

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA (FISIOPATOLOGIA E
TOXICOLOGIA)
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: TOXICOLOGIA

Gabriela de Paula Meirelles

Desenvolvimento de método analítico baseado em Toxicologia Analítica
Verde utilizando tecido do cordão umbilical humano para avaliação da
exposição materno-fetal à cocaína

São Paulo
2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA (FISIOPATOLOGIA E
TOXICOLOGIA)
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: TOXICOLOGIA

Gabriela de Paula Meirelles

Desenvolvimento de método analítico baseado em Toxicologia Analítica
Verde utilizando tecido do cordão umbilical humano para avaliação da
exposição materno-fetal à cocaína

Versão Corrigida

Dissertação para obtenção do título de Mestre;
Universidade de São Paulo; Toxicologia;

Orientador: Mauricio Yonamine

São Paulo
2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação: Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

d324d	de Paula Meirelles, Gabriela Desenvolvimento de método analítico baseado em Toxicologia Analítica Verde utilizando tecido do cordão umbilical humano para avaliação da exposição materno-fetal à cocaína / Gabriela de Paula Meirelles. - São Paulo, 2023. 75 p.
	Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Orientador: Yonamine, Mauricio
	1. Avaliação toxicológica. 2. Validação analítica. 3. Cordão umbilical humano. 4. DLLME. 5. Cocaína. I. T. II. Yonamine, Mauricio, orientador.

Gabriela de Paula Meirelles

Desenvolvimento de método analítico baseado em Toxicologia Analítica Verde utilizando tecido do cordão umbilical humano para avaliação da exposição materno-fetal à cocaína; dissertação e obtenção do título de Mestre; Universidade de São Paulo; área de Toxicologia;

Comissão Julgadora

Prof. Dr.
orientador/presidente

1o. Examinador

2o. Examinador

3o. Examinador

4o. Examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2023.

Agradecimento

Sou grata em primeiro lugar, à Deus, por todas as oportunidades que tive ao longo da vida. Agradeço ao professor Mauricio, por ter abertos as portas para que eu realizasse este trabalho. Aos meus pais e minha irmã, Messias, Marielza e Natália, pois graças ao esforço e luta deles que eu estou aqui. Ao meu namorado, Antonio, o qual eu admiro e sempre me apoia. E não menos importante, aos meus amigos de laboratório, em especial à Beatriz e ao Jefferson, pois esse trabalho foi possível também com a ajuda deles.

Apoio financeiro

Agradeço ao apoio financeiro concedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Process Number 830631/1999-2), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Process Number 2020/10809-5) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Resumo

DE PAULA MEIRELLES, G. Desenvolvimento de método analítico baseado em Toxicologia Analítica Verde utilizando tecido do cordão umbilical humano para avaliação da exposição materno-fetal à cocaína. 2023. 74p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

O consumo de drogas ilícitas é um grave problema de saúde pública devido aos danos causados, muitas vezes fatais, além das implicações sociais, como marginalização e o tráfico de drogas. Dentre as drogas de abuso mais utilizadas, a cocaína é responsável por pelo menos 21 milhões de usuários em todo o mundo. No Brasil, de acordo com o III Levantamento Nacional, a cocaína também se encontra entre as mais consumidas, apontando para a estatística de pelo menos 3,1% dos brasileiros de 12 a 65 anos declarando o uso em pelo menos uma vez na vida. Em vista dessa situação, o abuso de drogas também atinge mulheres em período gestacional, trazendo à tona este grupo de risco para epidemiologia. A exposição ao uso de drogas, especialmente a cocaína, pode ocasionar danos severos tanto à mãe quanto à criança, em períodos pré e pós-natais, além de complicações obstétricas. No entanto, este assunto ainda é pouco explorado e a avaliação toxicológica da exposição *in utero* torna-se um desafio no sentido do desenvolvimento de abordagens mais completas sobre a problemática em questão, sendo necessário o desenvolvimento de metodologias analíticas para um melhor manejo toxicológico. O diagnóstico do uso de cocaína depende em grande parte do relato da própria mãe, que em vários casos omite ou nega o consumo. Desta maneira, os desenvolvimentos de métodos analíticos toxicológicos, levando em consideração métodos físico-químicos de preparo de amostra e detecção de biomarcadores de exposição, auxiliam na comprovação do uso de drogas na gravidez. Neste trabalho desenvolveu e validou um método analítico para determinação de cocaína e produtos de biotransformação, utilizando o tecido do cordão umbilical humano como matriz biológica alternativa, sendo a instrumentação analítica baseada em extração por microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e separação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Os limites de detecção ficaram entre 15 and 25 ng/g, os limites de quantificação (LOQ) foram de 30 ng/g para EC, e 25 ng/g para os demais analitos. A faixa de linearidade foi do LOQ à 1000 ng/g. Os coeficientes de variação para precisão intra ensaio foi <18.5%, inter-ensaio foi <8.75% e exatidão foi <16.4% para todos os controles. O método desenvolvido foi aplicado em 10 amostras com suspeita de serem positivas, baseando-se no relato das mães e nas análises de screening e confirmação em urina materna, COC, BZE, EC e EME foram quantificadas em 4 cordões umbilicais com concentrações que variam de 39.6 à 420.5 ng/g.

Palavras-chave: avaliação toxicológica, validação analítica, cordão umbilical humano, DLLME, cocaína.

Abstract

DE PAULA MEIRELLES, G. Development of an analytical method based on Green Analytical Toxicology employing umbilical cord tissue for the evaluation of maternal-fetal exposure to cocaine. 74p. Dissertation (Master's degree) – School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2023.

Illicit drug use is a serious and complex public health problem, not only due to the degree of the damages, often fatal, but also to the social implications, such as marginalization and drug trafficking. Among the most used drugs, cocaine is responsible for 21 million of the world's users. In Brazil, according to the III Survey National, cocaine is among the most consumed drugs, with statistics revealing that at least 3.1% of Brazilians aged 12 to 65 declared having used it at least once in their lives. In addition to this context, the drug abuse has also been found in women during the pregnancy period, what has shed light into this group for epidemiology. The exposure to illicit drugs, especially cocaine, can harm both the mothers and their children, in the pre or post-natal periods, and can also imply obstetrical complications. However, this topic is generally poorly explored, and so the toxicological evaluation of *in utero* exposure becomes a further challenge, as it regards the development of more complete approaches to the problem in question, requiring the development of analytical methods aimed at better toxicological management. Besides, the diagnosis of cocaine use in these cases usually depend largely on the mother's reports, which in several cases omit or deny consumption. Therefore, considering physical-chemical methods of sample preparation and exposure biomarkers, the development of analytic toxicological methods can help confirm drug use during pregnancy. Thus, this work developed and validated of an analytical method for the determination of cocaine and its products, using umbilical cord tissue as an alternative biological matrix, with the analytical instrumentation based on extraction by dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and separation by gas chromatography coupled to mass spectrometry. The limits of detection were between 15 and 25 ng/g, the limits of quantification (LOQ) were 30 ng/g for EC, and 25 ng/g for the other analytes. Linearity ranged from the LOQ to 1,000 ng/g. Coefficients of variation for intra-assay precision were <18.5%, inter-assay was <8.75% and bias was <16.4% for all controls. The developed method was applied in 10 suspected positive samples, based on the mother's report and maternal urine screening and confirmation, COC, BZE, EC and EME were quantified in 4 umbilical cords with concentrations that ranged from 39.6 to 420.5 ng/g.

Keywords: toxicological evaluation, analytical validation, human umbilical cord, DLLME, cocaine.

Lista de abreviaturas

TCU tecido de cordão umbilical

DLLME microextração líquido-líquido dispersiva

US-DLLME microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ultrassom

LLE extração líquido-líquido

SPE extração em fase sólida

PLE extração líquida pressurizada

COC cocaína

COC-d3 cocaína deuterada

BZE benzoilecgonina

BZE-d3 benzoilecgonina deuterada

EME ecgonina metil éster

EME ecgonina metil éster deuterada

EC ecgonina

CE cocaetilino

CE-d3 cocaetileno deuterado

AEME anidroecgonina metil éster

NorCOC norcocaína

m-HBE m-hidroxibenzoilecgonina

THC-COOH ácido 11-nor-delta9-tetrahydrocannabinol-9-carboxílico

Delta-9-THC delta-9-tetrahydrocannabinol

MDA metilenedioxianfetamina

MDMA 3,4-metilenodioximetanfetamina

hCE-1 carboxilesterases-1 do fígado

SNC sistema nervoso central

SPE extração em fase sólida

SCU sangue do cordão umbilical

SPE extração em fase sólida

QuEChERS acrônimo do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*
(rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro)

ELISA ensaio imunossorvente ligado a enzima

GC-MS cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

HPLC-UV cromatografia líquida de alta resolução acoplada à detector UV
LC-MS/MS cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem
LC-MS cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.
LC-TOF- MS cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tempo de voo.

HC Hospital das Clínica

DIC diclorometano

ISO isopropanol

HA hidróxido de amônio

PSA fase sólida dispersível composta por aminas primárias-secundárias

PFP 2,2,3,3,3-pentafluoro-1-propanol

PFFPA anidrido pentafluoropropiônico

TCLE Termo de Consentimento/Assentimento Livre e Esclarecido

ANOVA análise de variância

DOE design de experimentos

LOD limite de detecção

LOQ limite de quantificação

RE% recuperação

CV% coeficiente de variação

Sumário

Agradecimento.....	5
Apoio financeiro.....	5
Resumo.....	6
Abstract.....	7
Lista de abreviaturas.....	8
1. Introdução.....	12
1.1. Considerações históricas.....	12
1.2. Toxicocinética da cocaína.....	13
1.3. Toxicodinâmica.....	15
1.4. Cocaína na gravidez e suas complicações.....	16
1.5. Métodos de detecção de cocaína em exposição materno-fetal.....	19
1.6. Preparos de amostra.....	20
1.7. Análise Instrumental.....	21
1.8. DLLME como preparo de amostra.....	25
2. Justificativa.....	28
3. Objetivos.....	28
4. Materiais e métodos.....	29
4.1. Materiais.....	29
4.1.1. Equipamento.....	29
4.1.2. Reagentes e outros materiais.....	29
4.1.3. Padrões de referência.....	29
4.1.4. Coleta de amostras biológicas e de dados epidemiológicos.....	29
4.2. Métodos.....	31
4.2.1. Triagem em urina para cocaína e confirmação por GC-MS.....	31
4.2.2. Aplicação dos métodos em amostras reais de cordão umbilical expostos à cocaína.....	31
4.2.3. Condições cromatográficas para detecção de cocaína e seus produtos em GC-MS.....	31
4.2.4. Otimização do método de extração/ preparo de amostra.....	33
4.2.5. Experimento de misturas.....	34
4.2.6. Extração de cocaína e seus produtos.....	35
4.2.7. Validação dos métodos.....	37

5.	Resultados e discussões	37
5.1.	Testes iniciais.....	37
5.1.1.	Extração	37
5.1.2.	Conversão de cocaína	38
5.1.3.	Homogeneização do tecido.....	39
5.2.	Resultados de otimização da extração e experimentos de misturas.....	39
5.3.	Validação do método	43
5.3.1.	Estudo de interferentes	43
5.3.2.	LOD – limite de detecção.....	45
5.3.3.	Linearidade	46
5.3.4.	LOQ – limite de quantificação	47
5.3.5.	Precisão e exatidão/Recuperação.....	49
5.3.6.	Carryover	51
5.3.7.	Amostras reais	51
6.	Conclusão	56
7.	Anexo	57
7.1.	Análise de Variância.....	57
7.2.	Gráfico de Efeitos Principais	59
7.3.	Fórmulas	61
7.4.	Aprovação do Comitê de Ética	62
8.	Referências	67

1. Introdução

1.1. Considerações históricas

A cocaína é o principal alcaloide da planta *Erythroxylum coca*, um arbusto encontrado nas montanhas dos Andes e noroeste da Amazônia. Entre as espécies, apenas *E. coca* var. *ipadu*, *E. novogranatense* e *E. novogranatense* var. *truxillense* apresentam quantidade considerável desta substância química. A utilização da folha da planta remonta a um contexto histórico longínquo da existência humana, sendo utilizada há milênios como recurso medicinal, rituais religiosos, mencionados em relatos do século XVI, nos quais acreditava-se que a planta “satisfaz os famintos, dá nova força aos cansados e exaustos e faz com que os infelizes esqueçam suas tristezas”. Em 1855, o princípio ativo foi isolado por Niemann, ocorrendo assim uma popularização da cocaína pela Europa, aumentando drasticamente seu consumo. Sigmund Freud sugeriu seu uso terapêutico para tratamento de asma, de distúrbios digestivos, como anestésico local, e no tratamento do transtorno por uso de álcool e morfina. No entanto, foram observados efeitos nocivos como o transtorno por uso de cocaína, alucinações e delírios. No século XX ocorreram duas epidemias nos Estados Unidos da América, sendo que a primeira levou a proibição do uso da cocaína, visto que na época era legalmente utilizada, como na bebida Coca-Cola. E a segunda, em meados dos anos oitenta, em que o uso elitizado se expandiu para todas as camadas sociais devido ao aumento da produção e aparecimento do crack, uma versão mais acessível. Na década de 1970, o abuso de cocaína aumentou, e alguns especialistas apontam que esta popularização ocorreu devido à aversão às anfetaminas. Em 1977, o *The New York Times* fez uma publicação sobre os efeitos deletérios da cocaína na forma de insultos raciais. A cocaína começou a ser uma droga temida e sua popularização diminuiu, por meio da legislação, que a tornou controlada e pelas publicações sobre seus efeitos adversos (Drake & Scott, 2018).

No Brasil, a cocaína era legalmente comercializada no início do século XX nas formulações de medicamentos e na forma pura; no entanto, passou a ser vista como uma ameaça à integridade física e à vida das pessoas. Esta visão surge por influência norte-americana, onde, em 1914, foi assinado o chamado Harrison Act, que restringiu a disponibilidade da cocaína para a população. Por meio do Decreto-lei 4.292, em 06/07/1921, o Congresso Nacional estabeleceu penalidades (multa e prisão) para as contravenções na venda de cocaína e outras drogas (Bahls & Bahls, 2002).

De acordo com dados extraídos da United Nations Office on Drugs and Crime – UNODC (2022), o número global de usuários de cocaína em 2020 foi de 21 milhões entre 15 e 64 anos (UNODC, 2022). Conforme os dados referentes à 2015, o Brasil foi o maior consumidor de cocaína e crack da América do Sul, com 1.5 milhões de usuários na faixa dos 15 aos 64 anos (UNODC, 2020). A Global Burden of Disease (2019) publicado pelo Institute for Health Metrics, demonstrou que a taxa de mortalidade por transtornos por uso de cocaína foram de 0,32 por 100 mil indivíduos, tendo um aumento relativo de 256% entre 1990 e 2019 (Ritchie & Roser, 2022). Em 2021, estimativas de consumo de drogas da União Européia apontam que 3,5 milhões de pessoas, entre 15 e 64 anos, tenham consumido cocaína (“European Drug Report 2022: Trends and Developments,” 2022). Vale ainda ressaltar, que o Brasil é o oitavo país com maior carga de doenças atribuídas ao transtorno mental devido ao uso de cocaína no mundo, afetando principalmente homens e adultos jovens (Crepalde et al., 2022). Além disso, de acordo com o III Levantamento Nacional sobre o uso de drogas pela população brasileira, a cocaína também se encontra entre as mais consumidas, apontando para a estatística de pelo menos 3,1% dos brasileiros de 12 a 65 anos declararam o uso em pelo menos uma vez na vida (Bastos et al., 2017).

1.2. Toxicocinética da cocaína

A cocaína encontra-se disponível na forma de cloridrato de cocaína e na forma de base livre através da reação do cloridrato com amônia, hidróxido de sódio ou bicarbonato (*crack*) (Cognard et al., 2005). O cloridrato de cocaína é encontrado na forma de cristais, grânulos ou pó branco e solúvel em água, sendo geralmente administrado por via oral, intravenosa ou nasal. Este é obtido pelo tratamento da pasta de coca, composta por solventes e folhas de coca maceradas, em acetona e ácido clorídrico (Drake & Scott, 2018).

Já a base-livre é uma substância cristalina, inodora e transparente, insolúvel em água; solúvel em álcool, acetonas, óleos e éter e comumente é administrada por via respiratória, sendo fumada (Drake & Scott, 2018). Os cristais são formados após o resfriamento e precipitação, podendo ser fumados devido ao seu baixo ponto de fusão de 98 °C, o qual possibilita que o aquecimento converta a cocaína em um vapor estável capaz de ser inalado (Ciccarone, 2011; Drake & Scott, 2018; Roque Bravo et al., 2022; Treadwell, 2007). Enquanto o cloridrato de cocaína possui alta estabilidade em temperaturas elevadas, e portanto, não volatiliza na fumaça (Roque Bravo et al., 2022).

As diferentes rotas de administração influenciam na biodisponibilidade, absorção e eliminação da droga. Dessa maneira, o pico de concentração da forma fumada é de cerca de 6 minutos, enquanto por via intranasal é de aproximadamente 45 minutos (Drake & Scott, 2018).

A cocaína possui diferentes vias metabólicas (Figura 1), pela hidrólise química espontânea, forma-se a benzoilecgonina (BZE) (Cognard et al., 2005); sendo a hidrólise de benzoil éster, catalisada principalmente pela butirilcolinesterase plasmática levando a produção de ecgonina metil éster (EME) e ácido benzóico; já a carboxilesterases-1 do fígado (hCE-1) hidrolisa o metil éster gerando metanol e BZE; além disso, ocorre oxidação da cocaína pelo microsomo hepático P450 3A4 em norcocaína (NorCOC). Entre os produtos de biotransformação, a NorCOC é reconhecida como ativa, possuindo uma contribuição significativa para toxicidade da cocaína (Coe et al., 2018; Zheng et al., 2019).

Em específico, o álcool pode reagir com a cocaína formando cocaetileno (CE) através da transesterificação sob a catálise de hCE-1. Além disso, nesta circunstância, ocorre a transesterificação da NorCOC sob a catálise de hCE-1 tendo como produto o norcocaetileno (NorCOCE). Estes produtos de biotransformação gerados na presença de etanol também possuem uma contribuição significativa sob a toxicidade da cocaína (Zheng et al., 2019).

Em relação ao *crack*, o processo de aquecimento volatiliza rapidamente a cocaína devido ao seu baixo ponto de fusão, tendo como produto o éster metílico da anidroecgonina (AEME), um produto de pirólise da cocaína, absorvido pelos pulmões (Caio et al., 2017; Cognard et al., 2005).

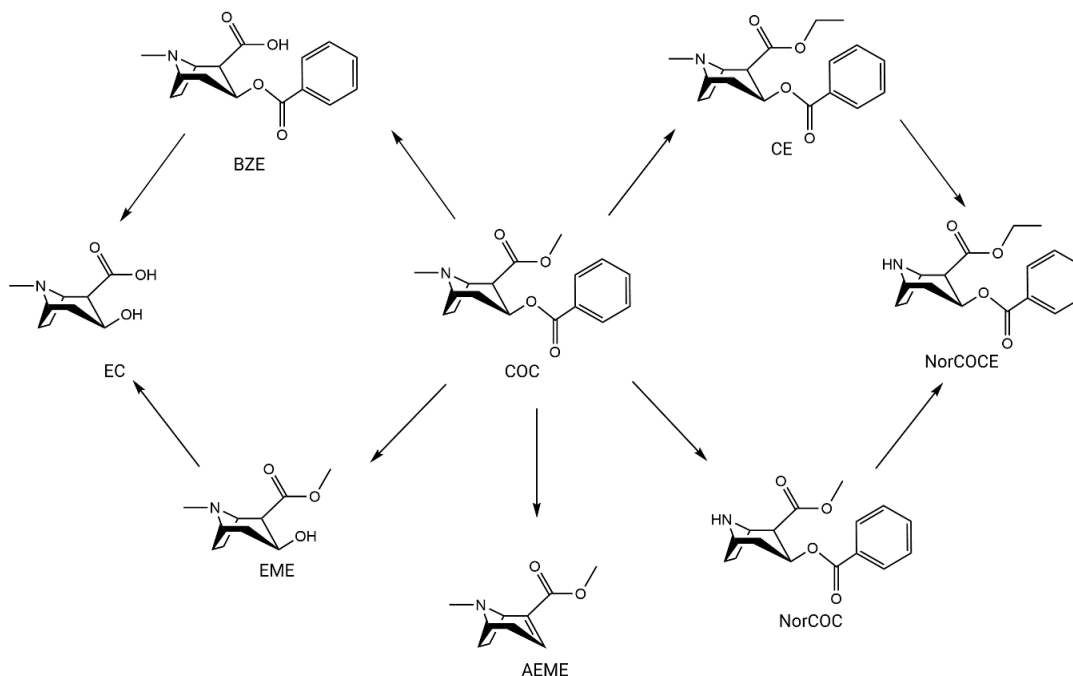


Figura 1. Produtos de biotransformação, transesterificação e de pirólise da cocaína

Legenda: COC: cocaína; BZE: benzoilegonina; EME: ecgonina metil éster; EC: ecgonina; CE: cocaetileno; NorCOC: norcocaína; NorCOCE: norcocaetileno; AEME: anidroecgonina metil éster. (Fonte: Do autor). A COC pode ser convertida em BZE e EME, sendo que estas ainda podem ser convertidas em EC. Por meio do uso concomitante com álcool, a COC pode sofrer transesterificação e gerar CE. A COC também pode ser convertida em NorCOC e, combinada ao uso de álcool, pode ocorrer transesterificação com NorCOC e gerar NorCOCE. Por fim, vale mencionar que, como produto de pirólise, é gerada AEME.

1.3. Toxicodinâmica

Como principal mecanismo de ação, a cocaína bloqueia a recaptação de dopamina por uma ação simpatomimética no sistema nervoso central (SNC), levando à ativação do sistema dopaminérgico, principalmente no *nucleus accumbens*, consequentemente causando euforia, prazer, aumento da atividade motora (Baik, 2013; Nestler, 2005). Os efeitos adrenérgicos como vasoconstrição, hipertensão, taquicardia, midríase e taquipneia possuem correlação com a disponibilidade de noradrenalina nas fendas sinápticas (Cain et al., 2013; Ganapathy, 2011). Com o uso prolongado, a dopamina esgota-se progressivamente nas terminações neuronais, visto que, a síntese e liberação de neurotransmissores são reduzidas como forma de compensação do estado de estímulo, podendo causar disforia, exaustão, depressão, irritabilidade e desconforto físico. Estas sensações se encontram presentes na abstinência e levam ao desejo pelo uso constante da droga (Baik, 2013; Nestler, 2005).

Em relação ao triptofano, sabe-se que em casos de uso crônico, diminui seu metabolismo em serotonina, tendo como consequência uma menor necessidade de horas de

sono, potencializada pelo acúmulo de dopamina, além de deficiências cognitivas (Havranek et al., 2015). Já no sistema nervoso periférico age bloqueando a permeabilidade da membrana celular ao sódio, o que resulta em um efeito anestésico (Cain et al., 2013).

Dessa maneira, a cocaína é um estimulante que inibe a recaptação pré-sináptica de dopamina, noradrenalina e serotonina. Entre as manifestações clínicas, as mais comuns na intoxicação aguda, incluem: psicose, taquicardia, disfunção respiratória (que pode evoluir para uma parada respiratória), acidente vascular cerebral e convulsões; no caso da intoxicação crônica, pode haver perfuração do septo nasal, perda de peso, distúrbios comportamentais e psiquiátricos, cardiomiopatias e transtorno por uso de cocaína (Cain et al., 2013; Schmidt et al., 2017).

As cardiomiopatias geradas pela cocaína ocorrem devido aos efeitos simpatomiméticos responsáveis pela taquicardia e vasoconstrição periférica; bloqueio dos canais de sódio e potássio, que gera arritmia; estresse oxidativo e dano mitocondrial e interrupção do acoplamento excitação-contração. Este efeito possui como possíveis complicações: infarto do miocárdio, isquemia miocárdica, arritmia, cardiomiopatia, dissecação da aorta ou endocardite (Stankowski et al., 2015).

1.4. Cocaína na gravidez e suas complicações

O consumo de drogas entre mulheres vem crescendo ao redor do mundo; estima-se que cerca de 90% das usuárias estão em idade fértil (Aghamohammadi & Zafari, 2015). Um estudo realizado em um hospital público de São Paulo com adolescentes grávidas, aos quais tiveram amostras de cabelo para análise de cocaína, revelou uma porcentagem de usuárias de drogas durante o terceiro trimestre de gravidez igual a 6%, sendo maconha: 4%, cocaína: 1,7% e ambos: 0,3% (Mitsuhiro et al., 2006).

O uso de cocaína na gravidez causa efeitos deletérios tanto na gestante quanto na criança devido a inúmeros fatores, uma vez que é capaz de atravessar a membrana placentária passando para os vasos sanguíneos dos vilos e através do cordão umbilical até o feto, atingindo o seu sistema nervoso central (SNC) rapidamente após o uso materno (Ganapathy, 2011; Lee et al., 2008). Essa situação se estabelece como um grande problema de saúde pública, visto que os custos sociais e econômicos são altos e os acometimentos podem ser graves (Concheiro et al., 2017).

A cocaína atua no SNC estimulando o sistema dopaminérgico, causando aumento da

frequência cardíaca e vasoconstrição. Dessa maneira, há uma diminuição da chegada de oxigênio e nutrientes para o feto (Aghamohammadi & Zafari, 2015). Os efeitos da cocaína, no feto, variam de acordo com o estágio de desenvolvimento no qual ocorre a exposição; dessa forma, durante a primeira metade da gestação afeta a citogênese e histogênese, já após esse período afeta a diferenciação e crescimento de áreas específicas do cérebro. A exposição pré-natal à cocaína tem sido associada com uma variedade de transtornos do SNC, tais como a redução da proliferação celular levando a prejuízos ao crescimento intrauterino, assim como a interferência na diferenciação e migração neuronal e déficits neurocomportamentais (Lee et al., 2008).

Periféricamente, a cocaína inibe a condução nervosa e evita a recaptura de norepinefrina pelos nervos terminais, e conseqüentemente ocorre vasoconstrição, taquicardia e aumento da pressão sanguínea devido aos altos níveis de norepinefrina. Tal fato está relacionado com aumento de contrações uterinas, que explica a elevação da incidência de abortamentos espontâneos, partos prematuros e descolamento de placenta. Além disso, é observada uma redução significativa das medidas dos recém-nascidos (peso, perna e circunferência da cabeça), microcefalia, malformações, infarto cerebral em poucas horas após o nascimento (48-72h) e aumento dos riscos de enterocolite necrotizante. Na Tabela 1 estão sumarizados os principais efeitos deletérios oriundos do uso de cocaína na gravidez. (Tabela 1) (Aghamohammadi & Zafari, 2015; Da Cunha et al., 2001).

Tabela 1. Complicações de saúde fetal em decorrência do uso de cocaína na gravidez	
Órgãos e Sistemas	Complicações
Membros superiores e inferiores	Defeitos ósseos parciais
	Redução de membros
Gastrointestinal	Atresia intestinal
	Enterocolite necrotizante
	Isquemia intestinal
	Obstrução intestinal
Genitourinário	Criptoquirdia
	Hidronefrose

	Encefalocele
	Exencefalia
Nervos	Hemorragias intracranianas
	Lesões cavitárias dos gânglios da base, fossa posterior e lobos frontais

Fonte: (Da Cunha et al., 2001).

Os riscos cardiovasculares da cocaína podem aumentar durante a gravidez. Há estudos que sugerem a ocorrência de malformações congênitas do coração em filhos nascidos de mães com histórico de abuso de cocaína, e a hipótese é de que seja resultado dos efeitos vasoconstritores da exposição à cocaína no sistema cardiovascular materno e no fluxo sanguíneo uteroplacentário. Além disso, estudos demonstram um aumento de cinco vezes no risco de malformações congênitas nas gestações expostas à cocaína em comparação aos controles negativos (Stankowski et al., 2015).

Não se sabe ao certo o mecanismo responsável pelos efeitos teratogênicos, mas acredita-se que envolvam a hipoxemia, alterações da síntese de DNA em algumas regiões do cérebro e alterações de neurotransmissores (Ganapathy, 2011). Também foi demonstrado que em crianças com exposição pré-natal à cocaína há redução do hipocampo e do corpo caloso, e alteração dos mecanismos neuroendocrinológicos envolvidos na mediação da resposta ao estresse (Min et al., 2017).

Outra possível consequência da exposição intra-uterina à cocaína é o desenvolvimento da síndrome de abstinência neonatal (NAS), que se manifesta nos primeiros dias de vida, tendo como sintomas a instabilidade autonômica, convulsões, reflexo de sucção insuficiente, hipertonia, irritabilidade e ganho de peso prejudicado (Stabler et al., 2017; Tolia et al., 2015). Este efeito exige cuidados especializados de suporte durante a retirada da substância (Weiner & Finnegan, 2011). Em um estudo foi demonstrado que a duração da internação na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal, o uso de terapias farmacológicas, de terapia intravenosa e a utilização de fórmulas para alimentação foi maior na população de crianças expostas à cocaína durante a gravidez (Lester & Lagasse, 2010).

Por esse motivo, essas pacientes apresentam risco aumentado de intercorrências maternas e fetais e necessitam de um manejo multidisciplinar, de obstetras, psiquiatras,

enfermeiros, psicólogos e assistentes sociais para o desenvolvimento de protocolo de conduta e treinamento para possíveis complicações referentes à saúde da mãe e do feto. Dessa maneira, o atendimento de gestantes usuárias de cocaína deve ser classificado como de alto risco devido às complicações cardiovasculares aumentadas na gestação e ao dano pulmonar crônico dessas pacientes, especialmente nas usuárias de *crack*, predispondo a infecções respiratórias, além dos riscos obstétricos.

1.5. Métodos de detecção de cocaína em exposição materno-fetal

A exposição às drogas pode ser determinada por métodos indiretos, como questionários ou diretos, em que se avaliam os marcadores biológicos. No caso da cocaína, os marcadores bioquímicos da exposição são os seus principais produtos de biotransformação - benzoilecgonina, ecgonina e metil ésteres de ecgonina, que podem ser encontrados em diversas matrizes biológicas, como urina, soro, cabelo, saliva, líquor, suor, fluido gástrico e meconio (Concheiro et al., 2017; Da Cunha et al., 2001).

A identificação de anidroecgonina metil éster e cocaetileno, apesar de possuírem menor incidência, oferece informações sobre o uso da droga, sendo que a presença destes demonstra, respectivamente, uso na forma de *crack* e administração concomitante de cocaína e álcool (Mantovani et al., 2014).

A obtenção de informações precisas por meio de entrevistas com a mãe em relação ao uso de drogas ilícitas é dificultada por vários fatores, como o medo em admitir o uso da droga e a retaliações forenses (Harrell, 1985; Ostrea et al., 2001). Em estudo realizado por Mantovani *et al.* (2014), pela Universidade de São Paulo, cerca de 43% das mulheres que fizeram uso durante a gestação admitiram o uso na entrevista (Mantovani et al., 2014).

A determinação de cocaína durante a gravidez pode ser realizada por meio de imunoensaio, utilizando a urina da mãe e do neonato. No entanto, no neonato a determinação apenas revela uma exposição à cocaína de alguns dias (Moore et al., 1993) - em imunoensaios com cutoff de 150 µg/L para BZE a janela de detecção é de 2-4 dias (Moeller et al., 2017). Por outro lado, usando um imunoensaio com limite de detecção para BZE de 300 ng/ mg de creatinina a média para a última amostra positiva foi de 35,6-235 horas, ou seja, uma janela de detecção variando para mais de 9 dias (Preston et al., 2002). Assim sendo, a determinação de cocaína por imunoensaio em urina pode possibilitar a ocorrência de falsos negativos nos resultados (Moore et al., 1993).

O mecônio tem sido uma opção de amostra para exposição materno-fetal à cocaína. Em estudos foram determinados produtos de biotransformação de cocaína no mecônio de fetos com 17 semanas de gestação, sendo uma amostra mais contundente que a urina, pois evidencia a distribuição dos xenobióticos no compartimento fetal (Ostrea et al., 1994).

O cordão umbilical pode ser uma opção para diagnóstico do uso de cocaína na gestação, por ser um tecido presente exclusivamente no período da gravidez e ser caracterizado como principal via de comunicação e circulação entre a mãe e o bebê. Estudo com tecido do cordão umbilical detectou a presença de benzoilecgonina em altas concentrações (0.6 mg/0.5 kg); no entanto, não foi encontrado cocaína em nenhuma das amostras (Moore et al., 1993).

Um estudo em que se analisava diferentes amostras para estabelecimento do período de detecção e monitoramento da distribuição de metadona, cocaína, opiáceos e seus produtos de biotransformação em gestantes demonstrou que o mecônio apresenta melhor detecção de cocaína e opiáceos, devido às maiores concentrações encontradas nesta matriz biológica, porém o cordão umbilical oferece maior praticidade em relação a coleta e preparo de amostra (de Castro et al., 2011).

O tecido do cordão umbilical tem sido proposto como uma amostra alternativa para testes toxicológicos referentes à exposição materno-fetal, tendo em vista os desafios inerentes à coleta de mecônio, como o custo elevado, impossibilidade de detectar exposições no primeiro trimestre da gestação e tempo necessário para sua eliminação, ou mesmo a liberação intrauterina (Gray & Huestis, 2007; Marin et al., 2014), esta que pode ocorrer em casos de estresse materno-fetal, como hipóxia e infecção (Ahanya et al., 2005). O cordão umbilical assim como o mecônio, abrange a exposição desde o terceiro trimestre de gestação e possivelmente no segundo trimestre, possuindo como vantagem a facilidade de ser coletado logo após o parto, apresenta quantidade abundante, além de excluir a presença de drogas administradas após o nascimento. No entanto, não se conhece ao certo o tempo e o mecanismo de deposição da droga no cordão umbilical (Gray & Huestis, 2007; Marin et al., 2014).

1.6. Preparos de amostra

Inúmeros métodos analíticos de detecção de exposição intrauterina às drogas ilícitas têm sido desenvolvidos e aprimorados em busca de resultados mais precisos e que

representem um período extenso da gestação, uma vez que, o abuso de drogas na gestação é um grande problema de saúde pública, que acarreta danos à saúde da mãe e da criança (Concheiro et al., 2013; de Castro et al., 2009). Apesar de o mecônio ser bastante utilizado para detecção de exposição fetal às drogas (de Castro et al., 2009; Moore et al., 1993; Palmer et al., 2017), o cordão umbilical tem sido visto como uma amostra alternativa para tais análises por conta de suas vantagens (Concheiro et al., 2013).

Em vista desta condição, em muitas análises de tecido do cordão umbilical é realizada extração em fase sólida como uma forma de reduzir os efeitos da matriz (Alexander et al., 2018; Concheiro et al., 2013; de Castro et al., 2009; Haglock-Adler et al., 2016; Winecker et al., 1997). Esta extração é mais vantajosa em relação à líquido-líquido, e uma boa opção para amostras complexas, pois utiliza menor quantidade de solvente orgânico, baixo limite de detecção e de quantificação, tem compatibilidade com diferentes analitos, maior recuperação e maior pureza dos extratos (Manno et al., 1993).

Para detecção de exposição à cocaína são escolhidos predominantemente, seus produtos de biotransformação (benzoilecgonina, anidroecgonina metil éster, cocaetileno) para desenvolvimento de métodos em diversas matrizes humanas (Alvear et al., 2014). Um estudo apresentou que altas concentrações de norcocaína foram encontradas em tecido de cordão umbilical, a qual pode ser uma indicação do metabolismo fetal da cocaína (Winecker et al., 1997). Na tabela 2 estão organizados os principais métodos analíticos e preparos de amostras sólidas para detecção de cocaína e derivados em matrizes materno-fetais.

1.7. Análise Instrumental

Em uma análise de 118 amostras de mecônio e cordão umbilical por microplaca de ensaio imunoenzimático direto e confirmação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, foi obtido uma concordância para cocaína de 99,2%, considerando amostras negativas e positivas na triagem. Já considerando apenas amostra positivas obteve-se uma concordância de 75% (D. Montgomery et al., 2005).

Um estudo realizado com 500 cordões umbilicais por teste de triagem em ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA) e confirmação de positivos por cromatografia gasosa ou líquida acoplada à espectrometria de massas mostrou que esta amostra é uma alternativa eficaz de rápido diagnóstico para exposição fetal às drogas, uma vez que, os valores preditivos negativos e positivos foram maiores que 98% e 70%, respectivamente,

para drogas testadas e os preditivos positivos de cocaína alcançaram valores de 95% (D. P. Montgomery et al., 2008). Tais achados demonstram que testes em tecido de cordão umbilical usando métodos baseados em ELISA podem ser uma maneira prática de detectar exposição fetal às drogas de abuso.

De acordo com o trabalho realizado por Concheiro *et al.* (2013), o cordão umbilical apresenta uma menor concentração para cocaína comparado ao mecônio. Portanto, requer o uso de técnicas com alta sensibilidade, que também pode ser aumentada pela adição de seus diferentes produtos de biotransformação. A presença ou ausência de produtos de biotransformação pode ser devido à concentração da droga no tecido, que é afetada pelo tempo, duração e período de exposição do feto. Infelizmente, não há dados suficientes sobre a incorporação de drogas e derivados no tecido do cordão umbilical (Concheiro et al., 2013; Marin et al., 2014) e em relação ao período de detecção da droga (de Castro et al., 2009).

Geralmente é feita uma triagem em busca de biomarcadores de exposição à drogas, usando urina ou mecônio do neonato por meio de imunoensaio, imunoensaio de polarização por fluorescência, radioimunoensaio ou ELISA. Devido estes ensaios possuírem baixa sensibilidade, baixa especificidade e baixa reatividade é preciso a realização de testes confirmatórios, que sejam mais sensíveis e específicos, como cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas ou, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas ou espectrometria de massas em tandem (Wang et al., 2010).

Recentemente, separações cromatográficas, por cromatografia líquida (LC) e por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) são os métodos utilizados para confirmação da maioria dos testes para drogas (Allen et al., 2005). Especificamente para amostras teciduais materno-fetais, os dados na literatura ainda são escassos, e em sua maioria, preconizam o uso de LC-MS (Concheiro et al., 2013; Wood et al., 2014). Um método analítico de determinação simultânea de anfetamina e metanfetamina foi desenvolvido para cordão umbilical através de LC-MS/MS, propondo uma maior eficiência e seletividade em relação ao mecônio (Jones et al., 2009).

Uma das dificuldades do desenvolvimento de métodos em LC-MS é a presença de interferentes na matriz, principalmente quando se trabalha com amostras complexas, como o cordão umbilical, que causam supressão ou aumento do sinal. Para superar o efeito matriz, pode-se otimizar a cromatografia, melhorar o preparo de amostra a fim de remover os

interferentes e/ou incluir deuterados análogos ao analito para compensar o efeito da matriz (de Castro et al., 2009).

Tabela 2. Principais métodos de preparo de amostra para detecção de derivados de cocaína em matrizes materno-fetais

Matriz biológica	Biomarcadores	Preparo de amostra	<i>Clean up</i>	Deteção	Referência
TCU e placenta	BZE, COC	Trituração mecânica com ácido perclórico 0,1%	SPE	LC-MS	(de Castro et al., 2009, 2011)
TCU	BZE, COC, m-HBE	Homogeneizadas com Triton X-100 a 0,1%	LLE	LC-TOF- MS	(Marin et al., 2014)
TCU	BZE, COC, EME, CE, NorCOC, m-HBE	Trituração mecânica em tampão fosfato 0,025 M, pH 4	SPE	GC-MS	(Winecker et al., 1997)
TCU	COC	Homogeneização em metanol	-	GC-MS	(D. Montgomery et al., 2005)
TCU	BZE, COC, CE, m-HBE	Trituração com <i>beads</i> metálicas	SPE	LC-MS/MS	(Haglock-Adler et al., 2016)
TCU e placenta	COC, BZE, CE, EME, m-HBE	Trituração mecânica em água	SPE	LC-MS/MS	(Concheiro et al., 2013)
TCU, SCU e Líquido amniótico	COC, BZE	Homogeneização	SPE	HPLC-UV	(Moore et al., 1993)
TCU	BZE	Homogeneizado em 3mL de acetonitrila	SPE	HPLC	(Alexander et al., 2018)

Legenda: BZE, benzoilecgonina. CE, cocaetilen. COC, cocaína. EME, ecgonina metil éster. m-HBE, m-hidroxi benzoilecgonina. NorCOC, norcocaína. COCE, cocaetilen. SPE, do inglês, *solid phase extraction* - (extração em fase sólida). TCU, tecido do cordão umbilical. SCU, sangue do cordão umbilical. SPE, extração em fase sólida. GC-MS, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. HPLC-UV, cromatografia líquida de alta resolução acoplada à detector UV. LC-MS/MS, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem LC-MS, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. LC-TOF- MS, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tempo de vôo.

1.8. DLLME como preparo de amostra

Atualmente existem diversas técnicas de extração empregadas em análises de drogas de abuso, porém estas apresentam inúmeras limitações, como diversas etapas no processo de extração, utilização de grandes volumes de solvente, o alto custo. As mais comuns são a extração em fase sólida (SPE), extração líquido-líquido (LLE), dentre outras (Asl et al., 2017; Usui et al., 2012). Apesar da LLE ser uma técnica relativamente simples, está sujeita a uma remoção de interferentes, podendo causar contaminação dos instrumentos e comprometer a confiabilidade dos resultados. Já a SPE, mesmo sendo mais seletiva e com menos interferentes, é um procedimento trabalhoso e demorado. Além disso, diversos pesquisadores têm buscado por técnicas de extração ecologicamente corretas, com menor geração de resíduos e menos danos à saúde do operador, além da necessidade de menores gastos e maior praticidade de execução. Essa crescente busca deu início com a Química Verde e atualmente encontra-se tão inserida na Toxicologia Analítica e Forense, que se tornou necessário propor o conceito da Toxicologia Analítica Verde, devido às especificidades e desafios dos toxicologistas no desenvolvimento de métodos de extração e preparos de amostras. Este conceito é ainda confirmado pelos princípios propostos por López-Lorente *et al.* (López-Lorente et al., 2022), De Paula Meirelles *et al.* (de Paula Meirelles et al., 2022), e por Silveira *et al.* (Silveira et al., 2019), que ainda demonstram diversas técnicas já desenvolvidas, dando destaque para as microextrações.

Neste contexto, a microextração líquido-líquido dispersiva (*dispersive liquid-liquid microextraction* – DLLME) foi escolhida para ser aplicada na determinação de COC e seus produtos em tecido de cordão umbilical humano. A DLLME é uma das alternativas dentre as microextrações baseadas em fase líquida, na qual um extrator orgânico e um solvente dispersor são rapidamente adicionados em uma amostra aquosa, criando uma solução emulsionada (como demonstrado na Figura 2). O solvente extrator é dispersado em soluções de amostra na forma de microgotas, em função da presença do solvente dispersor (He & Concheiro-Guisan, 2019; Rezaee et al., 2006). Dessa forma, a superfície de contato entre a amostra aquosa e o solvente extrator é alta, e, conseqüentemente, alcança rapidamente um estado de equilíbrio, apresentando altas taxas de recuperação (Rezaee et al., 2006; Sarafraz-Yazdi & Amiri, 2010).



Figura 2. Microextração líquido-líquido dispersiva

Legenda: A mistura contendo solvente extrator e dispersor é adicionada na amostra, criando uma emulsão, e, em seguida, esta solução é agitada e centrifugada. Por fim, é recolhido o extrato, composto pelo solvente extrator e parte do dispersor.

Diversos trabalhos já utilizaram esta técnica de extração para determinação de COC e seus produtos em variados tipos de matriz. Fisichella *et al.*, por exemplo, aplicou a DLLME para a determinação de drogas de abuso, incluindo COC, BZE, CE e EME, e outros medicamentos psicotrópicos em amostras de sangue (500 μL). Esta técnica foi realizada pela injeção rápida de 100 μL de clorofórmio (extrator) e 250 μL de metanol (solvente dispersor) (Fisichella *et al.*, 2015). Fernández *et al.* fez uma modificação no modelo tradicional e utilizou uma microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ultrassom (US-DLLME) para determinação simultânea de drogas de abuso em fluido oral, incluindo COC, BZE e CE. Para precipitação de proteínas e dispersão de solvente foi usado 1,4 mL de metanol e 200 μL de clorofórmio, como extrator de solvente, sendo rapidamente adicionado usando uma seringa (Fernández *et al.*, 2019).

Vincenti *et al.* desenvolveu um método para a determinação de drogas de abuso (incluindo COC, BZE, EME e NorCOC) em cabelos por extração líquida pressurizada (PLE)

para promover a descontaminação e extração dos analitos do núcleo interno do cabelo combinado com DLLME para limpeza. Neste método, a amostra foi submetida à alta temperatura e elevada pressão durante a descontaminação e extração. A limpeza foi realizada por DLLME, utilizando 500 µL de 2-propanol, como solvente dispersante, e 200 µL de clorofórmio, como solvente de extração. Os extratos obtidos eram limpos, apresentando boa reprodutibilidade. Embora a recuperação fosse geralmente baixa, em uma única análise foi possível determinar várias classes de drogas (Vincenti et al., 2019).

Na área da ecotoxicologia, a DLLME foi usada para análise de COC em efluentes hospitalares. Neste caso, a amostra teve seu pH ajustado para 9, sendo feita a adição de 0.3 mol/L de NaCl, seguido pela extração usando 150 µL de clorofórmio (extrator) e 350 µL metanol (dispersor). A técnica foi aplicada apenas para quantificação de COC, porém também se analisou BZE e AEME, no entanto, devido à baixa recuperação, o grupo optou em quantificá-las por SPE. Vale ressaltar que neste trabalho a exatidão e precisão do método foram avaliadas por meio de experimentos de recuperação, e por este motivo a BZE e AEME não puderam ser quantificadas por DLLME (Martins et al., 2017).

Todos os trabalhos apresentados demonstram uma diversidade de combinações entre solventes (extrator e dispersor) que podem ser realizadas para que os analitos sejam extraídos. Sendo assim, alguns critérios tornam-se importantes para que a escolha dos solventes forneça um boa extração e seletividade. Para uma DLLME convencional, um solvente extrator adequado deve ser capaz de extrair bem os analitos e ter baixa miscibilidade em água, para que ocorra a separação das fases líquidas e a partição dos analitos. Além disso, deve ter uma densidade superior à da água, ser dispersível após agitação manual ou mecânica, ter baixo custo e ser compatível com as seguintes etapas do método analítico ou ser de fácil volatilização. Dessa maneira, os solventes extratores mais comumente usados são os hidrocarbonetos halogenados como diclorometano, clorofórmio, tetracloreto de carbono, tetracloroetileno e bromobenzeno (Mansour & Khairy, 2017). Já o solvente dispersor precisa apresentar solubilidade nas fases doadora e extratora, promovendo uma alta dispersão do solvente de extração na fase aquosa, aumentando a área de contato entre as duas superfícies e, conseqüentemente, a eficiência da extração. Entre os solventes dispersivos comumente usados estão metanol, etanol, acetonitrila, acetona e isopropanol (Mansour & Khairy, 2017).

2. Justificativa

A exposição ao uso de cocaína na gestação é um problema de saúde pública que gera graves acometimentos fisiopatológicos tanto à mãe quanto ao infante, devido aos riscos à gravidez e efeitos deletérios causados a ambos. A escolha de uma matriz biológica que demonstre os danos causados pelo abuso de drogas tem sido um desafio para toxicologia, devido às dificuldades como a coleta, preparo de amostra e interpretação dos resultados.

Ainda não se possui muitos conhecimentos em relação à toxicocinética, toxicodinâmica e forma de deposição da cocaína no cordão umbilical, o que pode resultar em avaliações toxicológicas incompletas ou insuficientes (Gray & Huestis, 2007), o que consequentemente desencadeiam em medidas terapêuticas pré e pós-natal inadequadas.

O cordão umbilical é uma matriz biológica promissora para o diagnóstico da exposição gestacional a drogas de abuso, uma vez que é um dos principais meios de interação materno-fetal, além disso, possui como vantagem a praticidade de coleta e preparo da amostra e grande quantidade de material.

Além disso, a extração por meio da DLLME torna-se possível, visto que pode ser aplicado a diversas matrizes e em análises de drogas de abuso, sendo vantajosa em relação as demais alternativas, devido a simplicidade, poucas etapas, menores custos e seletividade.

Desta forma, o desenvolvimento de um método de determinação de cocaína em cordão umbilical faz-se necessário para promover mais informações em relação a esta amostra e padrões de incorporação da droga, possibilitando uma compreensão melhor dos resultados e interpretação com base na exposição e o período de gestação correspondente. Tais avanços possibilitam que medidas terapêuticas e protocolos sejam desenvolvidos e aplicados com maior conhecimento sobre o grau de exposição da criança e possíveis complicações.

3. Objetivos

O presente projeto teve como objetivo o desenvolvimento e validação de método para determinação de cocaína e seus produtos de biotransformação, em cordão umbilical por DLLME e análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

4. Materiais e métodos

4.1. Materiais

4.1.1. Equipamento

Equipamento de cromatografia em fase gasosa modelo 6850 acoplado a espectrômetro de massas quadrupolo modelo 5975, auto-amostrador G4513A, (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), homogeneizador T10 basic ultra-turrax e dispersor S10N-5G (IKA), disponíveis no Laboratório de Análises Toxicológicas – USP.

4.1.2. Reagentes e outros materiais

Acetato de etila, hidróxido de potássio, metanol, diclorometano, isopropanol, hidróxido de amônio, fosfato de sódio monobásico foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha) e diclorometano obtido da Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Alemanha). Testes-rápidos para cocaína em urina: Instant-View® (Poway, CA, EUA). Supelclean™ PSA SPE Bulk da Sigma Aldrich (Bellafonte, PA, USA). Agentes derivatizantes: 2,2,3,3,3-pentafluoro-1-propanol (PFP) e anidrido pentafluoropropiônico (PFPA), obtidos da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA).

4.1.3. Padrões de referência

Soluções-padrão de cocaína (COC), benzoilecgonina (BE), ecgonina metil éster (EME), cocaetilenos (CE), anidroecgonina metil éster (AEME) e os deuterados de cocaína (COC-d3), cocaetilenos (CE-d3) e ecgonina metil éster (EME-d3), foram obtidos da Cerilliant Corporation (Round Rock, Texas, EUA).

4.1.4. Coleta de amostras biológicas e de dados epidemiológicos

As amostras de cordão umbilical e urina foram previamente coletadas e armazenadas em biorepositório sob responsabilidade do Prof. Dr. Mauricio Yonamine pelo Laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP. Tais amostras são provenientes de do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sendo coletas, em 2016, pelo então aluno de doutorado Jefferson Pereira e Silva.

Amostras de urina foram coletadas durante o período de internação hospitalar, em frascos plásticos estéreis, sem conservantes e acondicionadas sob congelamento (- 20 ° C).

Os segmentos de cordão umbilical, de aproximadamente 5 centímetros, foram coletados das regiões proximal ao feto, região intermediária e proximal à placenta, imediatamente após o parto, despojados de sangue, lavados com solução salina estéril (NaCl

0,9%), acondicionados em tubos plásticos e estocados a - 20° C até análise subsequente. O material biológico foi agrupado em duas categorias, como a seguir.

- Grupo Controle, no qual foram inseridas amostras cujo teste de triagem em urina foi negativo e não houve relato materno e/ou indícios do uso de drogas no período gestacional. Amostras deste grupo foram utilizadas para o preparo de amostras de controle de qualidade nos ensaios de otimização e validação de métodos.

- Grupo de Risco, no qual foram agrupadas amostras com potencial para presença dos analitos de interesse. Foram considerados um ou mais critérios indicativos do uso de drogas na gestação, como proposto por Wood *et al.* (Wood et al., 2014), sendo eles:

- Triagem de drogas positiva em urina materna;
- Relato materno de uso de drogas na gestação;
- Manifestação de sinais clínicos de síndrome de abstinência;
- Histórico prévio de uso de drogas pela mãe e/ou companheiro;
- Uso de álcool, tabaco e derivados durante a gestação;
- Histórico de violência doméstica;
- Indivíduos em situação de rua;
- Ausência de pré-natal;
- Rompimento placentário inesperado;
- Diagnóstico de Doenças Sexualmente Transmissíveis;
- Doenças psiquiátricas.

Todas as amostras foram coletadas somente das participantes da pesquisa que voluntariamente aceitaram participar do projeto mediante ciência e assinatura do Termo de Consentimento/Assentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Após assinatura do TCLE, foi aplicado o Instrumento de Coleta de Dados com o objetivo de obter informações tais como idade da mãe, tempo de gestação, sexo do bebê, peso, estatura, perímetro cefálico, ocorrência de complicação perinatal, malformações congênitas e padrão de uso de substâncias psicoativas antes e durante a gestação.

Os dados de cada grupo foram analisados pelo teste t Student para amostras independentes com nível de significância de 0,05 e intervalo de confiança de 90%, a fim de obter informações sobre o estado de saúde materno fetal.

Este estudo possui aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de

Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, sob o parecer de número **1.744.736**.

4.2. Métodos

4.2.1. Triagem em urina para cocaína e confirmação por GC-MS

As amostras de urina foram processadas imediatamente após coleta, seguindo instruções do fabricante do teste rápido Instant-View[®] (Poway, CA, EUA). Foi realizado *screening* imunocromatográfico para diagnóstico visual qualitativo. O teste foi considerado positivo para o uso de drogas mediante a presença do produto de biotransformação benzoilecgonina. Em outro momento, as amostras de urina com resultado positivo para triagem, negativas para triagem e com relato de uso ou amostras de mães que não relataram uso de qualquer substância no relatório, mas que relataram ao médico, foram analisadas por SPE e GC-MS conforme (Mantovani et al., 2014). Para extração de benzoilecgonina em urina foi feito uma modificação do método aplicado em mecônio, uma vez que não foi utilizado a extração acelerada de solvente, mas somente a SPE.

4.2.2. Aplicação dos métodos em amostras reais de cordão umbilical expostos à cocaína

Amostras de cordão umbilical de neonatos expostos à cocaína foram submetidas aos métodos desenvolvidos. Foram determinadas as concentrações de cocaína nas diferentes regiões do cordão umbilical e a eficácia do método de DLLME em GC-MS com o objetivo de desenvolver um método analítico para determinação de cocaína em cordão umbilical.

4.2.3. Condições cromatográficas para detecção de cocaína e seus produtos em GC-MS

Para a padronização da corrida cromatográfica em GC-MS foram analisados 25 µL de solução padrão na concentração de 10 µg/mL contendo o pool dos analito de interesse, entre eles COC, BZE, CE, EC, AEME, EME, NorCOC e seus deuterados, COC-d3, BZE-d3, EME-d3 e CE-d3. Realizou-se a secagem à 40°C por 10 minutos sob fluxo de nitrogênio, com posterior derivatização com 30 µL de 2,2,3,3,3-pentafluoro-1-propanol e 30 µL de anidrido pentafluoropropiônico à 70°C por 30 minutos. Em seguida, a solução foi seca à 40°C por 10 minutos e ressuspensa com 25 µL de acetato de etila.

Foi injetado 1 µL no sistema de cromatografia em fase gasosa modelo 6850 acoplado a espectrômetro de massas quadrupolo modelo 5975, auto-amostrador G4513A (Agilent Technologies), composta por (5%-fenil)-metilpolisiloxano, apresentando dimensões de 30 m

x 0,25 mm x 0,1 μ m.

A análise preliminar dos íons foi realizada no modo de monitoramento seletivo de íons (SIM - *Selective Ion Monitoring*) e para identificação dos íons usou-se três íons para os analitos e dois íons para seus deuterados, sendo o íon mais abundante utilizado como quantificador. Nas Tabelas 3 e 4 são apresentados os parâmetros e condições do método, além dos íons e tempo de retenção dos analito analisados.

Tabela 3. Condições cromatográficas padronizadas para cocaína e seus produtos em GC-MS

Parâmetros do forno	
Temperatura inicial	70°C
Temperatura máxima	325°C
Rampa	15°C/ min. até 180°C, 15°C/min. até 250°C e 8°C/min. até 260°C, manter por 1 min.
Tempo total	15,25 min.
Parâmetros do injetor	
Modo	Splitless
Temperatura	250°C
Pulso de pressão	3,16 psi
Tempo de pulso	2 min.
Parâmetros da coluna	
Coluna	Capilar HP-5MS 30 m x 250 μ m x 0,1 μ m
Gás de arraste e fluxo	Hélio; 0,6 mL/min. Fluxo constante

Tabela 4. Parâmetros do Espetrômetro de massas

Parâmetros do Espetrômetro de Massas	
<i>Solvent delay</i>	5 min.

Modo	Selective Ion Monitoring – SIM, 1988 eV
Temperatura da fonte	230°C e máximo: 250°C
Temperatura do quadrupolo	150°C e máximo: 200°C

Analitos	Íons (m/z) identificadores*	Tempo de retenção (min.)
AEME	181 , 166, 152	7,084
EC	300 , 463, 314	7,448
EME-d3	185 , 348	7,810
EME	182 , 314, 345	7,820
BZE-d3	303 , 319	12,410
BZE	300 , 421, 316	12,401
COC-d3	185 , 306	13,122
COC	182 , 272, 303	13,133
CE-d3	199 , 320	13,677
CE	196 , 272, 317	13,687
NorCOC	214 , 313, 435	13,765

* (m/z), *mass/charge*. Íons em negrito são utilizados como quantificadores.

Em testes iniciais, a corrida cromatográfica possuía um tempo total de 18,92 min., porém realizando diversos ensaios, este método cromatográfico foi otimizado e o tempo total foi reduzido para 15,25 min., possibilitando uma análise mais rápida e com menos gasto de gás.

4.2.4. Otimização do método de extração/preparo de amostra

Para a otimização do preparo de amostra foi realizado delineamento de planejamento experimental por análise fatorial, utilizando a ferramenta estatística *DOE (Design of Experiment)* no *Minitab® Statistical Software*. Foi construído um modelo experimental ordenado de forma aleatória (Tabela 6) para avaliação de 2 fatores (efeitos), em 2 níveis categóricos, com influência crítica sobre o rendimento da extração de todos os analitos. O

modelo avaliou os seguintes efeitos: agitação (amostra/mistura de solventes): 2 e 10 min; e PSA: 25 mg e sem adição de fase sólida dispersiva, sendo que os ensaios em que são adicionados uma composição de aminas primárias-secundárias (PSA) configuram-se como *QuEChERS*, enquanto os sem a adição de PSA tratam-se da DLLME. Inicialmente pretendia-se usar o *QuEChERS*, porém com alguns testes foi observado a possibilidade de realizar uma DLLME. Em resultados e discussões será demonstrado as semelhanças, diferenças e como foi feito a escolha da técnica de extração.

Os testes foram realizados de forma aleatória de acordo com a tabela feita pelo *Minitab® Statistical Software*, como demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5. Ordem dos ensaios, com os fatores e níveis utilizados		
Ensaio	Agitação (min.)	PSA (mg)
1	10	25
2	2	0
3	2	25
4	10	0

4.2.5. Experimento de misturas

Para desenvolvimento do experimento de misturas é utilizado a ferramenta estatística *DOE (Design of Experiment)*, no *Minitab® Statistical Software*. O modelo foi construído com base nas proporções de mistura inicialmente aplicadas (DIC:ISO:HA, 78:20:2) no delineamento de planejamento experimental. Considerando que a DLLME é composta basicamente por dois solventes, extrator e dispersor, foi considerado a possibilidade de não se usar hidróxido de amônio. Além disso, também foram realizados testes preliminares de proporções, que demonstraram que acima de 50% de ISO não ocorria separação das fases, impossibilitando a recuperação do extrato. Dessa maneira, foram estabelecidos os seguintes limites (Tabela 6) e a ordem do experimento com as proporções geradas pelo próprio *Minitab® Statistical Software* (Tabela 7).

Tabela 6. Limites do experimento de misturas

Componetes	Limite Inferior	Limite superior
Diclorometano (DIC)	50%	80%
Isopropanol (ISO)	20%	50%
Hidróxido de amônio (HA)	0%	2%

Legenda: limites inferior e superior da proporção, em porcentagem, de cada componente da mistura, de acordo com as possibilidades e necessidades, no qual o *Minitab*® baseia-se para que gerar os ensaios.

Tabela 7. Experimento de misturas (valores em porcentagem)

OrdemEns	DIC	ISO	HA
1	50	50	0
2	50	48	2
3	80	20	0
4	78	20	2
5	64,5	34,5	1
6	57,25	42,25	0,5
7	57,25	41,25	1,5
8	72,25	27,25	0,5
9	71,25	27,25	1,5
10	64,5	34,5	1

Legenda: combinação de proporções de cada componente da mistura gerados pelo *Minitab*®

4.2.6. *Extração de cocaína e seus produtos*

Após a otimização do preparo de amostra e do experimento de misturas, o seguinte procedimento foi estabelecido, como esquematizado na Figura 3. Dessa maneira, 500 mg de TCU (cortado em filetes de aproximadamente 0,5 cm) foram homogeneizados em 2 mL de tampão fosfato de sódio à 0,1 M (pH 6) utilizando ultra-turrax por 1-2 min. em uma potência de 5 a 6. Após a centrifugação à 4000 rpm por 8 min., o sobrenadante (900 µL) foi recolhido e transferido para um tubo de centrífuga de 5 mL. Em seguida, adicionou-se 2 mL da mistura

DIC:ISO:HA (50:48:2), sendo agitado à 4000 rpm por 2 min., seguido pela centrifugação à 4000 rpm por 10 min. O extrato (1,2 mL) foi recolhido, transferido para um *vial* e seco sob fluxo de N₂ a 40 °C, sendo derivatizado com 30 µL de PFP e 30 µL de PFPA à 70° C por 30 min. Finalmente, os derivatizantes são secos sob fluxo de N₂ e ressuspensos em 25 µL de acetato de etila, para posterior análise no GC-MS.

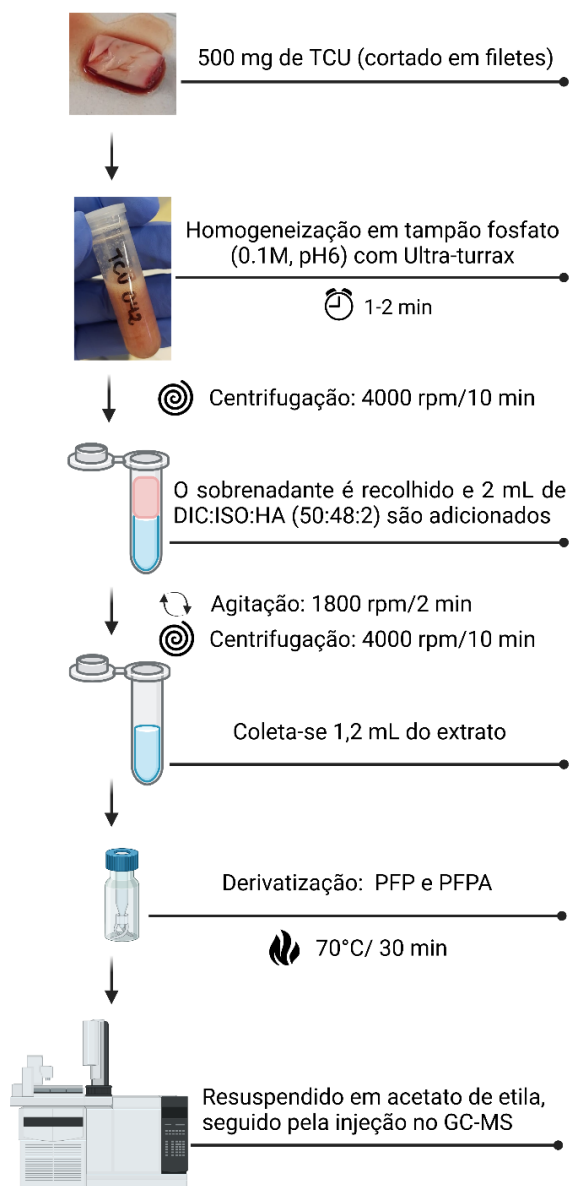


Figura 3. Procedimento de DLLME definido para análise de cocaína e seus produtos de biotransformação, transesterificação e pirólise em TCU.

4.2.7. Validação dos métodos

Foi realizada a validação do método, estabelecendo-se os parâmetros de estudos de interferência, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), linearidade (modelo de calibração), precisão intra e inter ensaio, exatidão, *carryover* e recuperação nas amostras de cordão umbilical. O método foi validado conforme o Guia de Validação Analítica ASB Standard 036, First Edition (2018) (ASB Standard 036, 2018). Tais parâmetros são explicados com mais detalhes ao longo da discussão dos resultados da validação.

5. Resultados e discussões

5.1. Testes iniciais

5.1.1. Extração

Inicialmente pretendia-se utilizar o *QuEChERS* como extração, que se trata de um procedimento composto por três etapas: a extração líquida, a partição promovida pela utilização de um sal e limpeza (*clean-up*) através da adição direta de uma fase sólida dispersível. Neste caso, para a limpeza foi usado uma composição de aminas primárias-secundárias (PSA), a partição ocorreu pela presença de tampão fosfato de sódio, usado na homogeneização do cordão e entre os inúmeros solventes testados, foi escolhido a mistura constituída por diclorometano: isopropanol: hidróxido de amônio (DIC:ISO:HA). Porém analisando o comportamento da mistura com a matriz (sobrenadante recolhido) observou-se que quando a mistura era adicionada criava-se uma emulsão, assim como em uma DLLME. O *QuEChERS*, da mesma maneira que a DLLME, não necessita de dispositivo extrator, e apresenta um baixo custo. No entanto a DLLME possui a vantagem de ser mais simples, com menos etapas e, portanto, mais rápida. E como mencionado anteriormente, devido às suas características, a DLLME é uma extração que se baseia nos princípios da Toxicologia Analítica Verde (de Paula Meirelles et al., 2022), sendo, portanto, uma boa opção.

Em relação aos solventes extratores, a mistura diclorometano: isopropanol: hidróxido de amônio (78:20:2) é uma possibilidade como já demonstrado nos testes iniciais de *QuEChERS* e por trabalhos que fizeram a utilização desta mesma mistura como solvente de eluição de SPE para determinação de cocaína e seus produtos em meconio (Mantovani et al., 2014), ou utilizando outras proporções com os mesmos componentes como já feito para TCU (D. P. Montgomery et al., 2008; Winecker et al., 1997) e unha (Valente-Campos et al., 2006). Além disso, o volume definido para a mistura de solventes foi baseado em testes isolados,

que demonstraram que quando o volume da mistura era reduzido para 1 ou 1,5 mL, com intuito de tornar a extração mais verde, não ocorria separação adequada das fases para algumas das fontes de matriz e conseqüentemente o extrato obtido era incompatível (turvo) com o equipamento de análise, como é demonstrado na Figura 4. Uma hipótese plausível para obtenção deste extrato turvo seria devido à complexidade e composição do TCU. Por outro lado, quando se utilizou 2 mL, esta situação não ocorreu mesmo quando aplicado em amostras de fontes variadas.

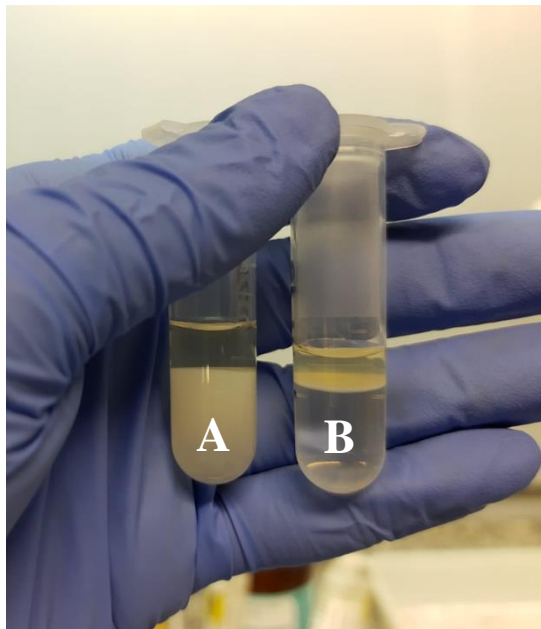


Figura 4. Extração usando 1,5 mL da mistura DIC:ISO:HA

Legenda: em (A) encontra-se o extrato incompatível com o GC-MS; e em (B) um extrato límpido usado como referência, ambos contendo 1,5 mL da mistura de solventes.

5.1.2. Conversão de cocaína

A extração foi desenvolvida baseando-se em diversos trabalhos voltados para determinação de cocaína e seus produtos de biotransformação. Nesse contexto, um trabalho demonstrou que a partir do pH 8, a COC pode ser convertida em BZE e em EME, devido à hidrólise química em condições alcalinas, quando mantidas à temperatura de 25°C (Klette et al., 2000). No entanto, Anzillotti *et al.* realizou uma técnica de *QuEChERS* em sangue, na qual utilizou um pH de aproximadamente 8-9 na incubação, e foi capaz de detectar COC, BZE, CE e EME, com LOD de 0,05-2,0 ng/mL e LOQ de 2,0 ng/mL (Anzillotti et al., 2014). Dois trabalhos utilizando *QuEChERS* demonstraram detecção de COC e seus produtos em sangue (Amorim Alves et al., 2017; Orfanidis et al., 2021) e em fígado, quando submetidos

à pH 10 (Orfanidis et al., 2020). Outro trabalho também demonstrou que, pela extração líquido-líquido, foi possível realizar a determinação de COC em urina, quando submetida à pH entre 9-10 (Farina et al., 2002). Apesar da maioria dos trabalhos ajustarem suas amostras para um pH entre 8-10, a homogeneização do cordão em pH 6 foi selecionada, pois neste pH a COC possui menos chances de sofrer conversão à 25°C (Klette et al., 2000). No entanto, após a adição da mistura de solventes, o pH é alterado para 9-10, permitindo que grande parte dos analitos fiquem em sua forma molecular e que a extração seja favorecida. Tal ajuste, que é permitido pelo hidróxido de amônio, será posteriormente demonstrado nos resultados.

5.1.3. Homogeneização do tecido

A etapa de liberação dos analitos também foi alterada, pois quando testado a incubação de tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 6) apenas com adicionado de COC em diferentes tempos (até 1h) e temperaturas (70°C, 80°C e 100°C), e usando tanto bloco de aquecimento quanto a estufa, foi detectado BZE. Este resultado pode ser explicado pela hidrólise de COC em BZE na presença de água (Klette et al., 2000) e pela conversão química na presença de calor (Ettliger & Yegles, 2016; Gambier et al., 2019). Além disso, quando testado a incubação do TCU em tampão fosfato de sódio, mesmo nas condições mais extremas de calor, a amostra não foi totalmente degradada (ainda havia pedaços íntegros), logo não se pode confirmar que os analitos foram idealmente liberados. Por este motivo, providenciamos um homogeneizador ultra-turrax® IKA, que permitiu uma degradação total do tecido por meio de ação mecânica e sem aquecimento da amostra, possibilitando uma maior liberação dos analitos e menos chances da conversão de COC em BZE.

5.2. Resultados de otimização da extração e experimentos de misturas

Após estes testes iniciais, a mistura e o volume a serem utilizados foram definidos e foi realizado o delineamento de planejamento experimental, para que a extração fosse otimizada em relação à agitação e uso de PSA. De acordo com a análise de regressão fatorial realizada pelo Minitab, no qual foram incluídos os termos do modelo até a primeira ordem, a recuperação dos analitos não apresentaram diferença significativa para ambos os fatores, uma vez que o valor de $p > 0,05$. Nas tabelas de análise de variância presentes no **Anexo 7.1** estão em destaque o p-valor dos fatores para cada analito.

Dessa maneira, mesmo não apresentando uma diferença significativa para a agitação e PSA, foi decidido avaliar os gráficos de efeitos principais de cada analito (demonstrados

no **Anexo 7.2)** para escolher as condições em que se obteve uma melhor resposta. Portanto, para a maioria dos analitos, a melhor resposta foi obtida usando uma agitação de 2 min. (com exceção da NorCOC) e sem a adição de PSA (com exceção da EC). Além disso, por não ter uma diferença significativa, o uso de agitação de 2 min. e sem a adição de PSA poderiam ser selecionados simplesmente pelo fato de tornar o procedimento de extração mais rápido e com menos etapas.

Após a definição destes fatores foi analisado uma amostra de tecido de cordão umbilical proveniente de uma mãe com detecção de 2478,03 ng/mL de benzoilecgonina em urina. Este teste tinha com o objetivo saber se este método seria capaz de extrair os analitos de uma matriz possivelmente positiva. Com base no cromatograma obtido, no TCU foi determinado COC, BZE, EME, EC e AEME, provando que a extração é capaz de liberar e extrair os analitos de uma amostra positiva.

Para o experimento de misturas, os resultados obtidos pelo *Minitab*, pela regressão de misturas incluindo os termos de componentes para modelo quadrático, demonstraram que o modelo não ficou bem ajustado, uma vez que os valores de R2, R2(aj) e R2(pred) não estão dentro dos valores adequados e, portanto, não é capaz de prever qual a melhor mistura. Sendo assim, foi utilizado a ferramenta *spetwise* e selecionando todos os termos do modelo, para que o *software* excluísse/incluísse termos até encontrar o melhor modelo possível. Testando todos os termos de componentes para modelo, o mais apropriado foi o quártico completo, sendo que apenas a AEME apresentou um modelo bem ajustado, com R2, R2(aj) e R2(pred) > 70%.

Sumário do Modelo (AEME)

S	R2	R2(aj)	PRESQ	R2(pred)
40505,7	99,99%	99,97%	4,99989E+11	98,81%

Pela avaliação do gráfico de contorno de mistura da AEME (Gráfico 1) e considerando apenas a região de estudo (destacado em cinza), a área em verde escuro corresponde às proporções da mistura que melhor extraem a AEME, a qual possui apenas uma fina faixa dentro da região estudada compreendendo as misturas de 50:48:2 e 57,25:41,25:1,5. Como este experimento foi realizado em unicata e apenas a AEME apresentou um modelo ajustado, para que esta predição fosse confirmada com maior certeza

seria mais apropriado realizar um novo experimento de misturas em triplicata. Além disso, apesar da mistura 57,25:41,25:1,5 ter sido uma das opções selecionadas de acordo com o modelo, esta não foi a que demonstrou melhor resposta para a maioria dos analitos.

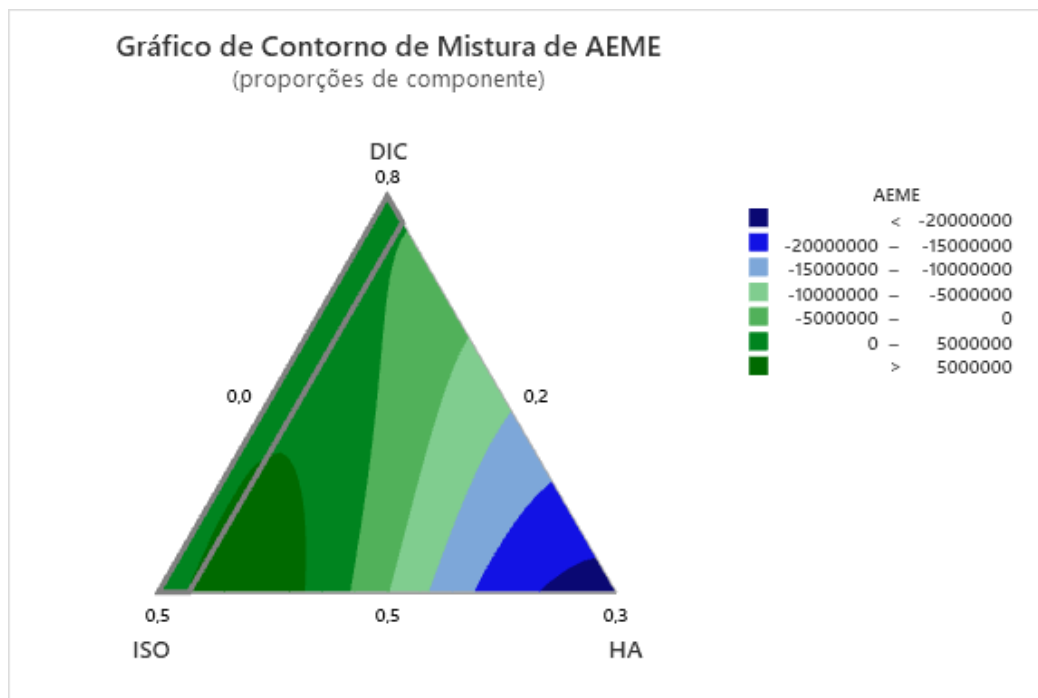


Gráfico 1. Contorno de mistura de AEME

Portanto, foi decidido fazer uma análise das respostas de cada analito usando o *Prisma* para saber qual das misturas exibe melhor resultado de extração. De acordo com o Gráfico 2, as misturas com as proporções de 64,5:34,5:1 e 50:48:2 para DIC:ISO:HA, respectivamente, foram as que apresentaram as melhores respostas para a maioria dos analitos. Sendo assim, foi realizado uma análise em triplicata destas duas proporções, além de também analisar estas mesmas proporções de DIC:ISO em triplicata sem o hidróxido de amônio (Gráfico 3, misturas 3 e 4), com o objetivo de avaliar se este componente seria realmente necessário para a extração, uma vez que originalmente a DLLME é composta apenas por um solvente extrator e um dispersor.

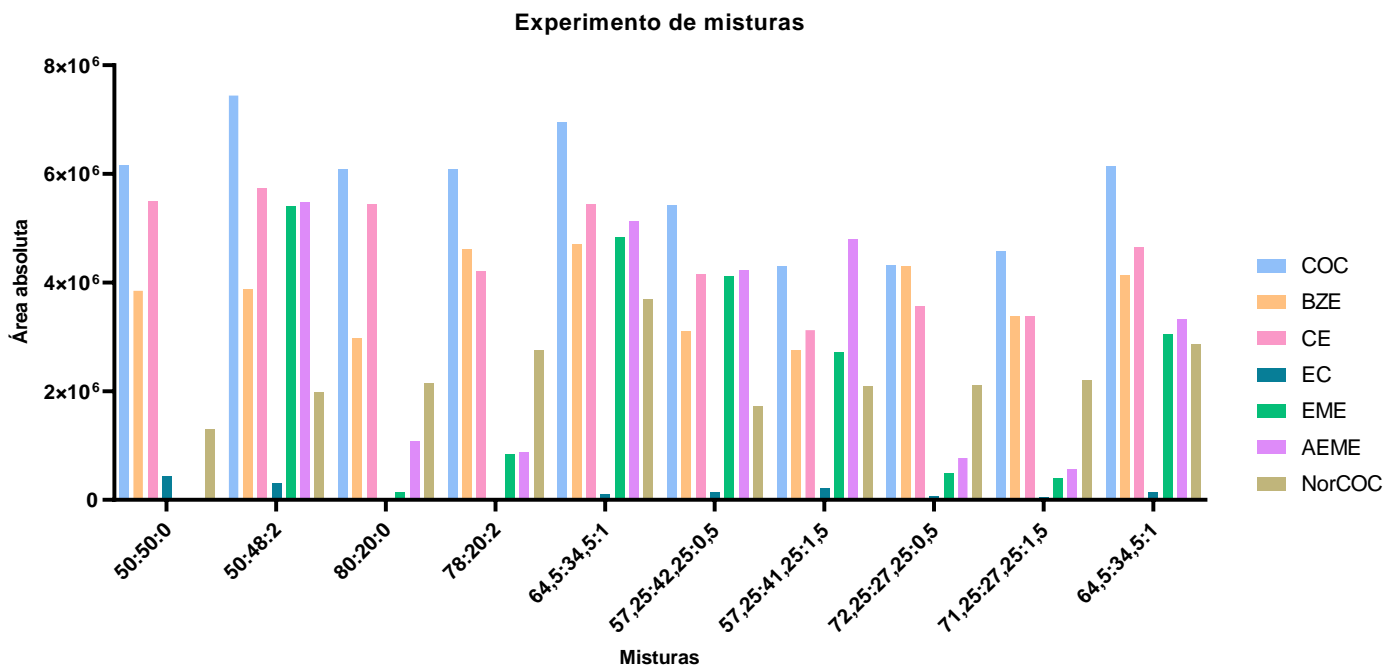


Gráfico 2. Experimento de misturas

No Gráfico 3 é possível observar que apenas alguns analitos apresentaram diferenças significativas entre as misturas. Analisando a EME pode-se constatar que a mistura 50:48:2 apresentou uma melhor extração em relação às demais, sendo que as misturas sem HA (3 e 4) obtiveram um pior resultado para extração de EME, o que comprova a influência do HA no ajuste de pH. Este mesmo perfil de extração entre as misturas ocorreu no caso da AEME. Além disso, verificando o pH da emulsão, constatou-se que estava entre 9-10.

Apesar da COC e CE terem apresentado uma diferença significativa para algumas misturas, tais analitos apresentam uma boa recuperação na extração e um alto sinal cromatográfico. Portanto, a escolha da mistura levou em consideração principalmente a EME, que é um dos analitos com maiores dificuldades de extração por conta de suas características físico-químicas e por possuir um baixo sinal no método cromatográfico. Sendo assim, a mistura 50:48:2 foi a escolhida como a mais adequada para extração de COC e seus produtos em TCU.

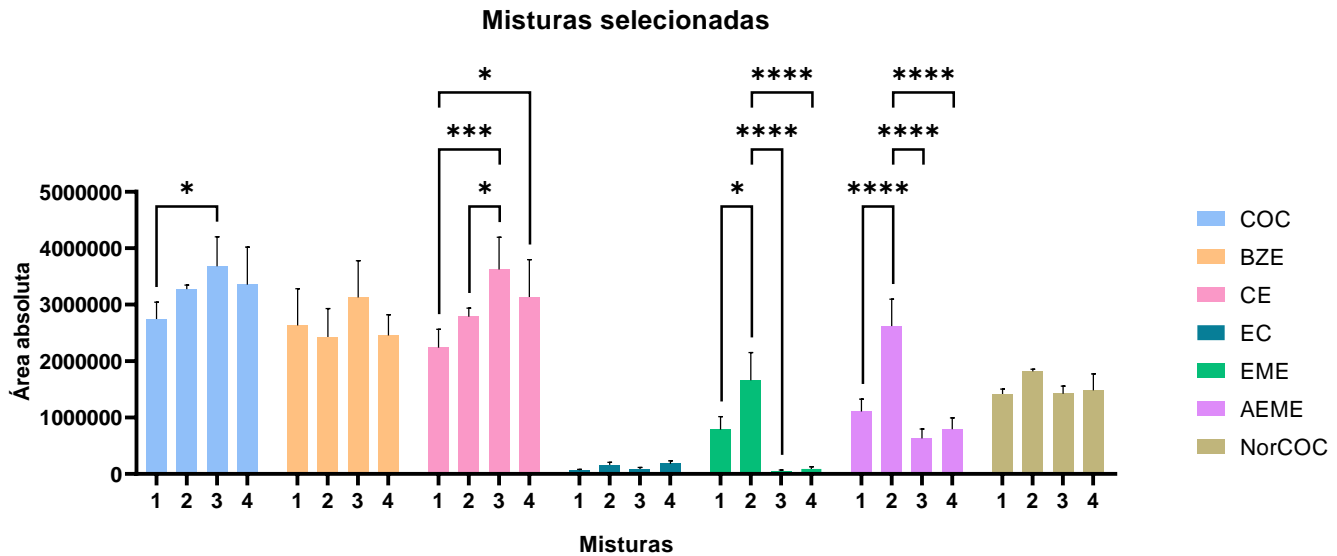


Gráfico 3. Teste em triplicata das melhores misturas

Legenda: mistura (1) 64,5:34,5:1; mistura (2) 50:48:2; mistura (3) 65:35; e mistura (4) 51:49.

*: diferença significativa, quanto mais *, maior a certeza da diferença significativa.

As DLLMEs tradicionalmente utilizam volumes de solventes em torno de μL (Fisichella et al., 2015; Vincenti et al., 2019), enquanto a DLLME desenvolvida neste projeto utiliza 2 mL da mistura de solventes. No entanto, a amostra de TCU apresenta limitações em vista de sua complexidade. Além disso, esta técnica mostra-se mais verde do que as SPEs desenvolvidas até o momento para análise de COC e seus produtos em TCU, sendo que o volume de solvente de eluição destes trabalhos variam entre 2-8 mL (de Castro et al., 2011; Haglock-Adler et al., 2016; D. Montgomery et al., 2005; Winecker et al., 1997), além de ter a necessidade de solventes nas etapas de condicionamento (de Castro et al., 2009) e até mesmo de homogeneização do tecido (Alexander et al., 2018). Ademais, através do experimento de mistura, foi possível reduzir a proporção de diclorometano, solvente mais tóxico da mistura, que passou de 78% para 50%.

5.3. Validação do método

5.3.1. Estudo de interferentes

Neste estudo foi realizado uma análise de 10 amostras de TCU (branco) provenientes de fontes diferentes para avaliar possíveis interferentes endógenos presentes nesta matriz. Também foi selecionado uma amostra branco e adicionado os deuterados à 100 ng/g para demonstrar se os padrões internos interferem no sinal dos analitos; e em uma outra amostra

branco foi adicionado um pool de analitos à 2 µg/g para avaliar se estes interferem no sinal dos padrões internos.

Além disso, foram analisadas substâncias que podem ter sido administradas durante a gestação, assim como medicamentos de uso contínuo pelas gestantes e substâncias ilícitas que podem ter sido consumidas pelas participantes de acordo com os relatos coletados. De acordo com o guia é necessário realizar 4 injeções de um pool de padrão com todas as substâncias em uma concentração que seria equivalente à 2 µg/g sem padrão interno (Tabela 8).

Tabela 8. Substâncias analisadas (2 µg/g)
Cafeína
Nicotina
Delta-9-THC, canabinol, canabidiol, THC-COOH
Anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA
Fenobarbital, secobarbital, pentobarbital
Paroxetina, fluoxetina, norfluoxetina, sertralina, amitriptilina, nortriptilina, imipramina, desipramina
Midazolam, nitrazepam, nordiazepam, oxazepam, flunitrazepam, bromazepam, aminoclonazepam, alprazolam, cloazepam, diazepam

Legenda: THC-COOH, ácido 11-nor-delta9-tetrahydrocannabinol-9-carboxílico. Delta-9-THC, delta-9-tetrahydrocannabinol. MDA, metilenedioxianfetamina. MDMA, 3,4-metilenodioximetanfetamina.

De acordo com os resultados, não foi demonstrado interferências entre os analitos e os padrões internos. Além de não ter sido observado a presença de interferentes endógenos e exógenos nos ensaios realizados, levando em consideração os íons utilizados para identificação dos analitos e seus respectivos tempos de retenção. Logo, o método mostrou-se seletivo e específico para o objetivo proposto, e portanto, na presença de interferentes não foi identificado os picos referentes aos analitos e padrões internos.

5.3.2. LOD – limite de detecção

Entre as abordagens para definição do LOD em análise quantitativa, foi escolhido usar o valor do calibrador mais baixo diferente de zero. Ou seja, foi definido o valor mais baixo diferente de zero, no qual era possível identificar e detectar os analitos, de acordo com a capacidade da extração e do método (Tabela 9). Para avaliar se todos os critérios de identificação foram atendidos é necessário analisar três amostras de fontes diferentes em três corridas diferentes.

Tabela 9. Limites de detecção	
Analitos	Valores de LOD (ng/g)
COC	15
BZE	15
CE	20
EC	25
EME	15
NorCOC	20

Alguns trabalhos que realizaram análises de determinação de COC em TCU usando separação por fase sólida conseguiram atingir LODs menores, variando de 0,5-1 ng/g (para COC e BZE, respectivamente) (de Castro et al., 2009) ou até mesmo de 0,1 ng/g (para BZE) (Alexander et al., 2018), porém estas amostras foram analisadas, respectivamente, em cromatografia líquida de armadilha de íons acoplada à espectrometria de massa e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem. Tais equipamentos possuem maior sensibilidade e conseqüentemente são capazes de detectar em concentrações mais baixas. Enquanto no trabalho realizado por Winecker *et al.* (Winecker et al., 1997), no qual foi analisado TCU usando extração por fase sólida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, atingiram LODs maiores, ficando entre 2,5-25 ng/g. Tal trabalho pode ser melhor comparado com o projeto, uma vez que utiliza o mesmo tipo de equipamento

de análise, porém conseguiu atingir alguns resultados menores, visto que foi utilizado uma extração por fase sólida, que possibilita uma maior recuperação dos analitos. Apesar do projeto não apresentar baixos LODs como os demais trabalhos, os limites obtidos foram suficientes para análise das amostras possivelmente positivas.

Apesar da AEME ter sido analisada ao longo dos testes, do delineamento de planejamento fatorial e do experimento de misturas, este analito não foi incluso na validação, devido à sua dificuldade de análise, uma vez que nem sempre era detectado ou não apresentava uma variação aceitável. Tal situação pode ser explicada pela grande variabilidade observada na formação de AEME a partir da COC e a formação depende de temperatura (Scheidweiler et al., 1990). Sendo assim, as condições de temperatura do injetor, com a rampa chegando à 260°C e sob o vácuo, estariam muito acima das observadas em um cachimbo de crack, e provavelmente o que se observava nos cromatogramas seriam concentrações de AEME acima do esperado. Logo há uma limitação do método de análise, o qual necessitaria de ajustes nas temperaturas para que este analito fosse quantificado. Na Figura 2 é demonstrado um cromatograma de um pool contendo todos analitos (na concentração de 10 µg/mL) que foram quantificados e validados no método. Vale ressaltar que a AEME não consta no cromatograma, uma vez que foi excluída. Além disso, todos os deuterados também foram detectados, porém não demonstrados no cromatograma.

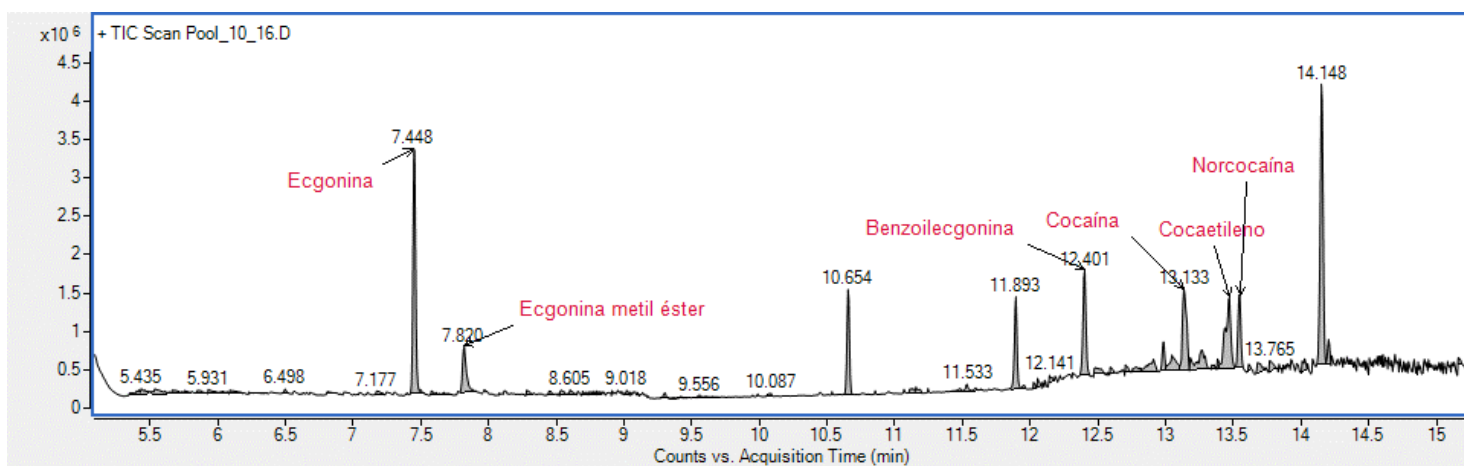


Figura 2. Cromatograma do pool do analitos na concentração de 10 µg/mL.

Fonte: *MassHunter*, GC-MS *Agilent*.

5.3.3. Linearidade

A linearidade foi determinada através de análise de um mínimo de quintuplicatas de

amostras negativas com adicionado dos analitos de interesse em pelo menos seis concentrações diferentes. Foi definido uma faixa de trabalho de 25, 75, 250, 500, 750 e 1000 ng/g, sendo que a ecgonina iniciou a faixa com a concentração de 30 ng/g. Esta faixa foi definida considerando as metodologias de determinação de COC e seus produtos em TCU, a amostra positiva previamente analisada e a capacidade do equipamento. A área relativa entre os analitos e respectivo padrão interno foi utilizada para o cálculo de regressão linear, expresso pelo coeficiente de correlação (r) e para estabelecer o modelo de calibração apropriado. No caso da EC foi utilizado como padrão interno o deuterado de BZE e para NorCOC foi usado o deuterado de COC, tais escolhas foram feitas considerando às semelhanças físico-químicas entre os analitos e os padrões.

O método mostrou-se linear na faixa de concentração estabelecida, sendo que a linearidade foi avaliada empregando-se o ajuste de reta pelo método dos mínimos quadrados ponderados, sendo selecionado, pela avaliação da heterocedasticidade, o modelo de equação da reta com menor somatória de erros relativos, para que os resultados quantitativos sejam precisos e confiáveis. As equações para linearidade podem ser observadas na Tabela 10.

Tabela 10. Equação da reta ajustada ao melhor modelo de regressão linear

Analitos	Equação da reta	r	Ponderação
COC	$y = 0,01033 x + 0,03049$	0,9983	1/Y ²
BZE	$y = 0,01048 x + 0,04419$	0,9971	1/X ^{1/2}
CE	$y = 0,00890 x + 0,03306$	0,9989	1/Y ²
EC	$y = 0,00099 x - 0,00141$	0,9932	1/Y ²
EME	$y = 0,00946 x - 0,12494$	0,9842	1/X ²
NorCOC	$y = 0,00610 x + 0,01804$	0,9987	1/Y ²

5.3.4. LOQ – limite de quantificação

Entre as abordagens para definição do LOQ em análise quantitativa, foi escolhido usar o valor do calibrador mais baixo diferente de zero. Para isso é necessário avaliar um

mínimo de três amostras de fontes diferentes em três corridas, para demonstrar que todos os critérios de detecção, identificação, exatidão e precisão foram atendidos. Nesta abordagem, é aceitável usar as mesmas réplicas do calibrador usadas para estabelecer o modelo de calibração, mas amostras adicionais são necessárias para atender ao mínimo de nove pontos de dados.

Dessa maneira, a curva de calibração é usada para que as áreas relativas dos LOQs sejam aplicadas na equação da reta gerada, obtendo-se suas respectivas concentrações. A exatidão é obtida através de uma comparação entre a concentração obtida e a concentração nominal. Para precisão é necessária uma análise de variância (ANOVA) usando a “corrida/dia” como agrupamento, sendo que as precisões intra-ensaio são calculadas para cada concentração separadamente para cada uma das cinco corridas e a precisão inter-ensaio é calculada para cada concentração ao longo das cinco corridas. No **Anexo 7.1** segue as fórmulas aplicadas para obtenção do coeficiente de variação, exatidão e precisão.

Tabela 11. Limites de quantificação

Analitos	LOQ (ng/g)	CV%	Exatidão	Precisão	
				Intra-ensaio	Inter-ensaio
COC	25	14,85	-2,6650	17,4151	8,7487
BZE	25	10,71	4,1512	11,4757	6,2356
CE	25	18,61	-11,5064	13,1455	11,3866
EC	30	15,01	-3,1882	12,7136	9,2410
EME	25	9,57	3,7860	12,5841	5,7443
NorCOC	25	13,45	-6,2650	15,5046	7,9051

Legenda: CV%: coeficiente de variação.

De acordo com os resultados demonstrados na Tabela 11 pode-se concluir que os LOQs definidos são aceitáveis conforme o guia, uma vez que, o coeficiente de variação, exatidão e precisão, inter e intra-ensaios, apresentaram valores que não excederam $\pm 20\%$.

5.3.5. Precisão e exatidão/Recuperação

Para avaliação da precisão e da exatidão deve-se analisar as três concentrações de controle (baixo, médio e alto) usando no mínimo triplicatas em cinco corridas diferentes. Dessa maneira, em cada um dos cinco dias é feito uma curva de calibração que é usada para que as áreas relativas de cada controle sejam aplicadas na equação da reta gerada, obtendo-se suas respectivas concentrações. A exatidão é obtida através de uma comparação entre a média de cada concentração obtida e sua respectiva concentração nominal. Enquanto para precisão é necessária uma análise de variância (ANOVA) usando a “corrida/dia” como agrupamento, sendo que a precisão intra-ensaio é calculada para cada concentração separadamente para cada uma das cinco corridas e a precisão inter-ensaio é calculada para cada concentração ao longo das cinco corridas. No **Anexo 7.3** segue as fórmulas aplicadas para obtenção do coeficiente de variação, exatidão e precisão.

Tabela 12. Precisão e exatidão/ recuperação – COC, BZE e CE

Analitos	Controles (ng/g)	Exatidão (%)	Precisão		RE%
			Intra-ensaio (%)	Inter-ensaio (%)	
COC	50	-2,04	9,14	5,89	15,67
	450	-1,93	9,15	3,33	14,76
	800	-0,30	13,92	5,29	18,57
BZE	50	-2,72	18,07	5,13	9,33
	450	-1,44	16,97	4,58	9,16
	800	-2,56	11,53	4,05	12,28
CE	50	-6,41	16,93	5,77	13,91
	450	-3,00	14,93	4,89	12,97
	800	-1,92	10,18	4,62	17,09

De acordo com as Tabelas 12 e 13, pode-se observar que para todos analitos, nas três concentrações de controle, os valores de precisão, intra e inter-ensaio, assim como os obtidos para exatidão não excederam $\pm 20\%$, estando, portanto, dentro dos limites aceitáveis.

Tabela 13. Precisão e exatidão/ recuperação – EC, EME e NorCOC

Analitos	Controles (ng/g)	Exatidão (%)	Precisão		RE%
			Intra-ensaio (%)	Inter-ensaio (%)	
EC	50	-8,74	10,96	8,15	0,55
	450	-9,64	13,52	8,72	0,97
	800	-3,06	8,49	6,86	1,65
EME	50	-16,36	18,49	7,22	20,73
	450	-4,93	11,77	4,74	25,20
	800	-0,08	11,70	4,28	21,63
NorCOC	50	2,01	13,27	7,62	15,39
	450	-4,36	9,52	6,68	11,56
	800	-4,30	15,90	8,11	16,84

Por fim, a recuperação foi avaliada de acordo com o artigo de Mastuszewski *et al.* (Matuszewski et al., 2003), no qual é necessário a análise de quintuplicatas de amostras de TCU de fontes variada tanto para analisar o extrato enriquecido com os analitos após a extração (*set 2 - C*), como para a análise das amostras em que os analitos são adicionados antes de dar início ao processo de extração (*set 3 - B*). Dessa maneira, a avaliação da

capacidade de recuperar os analitos na extração é realizada através da comparação entre o que seria o 100% de extração dos analitos (*C*) em relação ao que pode ser extraído pela DLLME (*B*). A porcentagem de recuperação é expressa pela fórmula demonstrada no **Anexo 7.3**.

Vale ressaltar que no artigo, o autor não especifica exatamente qual concentração deve ser usada como referência para análise deste parâmetro. Portanto, optou-se por avaliar as concentrações de controle (baixo, médio e alto). De acordo com os resultados demonstrados nas Tabelas 12 e 13, em geral os analitos apresentaram baixa recuperação. Apesar de tais valores, de acordo com os artigos de Peters *et al.* (Peters *et al.*, 2007) e de Tiwari, Gaurav e Tiwari, Ruchi (Tiwari & Tiwari, 2010), diversos autores concordam que a recuperação não seja o parâmetro mais importante para a validação, contanto que os LODs, LOQs, exatidão e precisão sejam aceitáveis, considerando-se importante apenas alcançar uma recuperação reprodutível e com valores suficientes para o objetivo proposto (Dadgar *et al.*, 1995; Hartmann *et al.*, 1998; McKay & Yacobi, 2000). Além disso, a EC foi o analito que apresentou os menores valores de recuperação (0,55-1,65%), porém foi capaz de ser quantificada devido ao seu alto sinal analítico, o maior entre todos os analitos (como demonstrado anteriormente na Figura 2).

5.3.6. *Carryover*

A análise de *carryover* têm como objetivo avaliar se o método não apresenta arraste, ou seja, uma transferência de analitos de uma amostra para as seguintes. Caso tal situação aconteça o método torna-se impreciso e conseqüentemente precisa de um ajuste, quando não for possível eliminar o arraste, deve-se encaminhar um procedimento operacional padrão de como será administrado. Sendo assim, para avaliação deste parâmetro é necessário analisar amostras branco em triplicata, considerando-se aceitável que a análise seja feita após o ponto mais alto da curva de calibração. Considerando os resultados obtidos, o método de determinação de COC e seus produtos não apresentou *carryover*, visto que nas amostras branco corridas após o ponto mais alto da curva não houve transferência, logo o sinal dos analitos de interesse não excedeu 10% do menor ponto da curva de calibração.

5.3.7. *Amostras reais*

O método validado foi aplicado em dez amostras de tecidos de cordão umbilical humano, que de acordo com o relatório, com a triagem e/ou confirmação em urina por GC-

MS, possivelmente seriam positivas. Além disso, para cada amostra foi analisado separadamente dos segmentos referentes às três regiões do tecido (fetal, intermediário e placenta), quando disponíveis, com o objetivo de avaliar se haveria alguma diferença e/ou concordância na determinação de COC e seus produtos entre as diferentes regiões do TCU. Entre as amostras analisadas, apenas quatro apresentaram um resultado positivo para alguns dos analitos de interesse.

Tabela 14. Amostras positivas (n=4)

Amostras	Partes	COC (ng/g)	BZE (ng/g)	EC (ng/g)	EME (ng/g)
HC020	Fetal	190,47	39,62	-	39,94
	Placenta	-	-	-	-
	Fetal	-	-	-	-
HC021	Interm.	43,14	-	-	Abaixo do LOQ
	Placenta	-	-	-	-
	Fetal	167,96	Acima de 1000	320,79	464,28
HC042	Interm.	137,97	Acima de 1000	420,54	391,47
	Placenta	95,06	Acima de 1000	319,50	244,28
HC043	Fetal	-	182,17	31,40	-

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 14, ficou comprovado que não há uma tendência de determinação de COC e seus produtos em cada uma das regiões do tecido. Além disso, foi possível observar que uma determinada região de uma amostra pode apresentar um resultado positivo para algum dos analitos (e.g. HC020 fetal), enquanto o tecido de outra região, da mesma amostra, apresenta um resultado negativo (e.g. HC020 placenta). Estes resultados levantam um questionamento quanto aos demais trabalhos realizados para tecido de cordão umbilical humano, uma vez que a maioria não informa como foi feita a seleção do tecido usado no preparo de amostra ou a seleção foi feita de forma

aleatória (Winecker et al., 1997). Além disso, em nenhuma das amostras foi detectado a presença de CE e NorCOC, portanto, seria necessário a análise de mais amostras para confirmar a relevância destes analitos para tecido de cordão umbilical. Resultados semelhantes em relação ao CE também foram apresentados em outros trabalhos (Concheiro et al., 2013; Marin et al., 2014; Winecker et al., 1997), porém Winecker *et al.* identificou em amostras reais (n = 2) altas concentrações de NorCOC (0-172 ng/mL) (Winecker et al., 1997).

Tabela 15. Questionário das amostras positivas

Mães	Cocaína/crack (frequência de uso na gestação)	Outras drogas (uso na vida e/ou gestação)	Comorbidade	Triagem (BZE)	GC-MS (BZE, ng/mL)
HC020	1 ou 2 vezes	Tabaco, álcool e <i>cannabis</i>	Rubéola congênita	Negativo	0,55
HC021	3 primeiros meses	Tabaco, álcool, <i>cannabis</i> e estimulantes	Usuária de cocaína e depressão	Negativo	4,19
HC042	1 °, 2° e 3° trimestre	Tabaco, álcool, <i>cannabis</i> e estimulantes	Usuária de cocaína	Positivo	2478,03
HC043	1 °, 2° e 3° trimestre	Tabaco e <i>cannabis</i>	Doença hipertensiva específica da gravidez	Positivo	801,95

Pode-se notar que na amostra HC042 foi determinado diversos analitos em concentrações consideravelmente elevadas. Considerando as informações do questionário (Tabela 15), tal resultado pode ser explicado pelo fato da mãe ter relatado ser usuária de cocaína, agravada pelo fato de viver em situação de rua. O recém-nascido e a mãe referentes à amostra HC042 apresentaram no parto sintomas de síndrome de abstinência. O mesmo sintoma também foi observado na mãe e recém-nascido referentes à amostra HC021, sendo

que a mãe também informou ser usuária de cocaína. Esta mãe relatou uso de COC/*crack* somente nos três primeiros meses e apresentou resultado negativo na triagem de urina, porém na análise por GC-MS foi confirmado a presença de BZE em urina, o que contraria o relato. Na amostra de tecido HC021 foi demonstrado baixa concentração de COC e detectado EME abaixo do LOQ, apenas na região intermediária do cordão. Todas as informações obtidas sugerem a possibilidade de que a mãe tenha feito uso de COC/*crack*, durante a gestação, maior do que foi relatado. Na amostra HC020 foi quantificado COC, BZE e EME, apesar da mãe ter relatado uso de COC/*crack* apenas 1 ou 2 vezes. Já no tecido HC043 foi quantificado BZE e EC, porém menos analitos foram determinados e em menores concentrações, diferentemente da amostra HC042, em que a mãe também relatou uso nos três trimestres. No entanto, na amostra HC043, a mãe não relatou ser usuária de cocaína, o que poderia explicar essa diferença entre duas amostras de cordão provenientes de mães que fizeram uso de COC/*crack* ao longo de toda gestação.

Entre as amostras de TCU que apresentaram resultados negativos ($n = 6$) para todos analitos, uma mãe relatou uso de COC/*crack* apenas no terceiro trimestre, duas relataram uso no primeiro trimestre, sendo que uma delas descobriu sua gravidez em uma clínica de reabilitação, e uma relatou uso nos primeiros quatro meses, estes relatos podem explicar o motivo das amostras referentes à estas mães não terem apresentado um resultado positivo, uma vez que não houve uma exposição crônica/prolongada ao longo de toda gestação. Contrariando as expectativas, uma mãe relatou uso nos três trimestres, porém na análise das três regiões de TCU nenhum dos analitos de interesse foram detectados. Apesar do resultado controverso, não se pode afirmar com certeza a frequência do uso ao longo da gestação, havendo a possibilidade de usos pontuais, uma vez que a mãe não relatou ser usuária de cocaína. Tal resultado também poderia ser obtido se a matriz estivesse em concentrações abaixo do LOD. Além disso, entre as amostras de TCU negativas, apenas uma mãe informou no questionário que não havia usado drogas durante a gestação, porém relatou uso de *cannabis* para os médicos e apresentou resultado negativo para triagem de BZE em urina. No entanto, fazendo a análise da urina por GC-MS foi confirmado a presença de BZE, por este motivo que as amostras de TCU referentes à esta mãe (HC040) foram analisadas.

Tabela 16. Questionário das amostras negativas

Mães	Cocaína/crack (frequência de uso na gestação)	Outras drogas (uso na vida e/ou gestação)	Comorbidade/ Doenças sexualmente transmissíveis	Triagem (BZE)	GC-MS (BZE, ng/mL)
HC017	4 primeiros meses	Tabaco, álcool, <i>cannabis</i> e estimulantes	Hipotireoidismo	Negativo	Não detectado
HC039	1 °, 2° e 3° trimestre	Tabaco, álcool e <i>cannabis</i>	Hipotireoidismo	Negativo	1,32
HC040	Não relatou uso	<i>Cannabis</i>	Síndrome gripal, pneumonia e sífilis	Negativo	4,59
HC041	1 ° trimestre	Tabaco	HIV	Negativo	5,93
HC048	1 ° trimestre	Tabaco, álcool e <i>cannabis</i>	Depressão	Negativo	Não detectado
HC051	3° trimestre	Álcool e <i>cannabis</i>	Usuária de cocaína	Negativo	Não detectado

6. Conclusão

Em síntese, a DLLME desenvolvida mostrou-se apropriada para extrair COC, BZE, CE, EC, EME e NorCOC em amostras de tecido de cordão umbilical humano, apesar de apresentar uma baixa recuperação. O método validado permitiu a quantificação de todos os analitos de interesse. Além disso, a extração é simples, com poucas etapas, sem a necessidade de dispositivos, baixo custo, uso de menos solventes em relação às demais técnicas já aplicadas para esta amostra e, portanto, segue os princípios da Toxicologia Analítica Verde. Apesar do uso de diclorometano, esta extração conseguiu diminuir sua proporção na mistura para 50%, sendo usado apenas 1 mL do solvente clorado.

Com base nos resultados das amostras positivas, pode-se concluir que a determinação de COC e seus produtos é mais provável em casos de mães que relataram ser usuárias ou apresentaram um uso crônico da droga, porém isso não implica no fato de que o uso de COC/*crack* pela mãe durante a gestação acarreta uma exposição materno-fetal, independentemente de sua frequência. No entanto, demonstra que os analitos para confirmação da exposição podem não ser detectados em casos de usos pontuais ou por poucos meses ou devido à limitações de detecção e recuperação dos analitos.

7. Anexo

7.1. Análise de Variância

Análise de Variância (COC)

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	2	3,14303E+12	1,57151E+12	53,89	0,096
Linear	2	3,14303E+12	1,57151E+12	53,89	0,096
Agitação	1	2,92914E+12	2,92914E+12	100,45	0,063
PSA	1	2,13887E+11	2,13887E+11	7,33	0,225
Erro	1	29160172932	29160172932		
Total	3	3,17219E+12			

Análise de Variância (BZE)

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	2	3,26375E+12	1,63188E+12	38,02	0,114
Linear	2	3,26375E+12	1,63188E+12	38,02	0,114
Agitação	1	1,10431E+12	1,10431E+12	25,73	0,124
PSA	1	2,15944E+12	2,15944E+12	50,31	0,089
Erro	1	42926038596	42926038596		
Total	3	3,30668E+12			

Análise de Variância (CE)

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	2	2,90947E+12	1,45473E+12	10,81	0,210
Linear	2	2,90947E+12	1,45473E+12	10,81	0,210
Agitação	1	2,30189E+12	2,30189E+12	17,11	0,151
PSA	1	6,07577E+11	6,07577E+11	4,52	0,280
Erro	1	1,34528E+11	1,34528E+11		
Total	3	3,04399E+12			

Análise de Variância (EC)

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	2	133689523	66844761	0,00	0,995
Linear	2	133689523	66844761	0,00	0,995
Agitação	1	75021582	75021582	0,01	0,953
PSA	1	58667940	58667940	0,00	0,958
Erro	1	13483041572	13483041572		
Total	3	13616731095			

Análise de Variância (EME)

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	2	1,03943E+12	5,19713E+11	1,80	0,466
Linear	2	1,03943E+12	5,19713E+11	1,80	0,466
Agitação	1	2,11049E+11	2,11049E+11	0,73	0,550
PSA	1	8,28377E+11	8,28377E+11	2,87	0,339
Erro	1	2,88603E+11	2,88603E+11		
Total	3	1,32803E+12			

Análise de Variância (AEME)

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	2	2,26248E+12	1,13124E+12	2,00	0,448
Linear	2	2,26248E+12	1,13124E+12	2,00	0,448
Agitação	1	3,34661E+11	3,34661E+11	0,59	0,583
PSA	1	1,92782E+12	1,92782E+12	3,40	0,316
Erro	1	5,66766E+11	5,66766E+11		
Total	3	2,82925E+12			

Análise de Variância (NorCOC)

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	2	16391872778	8195936389	0,04	0,959
Linear	2	16391872778	8195936389	0,04	0,959
Agitação	1	9018731089	9018731089	0,05	0,862
PSA	1	7373141689	7373141689	0,04	0,875
Erro	1	1,85352E+11	1,85352E+11		
Total	3	2,01744E+11			

7.2. Gráfico de Efeitos Principais

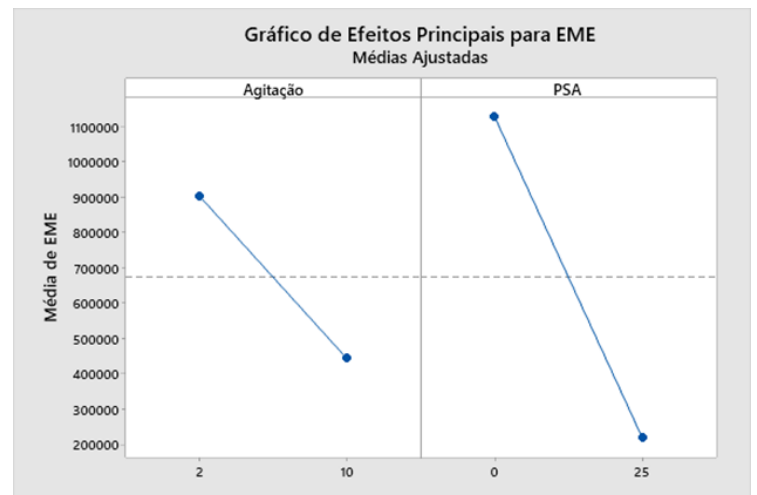
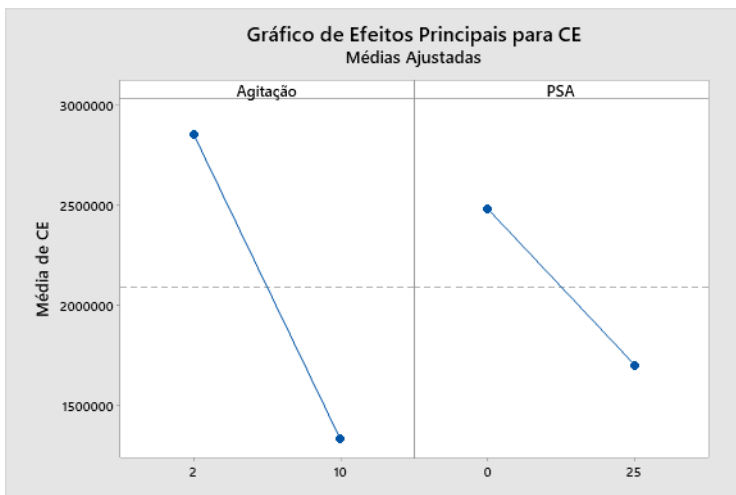
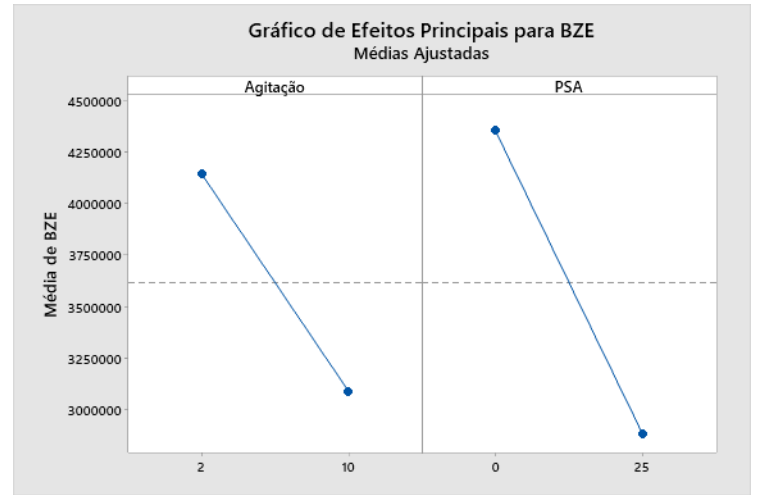
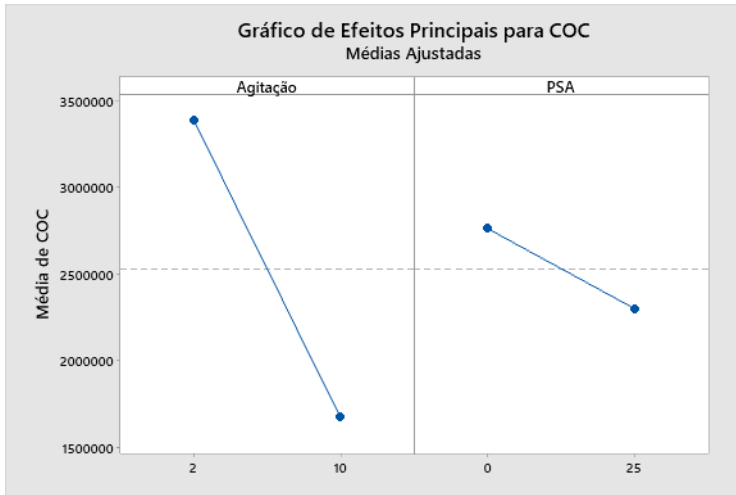


Gráfico de Efeitos Principais para EC
Médias Ajustadas

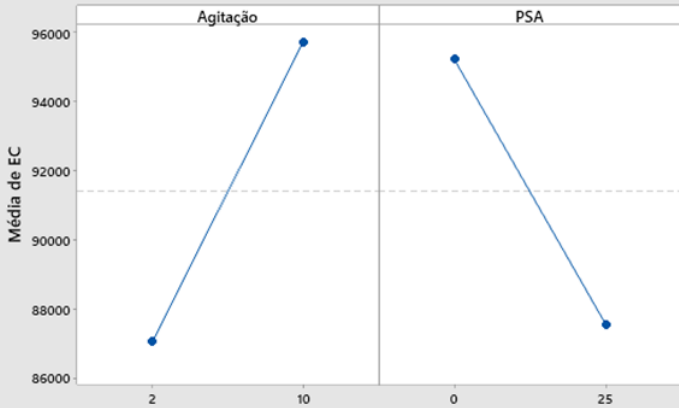


Gráfico de Efeitos Principais para NorCOC
Médias Ajustadas

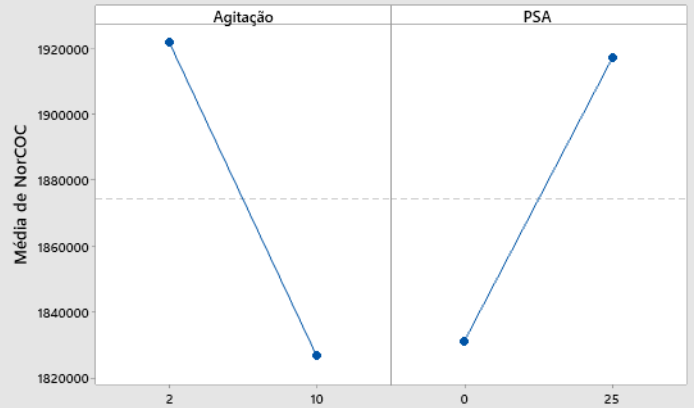
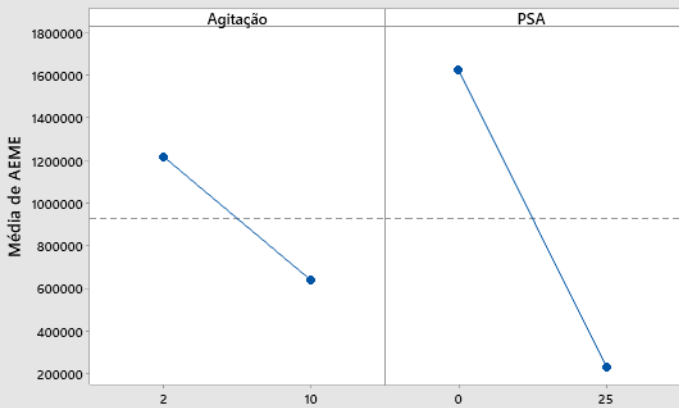


Gráfico de Efeitos Principais para AEME
Médias Ajustadas



7.3. Fórmulas

Coefficiente de variação (CV%):

$$CV\% = \frac{DesvPad}{Média\ das\ AR}$$

Exatidão (Bias):

$$Bias\ (\%) = \left[\frac{Média\ das\ conc.\ calculada / Conc.\ nominal}{Conc.\ nominal} \right] *$$

Precisão intra-ensaio:

$$Intra = \left[\frac{\sqrt{MSwg}}{Média\ geral\ para\ cada\ conc.} \right] * 100$$

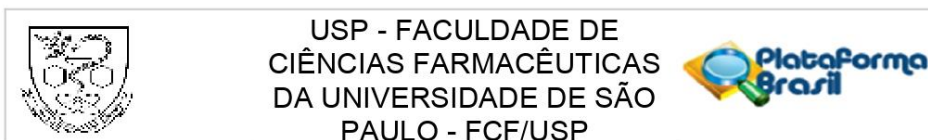
Precisão inter-ensaio:

$$Inter = \left[\frac{\sqrt{\frac{MSbg + (n-1) * MSwg}{n}}}{Média\ geral\ para\ cada\ conc.} \right] * 100$$

Recuperação (%):

$$RE\ (\%) = \frac{C}{B} * 100$$

7.4. Aprovação do Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Tecido do cordão umbilical como nova matriz para o diagnóstico da exposição fetal ao tetraidrocannabinol e à cocaína: comparação com mecônio

Pesquisador: Mauricio Yonamine

Área Temática:

Versão: 6

CAAE: 53929216.8.0000.0067

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.540.865

Apresentação do Projeto:

O abuso de drogas atinge aproximadamente 324 milhões de pessoas em todo planeta. Este alto número de usuários tem gerado grande preocupação devido seu potencial devastador, oferecendo graves riscos à saúde humana, intoxicações fatais, problemas psicossociais e econômicos além de subjugar um grande contingente de indivíduos à condição de dependência e marginalização social. No Brasil, o número de usuários tem crescido principalmente no consumo de maconha e cocaína, drogas amplamente difundidas, inclusive entre mulheres em período gestacional, trazendo à tona um novo grupo de risco com grande impacto na saúde pública. O abuso de drogas por gestantes traz danos irreversíveis ao neonato, favorece a negligência materna e aumenta as taxas de mortalidade fetal. Entretanto, este problema é pouco explorado no Brasil e em outros países. Os dados epidemiológicos são escassos e a avaliação da exposição in utero depende em grande parte do relato da própria mãe, que muitas vezes omite ou nega o consumo de drogas. Ademais, os exames comprobatórios com amostras convencionais (urina e sangue) possuem grandes limitações de coleta e processamento bem como pequeno período de detecção após exposição. O desenvolvimento de novos métodos que comprovem o uso de drogas durante o período da gravidez tem sido um desafio para a toxicologia social. Alguns estudos com matrizes alternativas materno-fetais tem utilizado mecônio e cordão umbilical para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico. Este trabalho visa abordar a aplicabilidade do tecido do cordão umbilical em

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br



USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FCF/USP



Continuação do Parecer: 4.540.865

comparação ao mecônio como alternativa de diagnóstico e comprovação da exposição in utero a substâncias ilícitas. Para a avaliação desta exposição, a matriz biológica será submetida à extração acelerada por solvente (ASE), um método ambientalmente seguro, associado à cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas, técnicas sensíveis e específicas para detecção de compostos químicos. O cordão umbilical é a principal interface entre a mãe e o feto. Fornece um amplo histórico do abuso de intoxicantes pelas mães, está disponível em todos os bebês e pode ser coletado imediatamente após o nascimento em quantidade suficiente para as análises, trazendo vantagens analíticas desde o procedimento de coleta e processamento. No entanto, a falta de dados relativos a esta amostra biológica traz um desafio para o desenvolvimento de métodos de analíticos eficientes que possam contribuir para o monitoramento de substâncias de abuso na gravidez.

O projeto coletará amostras de urina de 300 gestante, e o cordão umbilical e mecônio (72h após parto) dos Bebês logo após o parto. Serão pacientes do Hospital Universitário da USP.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Desenvolver e validar método de detecção de biomarcadores da exposição intrauterina à maconha e cocaína, utilizando como matriz biológica o tecido de cordão umbilical, e, em seguida, comparar seu desempenho de detecção em relação a um método já desenvolvido para mecônio.

Objetivo Secundário:

Avaliar o perfil de epidemiológico do uso de substância ilícitas na população estudada e fornecer informações para a escolha de um método de diagnóstico para o uso dessas drogas durante a gravidez.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos são mínimos, pois esta pesquisa não terá nenhum impacto sobre a fertilidade, a gravidez, o embrião ou o feto, o trabalho de parto, o puerpério, a lactação e o recém-nascido, sendo as coletas realizadas de modo não invasivo, evitando desconfortos.

Benefícios:

Não haverá benefícios diretos às mães doadoras de amostra, nem às suas crianças, mas os exames laboratoriais desenvolvidos poderão colaborar no entendimento da quantidade de substâncias psicoativas que atravessam a barreira transplacentária, distribuindo-se no tecido do cordão

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br



USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FCF/USP



Continuação do Parecer: 4.540.865

umbilical e mecônio e se esses níveis poderiam ter algum efeito ou não sobre as crianças. O diagnóstico do abuso de drogas na gravidez de pode auxiliar na definição de um plano terapêutico específico e individualizado aos pacientes expostos ao uso de drogas, diminuindo riscos à saúde.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Solicitação de emenda: Inclusão de pesquisadora no projeto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A declaração de participação da pesquisadora foi apresentado.

Recomendações:

sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1556611_E4.pdf	05/02/2021 16:39:29		Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Gabriela.pdf	05/02/2021 16:38:23	Mauricio Yonamine	Aceito
Outros	Termo_Compromisso_datado_assinado.pdf	12/09/2018 23:59:44	Mauricio Yonamine	Aceito
Outros	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_1744736_E1.pdf	12/09/2018 23:58:38	Mauricio Yonamine	Aceito
Outros	vinculo_estrangeiro.pdf	12/09/2018 23:58:21	Mauricio Yonamine	Aceito
Outros	Carta_concessao_Bolsa.pdf	12/09/2018 23:57:26	Mauricio Yonamine	Aceito
Outros	Justificativa_Emenda_Envio_Amostras_Exterior_10_09_2018.pdf	12/09/2018 23:55:27	Mauricio Yonamine	Aceito
Outros	Aprova_TCC.pdf	10/09/2018 16:57:20	Mauricio Yonamine	Aceito
Outros	Carta_TCC.pdf	13/03/2018 09:11:40	Mauricio Yonamine	Aceito
Outros	Carta_emenda.pdf	15/02/2018 15:47:04	Mauricio Yonamine	Aceito

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br



USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FCF/USP



Continuação do Parecer: 4.540.865

Declaração de Pesquisadores	Declaracao_M_Loturco.jpg	15/02/2018 15:46:35	Mauricio Yonamine	Aceito
Outros	instrumento_coleta_de_dados.pdf	18/07/2016 16:29:37	Mauricio Yonamine	Aceito
Outros	Justificativa_para_Emenda.pdf	18/07/2016 16:28:40	Mauricio Yonamine	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	novo_TCLE_emenda.pdf	18/07/2016 16:27:17	Mauricio Yonamine	Aceito
Outros	Carta_resposta_CEP.pdf	12/04/2016 17:36:08	Mauricio Yonamine	Aceito
Outros	Justificativa_Biorrepositorio.pdf	12/04/2016 17:34:51	Mauricio Yonamine	Aceito
Outros	Declaracao_Infraestrutura_E_Compromisso.pdf	12/04/2016 17:34:20	Mauricio Yonamine	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Novo_TCLE_abril_2016.pdf	12/04/2016 17:33:23	Mauricio Yonamine	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_jefferson.pdf	04/03/2016 11:08:54	Mauricio Yonamine	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_participacao_Jefferson.pdf	02/03/2016 12:56:27	Mauricio Yonamine	Aceito
Outros	HU_Declaracao_sobre_beneficios_resultantes_antes.pdf	02/03/2016 11:50:15	Mauricio Yonamine	Aceito
Outros	HU_declaracao_de_compromisso_pesq_resp.pdf	02/03/2016 11:46:15	Mauricio Yonamine	Aceito
Outros	HU_Cronograma_de_execucao.pdf	02/03/2016 11:43:52	Mauricio Yonamine	Aceito
Outros	Orcamento_HU.pdf	02/03/2016 11:42:17	Mauricio Yonamine	Aceito
Outros	Instrumento_de_coleta_de_dados_jefferson.pdf	02/03/2016 11:37:02	Mauricio Yonamine	Aceito
Outros	HU_cadastro_de_protocolo_de_pesquisa.pdf	02/03/2016 11:34:03	Mauricio Yonamine	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.pdf	01/03/2016 18:31:36	Mauricio Yonamine	Aceito
Outros	Anuencia_Departamento_SANDRAFAR_SKY.pdf	01/03/2016 18:27:49	Mauricio Yonamine	Aceito
Outros	Descricao_da_equipe_jefferson.pdf	01/03/2016 18:26:10	Mauricio Yonamine	Aceito
Outros	APROVA_CIAPP.pdf	01/03/2016 18:22:56	Mauricio Yonamine	Aceito
Outros	APROVA_CEP_DOG.pdf	01/03/2016 18:22:14	Mauricio Yonamine	Aceito

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br



USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FCF/USP



Continuação do Parecer: 4.540.865

Outros	CAR_ANUENCIA_HU_DR_ROSSANA.pdf	01/03/2016 18:19:26	Mauricio Yonamine	Aceito
Outros	Anuencia_CPesq_Mauricio_Yonamine.pdf	01/03/2016 18:18:22	Mauricio Yonamine	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Jefferson_Pereira.pdf	01/03/2016 18:13:14	Mauricio Yonamine	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Recurso_APROVADO_capes_forense_DOU.pdf	01/03/2016 18:12:01	Mauricio Yonamine	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_participacao_Edna_Diniz.pdf	01/03/2016 18:09:22	Mauricio Yonamine	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_participacao_Rossana_vieira.pdf	01/03/2016 18:08:03	Mauricio Yonamine	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_de_participacao_vera_krebs.pdf	01/03/2016 18:07:08	Mauricio Yonamine	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Infraestrutura_Pesq_Mauricio_Yonamine.pdf	01/03/2016 18:00:53	Mauricio Yonamine	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	01/03/2016 17:55:05	Mauricio Yonamine	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 15 de Fevereiro de 2021

Assinado por:

**Neuza Mariko Aymoto Hassimotto
(Coordenador(a))**

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfc@usp.br

8. Referências

- Aghamohammadi, A., & Zafari, M. (2015). Crack abuse during pregnancy: maternal, fetal and neonatal complication. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 29(5), 795–797. <https://doi.org/10.3109/14767058.2015.1018821>
- Ahanya, S. N., Lakshmanan, J., Morgan, B. L. G., & Ross, M. G. (2005). Meconium passage in utero: Mechanisms, consequences, and management. *Obstetrical and Gynecological Survey*, 60(1), 45–56. <https://doi.org/10.1097/01.OGX.0000149659.89530.C2>
- Alexander, A., Abbas, L., Jones, M., Jones, J., Lewis, D., & Negrusz, A. (2018). Discordant Umbilical Cord Drug Testing Results in Monozygotic Twins. *Journal of Analytical Toxicology*, 42(5), e47–e49. <https://doi.org/10.1093/JAT/BKY009>
- Allen, K. R., Azad, R., Field, H. P., & Blake, D. K. (2005). Replacement of immunoassay by LC tandem mass spectrometry for the routine measurement of drugs of abuse in oral fluid. *Annals of Clinical Biochemistry*, 42(4), 277–284. <https://doi.org/10.1258/0004563054255632>
- Alvear, E., von Baer, D., Mardones, C., & Hitschfeld, A. (2014). Determination of cocaine and its major metabolite benzoylecgonine in several matrices obtained from deceased individuals with presumed drug consumption prior to death. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 23, 37–43. <https://doi.org/10.1016/J.JFLM.2014.01.003>
- Amorim Alves, E., Sofia Agonia, A., Manuela Cravo, S., Manuel Afonso, C., Duarte Pereira Netto, A., de Lourdes Bastos, M., Carvalho, F., & Jorge Dinis-Oliveira, R. (2017). GC-MS Method for the Analysis of Thirteen Opioids, Cocaine and Cocaethylene in Whole Blood Based on a Modified Quechers Extraction. *Current Pharmaceutical Analysis*, 13(3), 215–223.
- Anzillotti, L., Odoardi, S., & Strano-Rossi, S. (2014). Cleaning up blood samples using a modified “QuEChERS” procedure for the determination of drugs of abuse and benzodiazepines by UPLC–MSMS. *Forensic Science International*, 243, 99–106. <https://doi.org/10.1016/J.FORSCIINT.2014.05.005>
- ASB Standard 036, F. E. (2018). *Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology*. <http://asb.aafs.org>
- Asl, S., Khodayar, M. J., Mousavi, Z., & Akhgari, M. (2017). Methadone Extraction by Modified Quechers and Liquid-Liquid Extraction from Post-Mortem Urine by GC-MS. *J Med Toxicol Clin Forensic Med*, 3(2), 10. <https://doi.org/10.21767/2471-9641.100030>
- Bahls, F. C., & Bahls, S.-C. (2002). Cocaína: origens, passado e presente. *Interação Em Psicologia*, 6(2), 177–181. <https://doi.org/10.5380/PSI.V6I2.3305>
- Baik, J. H. (2013). Dopamine signaling in reward-related behaviors. *Frontiers in Neural Circuits*, 7(OCT), 152. <https://doi.org/10.3389/FNCIR.2013.00152/BIBTEX>

- Bastos, F. I. P. M., Vasconcellos, M. T. L. D., De Boni, R. B., Reis, N. B. D., & Coutinho, C. F. D. S. (2017). III Levantamento Nacional sobre o uso de drogas pela população brasileira. *ICICT/FIOCRUZ*. <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/34614>
- Cain, M. A., Bornick, P., & Whiteman, V. (2013). The maternal, fetal, and neonatal effects of cocaine exposure in pregnancy. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, *56*(1), 124–132. <https://doi.org/10.1097/GRF.0B013E31827AE167>
- Caio, R., Garcia, T., Torres, L. H., Trigo Balestrin, N., Andrioli, T. C., Flório, J. C., Rodrigues De Oliveira, C. D., Luiz Da Costa, J., Yonamine, M., Regina, M., Sandoval, L., Camarini, R., & Marcourakis, T. (2017). Anhydroecgonine methyl ester, a cocaine pyrolysis product, may contribute to cocaine behavioral sensitization. *Toxicology*, *376*, 44–50. <https://doi.org/10.1016/J.TOX.2016.04.009>
- Ciccarone, D. (2011). Stimulant Abuse: Pharmacology, Cocaine, Methamphetamine, Treatment, Attempts at Pharmacotherapy. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, *38*(1), 41–58. <https://doi.org/10.1016/J.POP.2010.11.004>
- Coe, M. A., Phipps, R. A. J., Cone, E. J., & Walsh, S. L. (2018). Bioavailability and Pharmacokinetics of Oral Cocaine in Humans. *Journal of Analytical Toxicology*, *42*(5), 285–292. <https://doi.org/10.1093/JAT/BKY007>
- Cognard, E., Rudaz, S., Bouchonnet, S., & Staub, C. (2005). Analysis of cocaine and three of its metabolites in hair by gas chromatography-mass spectrometry using ion-trap detection for CI/MS/MS. *Journal of Chromatography B*, *826*(1–2), 17–25. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2005.07.043>
- Concheiro, M., González-Colmenero, E., Lendoiro, E., Concheiro-Guisán, A., de Castro, A., Cruz-Landeira, A., & López-Rivadulla, M. (2013). Alternative matrices for cocaine, heroin, and methadone in utero drug exposure detection. *Therapeutic Drug Monitoring*, *35*(4), 502–509. <https://doi.org/10.1097/FTD.0B013E31828A6148>
- Concheiro, M., Lendoiro, E., de Castro, A., González-Colmenero, E., Concheiro-Guisan, A., Peñas-Silva, P., Macías-Cortiña, M., Cruz-Landeira, A., & López-Rivadulla, M. (2017). Bioanalysis for cocaine, opiates, methadone, and amphetamines exposure detection during pregnancy. *Drug Testing and Analysis*, *9*(6), 898–904. <https://doi.org/10.1002/DTA.2087>
- Crepalde, R. D. S., Bonadiman, C. S. C., Malta, D. C., Naghavi, M., & Melo, A. P. S. (2022). The burden of mental disorders attributable by cocaine use: Global Burden of Diseases Study in Brazil, 1990 and 2019. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, *55*, e0320-2021. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0320-2021>
- Da Cunha, G. B., Rotta, N. T., Silva, A. R., Dieder, A. L., Wolf, A. L., Moser, C., Silva, F. F., Socal, M. P., Silva, P. F., & Margis, R. (2001). Prevalence of prenatal exposure to cocaine in a sample of newborns from a university teaching hospital. *Jornal de Pediatria*, *77*(5), 369–373. <https://doi.org/10.1590/S0021-75572001000500006>

- Dadgar, D., Burnett, P. E., Gerry Choc, M., Gallicano, K., & Hooper, J. W. (1995). Application issues in bioanalytical method validation, sample analysis and data reporting. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *13*(2), 89–97. [https://doi.org/10.1016/0731-7085\(94\)00106-C](https://doi.org/10.1016/0731-7085(94)00106-C)
- de Castro, A., Concheiro, M., Shakleya, D. M., & Huestis, M. A. (2009). Simultaneous Quantification of Methadone, Cocaine, Opiates, and Metabolites in Human Placenta by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, *33*(5), 243–252. <https://doi.org/10.1093/JAT/33.5.243>
- de Castro, A., Jones, H. E., Johnson, R. E., Gray, T. R., Shakleya, D. M., & Huestis, M. A. (2011). Methadone, Cocaine, Opiates and Metabolite Disposition in Umbilical Cord and Correlations to Maternal Methadone Dose and Neonatal Outcomes. *Therapeutic Drug Monitoring*, *33*(4), 443. <https://doi.org/10.1097/FTD.0B013E31822724F0>
- de Paula Meirelles, G., Fabris, A. L., Ferreira dos Santos, K., Costa, J. L., & Yonamine, M. (2022). Green Analytical Toxicology for the Determination of Cocaine Metabolites. *Journal of Analytical Toxicology*. <https://doi.org/10.1093/JAT/BKAC005>
- Drake, L. R., & Scott, P. J. H. (2018). DARK Classics in Chemical Neuroscience: Cocaine. *ACS Chemical Neuroscience*, *9*(10), 2358–2372. https://doi.org/10.1021/ACSCHEMNEURO.8B00117/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CN-2018-00117E_0024.GIF
- Ettliger, J., & Yegles, M. (2016). Influence of thermal hair straightening on cannabis and cocaine content in hair. *Forensic Science International*, *265*, 13–16. <https://doi.org/10.1016/J.FORSCIINT.2016.01.002>
- European Drug Report 2022: Trends and Developments. (2022). *EMCDDA*, 60. <https://doi.org/10.2810/715044>
- Farina, M., Yonamine, M., & Silva, O. A. (2002). One-step liquid–liquid extraction of cocaine from urine samples for gas chromatographic analysis. *Forensic Science International*, *127*(3), 204–207. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(02\)00124-X](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(02)00124-X)
- Fernández, P., Regenjo, M., Ares, A., Fernández, A. M., Lorenzo, R. A., & Carro, A. M. (2019). Simultaneous determination of 20 drugs of abuse in oral fluid using ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *411*(1), 193–203. <https://doi.org/10.1007/S00216-018-1428-5/FIGURES/5>
- Fisichella, M., Odoardi, S., & Strano-Rossi, S. (2015). High-throughput dispersive liquid/liquid microextraction (DLLME) method for the rapid determination of drugs of abuse, benzodiazepines and other psychotropic medications in blood samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and application to forensic cases. *Microchemical Journal*, *123*, 33–41. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2015.05.009>

- Gambier, N., Warling, J., van Elsue, N., & Yegles, M. (2019). AEME production in cocaine positive hair after thermal hair treatment. *Forensic Science International*, *302*, 109894. <https://doi.org/10.1016/J.FORSCIINT.2019.109894>
- Ganapathy, V. (2011). Drugs of abuse and human placenta. *Life Sciences*, *88*(21–22), 926–930. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2010.09.015>
- Gray, T., & Huestis, M. (2007). Bioanalytical procedures for monitoring in utero drug exposure. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *388*(7), 1455–1465. <https://doi.org/10.1007/S00216-007-1228-9/TABLES/4>
- Haglock-Adler, C. J., McMillin, G. A., & Strathmann, F. G. (2016). Development of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method to address the increased utilization of umbilical cord in the assessment of in utero drug exposure. *Clinical Biochemistry*, *49*(13–14), 1092–1095. <https://doi.org/10.1016/J.CLINBIOCHEM.2016.04.007>
- Harrell, A. V. (1985). Validation of self-report: the research record. In *Self-report methods of estimating drug use: Meeting current challenges to validity*. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Alcohol, Drug Abuse, and Mental Health Administration, National Institute on Drug Abuse, (Vol. 85, p. 12). <https://europepmc.org/article/med/3929109>
- Hartmann, C., Smeyers-Verbeke, J., Massart, D. L., & McDowall, R. D. (1998). Validation of bioanalytical chromatographic methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *17*(2), 193–218. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(97\)00198-2](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(97)00198-2)
- Havranek, M. M., Vonmoos, M., Müller, C. P., Büetiger, J. R., Tasiudi, E., Hulka, L. M., Preller, K. H., Mössner, R., Grünblatt, E., Seifritz, E., & Quednow, B. B. (2015). Serotonin Transporter and Tryptophan Hydroxylase Gene Variations Mediate Working Memory Deficits of Cocaine Users. *Neuropsychopharmacology* *2015* *40*:13, *40*(13), 2929–2937. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.146>
- He, Y., & Concheiro-Guisan, M. (2019). Microextraction sample preparation techniques in forensic analytical toxicology. *Biomedical Chromatography*, *33*(1), e4444. <https://doi.org/10.1002/BMC.4444>
- Jones, J., Rios, R., Jones, M., Lewis, D., & Plate, C. (2009). Determination of amphetamine and methamphetamine in umbilical cord using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, *877*(29), 3701–3706. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2009.09.021>
- Klette, K. L., Poch, G. K., Czarny, R., & Lau, C. O. (2000). Simultaneous GC-MS Analysis of meta- and para-Hydroxybenzoylecgonine and Norbenzoylecgonine: A Secondary Method to Corroborate Cocaine Ingestion Using Nonhydrolytic Metabolites. *Journal of Analytical Toxicology*, *24*(7), 482–488. <https://doi.org/10.1093/JAT/24.7.482>
- Lee, C. T., Chen, J., Hayashi, T., Tsai, S. Y., Sanchez, J. F., Errico, S. L., Amable, R., Su, T. P., Lowe, R. H., Huestis, M. A., Shen, J., Becker, K. G., Geller, H. M., & Freed, W. J.

- (2008). A Mechanism for the Inhibition of Neural Progenitor Cell Proliferation by Cocaine. *PLOS Medicine*, 5(6), e117. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PMED.0050117>
- Lester, B. M., & Lagasse, L. L. (2010). Children of addicted women. *Journal of Addictive Diseases*, 29(2), 259–276. <https://doi.org/10.1080/10550881003684921>
- López-Lorente, Á. I., Pena-Pereira, F., Pedersen-Bjergaard, S., Zuin, V. G., Ozkan, S. A., & Psillakis, E. (2022). The ten principles of green sample preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 148, 116530. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2022.116530>
- Manno, B. R., Abusada, G. M., Abukhalaf, I. K., Alford, D. D., Ansari, N. A., Manno, J. E., Vinzon-Bautista, I., & Pramanik, A. K. (1993). Solid-Phase Extraction and GC/MS Quantitation of Cocaine, Ecgonine Methyl Ester, Benzoylecgonine, and Cocaethylene from Meconium, Whole Blood, and Plasma. *Journal of Analytical Toxicology*, 17(6), 353–358. <https://doi.org/10.1093/JAT/17.6.353>
- Mansour, F. R., & Khairy, M. A. (2017). Pharmaceutical and biomedical applications of dispersive liquid–liquid microextraction. *Journal of Chromatography B*, 1061–1062, 382–391. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2017.07.055>
- Mantovani, C. de C., Lima, M. B., Oliveira, C. D. R. de, Menck, R. de A., Diniz, E. M. de A., & Yonamine, M. (2014). Development and practical application of accelerated solvent extraction for the isolation of cocaine/crack biomarkers in meconium samples. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 957, 14–23. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2014.02.039>
- Marin, S. J., Metcalf, A., Krasowski, M. D., Linert, B. S., Clark, C. J., Strathmann, F. G., & McMillin, G. A. (2014). Detection of neonatal drug exposure using umbilical cord tissue and liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Therapeutic Drug Monitoring*, 36(1), 119–124. <https://doi.org/10.1097/FTD.0B013E3182A0D18C>
- Martins, A. F., dos Santos, J. B., Todeschini, B. H., Saldanha, L. F., da Silva, D. S., Reichert, J. F., & Souza, D. M. (2017). Occurrence of cocaine and metabolites in hospital effluent - A risk evaluation and development of a HPLC method using DLLME. *Chemosphere*, 170, 176–182. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2016.12.019>
- Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L., & Chavez-Eng, C. M. (2003). Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry*, 75(13), 3019–3030. <https://doi.org/10.1021/AC020361S/ASSET/IMAGES/LARGE/AC020361SF00004.JPG>
- Mckay, G., & Yacobi, A. (2000). Bioanalytical Method Validation-A Revisit with a Decade of Progress. *Pharmaceutical Research*, 17(12), 1551–1557. <https://doi.org/10.1023/A:1007669411738>

- Min, M. O., Minnes, S., Kim, J. Y., Yoon, M., & Singer, L. T. (2017). Association of prenatal cocaine exposure, childhood maltreatment, and responses to stress in adolescence. *Drug and Alcohol Dependence*, *177*, 93–100. <https://doi.org/10.1016/J.DRUGALCDEP.2017.03.028>
- Mitsuhiro, S. S., Chalem, E., Barros, M. M., Guinsburg, R., & Laranjeira, R. (2006). Teenage pregnancy: use of drugs in the third trimester and prevalence of psychiatric disorders. *Brazilian Journal of Psychiatry*, *28*(2), 122–125. <https://doi.org/10.1590/S1516-44462006000200009>
- Moeller, K. E., Kissack, J. C., Atayee, R. S., & Lee, K. C. (2017). Clinical Interpretation of Urine Drug Tests: What Clinicians Need to Know About Urine Drug Screens. *Mayo Clinic Proceedings*, *92*(5), 774–796. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2016.12.007>
- Montgomery, D., Plate, C., Alder, S. C., Jones, M., Jones, J., & Christensen, R. D. (2005). Testing for fetal exposure to illicit drugs using umbilical cord tissue vs meconium. *Journal of Perinatology* *2006 26:1*, *26*(1), 11–14. <https://doi.org/10.1038/sj.jp.7211416>
- Montgomery, D. P., Plate, C. A., Jones, M., Jones, J., Rios, R., Lambert, D. K., Schumtz, N., Wiedmeier, S. E., Burnett, J., Ail, S., Brandel, D., Maichuck, G., Durham, C. A., Henry, E., & Christensen, R. D. (2008). Using umbilical cord tissue to detect fetal exposure to illicit drugs: a multicentered study in Utah and New Jersey. *Journal of Perinatology* *2008 28:11*, *28*(11), 750–753. <https://doi.org/10.1038/jp.2008.97>
- Moore, C. M., Brown, S., Negrusz, A., Tebbett, I., Meyer, W., & Jain, L. (1993). Determination of Cocaine and Its Major Metabolite, Benzoylcegonine, in Amniotic Fluid, Umbilical Cord Blood, Umbilical Cord Tissue, and Neonatal Urine: A Case Study. *Journal of Analytical Toxicology*, *17*(1), 62.
- Nestler, E. J. (2005). The Neurobiology of Cocaine Addiction. *Science & Practice Perspectives*, *3*(1), 4. <https://doi.org/10.1151/SPP05314>
- Orfanidis, A., Gika, H. G., Theodoridis, G., Mastrogianni, O., & Raikos, N. (2021). A UHPLC–MS-MS Method for the Determination of 84 Drugs of Abuse and Pharmaceuticals in Blood. *Journal of Analytical Toxicology*, *45*(1), 28–43. <https://doi.org/10.1093/JAT/BKAA032>
- Orfanidis, A., Gika, H., Theodoridis, G., Mastrogianni, O., & Raikos, N. (2020). Development of a UHPLC-MS/MS method for the determination of 84 pharmaceuticals and drugs of abuse in human liver. *Journal of Chromatography B*, *1151*, 122192. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2020.122192>
- Ostrea, E. M., Knapp, D. K., Tannenbaum, L., Ostrea, A. R., Romero, A., Salari, V., & Ager, J. (2001). Estimates of illicit drug use during pregnancy by maternal interview, hair analysis, and meconium analysis. *The Journal of Pediatrics*, *138*(3), 344–348. <https://doi.org/10.1067/MPD.2001.111429>

- Ostrea, E. M., Romero, A., Knapp, D. K., Ostrea, A. R., Lucena, J. E., & Utarnachitt, R. B. (1994). Postmortem drug analysis of meconium in early-gestation human fetuses exposed to cocaine: Clinical implications. *The Journal of Pediatrics*, *124*(3), 477–479. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(94\)70379-5](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(94)70379-5)
- Palmer, K. L., Wood, K. E., & Krasowski, M. D. (2017). Evaluating a switch from meconium to umbilical cord tissue for newborn drug testing: A retrospective study at an academic medical center. *Clinical Biochemistry*, *50*(6), 255–261. <https://doi.org/10.1016/J.CLINBIOCHEM.2016.11.026>
- Peters, F. T., Drummer, O. H., & Musshoff, F. (2007). Validation of new methods. *Forensic Science International*, *165*(2–3), 216–224. <https://doi.org/10.1016/J.FORSCIINT.2006.05.021>
- Preston, K. L., Epstein, D. H., Cone, E. J., Wtsadik, A. T., Huestis, M. A., & Moolchan, E. T. (2002). Urinary Elimination of Cocaine Metabolites in Chronic Cocaine Users during Cessation. *Journal of Analytical Toxicology*, *26*(7), 393–400. <https://doi.org/10.1093/JAT/26.7.393>
- Rezaee, M., Assadi, Y., Milani Hosseini, M. R., Aghaee, E., Ahmadi, F., & Berijani, S. (2006). Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, *1116*(1–2), 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2006.03.007>
- Ritchie, H., & Roser, M. (2022). Opioids, cocaine, cannabis and illicit drugs. *Our World in Data*. <https://ourworldindata.org/illicit-drug-use>
- Roque Bravo, R., Faria, A. C., Brito-Da-costa, A. M., Carmo, H., Mladěnka, P., Dias da Silva, D., & Remião, F. (2022). Cocaine: An Updated Overview on Chemistry, Detection, Biokinetics, and Pharmacotoxicological Aspects including Abuse Pattern. *Toxins*, *14*(4). <https://doi.org/10.3390/TOXINS14040278>
- Sarafraz-Yazdi, A., & Amiri, A. (2010). Liquid-phase microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *29*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2009.10.003>
- Scheidweiler, K. B., Plessinger, M. A., Shojaie, J., Wood, R. W., & Kwong, T. C. (1990). Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Methylecgonidine, a Crack Cocaine Pyrolyzate. *Jenkins and Goldberger*. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.055434>
- Schmidt, K. T., Schroeder, J. P., Foster, S. L., Squires, K., Smith, B. M., Pitts, E. G., Epstein, M. P., & Weinshenker, D. (2017). Norepinephrine regulates cocaine-primed reinstatement via α 1-adrenergic receptors in the medial prefrontal cortex. *Neuropharmacology*, *119*, 134–140. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2017.04.005>
- Silveira, G. D. O., Pego, A. M. F., Pereira E Silva, J., & Yonamine, M. (2019). Green sample preparations for the bioanalysis of drugs of abuse in complex matrices. *Bioanalysis*, *11*(4), 295–312. <https://doi.org/10.4155/BIO-2018-0208>

- Stabler, M. E., Long, D. L., Chertok, I. R. A., Giacobbi, P. R., Pilkerton, C., & Lander, L. R. (2017). Neonatal Abstinence Syndrome in West Virginia Substate Regions, 2007-2013. *The Journal of Rural Health, 33*(1), 92–101. <https://doi.org/10.1111/JRH.12174>
- Stankowski, R. v., Kloner, R. A., & Rezkalla, S. H. (2015). Cardiovascular consequences of cocaine use. *Trends in Cardiovascular Medicine, 25*(6), 517–526. <https://doi.org/10.1016/J.TCM.2014.12.013>
- Tiwari, G., & Tiwari, R. (2010). Bioanalytical method validation: An updated review. *Pharmaceutical Methods, 1*(1), 25–38. [https://doi.org/10.1016/S2229-4708\(10\)11004-8](https://doi.org/10.1016/S2229-4708(10)11004-8)
- Tolia, V. N., Patrick, S. W., Bennett, M. M., Murthy, K., Sousa, J., Smith, P. B., Clark, R. H., & Spitzer, A. R. (2015). Increasing Incidence of the Neonatal Abstinence Syndrome in U.S. Neonatal ICUs. *New England Journal of Medicine, 372*(22), 2118–2126. https://doi.org/10.1056/NEJMSA1500439/SUPPL_FILE/NEJMSA1500439_DISCLOSURES.PDF
- Treadwell, S. D. (2007). Cocaine use and stroke. *Postgrad Med J, 83*, 389–394. <https://doi.org/10.1136/pgmj.2006.055970>
- UNODC. (2020). *World Drug Report 2020*. (United Nations Publication, Sales No. E.20.XI.6). https://wdr.unodc.org/wdr2020/field/WDR20_Booklet_2.pdf
- UNODC. (2022). *World Drug Report 2022*. www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/world-drug-report-2022.html
- Usui, K., Hayashizaki, Y., Hashiyada, M., & Funayama, M. (2012). Rapid drug extraction from human whole blood using a modified QuEChERS extraction method. *Legal Medicine, 14*(6), 286–296. <https://doi.org/10.1016/J.LEGALMED.2012.04.008>
- Valente-Campos, S., Yonamine, M., Moreau, R. L. de M., & Silva, O. A. (2006). Validation of a method to detect cocaine and its metabolites in nails by gas chromatography–mass spectrometry. *Forensic Science International, 159*(2–3), 218–222. <https://doi.org/10.1016/J.FORSCIINT.2005.07.021>
- Vincenti, F., Montesano, C., Cellucci, L., Gregori, A., Fanti, F., Compagnone, D., Curini, R., & Sergi, M. (2019). Combination of pressurized liquid extraction with dispersive liquid liquid micro extraction for the determination of sixty drugs of abuse in hair. *Journal of Chromatography A, 1605*, 360348. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2019.07.002>
- Wang, P., Molina, C. P., Maldonado, J. E., & Bernard, D. W. (2010). In utero drugs of abuse exposure testing for newborn twins. *Journal of Clinical Pathology, 63*(3), 259–261. <https://doi.org/10.1136/JCP.2009.067595>
- Weiner, S. M., & Finnegan, L. P. (2011). *Drug withdrawal in the neonate*. Merenstein & Gardner's Handbook of Neonatal Intensive Care. <https://books.google.com.br/books?hl=pt->

BR&lr=&id=3ZLQAQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA201&dq=WEINER,+S.+M.%3B+FINNEGAN,+L.+P.+Drug+withdrawal+in+the+neonate.+&ots=XXzonP5uz5&sig=AC1AKpmzjOoD63ILvovVI8ifux8#v=onepage&q&f=false

- Winecker, R. E., Goldberger, B. A., Tebbett, I., Behnke, M., Eyler, F. D., Conlon, M., Wobie, K., Karlix, J., & Bertholf, R. L. (1997). Detection of Cocaine and its Metabolites in Amniotic Fluid and Umbilical Cord Tissue. *Journal of Analytical Toxicology*, *21*(2), 97–104. <https://doi.org/10.1093/JAT/21.2.97>
- Wood, K. E., Sinclair, L. L., Rysgaard, C. D., Strathmann, F. G., McMillin, G. A., & Krasowski, M. D. (2014). Retrospective analysis of the diagnostic yield of newborn drug testing. *BMC Pregnancy and Childbirth*, *14*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2393-14-250/TABLES/3>
- Zheng, X., Shang, L., Zhan, C. G., & Zheng, F. (2019). In vivo characterization of toxicity of norcoethylen and norcocaine identified as the most toxic cocaine metabolites in male mice. *Drug and Alcohol Dependence*, *204*, 107462. <https://doi.org/10.1016/J.DRUGALCDEP.2019.04.033>