPOSIUM ON WORKPLACE DRUG TESTING, 2, Rimini, 2000. *Abstracts*. Rimini: European Workplace Drug Testing Society, 2000a. p.56.
- SILVA, O.A.; YONAMINE, M.; FARINA, M. One-step liquid-liquid extraction of cocaine from urine samples for gas chromatographic analysis. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.3351, p.1-4, 2002.
- SMITH, F.P.; KIDWELL, D.A. Cocaine in hair, saliva, skin swabs, and urine of cocaine users' children. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.83, p.179-189, 1996.
- SNOW, N.H. Solid-phase micro-extraction of drugs from biological matrices. *J. Chromatogr., A*, Amsterdam, v.885, n.1/2, p.445-455, 2000.

SPIEHLER, V.; FAY J.; FOGERSON, R.; SCHOENDORFER, D.; NIEDBALA, R.S. Enzyme immunoassay validation for qualitative detection of cocaine in sweat. *Clin. Chem.*, Washington, v.42, p.34-38, 1996.

TAYLOR, J.R.; WATSON, I.D.; TAMES, F.J.; LOWE, D. Detection of drug use in a methadone maintenance clinic: sweat patches versus urine testing. *Addiction*, Abingdon, v.93, p.847-853, 1998.

THEODORIDIS, G.; KOSTER, E.H.M.; JONG, G.J. Solid-phase microextraction for the analysis of biological samples. *J. Chromatogr., A*, Amsterdam, v.745, p.49-82, 2000.

TOLEDO, F.C.P. *Identificação de benzoilecgonina por imunofluorescência polarizada em cabelo de usuários de cocaína*. São Paulo, 1999. 97p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

TOLEDO, F.C.P.; YONAMINE, M.; MOREAU, R.L.M.; SILVA, O.A. Determination of cocaine, benzoylecgonine and cocaethylene in human hair by solid-phase microextraction and gas chromatography – mass spectrometry. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, Amsterdam, v.798, p.361-365, 2003.

ULRICH, S. Solid-phase micro-extraction in biomedical analysis. *J. Chromatogr., A*, Amsterdam, v.902, p.167-194, 2000.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUG AND CRIME. Perfil do País. Disponível em: http://www.unodc.org/pdf/brazil/brazil_country_profile_2003_port.pdf. Acesso em: 07 fev. 2004.

WINHUSEN, T.M.; SOMOZA, E.C.; SINGAL, B.; KIM, S.; HORN, P.S.; ROTROSEN, J. Measuring outcome in cocaine clinical trials: a comparison of sweat patches with urine toxicology and participant self-report. *Addiction*, Abingdon, v.98, p.317-324, 2002.

YONAMINE, M. *Derivação de benzoilecgonina urinária com diazometano para verificação da exposição à cocaína por técnicas cromatográficas*. São Paulo, 2000. 96p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

YONAMINE, M.; TAWIL, N.; MOREAU, R.L.M.; SILVA, O.A. Solid-phase micro-extraction -gas chromatography-mass spectrometry and headspace-gas chromatography of tetrahydrocannabinol, amphetamine, methamphetamine, cocaine and ethanol in saliva samples. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, Amsterdam, v.789, n.1, p.73-78, 2003.

ZIEGLER, T.; EIKENBERG, O.; BILITEWISKI, U.; GROL, M. Gas phase detection of cocaine by means of immunoanalysis. *Analyst*, Letchworth, v.121, p.119-125, 1996.

ANEXOS



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 64

São Paulo, 24 de junho de 2003.

Ilmo(a) Sr(a).
Maria José Damas Follador

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 23 de junho p.passado, **APROVOU** o projeto "Avaliação do uso do suor como matriz biológica para detectar o consumo de cocaína" (Protocolo nº 182) apresentado por Vossa Senhoria.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 - item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Prof. Tit. Dulcineia Saes Parra Abdalla
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP

Orientador: Prof. Ovandir Alves Silva
FBC

Anexo 2: Procedimento de aplicação do adesivo coletor

1. Material necessário

- adesivo coletor
- lenço umedecido em álcool isopropílico para limpeza
- luvas de procedimento
- pinça

2. Seleção da área do corpo

O adesivo deve ser colado na parte superior externa do braço (região do músculo deltóide), em área livre de pelos (não raspar os pelos) e não comprometida por lesões, cortes ou irritações.

O voluntário deve ser questionado quanto a algum histórico de reação alérgica a esparadrapos ou similares. Em caso afirmativo, o adesivo não deve ser aplicado.

3. Limpeza da área de aplicação

- O aplicador deve usar luvas de procedimento.
- A área selecionada, numa extensão de aproximadamente 16 x 16 cm, deve ser limpa usando pelo menos dois lenços umedecidos em álcool

isopropílico, de modo a retirar excesso de oleosidade, células mortas e possíveis contaminantes.

- Deixar a área limpa secar completamente (60 a 90 segundos).

4. Aplicação do adesivo coletor

- Remover o adesivo coletor do envelope;
- Remover o papel protetor do adesivo;
- Segurar o adesivo pela ponta sem cola, evitando tocar na superfície da almofada absorvente;
- No momento da aplicação, o voluntário deve contrair os músculos;
- Aplicar o adesivo coletor na área limpa e esticada;
- Pressionar o adesivo coletor contra a pele e esfregar delicadamente a área do filme ao redor da almofada absorvente com o dedo indicador por aproximadamente 10 segundos;
- Encontrar a fenda na borda lateral do papel protetor, removê-lo e descartá-lo;
- Esfregar delicadamente as bordas do adesivo coletor.

5. Orientações ao voluntário

Ele pode levar uma vida normal enquanto estiver usando o adesivo coletor, só precisa evitar banho de imersão, evitar esfregar o adesivo quando estiver se lavando ou se secando, e deve observá-lo diariamente para avisar a enfermagem em caso de descolamento ou qualquer tipo de reação.

Não é esperado que ocorra reação alérgica, mas caso ocorra, procurar a enfermagem para a imediata remoção do adesivo.

Anexo 3: Procedimento de retirada do adesivo coletor

- Examinar o adesivo para verificar se houve descolamento ou tentativa de violação. A almofada absorvente está no centro do adesivo? Há alguma marca de furo com agulha? Qualquer alteração deste tipo invalida a análise.

- Descolar um dos cantos superiores do adesivo e puxar até que a parte superior da almofada absorvente fique exposta.

- Usar uma pinça para puxar almofada absorvente e acondicioná-la no saco plástico individual, destinado a esta finalidade.

- Lacrar o saco plástico e descartar a pinça.

Anexo 4: Esclarecimento do Pesquisador



Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

1. Título da Pesquisa: "Avaliação do uso do suor como matriz biológica para detectar o consumo de cocaína".
2. Pesquisador: Maria José Damas Follador - Farmacêutica-Bioquímica
Orientador: Prof. Dr. Ovandir Alves Silva - Farmacêutico-Bioquímico.
3. O objetivo da pesquisa é avaliar as vantagens e desvantagens da utilização do suor para detectar o uso da cocaína. A análise do suor poderá ajudar no diagnóstico e tratamento da dependência às drogas de abuso, indicando se a pessoa usou droga e quando o organismo estará limpo.
4. Esta pesquisa não oferece risco aos participantes pois a coleta do suor não é invasiva, será realizada através de adesivos coletores colados no braço, após limpeza do local com lenço umedecido em álcool. Cada adesivo permanecerá aderido à pele durante aproximadamente 5 dias, permitindo que o participante tenha vida normal. Após o período de 5 dias, o adesivo

será substituído por um novo. O que foi retirado será acondicionado em saco plástico individual e enviado para análise. OBS: o adesivo coletor só adere uma vez, portanto se for observado um descolamento importante, o adesivo deverá ser retirado para evitar a perda do suor recolhido.

São raros os casos de reações alérgicas, mas caso elas ocorram é só remover o adesivo coletor e tratar o local com pomada antialérgica, que a reação desaparece em pouco tempo.

A confidencialidade, sigilo e privacidade dos participantes serão preservados. A identificação das amostras será feita apenas através de uma numeração impressa no adesivo coletor.

A participação de voluntários é muito importante para esta pesquisa.

As dúvidas poderão ser esclarecidas com o próprio pesquisador, a qualquer tempo, através dos telefones: (11) 4485-1251 ou (11) 9136-6511.

Maria José Damas Follador

Pesquisador responsável

Anexo 5: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**Universidade de São Paulo**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Nome:.....

Documento de Identidade Nº :.....Sexo: () M () F

Data de Nascimento:...../...../.....

Endereço:.....Nº:.....

Bairro:.....Cidade:.....

CEP:.....Telefone:.....

2. Responsável Legal:.....

Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):.....

Documento de Identidade Nº:.....Sexo: ()M ()F

Data de Nascimento:...../...../.....

Endereço:.....Nº:

Bairro:.....

Cidade:.....

CEP:.....Tel:.....

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do paciente

Assinatura do médico responsável

(carimbo)

Anexo 6: Questionário

1. Tem alergia a Band-aid® ou esparadrapo?

2. Quando foi a última vez que usou cocaína?

Dia:

Hora:

3. Qual a via de consumo utilizada?

4. Qual a quantidade consumida neste último uso?

5. Qual era a frequência de uso?

6. Há quanto tempo você usava com esta frequência?

7. O último uso de cocaína foi associado à bebida alcoólica?

8. Primeiro Adesivo coletor: Número:

Data que foi aplicado:

Data que foi retirado:

9. Segundo Adesivo coletor: Número:

Data que foi aplicado:

Data que foi retirado:

10 Terceiro Adesivo coletor: Número:

Data que foi aplicado:

Data que foi retirado:

11 Observações:

