

Ana Caroline Hillesheim da Cruz

QUANTIFICAÇÃO DE COCAÍNA E SEU PRODUTO DE
BIOTRANSFORMAÇÃO, BENZOILECGONINA, EM AMOSTRAS
DE CABELO: DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E
APLICAÇÃO DE MÉTODO.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Mestrado Profissional em Farmacologia, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Alcíbia Helena de Azevedo Maia

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Cruz, Ana Caroline
QUANTIFICAÇÃO DE COCAÍNA E SEU PRODUTO DE
BIOTRANSFORMAÇÃO, BENZOILECGONINA, EM AMOSTRAS DE
CABELO: DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE
MÉTODO. / Ana Caroline Cruz ; orientadora, Alcibia
Helena Azevedo Maia, 2018.
107 p.

Dissertação (mestrado profissional) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de
Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

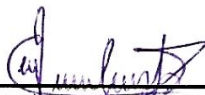
1. Farmacologia. 2. Toxicologia Forense. 3.
Cocaína. 4. Análise em Cabelo. 5. Cromatografia
Líquida de Alta Eficiência . I. Azevedo Maia, Alcibia
Helena . II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.
III. Título.

“Quantificação de cocaína e seu produto de biotransformação, benzoilecgonina, em amostras de cabelo: desenvolvimento, validação e aplicação do método”

Por

Ana Caroline Hillesheim da Cruz

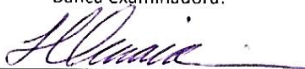
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (09/MPFMC/2017) do Programa de Pós-Graduação em Mestrado Profissional em Farmacologia - UFSC.



Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos

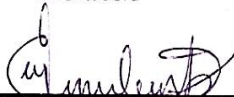
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Mestrado Profissional em Farmacologia

Banca examinadora:



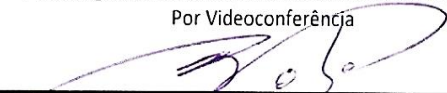
Dr.ª Alcibia Helena de Azevedo Maia (Universidade Federal de Santa Catarina)

Orientadora



Dr. André Valle de Bairros (Departamento de Análises Clínicas Toxicológicas/CCS/Universidade Federal de Santa Maria)

Por Videoconferência



Dr. Anicleto Poli (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 20 de dezembro de 2017.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais, os quais nunca mediram esforços para com a minha educação, apoiando-me sempre em minhas tomadas de decisão.

À minha orientadora Biba, pela dedicação durante a época de graduação e pós-graduação. Agradeço o carinho e parceria.

Às colegas de laboratório Bruna, Emanuella e Maitê, pelas contribuições. Sem vocês não conseguiria.

Ao Instituto Geral de Perícias de Santa Catarina, que em busca do aprimoramento de suas atividades firmou parceria com a Universidade e forneceu as amostras utilizadas neste trabalho.

RESUMO

O consumo da cocaína (COC) segue aumentando no Brasil, tornando-se maior a preocupação da área de segurança pública. Neste contexto, a toxicologia forense utiliza cada vez mais as amostras não convencionais como o cabelo (CB), que apresenta vantagens como longa janela de detecção e viabilidade de coleta em cadáveres com estágio avançado de decomposição. Assim, este estudo propõe desenvolvimento, validação e aplicação de uma metodologia para quantificação de COC e benzoilecgonina (BE) em amostras de CB, empregando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com Detector de Arranjo de Diodos (DAD). O preparo da amostra iniciou com as etapas de lavagem e fragmentação, avaliando o emprego de agente emulsificador e pulverização, respectivamente. Na digestão do CB avaliou-se 4 soluções: metanol, HCl 0,1 M, solução metanólica de HCl 0,1 M e metanol com HCl 0,1 M. Todas foram mantidas à 45 °C por 16 horas. O sobrenadante foi submetido a Extração em Fase Sólida (EFS). Nesta avaliou-se o pH da amostra e do tampão utilizado, assim como o eluente. Considerando a CLAE foram avaliados o tipo e proporção dos solventes, modo de eluição e fluxo da fase móvel (FM). A validação contemplou: linearidade, limite de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão e exatidão, recuperação, especificidade/seletividade e efeito memória. O método foi aplicado em 22 amostras de CB de casos atendidos no Instituto Geral de Perícias de Santa Catarina (IGP/SC). Como resultado, para a lavagem foi utilizado tween 80 0,1 % e diclorometano em banho de ultrassom. A fragmentação foi realizada com tesoura seguida de pulverização com gral e pistilo. A melhor solução digestora foi a mistura de metanol com HCl 0,1 M. Para a EFS utilizou-se pH 6 para amostra e tampão, e o solvente de escolha foi hidróxido de amônio 5% em metanol. Para a CLAE, obteve-se: acetonitrila:acetato de amônio 10 mM (FM) com eluição em modo gradiente na proporção 13:87 a 80:20 em 13 min; fluxo de 0,6 mL/min. Quanto à validação, o método foi linear na faixa de trabalho selecionada. Os LD e LQ em ng/mg de CB obtidos para BE e COC foram: 0,28; 0,27 e 0,95; 0,91. Para a precisão obtiveram-se coeficientes de variação (CVs) médios de 11,68 % (BE) e 7,41 % (COC). As exatidões médias foram de 94,8 (BE) e 97,63 (COC), e as recuperações médias, 85,63 (BE) e 80,36 (COC). Na especificidade/seletividade nenhum dos 15 compostos avaliados apresentou tempo de retenção (TR) semelhante aos da COC e BE, no entanto, amostras com tinta preta apresentaram interferência que inviabilizou a análise. No efeito memória observou-se contaminação a

partir de 50 µg/mL eliminada com alterações na lavagem do amostrador automático. Das 22 amostras reais, em 7 não foi detectado nenhum dos analitos de interesse em uma delas apenas COC e em outra apenas BE. Nas 13 restantes foram detectadas BE e COC, variando as concentrações de 2,33 a 123,03 µg/mg de BE e 2,17 a 127,05 µg/mg de COC. Diante do exposto pode-se inferir que o desenvolvimento das etapas pré-analíticas e analíticas foram importantes para o método proposto e validado, tornando-o passível de implementação na rotina de um laboratório forense. O trabalho ainda proporcionou a criação de um Procedimento Operacional Padrão (POP), a ser disponibilizado ao IGP/SC. Ao analisar as amostras de CB de casos reais observou-se as duas principais vantagens desta amostra, sua longa janela de detecção e a viabilidade de coleta e análise quando as amostras convencionais não estão disponíveis. Esses achados, já conhecidos da comunidade científica, reforçam a importância da utilização de tais amostras como alternativa na toxicologia forense.

Palavras Chave: Cocaína, Benzoilecgonina, Cabelo, Toxicologia Forense, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Procedimento Operacional Padrão.

ABSTRACT

The cocaine (COC) use continues to increase in Brazil. This becoming a concern in public security area. In this context, forensic toxicology increasingly uses unconventional samples such as hair. Those in contrast to the most usual samples, have advantages. An example is the long detection window and their viability even in cadavers in an advanced stage of decomposition. Thus, the present work proposes the development, validation, and application of a methodology for quantification of COC and benzoylecgonine (BE), in hair samples, using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) with Diodes Array Detector (DAD). Sample preparation started with washing and fragmentation stages. In these was evaluating the variables, emulsifying agent use and sample pulverization, respectively. For hair digestion, 4 solutions were analyzed: methanol, 0.1 M HCl, 0.1 M HCl methanolic solution and methanol with 0.1 M HCl. All were kept at 45 °C for 16 hours. After, the liquid phase was subjected to Solid Phase Extraction (SPE) and the pH of the sample and the buffer used, as well as the eluent, were evaluated. Considering the HPLC, the type and proportion of the solvents, elution mode and mobile phase (MP) flow were evaluated. The validation included: linearity, limit of detection (LD) and quantification (LQ), precision, accuracy, recovery, specificity/selectivity and carryover. The method was applied to 22 hair samples from victims of cases attended at the Instituto Geral de Perícias de Santa Catarina (IGP/SC). As result, for washing step was using tween 80 0.1 % and dichloromethane in an ultrasonic bath. The fragmentation was performed with scissors followed by pulverization with pestle and mortar. The best digestion solution was the methanol mixture with 0.1 M HCl. For SPE the pH chosen for sample and buffer was 6 and elution solvent was 5 % ammonium hydroxide in methanol. For HPLC, the MP was acetonitrile:ammonium acetate (10 mM). The elution mode was a gradient starting with 13:87 to 80:20 in 13 min; flow rate of 0.6 mL/min. About validation, the method was linear in the working range. The LD and LQ in ng/mg of hair obtained for BE and COC were: 0.28; 0.27 and 0.95; 0.91, respectively. For precision, the relative standard deviation (RSD) of 11.68 % (BE) and 7.41 % (COC) were obtained. The accuracy were 94.8 (BE) and 97.63 (COC), and mean recoveries were 85.63 (BE) and 80.36 (COC). In the specificity/selectivity, none of the 15 compounds evaluated had retention time (RT) similar to those of COC and BE. However, dyed samples presented interference that made analysis impossible. In carryover,

contamination after analysis of a 50 µg/mL concentration was observed. That was eliminated with changes in automatic sampler parameters. For the 22 real samples analyzed, in 7 no COC or BE was detected, in one of them only COC and in another just BE. In the remaining 13, BE and COC were detected, and the concentrations range was 2.33 to 123.03 µg/mg of hair (BE) and 2.17 to 127.05 µg/mg of hair (COC). All things considered, it can be inferred that the development of pre-analytical and analytical steps was important for the validated method, that can be implemented in the routine of a forensic laboratory. The work also provided a standard operating procedure, that is available to the IGP/SC. About samples from IGP/SC at its headquarters in Joinville was observed the two main advantages of the unconventional samples. First, their long detection window and second, the analysis viability at times when most usual samples are not available. These findings, already known by the scientific community, reinforce the importance of using such samples as an alternative to forensic toxicology.

Keywords: Cocaine, Benzoyllecgonine, Hair, Forensic Toxicology, High Performance Liquid Chromatography, Standard Operating Procedure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Arbusto jovem de <i>Erythroxylon coca</i>	17
Figura 2 - Produtos de biotransformação da COC.....	21
Figura 3 - Estrutura do CB.....	23
Figura 4 - Esquema de funcionamento da EFS.....	28
Figura 5 - Sistema de movimentação de fluidos para a EFS.....	28
Figura 6 - Esquema de um equipamento de CLAE com sistema quaternário.....	32
Figura 7 - Fórmula utilizada para obtenção da área ajustada.....	46
Figura 8 – Fórmulas utilizadas para os cálculos do LD e LQ.....	47
Figura 9 – Fórmula utilizada para o cálculo da exatidão.....	48
Figura 10 – Fórmula utilizada para cálculo da recuperação.....	48
Figura 11 - Comparação da matriz CB antes (A) e depois (B) do processo de pulverização.....	53
Figura 12 – Gráfico comparativo das áreas ajustadas da COC e BE para as quatro soluções digestoras utilizadas. A- HCl 0,1 M; B- Metanol; C- Metanol+HClO,1 M; D- HCl 0,1 M em Metanol.....	54
Figura 13 - Esquema com as quatro etapas da EFS desenvolvida.....	56
Figura 14 - Cromatograma pós EFS utilizando pH 6 e hidróxido de amônia 5 % em metanol como eluente. Concentração utilizada 1 µg/mL para ambos analitos.....	57
Figura 15 - Esquema da etapa pré-analítica desenvolvida.....	60
Figura 16 - Cromatograma com modo de eluição isocrático com aumento da porção aquosa apresentando uma significativa separação dos picos.....	62
Figura 17 - Cromatograma representativo do modo de eluição gradiente otimizado. Experimento realizado com amostra adicionada 1 µg/mL em modo de eluição gradiente (13:87 – 90:10 em 15 min), com ácido fórmico 0,01 % como fase aquosa.....	64
Figura 18 - Cromatograma utilizando como porção aquosa da FM o ácido acético 0,01 %. Experimento realizado com solução padrão de 5 µg/mL	

em modo de eluição gradiente (27:73 – 70:30 em 6 min), com ACN como solvente orgânico.....	65
Figura 19- Cromatograma representativo de interferência na amostra de CB prejudicial às análises. Tracejado superior em azul escuro representa a análise de uma amostra de CB adicionada dos padrões de COC e BE. Tracejado abaixo em azul claro representa a análise de uma amostra de CB sem adição de quaisquer padrões.....	66
Figura 20 - Cromatograma com acetato de amônio como porção aquosa da FM e ACN. Modo de eluição gradiente 13:87 a 80:20 em 13 min.....	67
Figura 21 - Curvas de calibração da BE e da COC, obtidas a partir das médias das áreas ajustadas com relação ao PI de seis dias distintos.....	69
Figura 22 - Cromatograma representativo do parâmetro especificidade/seletividade. Amostra de CB adicionada de 15 compostos, além dos analitos de interesse BE, COC e PI. São possíveis de serem visualizados no cromatograma: morfina (MORF); teofilina (TEO); cafeína (CAF); anfepramona (ANF); quetamina (QUET); lidocaína (LIDO); e haloperidol (HALO).....	72
Figura 23 – Cromatograma representativo do efeito memória após a concentração de 50 µg/mL. A- amostra de CB com padrões de COC e BE na concentração de 50 µg/mL. B- amostra de CB sem a adição dos padrões COC e BE.....	78
Figura 24 – Cromatograma de uma amostra de CB isenta de analitos de interesse, analisada após a amostra adicionada na concentração de 50 µL. Análises feitas com a alteração no método visando eliminação do efeito memória.....	79
Figura 25 - Distribuição dos 22 casos avaliados considerando simultaneamente as variáveis coleta de amostra e resultados obtidos.....	81

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação das técnicas analíticas segundo o SWGDRUG.....	30
Quadro 2 - Parâmetros do método proposto.....	68
Quadro 3 – Resultados obtidos com a análise da regressão linear: equação da reta e coeficiente de correlação.....	69
Quadro 4 - LD e LQ obtidos para o método proposto.....	70
Quadro 5 - Resultados obtidos para o parâmetro da precisão para BE.....	74
Quadro 6 – Resultados obtidos para o parâmetro da precisão para COC.....	74
Quadro 7 - Valores de exatidão em percentual obtidos para BE.....	75
Quadro 8 – Valores de exatidão em percentual obtidos para COC.....	75
Quadro 9 - Percentuais de recuperação.....	77
Quadro 10 - Resultados da aplicação da metodologia em 22 casos <i>post mortem</i> . Comparação da detecção de COC em sangue e urina e quantificação de COC e BE em CB. (D – Detectado; ND – Não Detectado; NC – Não Coletada).....	82

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

- AEME – Éster Metilanidroecgonina
- ANF – Anfepramona
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- BE – Benzoilecgonina
- CAF – Cafeína
- CB – Cabelo
- CCD – Cromatografia em Camada Delgada
- CEBRID – Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas
- CEPSH-UFSC - Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina
- CG – Cromatografia Gasosa
- CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- COC – Cocaína
- DAD – Detector de Arranjos de Diodos
- DP – Desvio Padrão
- EFS – Extração em Fase Sólida
- ELL – Extração Líquido-Líquido
- EME – Éster de Metilecgonina
- EMEA – do inglês *European Medicine Agency*
- FE – Fase Estacionária
- FM – Fase Móvel
- GHB – do inglês *Gama Hydroxy Butyrate*
- HALO – Haloperidol
- HCl – Ácido Clorídrico
- IAF – Instituto de Análises Forenses
- ICH – do inglês *International Conference on Harmonisation*
- IGP – Instituto Geral de Perícias

IMETRO – Instituto de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental

IN – Intranasal

IUPAC – do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*

IV – Intravenoso

LD – Limite de Detecção

LIDO – Lidocaína

LQ – Limite de Quantificação

MHLW – do inglês *Ministry of Health, Labour and Welfare*

MORF – Morfina

NaOH – Hidróxido de Sódio

PI – Padrão Interno

QUET – Quetamina

RIA – Radioimunoensaio

SC – Santa Catarina

SWGTOX – do inglês *Scientific Working Group for the Forensic Toxicology*

SWGDRUG - do inglês *Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs*

SNC – Sistema Nervoso Central

SoHT – do inglês *Society of Hair Testing*

TEO – Teofilina

TM – Tempo Morto

TR – Tempo de Retenção

UNODC – do inglês *United Nation Office on Drug and Crime*

V_{ss} – volume de distribuição no estado de equilíbrio

LISTA DE SÍMBOLOS

μ - Micro

α - Alfa

® - Marca Registrada

© - do inglês Copyright

% - Percentual

°C – Graus Celsius

mm- Milímetro

mL – Mililitro

h - Hora

M - Molar

r – coeficiente de correlação

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
1.1.	COCAÍNA	17
1.2.	CABELO	21
1.3.	METODOLOGIAS UTILIZADAS NA TOXICOLOGIA FORENSE.....	25
1.3.1.	Preparo de amostras	25
1.3.2.	Técnicas analíticas.....	29
1.4.	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	33
1.5.	ASPECTOS GERAIS.....	34
2.	OBJETIVOS	37
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	37
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3.	MATERIAL E MÉTODO	39
3.1.	MATERIAIS	39
3.1.1.	Soluções padrão e reagentes.....	39
3.1.3.	Instrumental.....	40
3.1.4.	Amostras	40
3.2.	MÉTODO	41
3.2.1.	Desenvolvimento do método.....	41
3.2.1.1.	Etapas pré-analítica	41
3.2.2.	Validação do método.....	46
3.2.2.1.	Linearidade	46
3.2.2.2.	Limite de Detecção e Quantificação	46
3.2.2.3.	Especificidade/Seletividade	47
3.2.2.4.	Precisão.....	47
3.2.2.5.	Exatidão	48
3.2.2.6.	Recuperação.....	48
3.2.2.7.	Efeito Memória	49
3.2.3.	Aplicação do método.....	49
3.2.4.	Análise estatística dos dados	49
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1.	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO	51
4.1.1.	Etapas pré-analítica.....	51

4.1.2.	Etapa analítica.....	61
4.2.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO	67
4.2.1.	Linearidade	69
4.2.2.	Limite de detecção e quantificação.....	70
4.2.3.	Especificidade/seletividade.....	71
4.2.4.	Precisão.....	73
4.2.5.	Exatidão	75
4.2.6.	Recuperação.....	76
4.2.7.	Efeito memória.....	77
4.3.	APLICAÇÃO DO MÉTODO	80
4.4.	PRODUTO FINAL DO ESTUDO.....	84
5.	CONCLUSÃO	85
	REFERÊNCIAS	87
	ANEXO I.....	100

1. INTRODUÇÃO

1.1. COCAÍNA

A cocaína (COC) é um alcaloide natural, extraído da planta *Erythroxylon coca* (figura 1), isolado pela primeira vez em 1859, pelo químico alemão Albert Niemann. Dentre os alcaloides encontrados na planta (cafeína, nicotina, morfina, COC, riboflavina e tiamina), a COC foi encontrada em maior concentração, cerca de 80% (FERREIRA; MARTINI, 2001).

Historicamente o primeiro vestígio encontrado data de 2100 A.C. na região sudoeste do Equador. O uso desta planta era comum na cultura Sul-Americana e estava associada a eventos sociais e religiosos (KARCH, 1989; PLOWMAN, 1985 apud BOTELHO, 2011).

Figura 1- Arbusto jovem de *Erythroxylon coca*.



Fonte: Bruncker (2012).

A partir de 1884 o efeito de anestesia local da COC foi descrito e seu uso para fins medicinais foi difundido por Sigmund Freud, que neste mesmo ano chegou a escrever um livro intitulado *Über coca* (sobre a coca), onde descreve e recomenda os diversos usos terapêuticos da coca.

A COC na forma de cloridrato, sintetizada em laboratório pela primeira vez por Willstatt em 1902, também era recomendada para depressão, tuberculose, problemas gástricos, asma e ainda para o tratamento da dependência de morfina e álcool. Freud utilizou o fármaco que dizia ser uma droga milagrosa, para tratar dois de seus amigos, não demorando muito tempo para perceber seus efeitos tóxicos. Apenas quatro anos depois da publicação de seu livro, Freud se “retratou” declarando que a COC possuía diversos inconvenientes e um potencial de dependência (FERREIRA; MARTINI, 2001; BOTELHO, 2011).

Diante das observações dos efeitos nocivos da COC, viu-se a necessidade da proibição do uso desta droga. Os Estados Unidos foi o primeiro país a fazer isso, com a *Harrison Act* em 1914, uma lei, que tornou ilegal a distribuição e o uso, além de regulamentar a produção e revenda de COC, assim como as taxas envolvidas nestes processos. No Brasil, a proibição do uso dessa droga surgiu em 1921 com o Decreto-lei 4.292 de 06 de julho de 1921, que estabeleceu a punição para venda e uso, assim como o procedimento para internação compulsória e voluntária para o tratamento da dependência (FERREIRA; MARTINI, 2001; BAHLS; BAHLS, 2002).

Com a proibição e a “propaganda negativa” feita com relação aos efeitos nocivos da COC, o uso da mesma reduziu consideravelmente. Porém, a partir da década de 80, o consumo voltado para fins recreativos ressurgiu. Estudo feito nos anos de 1987, 1989, 1993, 1997 e 2004 pelo Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID) do Departamento de Psicobiologia da Escola Paulista de Medicina, mostrou o aumento de quatro vezes no consumo de COC nos quatro anos do estudo, passando de 0,5 para 2% da população avaliada (CEBRID, 2010; LEITE, 1999 apud BAHLS; BAHLS, 2002).

Segundo o Departamento de Drogas e Crimes das Nações Unidas (UNODC - do inglês *United Nations Office on Drugs and Crime*, 2015), o uso da COC está em constante aumento no Brasil, sendo uma preocupação para a saúde pública. Esta droga também ganha destaque no estudo de Pericolo (2016), realizado na região norte de Santa Catarina. Este traz os dados referentes aos atendimentos de mortes violentas atendidos pelo Instituto Geral de Perícias de Santa Catarina (IGP/SC) da sua sede em Joinville (cidade localizada ao norte do Estado). Tal estudo conclui que de 2013 a 2015 a substância mais detectada nas análises toxicológicas foi a COC.

A COC pode ser usada por diferentes vias de administração, sendo as mais comuns: intranasal (IN), intravenosa (IV), e pulmonar, através do fumo da pedra de crack. Os usuários desta droga fazem uso em busca dos efeitos sobre o Sistema Nervoso Central (SNC), sendo estes: euforia, agitação, desinibição para se comunicar, e estado de alerta com relação às sensações de visão, audição e tato. Pode ser observado ainda diminuição temporária da necessidade de alimento e sono (REGO JUNIOR, 2010). Tais efeitos são decorrentes da inibição da recaptção das monoaminas (noradrenalina, serotonina e dopamina) pelos neurônios pré-sinápticos, permitindo que esses neurotransmissores permaneçam mais tempo na fenda sináptica, aumentando consequentemente a atividade desses três sistemas (LOPER, 1989).

Outro sistema bastante afetado pela COC é o cardiovascular. Esta droga o atinge de diferentes maneiras, seja por ação no sistema nervoso simpático (inibição da recaptção da noradrenalina), nos cardiomiócitos, nos vasos, no endotélio, ou no sistema plaquetário. Em casos mais graves pode ocorrer infarto, arritmias e parada cardíaca, causando a morte do usuário (para revisão ver STANKOWSKI; KLONERB; REZKALLA, 2015).

Além de ser uma preocupação para a saúde pública, a COC também é uma preocupação crescente do ramo de segurança pública. Sabe-se que o uso de COC está fortemente associado com violência e morte violenta. No Brasil há vários estudos que mostram esta relação, que se dá pelos efeitos da droga, seja no comportamento humano (agitação, irritabilidade e ansiedade, que gera um comportamento ativo pela busca da droga, envolvendo neste caso o tráfico), ou no organismo, com os efeitos cardiovasculares que podem levar a parada cardíaca e morte (BEATO FILHO et al., 2001 apud TOLEDO, 2003).

Com relação à sua cinética, em estudo realizado por Cone (1995), observou-se um pico plasmático de 5 min, para a droga fumada ou injetada (IV), e de cerca de 50 min para o uso IN. Ainda neste estudo obteve-se as concentrações plasmáticas máximas que variaram de 98-349 ng/mL para IV (dose administrada de 25 mg), 154-345 ng/mL para droga fumada (dose administrada de 42 mg) e 40-88 ng/mL para a via IN (dose administrada de 32 mg).

A COC apresenta uma extensa distribuição extravascular, tendo um volume de distribuição no estado de equilíbrio (V_{ss}) de 1,6 a 2,7 L/kg. Ela se liga extensamente as proteínas plasmáticas, cerca de 91% quando em baixas concentrações. A distribuição ocorre de forma rápida, sendo

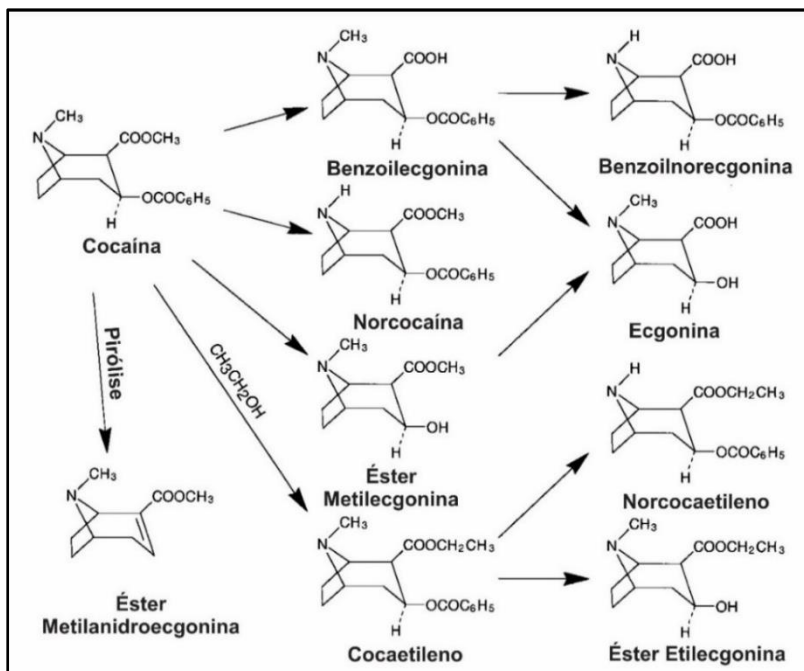
que os órgãos que recebem a maior concentração são cérebro, baço, rim e pulmão, seguido de sangue, coração e músculos (KARCH, 1998).

Nos seres humanos, a principal reação de biotransformação da COC é de hidrólise das ligações ésteres, promovida por colinesterases plasmáticas e hepáticas. Os dois principais produtos de biotransformação são o éster de metilecgonina (EME) e a benzoilecgonina (BE), que podem representar até 90% da biotransformação da COC. O EME é formado por ação das colinesterases, enquanto a BE é formado por desmetilação, que pode ocorrer espontaneamente no pH fisiológico. A BE pode ainda sofrer N-desmetilação produzindo benzoilnorecgonina. Outras reações podem ocorrer com esses dois produtos majoritários, sendo eles transformados em ecgonina (KARCH, 1998; FERIGOLO; SIGNOR, 2007).

Outro produto formado, porém, em menor quantidade, é a norcocaína que ganha destaque por ser o único produto de biotransformação biologicamente ativo, formando-se através da N-desmetilação pelo sistema oxidase de função mista hepática (KARCH, 1998; FERIGOLO; SIGNOR, 2007).

Há outro produto formado somente quando a COC é coadministrada com etanol, denominado de cocaetileno. Este é formado no fígado por transesterificação, e possui um caráter lipofílico, possibilitando-o atravessar a barreira hemato-encefálica e contribuir para os efeitos no SNC produzidos pela COC. Por outro lado, quando essa é utilizada na forma de crack, administração por via pulmonar, um produto de pirólise, éster metilanidroecgonina (AEME), é formado, indicando desta forma, a exposição à COC fumada (KARCH, 1998). Estudos evidenciam que a AEME, além de apresentar um maior potencial de adicção por meio de modulação colinérgica, o que poderia por sua vez justificar o maior potencial de abuso do crack, apresenta maior neurotoxicidade do que a COC, quando avaliado cultura celular primária de hipocampo (GARCIA, 2009, 2014). Um esquema com os produtos de biotransformação da COC está representado na figura 2.

Figura 2 - Produtos de biotransformação da COC.



Fonte: Adaptado de KARCH (1998).

A meia-vida de eliminação média é relatada como sendo 244 min após a administração IV, 272 minutos após o uso da droga fumada e 299 minutos após a administração IN, ou seja, variando de 4 a 5 horas aproximadamente (KARCH, 1998).

1.2. CABELO

Segundo a Sociedade de Análises em Cabelo (SoHT - do inglês *Society of Hair Testing*), o cabelo (CB) é considerado uma boa opção como amostra biológica, pois é um tecido forte, estável, menos afetado por adulterantes ou por curtos períodos de abstinência. Tem a vantagem sobre matrizes tradicionais, como sangue e urina, podendo confirmar a exposição de longo prazo a drogas, ou seja, a um período de semanas a meses, dependendo do comprimento do CB coletado (BOUMBA; ZIAVROU; VOUGIOUKLAKIS, 2006). Outras vantagens incluem o

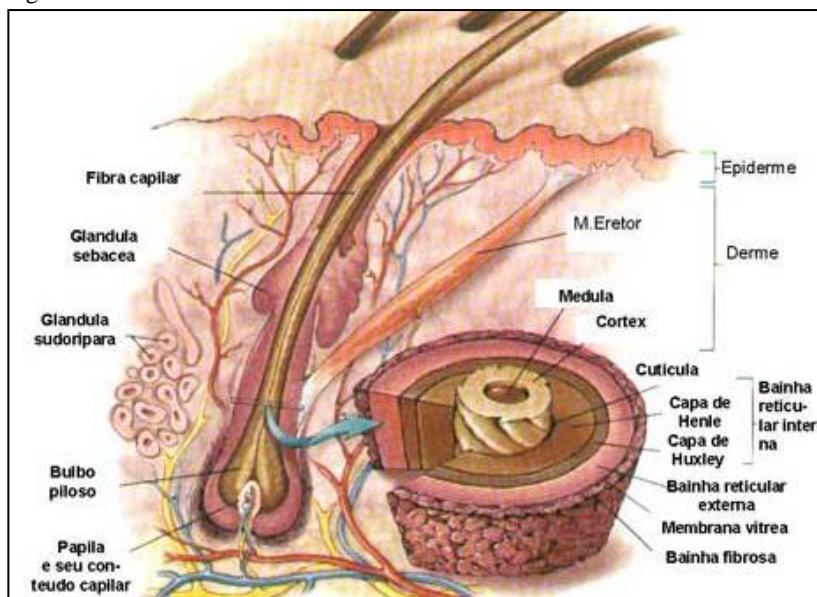
fato da coleta não ser invasiva e da amostra não precisar de refrigeração para armazenagem.

Quanto a sua estrutura, o CB encontra-se dividido em duas partes: a haste capilar, que se projeta para fora da superfície da pele, e o folículo piloso, que se encontra sob a superfície, apresentando uma dilatação terminal denominada por bulbo piloso. Ambas são constituídas por colunas de células epiteliais queratinizadas dispostas, de dentro para fora, em camadas concêntricas: a medula, o córtex (camada com células que contém melanina e bastante queratinizadas) e a cutícula, a qual confere resistência física e química ao CB (CARNEIRO; JUNQUEIRA, 2008 apud GORDO, 2013; PRAGST; BALIKOVA, 2006 apud GORDO, 2013).

Com relação à sua formação, o CB provém do folículo piloso situado entre 3 a 5 milímetros da superfície da pele. O bulbo piloso, extremidade do folículo piloso, é um local de síntese celular e encontra-se em contato com os capilares sanguíneos através da papila dérmica. Ao redor da papila dérmica há o centro germinativo formado por células da matriz (queratinócitos), presentes na membrana basal (figura 3) (PRAGST; BALIKOVA, 2006 apud GORDO, 2013).

Durante a fase de crescimento ativo do CB, as células da matriz proliferam-se e diferenciam-se para formar as três camadas internas (medula, córtex e cutícula). Estas, antes de serem expulsas para a superfície do couro cabeludo pelo bulbo piloso através de rápidas divisões mitóticas, encontram-se revestidas ainda pela bainha reticular interna, externa, membrana vítrea e bainha fibrosa (PRAGST; BALIKOVA, 2006 apud GORDO, 2013).

Figura 3 - Estrutura do CB.



Fonte: Zanini e Zanini (2014).

Com relação à constituição química do CB fazem parte: proteínas (65 – 95 %), água (15 – 35 %), lipídios (1 – 9 %) e minerais (< 1 %). A proteína mais abundante é a queratina, a qual é muito rica em cisteína, aminoácido que contém enxofre, o que confere ao fio resistência (BARROSO et al., 2011 apud GORDO, 2013).

As análises em amostras de CB iniciaram-se pelos metais, sendo o primeiro estudo realizado por Hoppe em 1858, buscando detectar arsênio em CB de cadáveres exumados 11 anos após a morte (LIMA; DA SILVA, 2007; POTSCH et al., 1997 apud GORDO, 2013).

As metodologias analíticas empregadas foram sendo aprimoradas até que em 1979, Baumgartner publicou o primeiro estudo no qual a morfina foi detectada pela técnica de Radioimunoensaio (RIA). Neste mesmo estudo observou-se pela primeira vez que a concentração dos xenobióticos variava ao longo da haste do CB, permitindo a avaliação da exposição do indivíduo em determinados períodos de tempo. Um ano depois, em 1980, Klug propôs a utilização de métodos cromatográficos para detecção de opioides nesta matriz biológica (BAUMGARTNER et al., 1979; BALIKOVA, 2005; PRAGS; BALIKOVA, 2006 apud GORDO, 2013).

Atualmente as análises toxicológicas em amostras de CB já estão bem estabelecidas como análises complementares, tendo aplicabilidade tanto na toxicologia clínica como forense. Esta amostra tem se mostrado uma ótima alternativa em diversos casos forenses, de forma que sua coleta já é feita de forma rotineira durante as investigações criminais em diversos países (COOPER; KRONSTRAND; KINTZ, 2012).

As utilidades das análises nesta amostra alternativa são inúmeras, como em casos *post mortem*, em que o cadáver encontra-se em estágio avançado de decomposição, e as amostras convencionais não se encontram disponíveis; em casos de abuso sexual, onde as vítimas, muitas vezes por vergonha, demoram a denunciar o caso, situação na qual a ampla janela de detecção torna-se indispensável; ou em casos onde há suspeita de maus cuidados com crianças, por se tratar de uma amostra não invasiva (COOPER; KRONSTRAND; KINTZ, 2012).

Nessas duas últimas situações, uma propriedade do CB é muito conveniente. Sabe-se que a taxa de crescimento deste é de aproximadamente 1cm/mês, isso proporciona a possibilidade de criar um histórico do uso da droga, segmentando o fio em parte menores, de aproximadamente 1cm, a partir da porção mais perto do couro cabeludo. Com relação aos casos com suspeita de abuso infantil, ressalta-se que se deve tomar cuidado na interpretação dos resultados, pois o uso de droga pela mãe durante a gestação passa para o bebê e pode ser incorporada no CB do mesmo ainda durante a gestação (COOPER; KRONSTRAND; KINTZ, 2012).

Acredita-se que a incorporação da droga nesta matriz ocorra por difusão passiva, passando da corrente sanguínea para as células germinativas do folículo piloso e em seguida para o interior da haste do CB durante a queratogênese. Isso ocorre mais facilmente com drogas lipofílicas e com caráter básico, como a COC, pois atravessam facilmente as paredes dos vasos, ligando-se as células do CB (queratinócitos) que possuem características ácidas. Essa ligação faz com que seja dificultada a redistribuição da droga, acumulando-se no CB (CLAUWAERT et al., 2000; BALIKOVA, 2005; DRUMMER, 2004). Outra proteína importante na constituição do CB que apresenta características ácidas é a melanina. A sua concentração varia de acordo com a coloração do CB. Essas informações são importantes quando se considera a análise de drogas nesta matriz biológica (SLOMINSKI et al., 2005; CHATTERTON, 2015).

Apesar das inúmeras vantagens desta amostra, uma das restrições muito comentada é o fato da detecção de drogas ser possível somente depois de algumas semanas do uso, quando se analisa somente a haste do cabelo cortado rente ao couro cabeludo. Com relação à COC é possível detectar 2/3 da sua concentração total somente depois de transcorrido duas semanas após o uso. Em casos em que há suspeita de morte por overdose em um cadáver onde não há mais a possibilidade de coletar amostras de urina, sangue ou vísceras, a análise do CB, não proporcionaria um resultado que poderia responder a essa questão (HARRISON; FU, 2014). Porém, para contornar essa restrição, alguns trabalhos vêm mostrando a possibilidade de analisar a raiz do CB. Isso diminuiria o tempo para o aparecimento da droga nesta amostra (NAKAHARA et al., 1997).

1.3. METODOLOGIAS UTILIZADAS NA TOXICOLOGIA FORENSE

1.3.1. Preparo de amostras

Para a realização das análises toxicológicas de matrizes biológicas faz-se necessário um preparo dessa matriz, anterior às análises instrumentais. Isto implica dentre outros fatores, na seletividade para o analito de interesse (MALAFATTI; MARTINS, 2009).

Para amostras queratinizadas, como o CB, é realizada a digestão da matriz orgânica. Essa técnica objetiva, dentre outros quesitos: degradar a matriz orgânica e como consequência liberar o analito no meio; solubilizar a matéria orgânica degradada no meio; e separar os interferentes e contaminantes do analito de interesse (MALAFATTI; MARTINS, 2009). Acrescenta-se que, para alcançar uma boa degradação e solubilização da matriz orgânica, deve haver uma fragmentação ou pulverização da amostra e homogeneização em um meio adequado (FAVRETTO et al., 2011).

Muitos autores trazem esta etapa como sendo uma extração do composto de interesse da matriz sólida, pois, muitas vezes a digestão é parcial, ou seja, o CB não é completamente degradado (PANTALEÃO, 2012). Para o CB são aplicados basicamente quatro tipos de digestão, as quais seguem:

❖ Digestão ácida ou com tampões – Utiliza desde soluções levemente ácidas como HCl 0,1 M ou tampões, como

fosfato, com pH de 6 a 7. Como vantagem, traz um extrato mais limpo que o obtido com a digestão metanólica, além de ser considerado eficiente para compostos básicos (UNODC, 2014).

❖ Digestão com metanol – Possui a vantagem de extrair da matriz praticamente todos os tipos de compostos (neutros, hidrofílicos e moderadamente lipofílicos). É considerado ainda um procedimento relativamente suave, não afetando compostos que possam sofrer hidrólise. Como desvantagem traz o fato de por ser capaz de extrair diferentes compostos, acaba por fornecer ao extrato, mais interferentes. Ainda, a capacidade de extrair da matriz compostos ionizados é menor que com outros solventes (UNODC, 2014).

❖ Digestão com metanol em meio ácido – Quando a digestão metanólica é feita juntamente com ácidos, trabalhos demonstram que a extração se torna mais eficiente para diversas drogas (HAN et al., 2005; LEE et al., 2011).

❖ Digestão básica – Geralmente emprega-se uma solução de NaOH 1 M. Possui como vantagem a digestão total da matriz. Porém não se torna aplicável para compostos que sofrem hidrólise básica (NAKAHARA, 1999; MUSSHOF; MADEA, 2007; KINTZ, 2011 apud PANTALEÃO, 2012; UNODC, 2014).

❖ Digestão enzimática – As enzimas mais utilizadas são a pronase e proteinase K, cujo mecanismo de atuação está na hidrólise das proteínas através da quebra das ligações de dissulfureto. A utilização de enzimas para a digestão do CB traz como vantagem a degradação completa da matriz, e como principal desvantagem, seu alto custo (PRAGS; BALIKOVA, 2006 apud GORDO, 2013).

Na sequência, após a digestão da matriz queratinizada, faz-se necessária a extração dos compostos de interesse da solução digestora, o separando de outros compostos presentes na mesma, consequentemente.

Neste sentido, aplica-se uma etapa de extração conhecida também como *clean-up*. Esta tem por objetivo, concentrar o composto de interesse, além de separá-lo dos interferentes presentes na amostra, muito utilizada em amostras complexas (JARDIM, 2010). Dentre os tipos de extração utilizados, a Extração em Fase Sólida (EFS), desenvolvida nos anos 70, tornou-se bastante empregada por ter um menor consumo de solvente orgânico, não formar emulsões (situação na qual pode haver

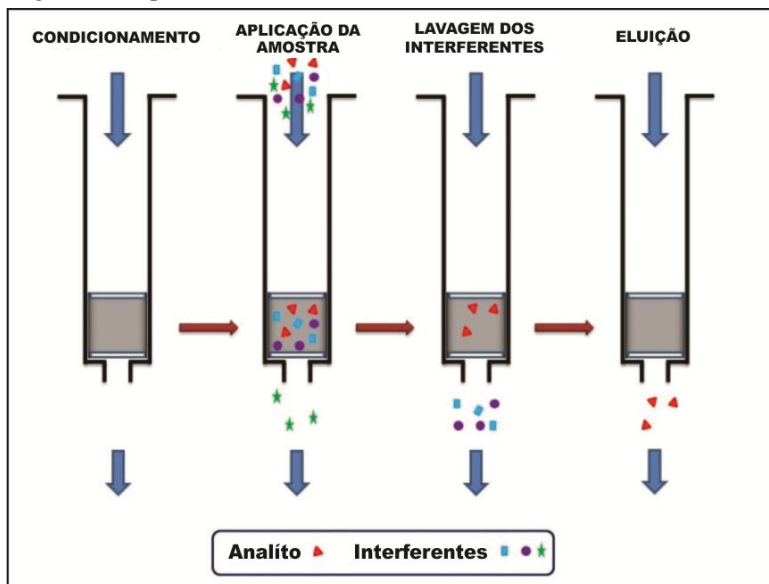
perda do analito), facilidade de automação, altos percentuais de recuperação e capacidade de aumentar seletivamente a concentração do analito (HERNÁNDEZ-BORGES et al., 2007).

A EFS tem como princípio a separação do composto de interesse de uma amostra no estado líquido através da retenção deste em um sorvente sólido e sua subsequente recuperação por meio de eluição com uma mistura de solventes. Esta técnica foi desenvolvida para ser uma alternativa à Extração Líquido-Líquido (ELL) por ser heterogênea, ou seja, composta por duas fases: sólida (sorvente) e líquida (mistura de solventes chamada de eluente) (WELLS, 2000).

Neste sentido, a EFS assemelha-se muito com a cromatografia líquida, isso por utilizarem os mesmos materiais adsorventes, tendo por consequência os mesmos mecanismos de separação: adsorção, partição (fase normal ou reversa), troca iônica e exclusão (JARDIM, 2010; PANTALEÃO, 2012). Acrescenta-se que nestes, as interações envolvidas são de ordem química e física, destacando-se as ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido, dipolo induzido-dipolo induzido e interações iônicas (LANÇAS, 2004 apud JARDIM, 2010).

O procedimento empregado para a EFS envolve basicamente quatro etapas. São elas: condicionamento do sorvente; aplicação da amostra, momento em que o composto de interesse irá interagir na fase sólida; limpeza do sorvente, importante para retirar os interferentes que ficaram retidos, também conhecida como lavagem; eluição do analito, momento onde o composto será retirado da fase sólida por uma fase líquida (LANÇAS, 2004 apud JARDIM, 2010). Um esquema do funcionamento da EFS (figura 4), assim como uma ilustração do aparato (figura 5) são apresentados a seguir.

Figura 4 - Esquema de funcionamento da EFS.



Fonte: Adaptado de Lucci et al. (2012).

Figura 5 - Sistema à vácuo para a EFS.



Fonte: Teknokroma (2017).

1.3.2. Técnicas analíticas

As principais técnicas de análise toxicológica utilizadas atualmente incluem desde métodos não instrumentais, como os testes colorimétricos, considerados mais simples e de fácil realização, até outros mais sofisticados, como é o caso dos imunoenaios e das diversas técnicas cromatográficas, como a Cromatografia em Camada Delgada (CCD), a Cromatografia Gasosa (CG) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (CUNHA et al., 2001 apud AIELLO, 2011; OSSELTON, 2004 apud AIELLO, 2011).

Na toxicologia forense, na maioria das vezes não é possível obter dados do caso (sintomas), como na toxicologia clínica, desta forma torna-se necessário iniciar a pesquisa dos analitos mais comuns de serem encontrados, através de uma etapa de triagem. Esta etapa tem por objetivo a detecção de uma quantidade grande de analitos com boa sensibilidade. Um exemplo de método empregado na fase de triagem é o imunoenasão, pois é prático e fornece um resultado relativamente rápido. Porém, apesar de apresentarem boa sensibilidade, não são considerados muito específicos, podendo haver falsos positivos (CORRÊA; TEIXEIRA, 2016). Desta forma, empregam-se testes com maior especificidade para uma etapa confirmatória, como as técnicas cromatográficas (SWGDRUG, 2016).

A importância dos testes confirmatórios está na segurança analítica do resultado. Com o propósito de evitar falsos positivos e falsos negativos, foi criado em 1997 um grupo de vários cientistas forenses denominados de Grupo de Trabalho Científico para Análise de Drogas Apreendidas (SWGDRUG - do inglês *Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs*), que em 2016 lançou a 7ª versão do manual de recomendações para as análises de drogas. Neste manual, o grupo classifica as técnicas empregadas em três categorias, como é possível observar no quadro 1, e recomenda que para um resultado ser confiável, as amostras devem passar, por pelo menos duas técnicas, sendo uma obrigatoriamente da categoria A, ou três técnicas, sendo duas delas, obrigatoriamente da categoria B.

Quadro 1 - Classificação das técnicas analíticas segundo o SWGDRUG.

CATEGORIA A	CATEGORIA B	CATEGORIA C
Espectroscopia de Infravermelho	Eletroforese Capilar	Teste de cor
	Cromatografia em Fase Gasosa	
Espectroscopia de Massas	Cromatografia de Íons	Espectroscopia de Fluorescência
	Cromatografia Líquida	
Espectroscopia de RMN	Teste de Microcristalização	Imunoensaio
	Identificadores farmacêuticos	
Difratometria de raios-X	Cromatografia em Camada Delgada	Ponto de Fusão
Espectroscopia Raman	Exames macro e microscópicos específicos para <i>Cannabis</i>	Espectroscopia Ultravioleta

Fonte: Adaptado de SWGDRUG (2016).

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A CLAE tornou-se uma ferramenta analítica indispensável nas análises toxicológicas forenses. Muitos laboratórios criminais empregam esta técnica no processo de obtenção de evidências criminais. Esta consiste na partição dos componentes de uma mistura (analitos) entre a Fase Móvel (FM) e a Fase Estacionária (FE). Na cromatografia líquida a FE é constituída de partículas sólidas empacotadas em uma coluna, a qual é atravessada pela FM. O tipo de técnica utilizada está relacionado com o mecanismo de separação, que pode ser: partição ou cromatografia líquido-líquido; adsorção ou cromatografia líquido-sólido; troca iônica ou cromatografia de íons; cromatografia por exclusão; cromatografia por afinidade; e por fim cromatografia quiral (SKOOG et al., 2006).

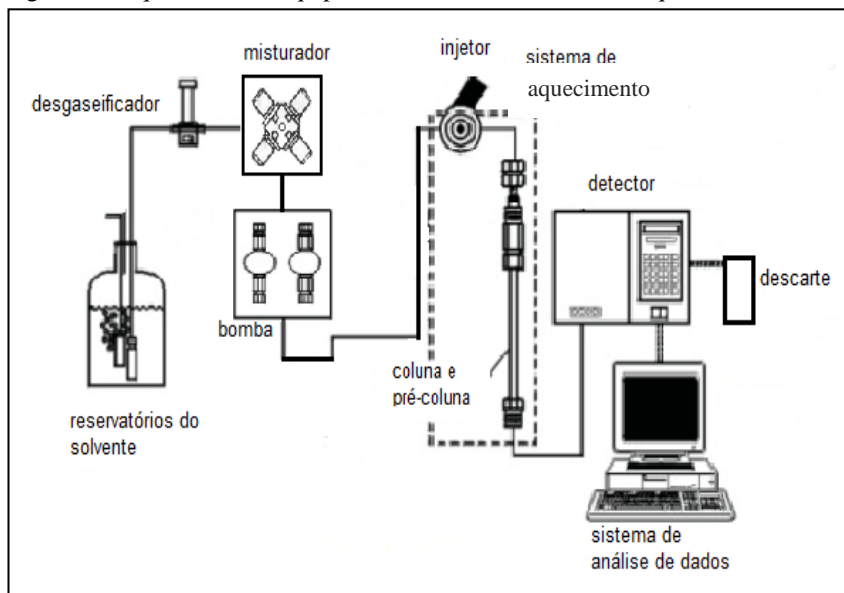
Dentre os tipos de CLAE, o mais utilizado é a cromatografia por partição, na qual a FE é um segundo líquido imiscível com o da FM. Esta pode ser subdividida em líquido-líquido e líquida com fase ligada. A distinção entre as duas é feita pela forma com que a FE (neste caso um líquido) é imobilizada nas partículas de suporte do recheio. Para a primeira, o líquido é imobilizado por adsorção física, enquanto que para a segunda é retido por meio de ligações químicas. A cromatografia de partição com fase ligada predomina devido a sua maior estabilidade (SKOOG et al., 2006).

Ainda dentro da cromatografia por partição há outra divisão feita de acordo com a polaridade relativa da FE e da FM, são elas: cromatografia de fase normal e de fase reversa. Os primeiros trabalhos realizados basearam-se em FEs altamente polares como o trietileno glicol ou água e um solvente relativamente não-polar, como o hexano ou o éter *i*-propílico como FM. Por razões históricas, esse tipo de cromatografia é atualmente chamado de fase normal. Já para a fase reversa, o oposto ocorre, tendo-se FEs apolares (geralmente hidrocarbonetos) e usando-se solventes mais polares (como água, metanol, acetonitrila (ACN) ou tetraidrofurano) (SKOOG et al., 2006).

Atualmente estima-se que mais de três quartos de todas as separações feitas por CLAE são realizadas em fase reversa com recheios com fase ligada contendo octil (C₈) ou octadecil (C₁₈) siloxano. Com o uso dessas preparações, os grupos hidrocarbonetos de cadeia longa encontram-se alinhados de forma paralela uns aos outros e perpendicular à superfície da partícula, gerando uma superfície não-polar que se assemelha a uma escova (SKOOG et al., 2006).

Com relação aos equipamentos utilizados na CLAE, estes são compostos por: um reservatório de solventes, onde são armazenados solventes utilizados como FM; um misturador de solventes, onde há a mistura dos solventes, nas proporções necessárias para o método; uma bomba, que possibilita a eluição da FM pela FE em um fluxo determinado; um injetor, onde será injetada a amostra a ser analisada; uma coluna onde se encontra a FE, muitas vezes é precedida pela pré-coluna (com função de proteger a coluna de pressões altas e sujeiras); um detector, que possibilita a conversão do sinal gerado para um eletrônico, e por fim, um sistema de análise de dados. Um esquema com os principais componentes de um equipamento de CLAE pode ser visualizado na figura 6 (SIGMA ALDRICH, 2017).

Figura 6 - Esquema de um equipamento de CLAE com sistema quaternário.



Fonte: Adaptado de Sigma Aldrich (2017).

Ainda com relação ao equipamento de CLAE, os detectores do tipo espectrofotométricos são bastante conhecidos e amplamente utilizados. O funcionamento destes baseia-se na absorvância de luz por parte da amostra ao passar através dela qualquer radiação eletromagnética. Existem basicamente dois tipos de detectores de luz ultravioleta: o fotométrico e o espectrofotômetro (arranjos de iodo) (CEFET- QUÍMICA RJ, 2000).

O segundo, ao contrário do primeiro, permite a análise de comprimentos de onda variáveis. Resumidamente, consiste em uma série de fotodiodos posicionados lado a lado em um cristal de silício. Isso permite que cada comprimento de onda difratado atinja um ponto deste arranjo, ou seja, um detector. Desta forma, torna-se possível a determinação da absorvância em todos os comprimentos de modo simultâneo, sendo essa uma de suas vantagens (MARKUS, 2014; CEFET- QUÍMICA RJ, 2000).

1.4. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação é um processo de avaliação que estima a eficiência de um método analítico. Seu objetivo consiste em demonstrar que este método é adequado para o seu propósito e deve ser considerada quando se desenvolve uma nova metodologia, efetua-se adaptações em metodologia já validada, inclui-se novas técnicas ou utiliza-se diferentes equipamentos. A validação visa ainda garantir a qualidade metrológica dos resultados analíticos, conferindo a eles confiabilidade para a tomada de decisões (BRITO et al., 2003; WALSH, 1999; MAPA, 2011).

Para a realização da validação analítica são analisados diversos parâmetros, como limite de detecção (LD) e quantificação (LQ), linearidade, precisão, exatidão, seletividade, entre outros. A estimativa destes parâmetros pode variar de acordo com a técnica analítica empregada, ou com o protocolo de validação a ser seguido (MAPA, 2011).

A necessidade de validar um método analítico já era conhecida quando, na década de 90 a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC - do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*), publicou um guia de calibração em Química Analítica, com a intenção de padronizar o procedimento de validação de um método analítico. Nesta mesma década, as agências regulatórias, dos Estados Unidos, Administração Federal de Alimentos e Medicamentos (FDA - do inglês *Food and Drug Administration*), do Japão, Ministério da Saúde, do Trabalho e do Bem Estar (MHLW- do inglês *Ministry of Health, Labour and Welfare*) e da Europa, Agencia Europeia de Medicina (EMEA - do inglês *European Medicine Agency*), passaram a organizar a Conferência Internacional sobre Harmonização (ICH - do inglês *International Conference on Harmonisation*), com o intuito de estabelecer padrões para os procedimentos de pesquisa e desenvolvimento de fármacos. Neste contexto, a ICH elaborou um guia sobre validação de métodos que tem sido utilizado em diversas áreas além da farmacêutica (RIBEIRO et al., 2008).

No Brasil, há dois órgãos que regulamentam a validação analítica, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental (IMETRO) (RIBEIRO et al., 2008).

Brito (2003) descreve que muitos dos artigos sobre validação analítica são das áreas biológicas, farmacêuticas e químicas. Acrescenta

que, mesmo diante de guias e protocolo, para validação de métodos analíticos, os artigos abordam os critérios de validação de acordo com suas áreas específicas, não necessariamente seguindo com rigor os referidos guias e protocolos, enfatizando a exatidão, a precisão e os LD e LQ.

No âmbito das análises forenses há alguns documentos internacionais que auxiliam no processo de validação. Um desses documentos foi elaborado pela UNODC, o *Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens*, publicado pelas Nações Unidas, em 2009. Este guia detalha os testes que são considerados importantes para a validação de um método analítico, para cada técnica utilizada. O segundo documento é o *Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology*, publicado em 2013 pelo SWGTOX e traz informações detalhadas dos procedimentos analíticos necessários para validação de um método em análises forenses como, precisão, curva de calibração, efeito memória, estudos de interferências, LD e LQ.

Estes guias de validação voltados para a toxicologia forense são importantes e de grande relevância, pois a pesquisa voltada para o campo forense vem crescendo cada vez mais no Brasil, trabalhando para ampliar a gama de drogas a serem detectadas, o tipo de amostra a ser analisada, assim como a melhora na sensibilidade dos métodos de detecção.

1.5. ASPECTOS GERAIS

No cenário de drogas de abuso, uma que ganha destaque no campo forense é a COC, pois o número de usuários desta droga vem aumentando tanto no Brasil como no mundo. Este aumento reflete uma preocupação para área de segurança pública, uma vez que esta droga tem forte relação com a violência (BEATO FILHO et al., 2001 apud TOLEDO, 2003). Muitas das mortes violentas investigadas estão associadas com o achado de COC nas amostras biológicas do cadáver (PERICOLO, 2016).

A área nas ciências forenses que trabalha com a detecção de drogas em amostras biológicas, como a COC, é a toxicologia forense. Atualmente, esta vem concentrando sua atenção cada vez mais para matrizes não convencionais. Um exemplo é o CB, um tecido resistente, química e fisicamente, e com uma ampla janela de detecção. Devido a essas características sua análise torna-se importante no campo forense, principalmente em casos *post-mortem*, quando o cadáver é encontrado em

estágio avançado de decomposição, tornando-se difícil a obtenção das amostras convencionais (COOPER; KRONSTRAND; KINTZ, 2012).

O CB é uma amostra biológica complexa em sua composição, fazendo-se necessário um procedimento pré-analítico de preparo, que tornará essa amostra mais compatível com equipamentos como cromatógrafos (MALAFATTI; MARTINS, 2009; MOREAU; SIQUEIRA, 2016). Após o tratamento prévio, utiliza-se técnicas analíticas para detecção ou quantificação do analito de interesse. Dentre estas está a CLAE que possibilita o desenvolvimento de um método bastante seletivo e sensível, pelas inúmeras possibilidades de combinação dos solventes extratores (CEFET- QUÍMICA RJ, 2000).

Diante da complexidade da matriz CB e dos procedimentos para análise que devem a ela ser empregados, o desenvolvimento analítico de um método, envolvendo tanto procedimento pré-analíticos como analíticos, assim como sua devida validação são fundamentais para a construção de uma ferramenta analítica forense eficaz.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver, validar e aplicar uma metodologia para quantificação de COC e seu produto de biotransformação, BE, em amostras de CB por CLAE acoplada ao Detector de Arranjos de Diodos (DAD).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver procedimentos para o preparo da amostra CB, etapa pré-analítica;
- Desenvolver metodologia para quantificação de COC e BE por CLAE-DAD, etapa analítica;
- Validar a metodologia previamente desenvolvida para a quantificação de COC e BE, em CB por CLAE-DAD;
- Realizar a quantificação de COC e BE em amostras de CB de vítimas de morte violenta procedentes de casos atendidos no IGP/SC em sua sede de Joinville.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Soluções padrão e reagentes

Utilizou-se os padrões de COC, cafeína, nicotina e o gama-hidroxi-butirato (GHB - do inglês *Gama Hydroxy Butyrate*) da Cerilliant Corporation® (Texas, USA), BE gentilmente cedido pela Polícia Federal (Brasil) e articaína proveniente da empresa Nova DFL® (Rio de Janeiro, Brasil), esta última usada como padrão interno (PI). Utilizou-se ainda os seguintes padrões: lidocaína da Hipolabor® (Minas Gerais, Brasil), propofol e tramadol da Astrazaneca® (São Paulo, Brasil), midazolam, diazepam e morfina da Cristália® (São Paulo, Brasil), quetamina, anfepramona e teofilina da Aché® (São Paulo, Brasil) e por fim, haloperidol, metadona e prometazina da Boehringer Ingelheim® (São Paulo, Brasil). Os reagentes e sais utilizados foram: metanol LiChrosolv® da Merck® (Darmstadt, Alemanha); ACN da Tedia® (Fairfield, EUA); hidróxido de amônia da Êxodo Científica® (São Paulo, Brasil); ácido clorídrico supra puro, ácido fórmico 98 % P.A., hidróxido de sódio, fosfato de potássio dibásico e diclorometano P.A. foram todos adquiridos da Vetec® (Rio de Janeiro, Brasil); fosfato de potássio monobásico e ácido acético glacial UV/HPLC obtidos da Dinâmica® (São Paulo, Brasil); acetato de amônio procedente da Sigma Aldrich® (Missouri, EUA) e por fim, tween 80 da Splabor® (São Paulo, Brasil).

Os padrões de COC e BE, na concentração de 1 mg/mL, e de articaína, na concentração de 4 %, foram todos diluídos em ACN para a preparação das soluções estoque. Para os analitos de interesse foram preparadas duas soluções mistas nas concentrações de 50 µg/mL e 5 µg/mL e para o P.I. 50 µg/mL. Estas foram mantidas em microtubos de polipropileno a -20 °C, e diluídas até a concentração desejada imediatamente antes ao uso. As soluções de tampão fosfato, assim como as demais soluções utilizadas neste trabalho foram preparadas com água ultrapura, grau do tipo 1 (resistividade: > 18 MΩ).

Acrescenta-se que a escolha da articaína como PI baseou-se no trabalho de Fernández e colaboradores (2003). Ainda, esta é um anestésico utilizado na odontologia e não sendo comumente encontrado como adulterante da droga COC (PAWLIK et al., 2015).

3.1.3. Instrumental

Na execução deste trabalho foi utilizado Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, modelo *FinniganSurveyor* da empresa Thermo SCIENTIFIC® (Massachusetts, EUA), contendo bomba quaternária (*Surveyor LC Pump Plus*), amostrador automático (*SurveyorAutosampler Plus*) e detector de arranjos de diodos (*Surveyor PDA Plus Detector*). Para os experimentos pré-analíticos como preparo de amostra e extração dos analitos de interesse foram utilizados: banho ultrassom da Unique® (São Paulo, Brasil); estufa da empresa Binder® (Baden-Württemberg, Alemanha); centrífuga da Datamed® (São Paulo, Brasil); sistema de Extração em Fase Sólida, Visiprep™, Sigma Aldrich® (Missouri, EUA); e concentrador de amostra miVac, Genevac® (Ipswich, Reino Unido).

3.1.4. Amostras

As amostras de CB utilizadas neste trabalho foram obtidas de vítimas de morte violenta dos casos atendidos no IGP/SC em sua sede de Joinville no período de março a dezembro de 2015. Destaca-se que o setor de toxicologia do Instituto de Análises Forenses (IAF) do IGP/SC adota como rotina a varredura toxicológica em sangue e urina por imunoensaio e análises de confirmação por GC/MS, para detecção de drogas ilícitas (PERICOLO, 2016), sendo os resultados destas, utilizados neste trabalho

Acrescenta-se que dos casos que apresentaram resultados não detectado para COC nos exames toxicológicos em amostras de sangue e/ou urina realizados pelo IGP/SC, uma porção foi reservada para a realização dos testes de desenvolvimento e validação, e outra, utilizada na aplicação do método. Já aqueles que apresentaram resultados detectado foram utilizados para o desenvolvimento da etapa de digestão e para a aplicação do método.

A coleta das amostras foi realizada por indivíduos devidamente treinados, após consentimento de um responsável legal, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Acrescenta-se que este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC) e aprovado sob o número 42155115.5.0000.012.

3.2. MÉTODO

3.2.1. Desenvolvimento do método

Para o desenvolvimento do método realizou-se diferentes experimentos, tanto para a etapa pré-analítica de preparo da amostra como para a analítica, a fim de obter um método eficaz, sensível e com boa reprodutibilidade na quantificação de COC e BE em CB, para sua posterior validação e aplicação.

3.2.1.1. Etapa pré-analítica

Coleta e armazenamento da amostra biológica

A coleta das amostras de CB realizada no IGP/SC em sua sede de Joinville seguiu as recomendações da SoHT (SoHT, 2004). Desta forma, foram coletados aproximadamente 200 mg de CB da região do vértice posterior, o mais próximo possível ao couro cabeludo. Após, as amostras foram armazenadas em envelopes de papel a temperatura ambiente. Cada envelope foi identificado com a data da coleta, data do óbito e número do caso (estratégia utilizada para preservar a identidade da vítima).

Lavagem da amostra biológica

As amostras de CB passaram por um processo de lavagem com intuito de remover contaminação externa.

O procedimento consistiu-se de uma etapa inicial empregando tween 80 a 0,1 % em banho de ultrassom por 5 min, seguida de sucessivas lavagens com água do tipo 1, até a retirada do tensoativo (BERMEJO et al., 2006). Na sequência, adicionou-se às amostras diclorometano, submetendo-as novamente ao banho de ultrassom por 5 min. Após sucessivos enxagues com água do tipo 1, as amostras foram submetidas à secagem em temperatura ambiente sobre papel filtro (UNODC, 2014).

Fragmentação da amostra

Para esta etapa foram avaliados dois diferentes processos. Estes visavam verificar a melhor alternativa para fragmentação da matriz e conseqüentemente uma melhor digestão da mesma. Os processos avaliados foram: corte do CB com tesoura em pequenos fragmentos de cerca de 1 mm (SoHT, 2004; MERCOLINI et al., 2008) e também este acrescido de pulverização do CB em grau com pistilo, ambos de vidro.

Digestão da amostra biológica

Avaliou-se neste momento, quatro procedimentos distintos de digestão, com solução aquosa ácida, solvente orgânico, solvente orgânico acrescido de solução aquosa ácida, e por fim, solução ácida em solvente orgânico. Para esta etapa utilizou-se uma amostra supostamente positiva para COC que, após lavada, fragmentada e homogeneizada, foi alíquotada em quatro porções, cada qual para uma das soluções digestoras avaliadas.

Na digestão com solução aquosa ácida, adicionou-se a amostra 1,5 mL de HCl 0,1 M em tubo de vidro de 10 mL, que foi agitado levemente e submetido na sequência à aquecimento de 45 °C em estufa *overnight* (16 h). Posteriormente, a amostra foi mantida em repouso e resfriada a temperatura ambiente, o conteúdo líquido foi então transferido para um tubo de polipropileno, ao qual foi adicionado 1,5 mL de tampão fosfato 0,02 M pH 6 e 25 µL de NaOH 2 M (adaptado de MERCOLINI et al., 2008).

Para a digestão com solvente orgânico foram adicionados à amostra 2 mL de metanol em tubo de vidro de 10 mL, que foi agitado levemente, sendo posteriormente submetido ao aquecimento de 45 °C em estufa *overnight* (16 h). O sobrenadante foi coletado, transferido para frasco de polipropileno, seco no concentrador de amostra à 45 °C e por fim, ressuscitado em 2 mL de tampão fosfato 0,02 M pH 6 (adaptado de TOLEDO et al., 2003).

Na terceira tentativa foi analisada a digestão com solvente orgânico acrescido de solução aquosa ácida. Para tal, adicionaram-se 2 mL de metanol e 1 mL de HCl 0,1 M à amostra em tubos de vidro de 10 mL, agitando moderadamente, submetendo-a à temperatura de 45 °C em estufa *overnight* (16 h). Na sequência, o sobrenadante foi transferido para frasco de polipropileno, o volume referente à porção orgânica foi seco em concentrador de amostra à 45 °C e ao 1 mL de solução restante foi adicionado 1 mL de tampão fosfato 0,02 M pH 6 (adaptado de BARROSO et al., 2008).

Por fim, foi avaliada a digestão com solução metanólica ácida, na qual a solução de HCl 0,1 M foi preparada em metanol. Adicionaram-se 2 mL desta solução à amostra em tubo de vidro de 10 mL, agitando moderadamente, o qual foi submetido ao aquecimento em estufa à 45 °C *overnight* (16 h). O sobrenadante foi transferido para tubo de polipropileno e seco em concentrador de amostra à 45 °C. Ao extrato adicionaram-se 2 mL de tampão fosfato 0,02 M pH 6 (UNODC, 2014).

Na sequência, para as quatro tentativas, as amostras foram submetidas à ESF previamente otimizada.

Processo de extração

O processo de extração foi realizado pelo método da EFS. Para isso foram utilizados cartuchos DSC-MCAX 300 mg, 3 mL (Sigma Aldrich®). Estes são compostos por uma fase estacionária mista, parte apolar (C8) e parte de troca catiônica.

Nesta etapa foram avaliados quatro procedimentos distintos, almejando obter melhores resultados para a extração dos analitos de interesse. Seguem abaixo os procedimentos realizados.

Para o primeiro procedimento seguiram-se as recomendações do fabricante do cartucho. Iniciou-se pelo condicionamento do cartucho feito com 3 mL de metanol e 3 mL de tampão fosfato 0,02 M pH 6. Na sequência aplicou-se a amostra (3 mL), cujo pH havia sido ajustado previamente para 6. Em seguida foi realizada a etapa de lavagem utilizando 2 mL de tampão fosfato pH 6, 2 mL de HCl 0,1 M e 2 mL de metanol, nesta ordem. Por fim a amostra foi eluída com 2 mL de 5 % de hidróxido de amônio em metanol.

No segundo procedimento as etapas de condicionamento, aplicação da amostra e lavagem foram idênticas ao procedimento anterior. Assim, a alteração feita foi apenas na etapa de eluição, alterando somente o solvente orgânico no qual o hidróxido de amônio foi diluído. O eluente empregado foi 5 % de hidróxido de amônio em ACN.

No terceiro procedimento, assim como no segundo, alterou-se somente a etapa de eluição. Neste, utilizou-se como eluente 2 mL de uma solução de diclorometano:isopropanol:amônio (78:20:2) (CROUCH et al., 1995; ROMOLO et al., 2003; COGNARD et al., 2005).

Por último, no quarto procedimento, para o condicionamento do cartucho, na primeira etapa, adicionou-se ao mesmo 3 mL de metanol e 3 mL de tampão fosfato 0,02 M pH 3. Na sequência aplicou-se a amostra (3 mL), a qual foi ajustada para pH 3, seguido do procedimento de lavagem realizado com 2 mL de tampão fosfato pH 3, 2 mL de HCl 0,1 M e 2 mL de metanol, nesta ordem. Posteriormente, a amostra foi eluída com 2 mL de 5 % de hidróxido de amônio em metanol. A alteração do pH do tampão feita neste procedimento é citada também como uma opção pelo fabricante do cartucho, sendo recomendada para compostos fortemente básicos.

Destaca-se que para todas as etapas da EFS, e nos quatro procedimentos avaliados, observou-se cuidadosamente o fluxo de passagem das soluções pela FE, sendo este em gotejamento, evitando assim, perda dos analitos de interesse.

Finalmente, para cada um dos procedimentos a fração coletada das amostras, 2 mL, foi concentrada em concentrador de amostra por cerca de 1 h a 45 °C e ressuspensa em 250 µL da porção aquosa da FM.

Etapa analítica

Para a análise cromatográfica foi utilizada uma coluna C₁₈ 250 mm, 4,6 mm com partículas de 5 µm de diâmetro, e um volume de injeção fixado em 25 µL. O desenvolvimento desta etapa deu-se sobre os seguintes parâmetros:

1. Tipo de solvente orgânico;
2. Proporção dos solventes da FM;
3. Modo de eluição da FM (isocrático ou gradiente);
4. Tipo de solução aquosa presente na FM (soluções ácidas ou tampões);
5. Fluxo da FM.

Inicialmente seguiu-se com a FM utilizada por Fernández et al. (2003), composta por metanol e tampão fosfato (0,02 M) pH 7 na proporção de 70:30 com fluxo de 0,4 mL/min. No entanto, não foi possível visualização de nenhum sinal no cromatograma. Considerando algumas observações experimentais e diferenças técnicas constatadas entre o equipamento empregado no laboratório e o do referido artigo, como tamanhos diferentes de coluna (artigo: C₁₈ 125 mm, 4,6 mm com partículas de 5 µm de diâmetro), realizou-se alterações nas variáveis usadas no artigo, obtendo-se o seguinte método para dar início ao desenvolvimento: FM metanol:tampão fosfato 0,02 M pH 6 (80:20), com fluxo de 1 mL/min.

Para o desenvolvimento dos parâmetros utilizou-se solução padrão de COC e BE nas concentrações de 1 µg/mL ou 5 µg/mL.

Acrescenta-se que a ordem de apresentação dos parâmetros para o desenvolvimento do método descrita a seguir foi realizada para fins didáticos, não sendo estes necessariamente realizados nesta sequência.

Avaliação quanto ao tipo de solvente orgânico

Primeiramente, partiu-se do parâmetro tipo de solvente orgânico. Para tal, foi analisado o uso de metanol e ACN, ambos em associação

com tampão fosfato 0,02 M pH 6 em proporções que apresentassem forças cromatográficas iguais, afim de avaliar apenas suas diferentes seletividades com relação aos analitos de interesse. Nesse sentido, utilizou-se as proporções de 80:20 para a FM composta por metanol:tampão fosfato e 70:30 para acetonitrila:tampão fosfato.

Avaliação quanto à proporção dos solventes da FM

Avaliou-se também a proporção entre o solvente orgânico escolhido e a porção aquosa na FM. Essa proporção foi avaliada amplamente, de 10:90 a 90:10, sendo realizada em dois momentos: somente com padrões dos analitos de interesse e na sequência com amostras de CB adicionada dos referidos padrões.

Avaliação quanto ao modo de eluição

Com os resultados observados na avaliação da proporção de solvente orgânico na FM, questionou-se a necessidade de avaliar o modo de eluição. Sendo assim, os resultados obtidos até este momento, em modo de eluição isocrático, foram comparados com os resultados obtidos com o modo de eluição gradiente. Para tal utilizou-se como base resultados obtidos no parâmetro anterior.

Avaliação quanto ao tipo de solução aquosa presente na FM

Para a composição da fração aquosa da FM, foi analisado o uso dos tampões fosfato de potássio 0,02 M (FERNÁNDEZ et al., 2003) e acetato de amônio 0,01 M (CLAUWAERT et al., 2000), além das soluções ácidas de ácido fórmico a 0,01 % e ácido acético 0,1 %.

Avaliação quanto ao fluxo da FM

Por fim, considerando esta etapa, avaliou-se os fluxos de 0,6, 0,8, e 1 mL/min. Neste momento do desenvolvimento do método objetivou-se avaliar se era possível a mudança do fluxo sem comprometimento dos Tempos de Retenção (TRs) da BE e da COC. Neste sentido, reduzindo o fluxo sem alterar relevantemente os TRs, e conseqüentemente o tempo total da análise, seria possível a economia no uso dos solventes, nos momentos de estabilização do equipamento e intervalo entre as análises.

3.2.2. Validação do método

Diante da ausência de normativa nacional específica para laboratórios forenses, foram utilizados como base para escolha dos parâmetros na validação, guias internacionais como os publicados pelo SWGTOX (2013) e UNODC (2009). A partir destes, foram elencados os seguintes parâmetros: linearidade, LD e LQ, especificidade/seletividade, precisão, exatidão, recuperação e efeito memória. Acrescenta-se que foi utilizado PI nas análises, na concentração de 5 ug/mL.

A razão das áreas obtidas pelo analito e pelo PI foi nomeada de área ajustada (figura 7). Esta foi utilizada para todos os cálculos do processo de validação e aplicação do método.

Figura 7 - Fórmula utilizada para obtenção da área ajustada.

$$\text{Área ajustada} = \frac{\text{Área do analito}}{\text{Área do PI}}$$

Fonte: Collins; Braga; Bonato (1997).

3.2.2.1. Linearidade

Na análise da linearidade selecionou-se cinco concentrações iguais para os dois analitos, sendo estas descritas a seguir em µg/mL: 0,5; 2,5; 5; 7,5 e 10. Estas concentrações foram analisadas em seis dias distintos.

Para avaliação deste ensaio construiu-se uma curva de calibração com as médias das áreas ajustadas para cada uma das cinco concentrações. A partir do modelo de regressão linear obteve-se o coeficiente de correlação (r), o qual deve ser superior a 0,99 para aprovação deste parâmetro (UNODC, 2009).

3.2.2.2. Limite de Detecção e Quantificação

O LD compreende a menor concentração dos analitos de interesse que pode ser detectada com certo grau de confiança. Este pode ser definido ainda como a menor concentração dos analitos de interesse que pode ser distinguida do ruído de fundo. Quanto ao LQ, este é considerado a menor concentração que pode ser mensurada com certo grau de confiança (UNODC, 2009).

Ainda segundo a UNODC (2009), o LD e o LQ podem ser estimados a partir de dados obtidos na curva de calibração do parâmetro da linearidade. Dessa forma, calculou-se o LD e o LQ como segue abaixo:

Figura 8 – Fórmulas utilizadas para os cálculos do LD e LQ.

$$\text{LD} = 3x \text{ DP}/\alpha$$

$$\text{LQ} = 10 x \text{ DP}/\alpha$$

Fonte: UNODC (2009).

Onde o DP é o desvio padrão da menor concentração da curva de calibração e α o coeficiente angular da mesma.

3.2.2.3. Especificidade/Seletividade

Neste parâmetro foram analisadas amostras fortificadas com os analitos de interesse e mais 15 outros compostos (lidocaína, cafeína, nicotina, tramadol, morfina, midazolam, diazepam, propofol, quetamina, teofilina, GHB, anfepramona, haloperidol, metadona e prometazina). Acrescenta-se que estas análises foram feitas em triplicatas. Por último foram analisadas dez amostras de CB brancas (sem fortificação de quaisquer compostos) de dez fontes distintas (UNODC, 2009).

Avaliou-se nesse parâmetro, a existência de algum sinal no TR da COC, BE e PI que poderia interferir nas áreas dos picos indicando uma possível coeluição. Analisou-se ainda a possibilidade de ocorrência de sinal nos TRs dos analitos nas amostras de CB sem adição de padrão (UNODC, 2009).

3.2.2.4. Precisão

Para avaliar a precisão foram analisadas três concentrações (baixa, média e alta – 1,5; 6 e 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente) em triplicatas e em três dias distintos. Ao final, para as nove replicatas obtidas foram calculados os coeficientes de variação (CVs) em %, precisão interdia, assim como para as três replicatas de cada um dos três dias, precisão intradia. Como critério de aceitação estabeleceu-se o limite de 20 % para o CV da menor concentração e 15 % para as demais concentrações (UNODC, 2009).

3.2.2.5. Exatidão

Na análise da exatidão do método foram utilizados os dados da precisão calculando-se a diferença entre a concentração obtida (CO) e a esperada (CEs) em percentual de acordo com a seguinte fórmula (UNODC, 2009):

Figura 9 – Fórmula utilizada para o cálculo da exatidão.

$$\text{Exatidão (\%)} = \text{CO} / \text{CEs} \times 100$$

Fonte: UNODC (2009).

Como critério de aceitação utilizou-se o valor percentual de 80 % para a menor concentração e 85 % para as demais (UNODC, 2009).

3.2.2.6. Recuperação

A inclusão deste parâmetro no processo de validação torna-se necessário quando o método em questão envolve uma etapa de extração (UNODC, 2009). Considerando o exposto, o parâmetro de recuperação foi avaliado no presente trabalho da seguinte forma: a cinco amostras de CB foram adicionados os padrões de CO e BE nas mesmas concentrações utilizadas para a precisão e exatidão (A1). Estas amostras foram submetidas à EFS e na sequência o PI (A2) foi adicionado na concentração de 5 µg/mL. Paralelamente, três soluções para cada uma das três concentrações foram analisadas (A3) com o PI (A4) na mesma concentração das amostras de CB.

A partir dos resultados obtidos com as análises acima descritas, o percentual de recuperação foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

Figura 10 – Fórmula utilizada para cálculo da recuperação.

$$\text{RECUPERAÇÃO \%} = \frac{\text{A1} / \text{A2}}{\text{A3} / \text{A4}} \times 100$$

Fonte: UNODC (2009).

3.2.2.7. Efeito Memória

A SWGTOX (2013) define efeito memória como o aparecimento de sinal no TR dos analitos de interesse em amostras isentas dos analitos de interesse, analisadas posteriormente à amostra positiva.

Para avaliação deste parâmetro, uma amostra isenta dos analitos de interesse, COC e BE, foi avaliada após a análise de uma amostra de CB fortificada na concentração de 20 µg/mL, o dobro da concentração do último ponto da curva. Esse procedimento foi avaliado em triplicata (SWGTOX, 2013).

3.2.3. Aplicação do método

O método validado foi aplicado em amostras oriundas do IGP/SC da sua sede de Joinville de vítimas de morte violenta. Estas foram avaliadas anteriormente pelo IAF do IGP de forma que já possuíam resultados detectados ou não detectados para COC em amostras de sangue e/ou urina.

3.2.4. Análise estatística dos dados

Os resultados obtidos através dos ensaios para o desenvolvimento das etapas pré-analíticas e analíticas e para a validação foram expressos na forma de média, DP e CV e representados sob a forma de tabelas e gráficos/cromatogramas. Os dados obtidos da aplicação do método validado foram plotados em tabela e comparados com os resultados no sangue e/ou urina. Para isso foram utilizados os softwares Microsoft Excel® 2016 e GraphPadPrism® 6.01.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO

O desenvolvimento do método compreendeu as etapas pré-analíticas e a analítica. A primeira refere-se ao tratamento prévio da amostra, envolvendo a lavagem, a fragmentação e digestão, além da extração dos analitos de interesse. A segunda refere-se a análise propriamente dita, realizada nesse estudo por um método cromatográfico.

4.1.1. Etapa pré-analítica

Lavagem da amostra

Segundo a SoHT, o procedimento de lavagem tem dois propósitos: primeiro, remover impurezas como suor, sebo ou material de superfície (por exemplo, células da pele, fluidos corporais, etc.); segundo, para eliminar a potencial contaminação externa de drogas do meio ambiente (COOPER; KRONSTRAND; KINTZ, 2012). Esta etapa foi realizada com base nas diretrizes para análise de drogas sob controle internacional em cabelo, suor e saliva (UNODC, 2014), com algumas modificações.

A adição de detergente no procedimento de lavagem é citada como uma possibilidade pelo guia supracitado, e utilizada por diversos autores (CHIAROTTI et al., 1996; BERMEJO et al. 2006; PEGO et al., 2017). Neste estudo optou-se por utilizar tween 80 na concentração de 0,01 %, assim como Bermejo et al. (2006). O tween é um surfactante não iônico e emulsionante derivado do sorbitol (GENNARO, 1995). Este agente é encontrado comercialmente com números após seu nome, como Tween 20, Tween 80. Estes números indicam o tipo de ácido graxo ligado à molécula, o 80, por exemplo, representa uma molécula de monooleato, que comparativamente ao 20, apresenta maior propriedade emulsificadora (SCHIWECK et al., 2012). A percepção da necessidade de incorporar ao protocolo um detergente ocorreu após a constatação do estado físico das amostras reais, oriundas de vítimas de morte violenta, as quais apresentavam sujeiras diversas como terra.

As diretrizes ressaltam ainda o cuidado que se deve ter na escolha do solvente, considerando que solventes próticos, aqueles que possuem um hidrogênio dissociável, como o metanol e água, podem causar o inchaço do CB e conseqüentemente perda de analitos que estejam incorporados nesta matriz. Para minimizar esse efeito selecionou-se um

solvente orgânico aprótico, o diclorometano, e usou-se água do tipo 1 somente para enxague, reduzindo assim o contato deste solvente prótico com a amostra.

Assim, após as ponderações mencionadas, o procedimento da lavagem da amostra foi realizado conforme as seguintes etapas:

1. Imersão da amostra de CB em solução de tween 80 0,1 % por 5 min em banho de ultrassom;
2. Enxague com água do tipo 1;
3. Imersão da amostra de CB em diclorometano por 5 min em banho de ultrassom;
4. Enxague com água do tipo 1.

Fragmentação da amostra

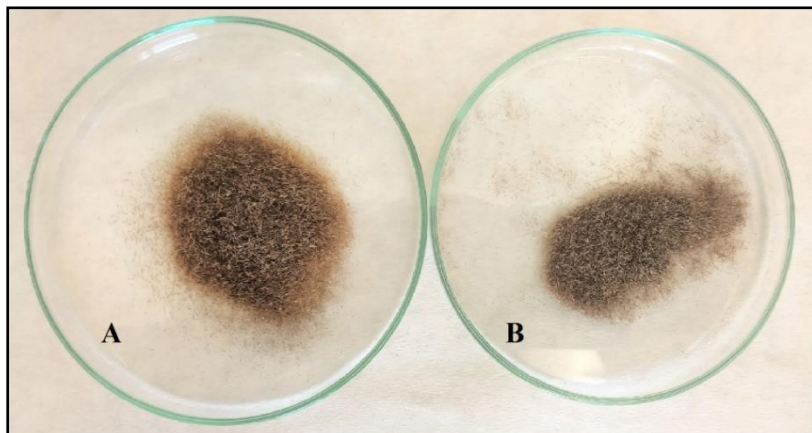
O emprego do processo de pulverização para amostras de CB está bem estabelecido na literatura. Com esta finalidade, vários estudos, posterior ao corte com tesoura, utilizam aparato constituído de esferas de metal, denominado em inglês de *mini ball mill*. Essas são colocadas juntamente com a matriz em um tubo de vidro sob forte agitação, pulverizando de forma eficiente a amostra biológica (LEONG et al., 2005; SHAH et al., 2014; HARDY et al., 2015). Entretanto, nem todos os laboratórios têm disponível este aparato.

Assim, inicialmente avaliou-se a fragmentação utilizando apenas uma tesoura para cortar o CB em porções de aproximadamente 1mm. Porém, percebeu-se uma grande dificuldade em manusear as amostras para que fosse possível o corte em pequenos fragmentos, principalmente nas porções finais das mesmas. No sentido de melhorar este procedimento, e aumentar a superfície de contato da amostra, acrescentou-se a pulverização em gral e pistilo de vidro. A escolha deste material deu-se pelo fato de ser menos poroso que a porcelana, por exemplo, o que poderia causar aderência do CB e contaminação de uma amostra para outra.

Como é possível constatar na imagem a seguir, figura 11 A e B, observou-se a olho nu, uma diferença no aspecto da matriz antes e depois da pulverização, respectivamente. Depois de pulverizada em gral de vidro, esta apresentou um aspecto mais claro, tendendo ao esbranquiçado,

demonstrando que este processo poderia tornar a matriz capilar mais frágil, o que foi determinante para sua adoção na etapa de fragmentação.

Figura 11 - Comparação da matriz CB antes (A) e depois (B) do processo de pulverização.



Fonte: Autora.

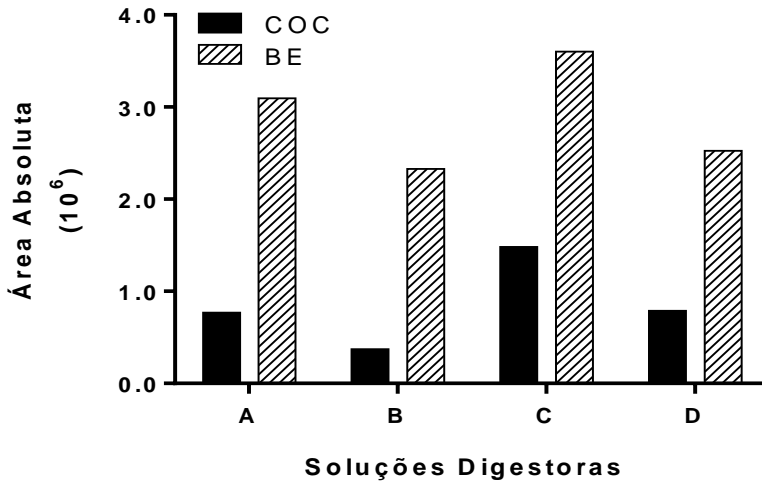
Desta forma, ressalta-se que a forma alternativa de pulverização aplicada no presente trabalho foi eficiente e permitiu um preparo adequado da matriz para a etapa pré-analítica seguinte.

Digestão da amostra biológica

Para a digestão das amostras foram avaliadas quatro possibilidades: com uma solução aquosa de HCl 0,1 M; somente com o solvente orgânico metanol; com metanol mais solução aquosa de HCl 0,1 M (2:1); e por fim uma solução metanólica de HCl 0,1 M. Após cada processo, as amostras foram tamponadas em pH 6 e submetidas à EFS. Ressalta-se que todos os quatro procedimentos foram realizados com a mesma amostra real.

A partir dos resultados obtidos (figura 12) é possível observar claramente que a solução digestora composta pela mistura de 1 mL de HCl 0,1 % e 2 mL de metanol (C) foi a mais eficiente na extração dos analitos de interesse (BE e COC) da matriz CB, tendo em vista que as áreas de ambos se apresentaram significativamente maiores quando comparadas com as demais (A, B e D).

Figura 12 – Gráfico comparativo das áreas ajustadas da COC e BE para as quatro soluções digestoras utilizadas. A- HCl 0,1 M aquoso; B- metanol; C- mistura de HCl 0,1 M aquoso e metanol na proporção (1:2); D- HCl 0,1 M em metanol.



Fonte: Autora

Com relação à solução aquosa ácida, essa é mencionada também pelo guia (UNODC, 2014) e utilizada por diversos autores. Outras soluções aquosas, como tampões também são utilizadas. Esse fato se deve ao papel da água como solvente prótico, que permite o intumescimento do CB e consequentemente a liberação dos analitos incorporados a ele na solução (UNODC, 2014). Porém, como é possível observar na figura 12, esta solução digestora não se mostrou a mais eficiente na digestão do CB. Este resultado pode ser explicado pela dificuldade que a matriz apresentou em se dispersar pela solução, fato observado a olho nu. Para contornar esta situação foi necessária agitação vigorosa, o que fez com que uma parte da amostra aderisse as paredes do tubo de vidro, não mantendo contato com a solução digestora durante todo processo.

A respeito do uso solvente orgânico metanol para digestão de CB, esse é difundido por diversos autores no decorrer das últimas décadas (PICHINI et al., 1999; TOLEDO, 2003; FERNÁNDEZ et al., 2003). O metanol é considerado um solvente apropriado para extração de analitos do CB, pois, devido às suas características hidrofílicas, penetra na matriz e causa turgência, como comentado anteriormente, permitindo assim a

liberação dos compostos incorporados. Nesse sentido, considera-se esse solvente ideal para extração de compostos neutros, hidrofílicos e moderadamente lipofílicos. No entanto, essa propriedade pode se tornar uma de suas principais desvantagens, pois acaba extraindo muitos interferentes (UNODC, 2014). Por outro lado, esse fato não influenciou na decisão de não ter sido selecionado como solução digestora, e sim o motivo de apresentar as menores áreas para BE e COC dentre as quatro soluções avaliadas.

No que se refere à utilização de uma mistura de solução ácida com metanol, a qual apresentou melhor resultado no presente estudo, essa é sugerida por alguns autores, como Nakahara, Takahashi e Kikura (1995), que além da mistura de metanol com HCl (2:1), utilizaram a de solvente orgânico com o ácido trifluoroacético (9:1). Esta última foi empregada também por Frison et al. (2016) na mesma proporção, o que sugere que o pH da solução é um fator importante nesta etapa. Esta afirmação é reforçada considerando o resultado obtido na figura 12 B, já mencionado, o qual demonstra que a solução digestora composta apenas por metanol, a única que não contém ácido, foi a que apresentou as menores áreas para ambos analitos, sugerindo menor potencial para liberação dos mesmos do CB.

Barroso et al. (2008), em seu artigo, fez a otimização do processo de digestão com três das soluções digestoras utilizadas: HCl 0,1 M, metanol e metanol acrescido de HCl 0,1 M. E, assim como no presente estudo, constatou que a melhor solução foi a composta por metanol acrescido de HCl 0,1 M.

Destaca-se, que o referido autor analisou somente COC no CB, ou seja, somente um analito, além de empregar uma amostra branca, que passou por um processo de incorporação da droga na matriz (do inglês *soaked hair*). Por outro lado, o presente estudo utilizou uma amostra real, o que por consequência permitiu a avaliação do comportamento das soluções digestoras frente ao produto de biotransformação BE. Além da vantagem de ser uma amostra que retrata a realidade, este diferencial é bastante importante se forem consideradas as diferentes características químicas das duas moléculas. A BE é anfótera e a COC básica (SHIMOMURA; HODGE; PAUL, 2001 apud CARVALHO; 2011). Logo, avaliar concomitantemente o comportamento destes analitos diante da solução digestora, é sem dúvida importante.

Outra diferença relevante do presente estudo com relação ao do autor supracitado é a inserção de uma quarta solução digestora, a solução

metanólica de HCl 0,1 M. Esta possibilidade é citada pelas diretrizes para análise de drogas de controle internacional em cabelo, suor e saliva (UNODC, 2014), sendo utilizada por alguns autores como Han et al. (2005) e Lee et al. (2011).

Como resultado dessas observações, selecionou-se como solução digestora para este estudo, a solução composta por metanol e solução aquosa de HCl 0,1 M na proporção 2:1.

Extração

A extração dos compostos BE e COC da solução digestora, também é chamada de procedimento de limpeza, do inglês *clean up*, momento onde são separados os compostos de interesse de outros interferentes da amostra (JARDIM, 2010).

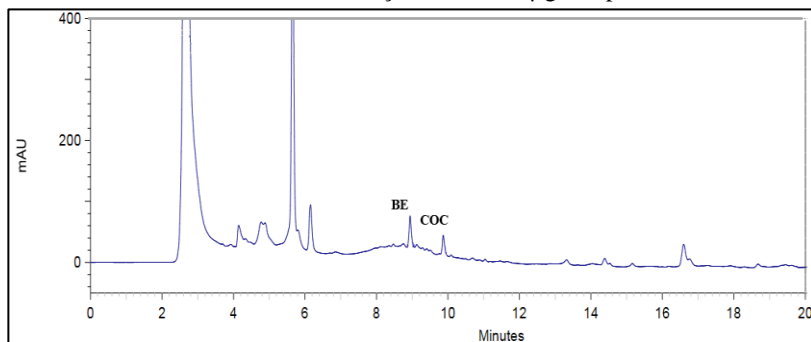
Neste trabalho utilizou-se a EFS, que foi otimizada para obter uma melhor eficiência na limpeza dos interferentes, associada a uma menor perda dos analitos de interesse. Para isso quatro possibilidades foram avaliadas, sendo aquela escolhida a esquematizada abaixo (figura 13) e representada em seguida no cromatograma (figura 14):

Figura 13 - Esquema com as quatro etapas da EFS desenvolvida.



Fonte: Autora.

Figura 14 - Cromatograma pós EFS utilizando pH 6 e hidróxido de amônia 5 % em metanol como eluente. Concentração utilizada 1 µg/mL para ambos analitos.



Fonte: Autora.

A EFS utiliza as características químicas das moléculas para separá-las dos interferentes presentes na amostra ao proporcionar a interação destas com uma FE a qual possuem afinidade (JARDIM, 2010). Conforme abordado anteriormente, os analitos de interesse, a BE e a COC, são moléculas anfótera e básica, respectivamente. Nesse sentido, selecionou-se uma FE mista para EFS composta por uma porção de troca iônica e uma apolar (C8). Esse tipo de fase estacionária é bastante utilizada para extração de moléculas básicas em amostras complexas (GHEORGHE et al., 2007), além de possibilitar a retenção de compostos ionizados e não ionizados. Com isso é possível separar os analitos de interesse de interferentes que tenham características químicas diferentes, como compostos ácidos (BELL et al., 2017).

O processo da EFS é composto por quatro etapas. A etapa inicial, de condicionamento e equilíbrio da FE tem por objetivo ativar os grupamentos da mesma, para que seja possível a interação com os analitos, assim como eliminar qualquer resíduo proveniente do processo de produção. Esta etapa é feita geralmente com um solvente orgânico e um aquoso. Um dos solventes orgânicos amplamente utilizados é o metanol. Quanto ao aquoso, esse pode variar, podendo ser água ou uma solução tampão, que deve apresentar o mesmo pH que a solução na qual a amostra foi preparada (WATSON; RAYNIE, 2014). O presente estudo optou pela solução tampão e avaliou dois pHs diferentes, 3 e 6, os quais não apresentaram diferença no resultado final quando analisado o

cromatograma, sendo escolhido o pH 6, por ser este o recomendado pelo fabricante para moléculas fracamente básicas como a COC.

A segunda etapa é a de aplicação da amostra. Neste momento, um dos cuidados que se tem é com o pH da solução que se encontra essa amostra. Esse cuidado deve-se a dois motivos. O primeiro é o fato de que, por usar uma FE de troca iônica, os analitos de interesse devem estar na sua forma ionizada, no caso deste estudo, pH ácido. O segundo motivo, é que o pH da solução em que a amostra se encontra deve ser igual ao pH da solução utilizada na etapa anterior, para condicionar a FE. A justificativa para isto está no fato de que caso as soluções apresentem pHs diferentes, isso resultará na porção inicial da amostra experimentando um ambiente de extração diferente do que experimentará a porção final dessa mesma amostra. Isto pode afetar as características de retenção, causando inclusive resultados irreproduzíveis e uma recuperação de analitos prejudicada (WATSON; RAYNIE, 2014). Considerando o exposto, variou-se também o pH das soluções em que as amostras se encontravam em 3 e 6, e conforme citado anteriormente não houve diferença no resultado quando observado o cromatograma, sendo selecionado o pH 6.

A etapa seguinte refere-se a lavagem dos interferentes do cartucho. Nesta etapa, de modo geral é recomendado que se utilize o mesmo solvente em que a amostra está diluída ou solventes que sejam mais fortes que aquele utilizado na solubilização da amostra, porém não fortes o suficiente para que propiciem a eluição dos analitos de interesse do cartucho junto com os interferentes (JARDIM, 2010; WATSON; RAYNIE, 2014). Neste estudo foi utilizada solução tampão pH 6 e 3, mesmos pHs avaliados para solubilização da amostra e condicionamento do cartucho, solução de HCl 0,1 M e metanol. A solução ácida foi acrescentada considerando a FE seletiva para troca catiônica, e tem a função de lavar os interferentes ácidos, tornando-os neutros e assim os fazendo “desgrudar” dos sítios de retenção da FE (SIGMA ALDRICH, 2004; CHAMBERS et al., 2007). Acrescenta-se que conforme as etapas anteriores, a alteração de pH de 6 para 3 não gerou alteração no resultado, mantendo-se, portanto, o pH 6 como escolha.

Por fim, a eluição, quarta etapa da EFS, tem por objetivo retirar os analitos de interesse que estão retidos na FE. O solvente utilizado nesta fase, conhecido também como eluente, deve ser capaz de desfazer todas as interações entre o analito e a FE. No entanto, é necessário haver um cuidado para que este não seja muito forte a ponto de remover contaminantes que possam estar fortemente ligados a FE, como no caso do presente estudo, as bases fortes (WATSON; RAYNIE, 2014). Nesta

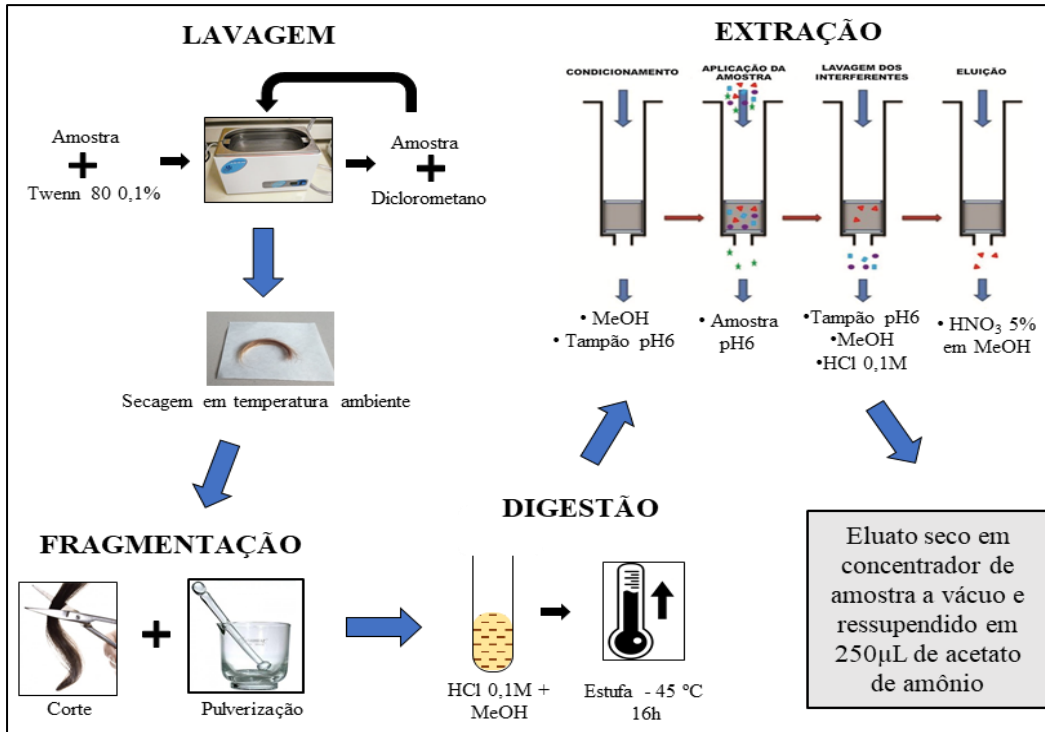
etapa é possível avaliar diferentes tipos de solvente para otimizar o processo visando uma melhor recuperação do analito. Não houve extração dos analitos quando utilizado como eluente a composição clorofórmio:isopropanol:amônio (78:20:2). Algo semelhante ocorreu com o hidróxido de amônio 5% em ACN. Com esta solução foi possível observar uma melhora considerável na extração da COC, quando comparada a área com a extração com hidróxido de amônio 5% em metanol, no entanto, a mesma não foi eficiente na extração da BE. O eluente que se mostrou mais adequado para a extração dos analitos de interesse foi hidróxido de amônio 5% em metanol (Figura 14).

Quanto ao solvente extrator, quando usado uma FE mista, a literatura é basicamente dividida entre os eluentes hidróxido de amônio 5% em metanol (WOOD et al., 2005; BAKER; KASPRZYK-HORDERN, 2011; FERNÁNDEZ et al., 2014; CHEN et al., 2017) e a mistura clorofórmio:isopropanol:amônio (78:20:2) (GIROD; STAUB, 2000; MOORE; COULTER; CROMPTON, 2007; GHEORGHE et al., 2007). Apesar de haver relatos na literatura do uso desta última mistura citada, não foi possível reproduzir seus resultados. Por outro lado, o eluente hidróxido de amônio 5 % em metanol mostrou-se bastante apropriado, possibilitando a continuidade dos trabalhos. Destaca-se ainda que as datas de publicação dos artigos avaliados que utilizaram este eluente são relativamente mais recentes.

Convém mencionar que em todo o processo de desenvolvimento da EFS foi empregado o procedimento de digestão ácida com 0,1 M de HCl e amostras fortificadas na concentração de 1 µg/mL, tanto para COC como para a BE.

A fim de ilustrar a etapa pré-analítica desenvolvida, apresenta-se a figura 15, onde pode-se observar todos os procedimentos realizados nessa etapa de forma resumida e esquematizada.

Figura 15: Esquema da etapa pré-analítica desenvolvida.



Fonte: Autora.

4.1.2. Etapa analítica

Avaliação quanto ao tipo de solvente orgânico da FM

Os dois tipos de solventes avaliados foram metanol e ACN, ambos com tampão fosfato 0,02 M pH 6, nas proporções de 80:20 e 70:30, respectivamente. A ACN mostrou ser o solvente mais seletivo para os compostos, apresentando o melhor formato para ambos os picos, sendo o solvente de escolha deste trabalho.

Na fase inicial desta etapa do desenvolvimento foi utilizado somente metanol como solvente orgânico na FM (FERNÁNDEZ et al., 2014), escolha fundamentada no artigo que serviu de base para o presente estudo. No entanto, os resultados obtidos não foram satisfatórios. Além disso, a referência citada não relatava o desenvolvimento deste parâmetro.

A partir destes resultados, buscou-se na literatura alternativas com relação ao tipo de solvente para os analitos de interesse, sendo constatado que é bastante diversificada. Dentre elas, Clauwaert et al. (2000), Mercolini et al. (2008) e Schaffer et al. (2016) utilizam ACN na composição de suas FMs. Acrescenta-se que o comprimento de onda em que ela absorve (190 nm) é menor que o do metanol (205 nm), sendo dessa forma mais distante do comprimento de onda usado no presente estudo (240 nm), o que pode auxiliar na redução do ruído da linha de base (ADVANCED CHROMATOGRAPHY SOLUTIONS, 2013; SCHUG; TAYLOR, 2017).

Quanto à proporção do solvente orgânico na FM

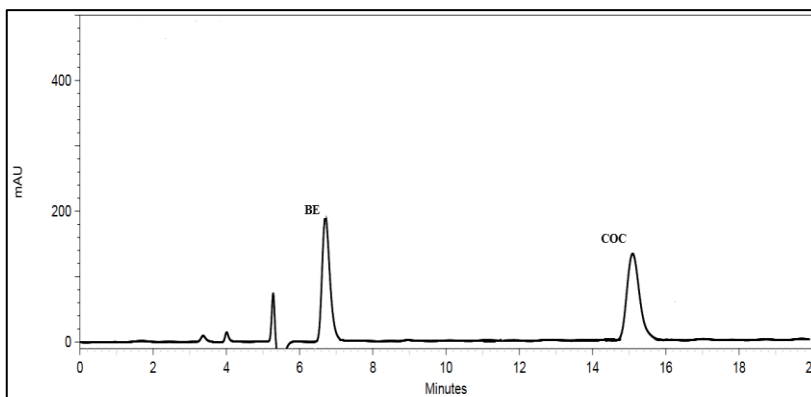
Diante do resultado obtido na avaliação do tipo de solvente, partiu-se para a avaliação da sua proporção na composição da FM. Iniciou-se utilizando 70 % de ACN chegando a um resultado de 13 %. Assim, considerando o modo de eluição isocrático, os melhores resultados para os TRs da BE e COC foram obtidos com a proporção de 13:87.

Inicialmente as proporções avaliadas variaram de 70 a 80 %, tendo como estratégia analítica a alteração de duas unidades por vez, chegando-se na proporção considerada ideal de 72 %. No entanto, nestas condições, a BE apresentou um TR muito baixo, o que poderia sugerir pouca interação com a FE e podendo afetar posteriormente a separação com os interferentes da matriz biológica. Dessa forma, optou-se por alterar novamente a proporção da FM, aumentando a proporção da fase aquosa. Este procedimento faz com que as moléculas analisadas reduzam sua

afinidade pela FM, o que às possibilita uma maior interação com a FE (coluna) (SKOOG et al., 2006).

Para tal, as proporções de 10 a 60 %, as quais não tinham sido avaliadas anteriormente, foram analisadas, e como é possível observar (figura 16) com uma proporção maior da fase aquosa, foi realmente possível retardar a eluição da BE. No entanto, o TR da COC ficou muito distante da BE, e o formato de seu pico alargado.

Figura 16 - Cromatograma com modo de eluição isocrático com aumento da porção aquosa apresentando uma significativa separação dos picos.



Fonte: Autora.

Diante do resultado obtido, algumas possibilidades foram levantadas para dar encaminhamento no desenvolvimento do método pretendido. A partir da constatação de que uma parte maior da porção aquosa da FM causou uma piora no formato do pico da COC, uma das alternativas ponderada para contornar este problema foi mudar o pH da FM. A COC é uma molécula com características básicas (pK_a 8,6), o que demanda um pH elevado, aproximadamente 2 pontos acima do seu pK_a , para que a molécula esteja 100% na sua forma não ionizada. No entanto, a FE utilizada não suporta pHs superiores a 8, conforme manual do fabricante. Nestas situações, a literatura traz como alternativa a acidificação da FM de forma a converter 100% da molécula a sua forma ionizada (BERG et al., 2009).

Segundo Santos Neto (2009), outros fatores que poderiam causar o alargamento do pico é a falta de força cromatográfica na FM, assim como a força cromatográfica do solvente em que a amostra é diluída. Em experimentos anteriores, conforme observações de cromatogramas

obtidos com proporções mais elevadas de solvente orgânico na FM, não foi constatado problemas no formato do pico da COC. Considerando que na cromatografia em fase reversa, utilizada neste estudo, o aumento da força cromatográfica se dá com a redução da polaridade (SKOOG et al., 2006), foi possível inferir que para melhora do formato do pico da COC seria necessária proporção maior de solvente orgânico, condição diferente da necessária para a BE.

Ainda a esse respeito, outra alteração feita foi a troca do solvente no qual a amostra era ressuspendida, passando a ser composto somente pela fase aquosa da FM, ao invés de ser a própria FM, como até então era feito.

Quanto ao modo de eluição da FM

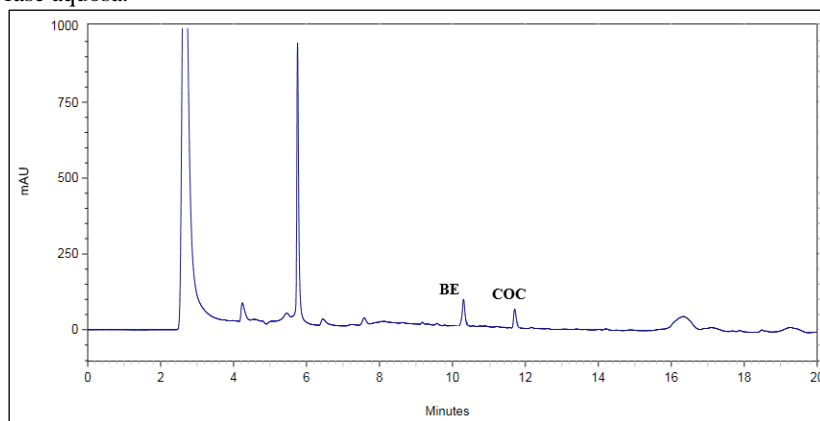
Neste momento do desenvolvimento foi analisado o modo de eluição, isocrático e gradiente. O método utilizado por Fernández et al. (2003) empregou o modo de eluição isocrático, sendo esse o ponto de partida do presente estudo. Após a análise de amostras de CB adicionadas com os padrões dos analitos, assim como a avaliação dos resultados do desenvolvimento quanto à proporção do solvente orgânico, percebeu-se a necessidade de analisar o modo de eluição em gradiente, o qual, por fim tornou-se a melhor opção para o presente estudo.

O modo isocrático mostrou-se inadequado para a avaliação dos analitos de interesse. Isso se explica pelo fato dos analitos deste estudo apresentarem características químicas diferenciadas. A COC é menos polar do que a BE (RUPPENTHAL, 2013) e como consequência precisa de uma proporção maior de solvente orgânico. Por outro lado, quando a proporção do solvente orgânico é ideal para eluição da COC, observou-se um cromatograma onde a BE apresenta um TR muito baixo, demonstrando que há pouca interação com a FE.

Diante desta heterogeneidade de comportamento, ponderou-se que o modo de eluição gradiente poderia proporcionar uma condição ideal para as necessidades de ambos analitos. A proposta foi de iniciar o gradiente com a proporção de solvente orgânico ótima para eluição da BE, para que esta pudesse apresentar um TR maior, distante dos interferentes do CB, chegando até a proporção ideal para eluição da COC.

Avaliou-se diversas proporções iniciais para o gradiente, alcançando uma proporção ótima de 13 % de ACN, sendo este feito até 90 % da mesma, em 15 min. Conforme é possível observar na figura 17, tanto o pico da BE quanto o pico da COC apresentaram um bom aspecto.

Figura 17 - Cromatograma representativo do modo de eluição gradiente otimizado. Experimento realizado com amostra adicionada 1 $\mu\text{g/mL}$ em modo de eluição gradiente (13:87 – 90:10 em 15 min), com ácido fórmico 0,01 % como fase aquosa.



Fonte: Autora.

A fim de diminuir o tempo de análise, o gradiente final otimizado foi de 13:87 a 80:20 em 13 min, sendo esse o gradiente final submetido ao processo de validação.

Quanto ao tipo de solução aquosa da FM

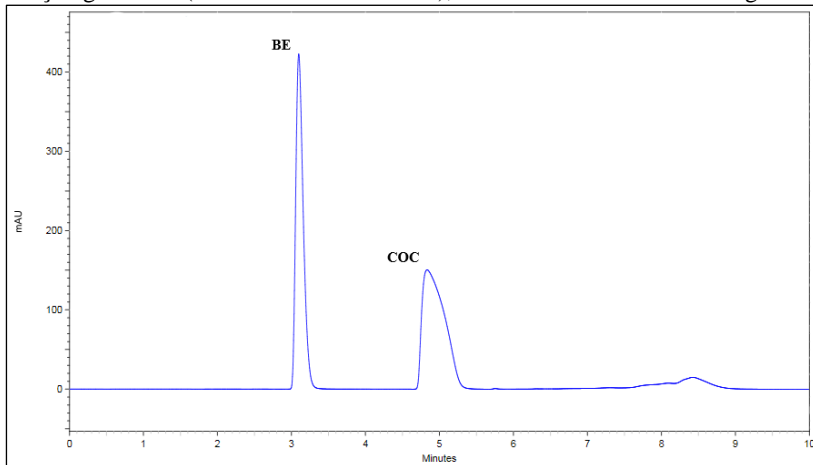
Como candidatos a porção aquosa da FM foram avaliados os tampões fosfato de potássio 0,02 M e acetato de amônio 0,01 M, assim como as soluções ácidas de ácido fórmico a 0,01 % e ácido acético 0,1 %. Dentre estes, o que apresentou melhores resultados foi o tampão composto por acetato de amônio 0,01 M.

Iniciou-se os experimentos com o tampão fosfato de potássio 0,02 M pH 6 (adaptado de FERNÁNDEZ et al., 2003). Este tampão exibiu bons resultados de início, porém não fornecia reprodutibilidade quanto ao formato e área dos picos.

Considerando as observações feitas a respeito do formato do pico, as quais sugeriam a redução do pH, seguiram-se as análises com a solução de ácido acético 0,1 % e ácido fórmico 0,01 %. Tais soluções, amplamente utilizadas em cromatografia líquida, apresentam pH médio de 3,5.

Os resultados obtidos com ácido acético não foram satisfatórios. Conforme é possível observar na figura 18, o pico da COC não apresentou um formato adequado.

Figura 18 - Cromatograma utilizando como porção aquosa da FM o ácido acético 0,01 %. Experimento realizado com solução padrão de 5 µg/mL em modo de eluição gradiente (27:73 – 70:30 em 6 min), com ACN como solvente orgânico.

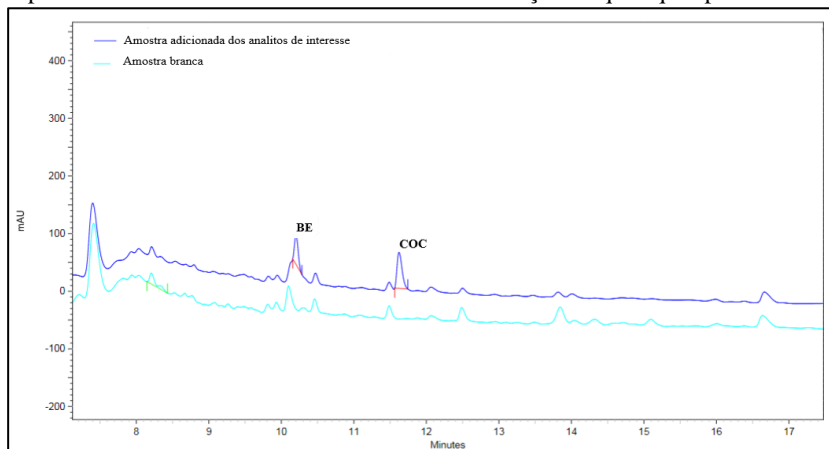


Fonte: Autora.

Por outro lado, a solução de ácido fórmico a 0,01 % mostrou-se muito promissora. Na sequência dos experimentos foi realizada análises com introdução da amostra de CB adicionadas com padrões dos analitos de interesse (figura 17).

No entanto, ao avaliar amostras brancas juntamente com amostras de CB adicionadas dos analitos de interesse, percebeu-se em algumas amostras brancas que havia dois interferentes que possuíam TRs muito próximos aos da BE e da COC (figura 19). Apesar de apresentarem pequenas áreas, estes dificultariam o processo de validação e aplicação do método.

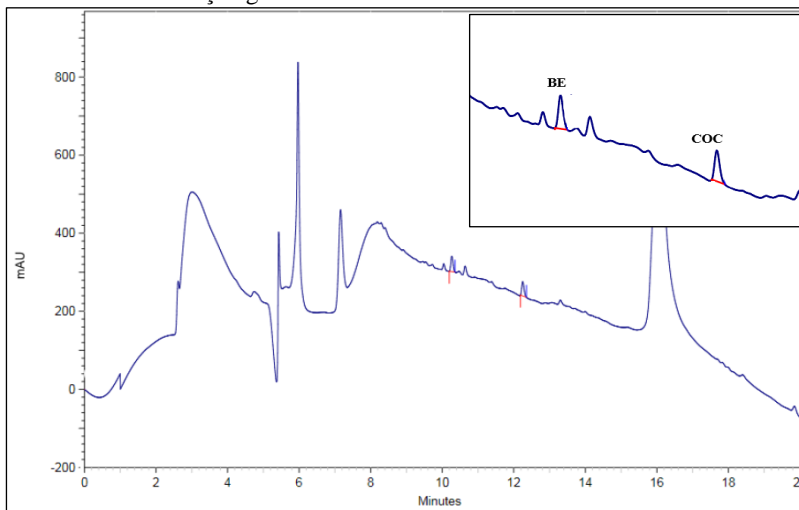
Figura 19 - Cromatograma representativo de interferência na amostra de CB prejudicial às análises. Ácido acético 0,01 % utilizado como porção aquosa da FM. Tracejado superior em azul escuro representa a análise de uma amostra de CB adicionada dos padrões de COC e BE. Tracejado abaixo em azul claro representa a análise de uma amostra de CB sem adição de quaisquer padrões.



Fonte: Autora.

Visando resolver este impasse, avaliou-se o tampão acetato de amônio 0,01 M pH 3,5 (CLAUWAERT et al., 2000). Conforme é possível observar na figura 20, com a utilização deste tampão na FM foi possível realizar a separação cromatográfica dos interferentes e dos analitos de interesse.

Figura 20 - Cromatograma com acetato de amônio como porção aquosa da FM e ACN. Modo de eluição gradiente 13:87 a 80:20 em 13 min.



Fonte: Autora.

Quanto ao fluxo da FM

A avaliação quanto ao fluxo para eluição da FM foi feita visando uma economia de solventes, assim como um tempo ótimo para a análise de cada amostra. O fluxo que apresentou o melhor custo benefício para os objetivos da avaliação deste parâmetro foi o de 0,6 mL/min, sendo esse escolhido para o método a ser submetido ao processo de validação.

O fluxo inicial utilizado foi aquele proposto por Fernández et al. (2003), 0,4 mL/min. Logo percebeu-se que ele deveria ser aumentado, pois a coluna que o presente estudo utilizou era o dobro do tamanho do estudo do referido autor. Partiu-se então para um fluxo de 0,8 mL/min e na sequência para 1 mL/min, pretendendo avaliar a possibilidade de redução no tempo da corrida. Por último, optou-se pela diminuição para 0,6 mL/min a fim de averiguar se o aumento causado no tempo da corrida seria menos significativo comparado a redução de consumo de solvente nos períodos de estabilização do equipamento.

4.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Após um extenso processo de desenvolvimento do método, incluindo as etapas pré-analíticas e analíticas, o seguinte método (quadro 2) foi proposto para o processo de validação analítica, com o propósito de

averiguar sua precisão, exatidão, recuperação, linearidade, sensibilidade e especificidade:

Quadro 2 - Parâmetros do método proposto.

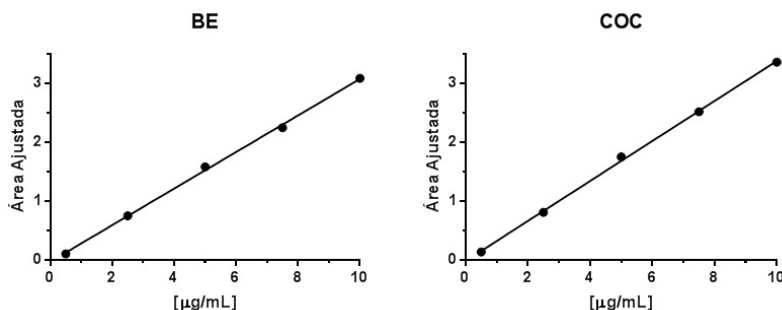
Parâmetros pré-analíticos	
Lavagem da amostra	Tween 80 0,1 % e diclorometano em banho de ultrassom seguido de enxague com água do tipo 1
Fragmentação da amostra	Tesoura + pulverização com gral e pistilo de vidro
Digestão da amostra	2 mL de Metanol + 1mL de HCl 0,1 M a 45° C <i>overnight</i>
SPE	Condicionamento: Metanol + tampão fosfato pH 6 Adição da amostra: amostra em pH 6 Lavagem: tampão fosfato pH 6 + HCl 0,1M + metanol Eluição: hidróxido de amônio 5 % em metanol
Ressuspensão da amostra	250 µL de acetato de amônio 0,01 M
Parâmetros analíticos	
FE utilizada	C ₁₈ 250 mm, 4,6 mm com partículas de 5 µm de diâmetro
FM utilizada	Acetato de amônio 0,01 M pH 3,5 com ACN
Modo de eluição	Gradiente: 13:87 a 80:20 (ACN:acetato de amônio) em 13 min.
Fluxo de eluição	0,6 mL/min
Comprimento de onda de detecção	240 nm
Volume de injeção	25 µL

Fonte: Autora.

4.2.1. Linearidade

As curvas de calibração ilustradas na figura 21 foram obtidas com as médias das áreas ajustadas das seis replicatas para cada uma das cinco concentrações (0,5; 2,5; 5; 7,5 e 10 µg/mL). O r para o analito BE foi de 0,9993 e para a COC 0,9995 (quadro 3). Assim, conclui-se que o método é linear dentro da faixa de concentração analisada por atender aos critérios da UNODC (2009), que exige um r superior a 0,99.

Figura 21 - Curvas de calibração da BE e da COC, obtidas a partir das médias das áreas ajustadas de seis dias distintos.



Fonte: Autora.

Quadro 3 – Resultados obtidos com a análise da regressão linear: equação da reta e coeficiente de correlação.

	BE	COC
Equação da reta	$y = 0,3095x - 0,02397$	$y = 0,3387x - 0,01254$
r	0,9993	0,9995

Fonte: Autora.

A faixa de concentração escolhida para o presente estudo é muito semelhante à utilizada por Fernández et al. (2003), 0,1 a 10 µg/mL, o qual utilizou como equipamento para análise também um Cromatógrafo Líquido acoplado ao DAD. Trabalhos que utilizam outros tipos de detectores considerados mais sensíveis, como o espectrofluorométrico, adotaram faixas de trabalho com concentrações mais baixas. Mercolini et al. (2008), que analisou apenas COC, utilizou uma faixa de trabalho que variou de 0,003 a 1 µg/mL. Muito semelhante a essa, cita-se Clauwaert et

al. (2000), que utilizou a faixa de 0,002 a 1 $\mu\text{g/mL}$, para ambos analitos, BE e COC. É possível trabalhar com concentrações ainda menores, como no estudo de Pego et al. (2017), que utilizou CG acoplado ao detector Espectrômetro de Massas (EM) e utilizou uma faixa de concentração de 0,0025 a 1 $\mu\text{g/mL}$ para COC e 0,00025 a 0,5 $\mu\text{g/mL}$ para BE.

No entanto, esclarece-se que a faixa de trabalho selecionada no presente estudo, apesar de ser mais elevada, devido às limitações instrumentais e metodológicas, não foram um fator limitante no método, isso pois esta atende as concentrações normalmente observadas nas amostras reais.

4.2.2. Limite de detecção e quantificação

Para a avaliação da sensibilidade do método, calculou-se os LD e LQ (quadro 4) a partir dos dados obtidos com as análises do parâmetro linearidade.

Quadro 4 – LD e LQ obtidos para o método proposto.

Unidades	LD		LQ	
	BE	COC	BE	COC
$\mu\text{g/mL}$	0,11	0,11	0,38	0,36
ng/mg de CB	0,28	0,27	0,95	0,91

Fonte: Autora.

Para a toxicologia, a análise de agentes tóxicos no CB quando utilizado somente o fio (haste), retrata uma exposição crônica, tendo em vista o tempo que o cabelo demora para se desenvolver, do bulbo, local onde o agente é incorporado, até o couro cabeludo (HARRISON; FU, 2014). Considerando que a análise é feita para observação de uma exposição crônica, cabe esclarecer que a concentração esperada desses analitos é baixa. Nesse sentido, a SoHT (COOPER; KRONSTRAND; KINTZ, 2012) sugere como LD valores de 0,5 ng/mg de CB para COC e de 0,05 ng/mg de CB para BE, assim como o uso de metodologias para detecção com boa sensibilidade, como cromatografia líquida e gasosa, ambas com EM.

Conforme é possível observar foram obtidos valores de LD superiores aos mencionados pela SoHT (COOPER; KRONSTRAND; KINTZ, 2012) para a BE. Acredita-se que isso deve-se ao tipo de detector

utilizado neste estudo, DAD. Sabe-se que a sensibilidade desse detector é menor quando comparada com o EM (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1997), o que faz obter LD superiores. No entanto, cabe ressaltar que, apesar destes valores não serem tão baixos quanto sugerido pela SoHT (COOPER; KRONSTRAND; KINTZ, 2012), não inviabilizam a aplicação do método. Esta ressalva é feita inclusive para própria referência supracitada, a qual descreve que os valores de LD e LQ devem ser adequados para fornecer uma resposta para o caso a ser investigado. Assim, dependendo da finalidade da análise toxicológica não se faz estritamente necessário LD e LQ extremamente baixos.

4.2.3. Especificidade/seletividade

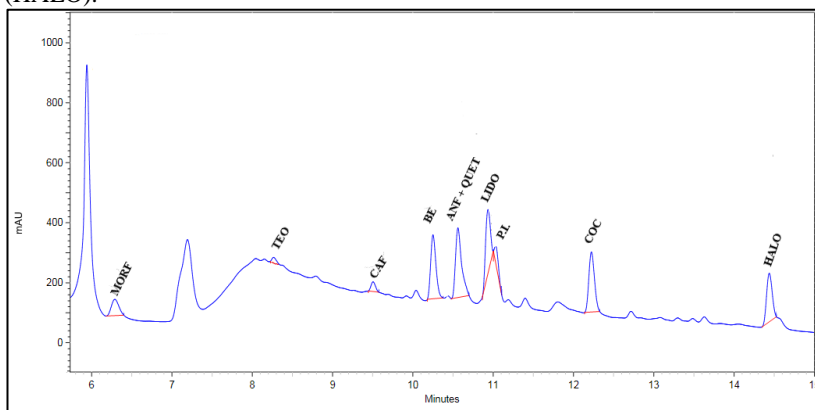
Para este parâmetro, 10 CBs de fontes distintas, isentos dos analitos de interesse, foram avaliados. Desses, 3 eram pintados com tinta preta. Nas 7 amostras que não possuíam tintura, os cromatogramas se mostraram muito semelhantes e não apresentaram picos nos TRs dos analitos de interesse (BE e COC). Já as 3 amostras pintadas apresentaram alteração no cromatograma, tendo muitos picos a mais, inclusive nos TRs dos analitos de interesse.

Alguns trabalhos trazem como observação a questão dos tratamentos químicos no CB. Esses produtos utilizados podem causar interferência na análise, assim como alterar a concentração do analito no CB. Em particular, os produtos usados para relaxamento e coloração (tintas) são compostos considerados bases fortes, com características semelhantes à COC. Essa característica química faz com que sejam extraídos juntamente com os analitos de interesse, dificultando bastante a separação (CIRIMELE, KINTZ, MANGIN; 1995 apud KINTZ, 2004).

Entretanto, há um fator importante a ser considerado que é a fácil identificação durante o processo de preparo das amostras que são pintadas. Já no momento da digestão, mais precisamente no final dela, foi possível perceber que as soluções digestoras das amostras pintadas estavam acastanhadas. Na sequência, no procedimento de extração após a aplicação das amostras, os cartuchos retiveram a coloração acastanhada, mantendo-a retida durante a etapa de lavagem, somente “soltando-as” na etapa de eluição, o que confirma serem moléculas básicas. Apesar desta constatação, destaca-se que o método não fica inviabilizado. Todavia, ressalta-se que se faz necessária a incorporação de um procedimento no preparo da amostra que retire esses interferentes.

Outra avaliação feita ainda para esse parâmetro foi a verificação da interferência no TR dos analitos de interesse de outros compostos. No total, 15 compostos foram avaliados. No cromatograma foi possível observar apenas 6 picos, além dos referentes aos analitos e ao PI do estudo. Os compostos que apresentaram picos foram: morfina, teofilina, cafeína, anfepramona e quetamina, lidocaína e haloperidol, conforme observado na figura 22.

Figura 22 - Cromatograma representativo do parâmetro especificidade/seletividade. Amostra de CB adicionada de 15 compostos, além dos analitos de interesse BE e COC e do PI. São possíveis de serem visualizados no cromatograma: morfina (MORF); teofilina (TEO); cafeína (CAF); anfepramona (ANF); quetamina (QUET); lidocaína (LIDO); e haloperidol (HALO).



Fonte: Autora.

Dentre os compostos avaliados, dois são moléculas ácidas, o propofol e o GHB. Neste sentido, considerando a seletividade da fase estacionária utilizada no processo de extração, assim como o procedimento como um todo (lavagem dos interferentes ácidos), é possível propor que estas duas moléculas não foram extraídas juntamente com os outros compostos com características básicas.

Outros compostos utilizados neste parâmetro que não foram observados no cromatograma (figura 21) foram: tramadol, nicotina, prometazina e metadona. Esses quatro compostos em particular absorvem em comprimentos de onda diferentes do utilizado (240 nm), sendo eles 220 nm (PHENOMENEX, 2017), 260 nm (CAMILLO, 2014), 250 nm (TANAKA et al., 2007) e 205 nm (RANJBARI; GOLBABANEZHAD-

AZIZI; HADJMOHAMMADI, 2012), respectivamente. A prometazina, por absorver em um comprimento de onda mais próximo do utilizado, é possível de ser visualizada, porém com áreas menores. Assim, considerando o exposto e que o seu TR (14,6 min) é muito próximo do TR do haloperidol (14,4 min), pode-se supor que o sinal logo no final do pico do haloperidol seja a prometazina.

Com relação aos dois benzodiazepínicos avaliados, midazolam e diazepam, sabe-se que o comprimento de onda de absorção é de 230 nm. Apesar de ser possível observá-los em comprimentos maiores, estes devido às suas estruturas moleculares, interagem por mais tempo com a coluna, apresentando TRs maiores (LIMA, 2009), o que pode ter sido o motivo de não terem sido observados nesta análise.

Destaca-se que o composto lidocaína apresentou uma coeluição parcial com o PI utilizado, a articaína. Acredita-se que este fato se deva à semelhança estrutural dos dois compostos. Tal coeluição não impede a análise dos analitos de interesse de forma geral, somente o uso do PI na análise específica. Isto é possível, pois sabe-se que o PI na análise é uma forma de auxílio ao analista na redução de erros principalmente no momento da aplicação da amostra, no entanto não é um elemento obrigatório na análise (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1997).

4.2.4. Precisão

A precisão do método foi feita através do cálculo do CV das nove replicatas para cada uma das três concentrações analisadas (1,5; 3 e 6 $\mu\text{g/mL}$), precisão interdia, assim como para as três replicatas de cada um dos três dias, precisão intradia. De acordo com a UNODC (2009), os CVs obtidos devem ser inferiores a 20 % para a concentração mais baixa a ser analisada e inferior a 15 % para as demais.

Ressalta-se que a precisão intradia, não é descrita pela UNODC (2009), e foi avaliada como uma forma de complementar os resultados, buscando a melhor avaliação possível para esse parâmetro, precisão.

Conforme é possível observar nos quadros 5 e 6, os valores de CVs obtidos estão dentro dos estabelecidos pela referência acima citada. Dessa forma, o método pode ser considerado preciso.

Quadro 5 - Resultados obtidos para o parâmetro da precisão para BE, total de 9 replicatas.

Concentração nominal (µg/mL)	Concentrações obtidas												CV (%)
	Dia 1			CV(%)	Dia 2			CV(%)	Dia 3			CV(%)	
1,5	1,20	1,36	1,25	6,24	1,80	1,59	1,80	7,02	1,35	1,22	1,17	7,38	17,76
6	5,28	4,79	5,35	5,92	5,83	6,43	6,37	5,29	6,17	5,52	5,17	9,02	10,17
9	8,35	7,39	8,59	7,78	8,59	8,27	8,84	3,34	9,32	9,25	9,26	0,38	7,13

Fonte: Autora.

Quadro 6 – Resultados obtidos para o parâmetro da precisão para COC total de 9 replicatas.

Concentração nominal (µg/mL)	Concentrações obtidas												CV (%)
	Dia 1			CV(%)	Dia 2			CV(%)	Dia 3			CV(%)	
1,5	1,23	1,26	1,17	3,65	1,50	1,47	1,62	5,18	1,38	1,62	1,58	8,56	12,18
6	5,71	5,45	5,91	4,03	6,02	6,39	6,39	3,36	5,65	6,50	6,00	7,07	6,08
9	9,03	7,99	9,05	7,00	8,84	8,77	9,03	1,52	8,88	9,19	8,79	2,37	3,96

Fonte: Autora.

Cabe destacar que os resultados alcançados foram bons considerando fatores como o processo de digestão utilizado, constituído apenas de solventes (HCl e metanol). Tal processo apresenta um custo bastante inferior quando comparado aos reagentes utilizados na digestão enzimática, que possibilita uma digestão completa da matriz. Embora esta última permita a obtenção de valores de CV ainda inferiores (Fernández et al., 2003), a alternativa apresentada está em conformidade com os critérios aceitos pelos guias norteadores e é bastante viável para laboratórios com recursos restritos ou de pequeno porte, entre outras aplicações.

4.2.5. Exatidão

A exatidão do método proposto foi avaliada através das análises da precisão realizando um cálculo em forma de porcentagem. Conforme é possível observar nos quadros 7 e 8, a exatidão para as três concentrações avaliadas foram satisfatórias e estão consideravelmente acima do especificado pela UNODC (2009), 80 % na menor concentração e 85% nas demais.

Quadro 7 - Valores de exatidão em percentual obtidos para BE.

Concentração nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração média obtida ($\mu\text{g/mL}$)	Exatidão (%)
1,5	1,41	94,00
6	5,66	94,33
9	8,65	96,11

Fonte: Autora.

Quadro 8 – Valores de exatidão em percentual obtidos para COC.

Concentração nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração média obtida ($\mu\text{g/mL}$)	Exatidão (%)
1,5	1,42	94,67
6	6,00	100,00
9	8,84	98,22

Fonte: Autora.

Há trabalhos na literatura que não apresentam os valores de exatidão do método, como é o caso do trabalho de Fernández et al. (2003). Dentre os trabalhos que realizaram este parâmetro no processo de validação, os valores obtidos foram muito próximos ou até mais baixos do que aqueles obtidos pelo presente estudo. Mercolini et al. (2008), que avaliou somente a COC obteve uma média de 90 % (± 5) para a concentração mais baixa avaliada, 90 % (± 2) para a concentração média e 92 % (± 2) para a concentração alta. Pego et al. (2017), obteve para BE uma média de 84,5 % na concentração baixa, 97,2 % na média e 98,2 % na alta. E para a COC, 99,6 % na concentração menor, 94,3 % na média e 97,6 % na alta. Já Clauwaert et al. (2000) avaliou somente duas concentrações, 0,2 e 10 ng/mg de CB, sendo que os valores para a primeira variaram de 98,2 a 99,3 % e para a segunda 99,7 a 101,2 %.

Ainda com relação à exatidão, acrescenta-se que há diferentes formas de ser obtida, sendo a mais recomendada a utilização de amostra de referência certificadas. Estas são "controles" ou padrões usados para verificar a qualidade e rastreabilidade metrológica dos produtos, validar métodos de medição analítica ou para a calibração de instrumentos (ILAC, 2005). No entanto, muitas vezes estas não são disponíveis nos tecidos biológicos desejados ou ainda apresentam dificuldades para aquisição. Neste contexto, cabe destacar que os guias de validação, entre eles o utilizado neste estudo, não colocam o uso de amostras de referência como obrigatório, podendo as análises serem feitas com amostras brancas da matriz biológica de escolha, adicionadas de quantidade conhecida dos padrões dos analitos do estudo.

4.2.6. Recuperação

A recuperação de um analito representa a resposta do detector obtida a partir de uma quantidade do analito adicionado e extraído da matriz, em comparação com a resposta do detector para a concentração do padrão puro, ou seja, não extraído (UNODC, 2009).

Os resultados para este parâmetro (quadro 9) foram obtidos através da comparação das áreas ajustadas dos analitos de interesse adicionados ao CB e extraídos por EFS, com áreas ajustadas dos padrões destes nas mesmas concentrações utilizadas para precisão e exatidão.

Quadro 9 - Percentuais de recuperação.

Concentração nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	
	BE	COC
1,5	78,0	87,4
6	83,7	70,9
9	95,2	82,8

Fonte: Autora.

Na academia há muitas discussões a respeito deste parâmetro. Muitos guias nem o trazem como requisito para o processo de validação (SWGTOX, 2013; ANVISA, 2017). Outra controvérsia é o percentual de aceitação para recuperação. Vários autores e guias trazem como um percentual aceitável valores acima de 85 %. No entanto, muitos trabalhos encontram percentuais mais baixos, porém com boa precisão e exatidão.

A esse respeito, há um consenso no mundo acadêmico (DONNARUMMA, 2014), assim como uma ressalva em alguns guias de validação (UNODC, 2009), que permite a aplicação de métodos que apresentem valores abaixo de 85 % desde que apresentem boa reprodutibilidade e LQs aceitáveis.

Assim, considerando que os percentuais encontrados para recuperação nesse estudo para ambos analitos estão dentro ou muito perto dos limites de percentuais recomendados e ainda, que o método proposto demonstrou boa precisão e exatidão, assim como um bom LQ para ambos analitos, é possível considerar a recuperação deste, aceitável.

4.2.7. Efeito memória

Segundo a SWGTOX (2013), efeito memória é a visualização de sinal do analito não intencional em amostras subsequentes a análise de uma amostra positiva. Para o método utilizado observou-se efeito memória a partir da concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, porém este foi eliminado após algumas alterações no método.

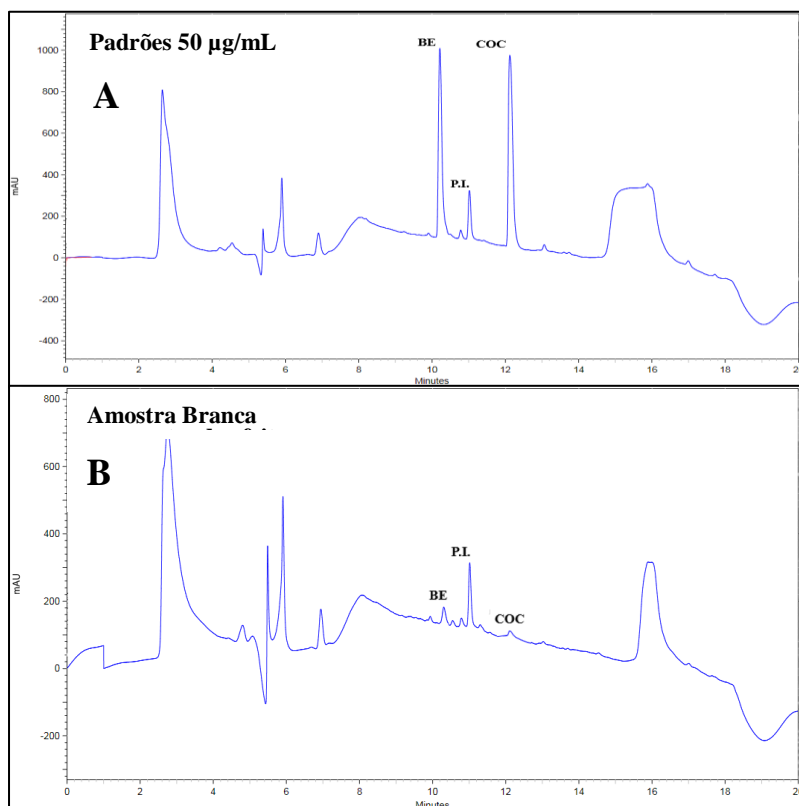
A avaliação deste parâmetro foi iniciada com amostras adicionadas de padrões dos analitos de interesse na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$, concentração essa duas vezes maior do que o último ponto da curva de

calibração proposta. Nas análises do branco não se observou sinal dos analitos nos seus devidos TRs.

Desta forma, decidiu-se aumentar a concentração para observar em qual seria visível o efeito memória. Análises com as concentrações de 30 e 40 $\mu\text{g/mL}$ foram feitas, porém também não foi possível observar sinal nos TRs dos analitos nas amostras brancas.

No entanto, ao avaliar uma amostra branca após a análise da concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ (figura 23 A), foi possível observar um pequeno sinal para ambos analitos (figura 23 B).

Figura 23 – Cromatograma representativo de efeito memória após a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. A- amostra de CB com padrões de COC e BE na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. B- amostra de CB sem a adição dos padrões COC e BE.



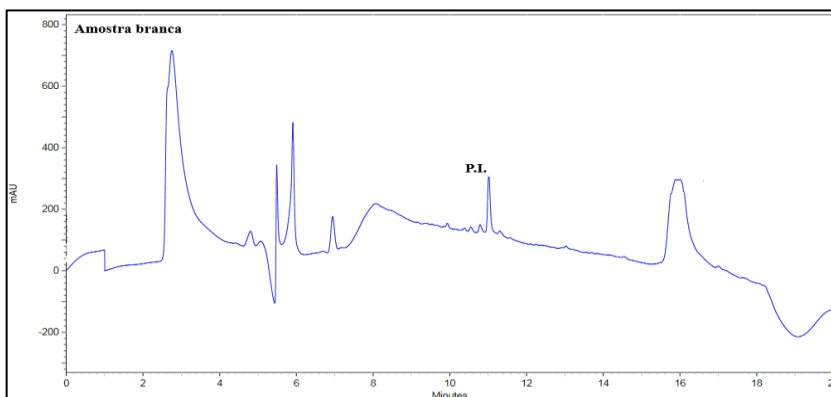
Fonte: Autora.

Para sanar tal problema, primeiramente foi aumentado o tempo de limpeza da coluna, após o final da corrida, porém, não se obteve sucesso. Num segundo momento, ainda pensando em contaminação na coluna, foi aumentado a força cromatográfica do gradiente, chegando o mesmo até 100 % de ACN. Ainda assim não foi obtido sucesso na eliminação do efeito memória, mantendo-se inclusive as áreas dos picos em ambas situações.

Pensando agora em contaminação no momento de injeção da amostra, foi observado nas configurações do método que esse não realizava o *wash* da seringa, somente o *flush* e esse com um volume de 400 μ L. Decidiu-se então acrescentar o parâmetro *wash* no método com volume de 800 μ L e aumentar o do *flush* para o mesmo volume.

Com essas alterações foi possível visualizar uma pequena melhora, ou seja, uma redução nas áreas dos picos, porém estes ainda eram visíveis. Decidiu-se aumentar ainda mais o volume, passando para 2 mL para cada parâmetro. Houve uma redução ainda maior da área de ambos os picos, porém ainda estavam presentes. Na sequência pensou-se em aliar ao aumento de volume a troca do solvente utilizado, de água para ACN. A redução foi notável, porém ainda não o suficiente para eliminar o efeito memória. Partiu-se novamente para o aumento dos volumes. A eliminação do efeito memória (figura 24) somente foi alcançada com volumes de 5 mL para os dois parâmetros.

Figura 24 – Cromatograma de uma amostra de CB isenta de analitos de interesse, analisada após a amostra adicionada na concentração de 50 μ L. Análises feitas com a alteração no método visando eliminação do efeito memória.



Fonte: Autora.

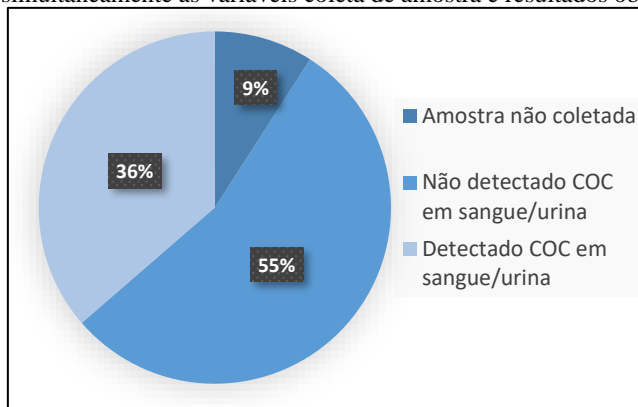
A existência de efeito memória neste método também conhecido como efeito residual, ressalta a importância da sua avaliação em processos de validação. Isso pois, a menos que toda a amostra seja removida do sistema analítico, a análise subsequente terá resíduo da injeção anterior, o que poderia levar a dados incorretos, podendo até gerar um falso positivo (INTERNATIONAL LABMATE, 2013).

Diversos autores relatam a presença de efeito memória em seus métodos (SÁNCHEZ-ORTEGA et al., 2005; FANG et al., 2011). As abordagens para eliminação são das mais diversas. Um exemplo é o método de lavagem da coluna e dos compartimentos de injeção (FANG et al., 2011). Outros estudos recomendam inicialmente identificar a fonte do efeito memória, podendo ser esse da coluna, detector, amostrador ou até mesmo contaminação na FM. Após, dependendo da fonte é recomendado uma abordagem diferenciada, como a substituição de componentes contaminados ou danificados, ou a alteração dos solventes usados para limpar componentes individuais. Ressalta-se ainda que a seleção do solvente de lavagem correto é um fator importante para otimizar o regime de limpeza (INTERNATIONAL LABMATE, 2013).

4.3. APLICAÇÃO DO MÉTODO

A aplicação do método validado fez-se em amostras de casos onde houve vítimas de morte violenta, provenientes do IGP/SC de sua sede em Joinville. No total foram avaliados 22 casos. Desses, oito apresentaram resultado detectado para COC em sangue e/ou urina, 12 apresentaram resultado não detectado e dois não tiveram amostras de sangue e/ou urina coletadas (figura 25).

Figura 25 - Distribuição dos 22 casos avaliados considerando simultaneamente as variáveis coleta de amostra e resultados obtidos.



Fonte: Autora.

Em todos os oito casos que apresentavam resultado detectado para as amostras convencionais, foi possível detectar COC e seu produto de biotransformação BE no CB. As concentrações variaram de 3,3 a 123,03 ng/mg de CB para a BE (média: 61,02 ng/mg de CB, mediana: 59,02 ng/mg de CB) e de 2,41 a 127,05 ng/mg de CB para COC (média: 47,86 ng/mg de CB, mediana: 54,46 ng/mg de CB) (quadro 10). Considerando que a janela de detecção das drogas no CB, quando não se usa a raiz do mesmo para análise, inicia após aproximadamente 20 dias (HARRISON; FU, 2014), é possível inferir que em todos estes casos as vítimas utilizaram a droga horas/dias antes de irem a óbito, assim como há pelo menos 20 dias, o que as classifica como usuárias (CEBRID, 2017).

Quadro 10 - Resultados da aplicação da metodologia em 22 casos *post mortem*. Comparação da detecção de COC em sangue e urina e quantificação de COC e BE em CB. (D – Detectado; ND – Não Detectado; NC – Não Coletada).

CASO	TOXICOLÓGICO		CONCENTRAÇÃO (ng/mg) CB	
	Sangue	Urina	BE	COC
1	D	D	84,89	10,34
2	D	D	123,03	127,05
3	D	ND	57,44	68,76
4	D	ND	60,61	77,65
5	D	ND	117,64	92,80
6	D	ND	24,67	40,15
7	D	NC	16,56	2,41
8	ND	D	3,30	8,30
9	ND	ND	6,05	3,23
10	ND	ND	ND	ND
11	ND	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND	ND
13	ND	NC	ND	ND
14	ND	ND	ND	ND
15	ND	NC	ND	2,60
16	ND	NC	ND	ND
17	ND	NC	ND	ND
18	ND	NC	24,58	2,17
19	ND	NC	9,99	24,43
20	ND	NC	10,67	ND
21	NC	NC	2,33	7,24
22	NC	NC	7,85	5,38

Fonte: Autora.

Com relação aos 12 casos em que não foi possível detectar COC nas amostras convencionais, em três deles foram encontradas COC e BE (quadro 10). Este resultado mostra um dos diferenciais do CB como amostra para toxicologia forense. Certamente, a partir dos resultados negativos nas análises com o sangue e urina, pode-se concluir que estas vítimas não utilizaram COC horas/dias antes da sua morte, e inclusive

pode-se descartar uma overdose desta droga como causa da morte. No entanto, a presença de COC e BE no cabelo representa que essas vítimas tiveram contato com a droga e ainda que há a possibilidade destas serem usuárias da droga, o que pode auxiliar no esclarecimento do caso.

Ainda sobre os 12 casos que não apresentaram resultados detectado para COC nas amostras de sangue e/ou urina, um deles apresentou somente COC, na concentração de 2,6 ng/mg (caso 15). Quando apenas a droga é encontrada sem a presença do produto de biotransformação, a literatura traz a possibilidade de que tenha ocorrido contaminação externa, não sendo o achado decorrente do uso (HILL; CAIRNS; SCHAFFER, 2008). Porém, também é possível inferir que, neste caso específico, como a concentração de COC é baixa, a BE pode estar abaixo do LQ do método deste trabalho. Tal afirmação é fundamentada no fato de ser esperado no CB concentrações menores para os produtos de biotransformação do que para a COC (CORDERO; LEE; PATERSON, 2010).

Por fim, desses 12 casos citados, em um deles foi observado apenas BE (10,67 ng/mg), resultado este inesperado, considerado fatores como a afinidade da COC, como molécula básica, pelas células germinativas do folículo piloso de características ácidas (CLAUWAERT et al., 2000; BALIKOVA, 2005; DRUMMER, 2004). No entanto, esse tipo de achado já foi relatado anteriormente, assim como a detecção de concentrações maiores de BE do que de COC, quando ambas são detectadas (CLAUWAERT et al., 2000, FERNÁNDEZ et al., 2003, CORDERO; LEE; PATERSON, 2010). Sabe-se que a COC é convertida para BE por hidrólise, podendo essa ocorrer *in vivo*. Nesse sentido, as circunstâncias em que as vítimas são encontradas, como em um rio, mar ou banhado, por um período prolongado após o afogamento, pode ter causado a conversão de COC para BE (CORDERO; LEE; PATERSON, 2010).

Para os dois casos (9 %) em que as amostras convencionais não foram coletadas, tanto BE quanto COC foram detectadas no CB (quadro 10). Com relação a este achado cabe destacar o que já foi constatado em outros trabalhos, que cerca de 37 % dos casos de morte violenta atendidos pelo IGP/SC, na sua sede de Joinville nos anos de 2013 a 2015, não apresentam amostras de sangue/urina coletadas, e por isso exames toxicológicos acabam por não serem realizados (PERICOLO, 2016).

Neste contexto, esse resultado reforça o que já é de conhecimento no âmbito forense, análises de amostra alternativa como o CB em casos *post mortem*, onde o cadáver encontra-se em estágio avançado de

decomposição, no qual as amostras convencionais não se encontram disponíveis, são importantes para o esclarecimento do caso (COOPER; KRONSTRAND; KINTZ, 2012).

4.4. PRODUTO FINAL DO ESTUDO

Os resultados alcançados no presente estudo irão se somar aos resultados obtidos em amostras de humor vítreo por Pericolo (2016) e que visam atender a uma necessidade do IAF/SC, em sua sede de Joinville, referente ao emprego de matrizes alternativas na rotina forense. Estima-se que a diversificação de matrizes biológicas possa contribuir de maneira mais efetiva para a elucidação de casos atualmente prejudicados por limitação de disponibilidade de amostras convencionais e técnicas.

Desta forma, o Laboratório de Pesquisas Toxicológicas – LPTox (Patologia/CCS/UFSC) em consonância com o IAF/SC, em sua sede de Joinville, e o Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional em Farmacologia (Farmacologia/CCB/UFSC), vem desenvolvendo métodos pré-analíticos e analíticos para identificação COC em amostras não convencionais provenientes de vítimas atendidas no IGP/SC em sua sede de Joinville.

Em levantamento realizado no período compreendido entre os anos de 2013 e 2015 foram registrados 1.422 casos de morte violenta atendidos pelo Instituto na região de Joinville, sendo que em aproximadamente 37% as amostras não foram coletadas (Pericolo, 2016). Parte destes casos não possuem laudos de exames toxicológicos em decorrência da inviabilidade de coleta de sangue e urina dos cadáveres, evidenciando gargalo onde o aparato forense não corroborou com a persecução penal. Desta forma, a diversificação de amostras passíveis de análise pode dirimir parte desta limitação.

Assim, como produto final deste trabalho apresenta-se um Procedimento Operacional Padrão (POP) (anexo I). Este resume todo o método validado e foi produzido a fim de proporcionar sua aplicação por qualquer analista de forma prática.

Ressalta-se que o POP é a exteriorização do método desenvolvido, sendo a real ferramenta para aplicação do método. Sua disponibilização ao IGP/SC objetiva estimular a utilização de matriz não convencional, o que pode trazer ao referido Instituto um ganho nos resultados diários considerando o grande número de catarinenses atendidos pelo serviço.

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste estudo é possível inferir que:

- O procedimento de lavagem da amostra é de extrema importância na etapa pré-analítica. O seu desenvolvimento permitiu a incorporação de um agente detergente. Este foi de vital importância para a remoção de sujeiras fortemente aderidas as amostras provenientes do IGP/SC da sua sede em Joinville.
- A fragmentação da amostra é fundamental para garantir uma melhor extração dos analitos de interesse do CB. Quanto mais fragmentada, maior será sua superfície de contato com o solvente digestor. A utilização de gral e pistilo de vidro para a pulverização foi uma alternativa eficaz aos equipamentos mais sofisticados, proporcionando uma boa fragmentação e enfraquecimento da matriz capilar.
- A solução de metanol com ácido clorídrico 0,1 M (2:1) mostrou-se a mais eficiente na digestão das amostras visando remover os analitos de interesse do CB. Apresentou as maiores áreas dos picos para BE e COC, na amostra real avaliada, quando comparadas com as outras soluções.
- A técnica de extração utilizada (EFS) se mostrou eficiente na recuperação dos analitos de interesse e na separação dos mesmos das impurezas provenientes do CB. Dentre os procedimentos avaliados nesta etapa, o que apresentou melhor resultado foi aquele recomendado pelo fabricante do material e que também é amplamente citado na literatura.
- Para análise de COC e BE utilizou-se a cromatografia líquida, empregando CLAE-DAD. O método desenvolvido mostrou-se eficiente na detecção de ambos os analitos nas amostras de CB. A separação cromatográfica foi boa, portanto, apropriada para validação analítica.
- O método foi linear na faixa de trabalho selecionada, preciso, exato, sensível, com boa especificidade e recuperação. Desta forma, validado analiticamente.
- O método desenvolvido e validado pode ser aplicado em amostras reais, uma vez que foi eficaz na quantificação de COC

e BE em amostras de CB de vítimas de morte violenta atendidas pelo IGP/SC em sua sede de Joinville.

- Os resultados obtidos destas análises quando comparados com aqueles das amostras convencionais, corroboram com os dados da literatura. As amostras de CB apresentam uma janela de detecção mais longa, o que permite inferir a possibilidade de uso crônico e a vítima como possível usuária.
- Destacam-se os casos em que as amostras de CB analisadas apresentaram resultados positivos e que não houve coleta das amostras convencionais. Há várias situações em que estas últimas amostras não estão disponíveis, como em cadáveres em estágio avançado de decomposição, tornando-se o CB uma importante amostra alternativa na análise toxicológica forense.
- O desenvolvimento das etapas pré-analítica e analítica, bem como a validação, possibilitaram a confecção de um POP, que ao ser disponibilizado ao IGP/SC possibilita a implantação da técnica na rotina forense do Estado de Santa Catarina.

REFERÊNCIAS

- ADVANCED CHROMATOGRAPHY SOLUTIONS. **HPLC basics: improving resolution (III): mobile phases: pH effect on HPLC separations**. 2013. Disponível em: <<https://chromblog.wordpress.com/>>. Acesso em: 12 set. 2017.
- AIELLO, Talita Bianchi. **ANÁLISE TOXICOLÓGICA FORENSE: DA FICÇÃO CIENTÍFICA À REALIDADE**. 2011. 30 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, Sorocaba, 2011.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RDC 166/17**: Validação de métodos analíticos. Brasília: Anvisa, 2017. 22 p.
- BAHLS, Flávia Campos; BAHLS, Saint-Clair. Cocaína: origens, passado e presente. **Interações em Psicologia**, Curitiba, v. 2, n. 6, p.177-181, jul. 2002.
- BAKER, David R.; KASPRZYK-HORDERN, Barbara. Multi-residue determination of the sorption of illicit drugs and pharmaceuticals to wastewater suspended particulate matter using pressurised liquid extraction, solid phase extraction and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, [s.l.], v. 1218, n. 44, p.7901-7913, nov. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.08.092>.
- BALÍKOVÁ, Marie. HAIR ANALYSIS FOR DRUGS OF ABUSE. PLAUSIBILITY OF INTERPRETATION. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, Praga, v. 2, n. 149, p.199-207, set. 2005.
- BARROSO, M. et al. Development and validation of an analytical method for the simultaneous determination of cocaine and its main metabolite, benzoylecgonine, in human hair by gas chromatography/mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, [s.l.], v. 22, n. 20, p.3320-3326, 30 out. 2008. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/rcm.3738>.
- BAUMGARTNER, Annette M. et al. Radioimmunoassay of Hair for Determining Opiate-Abuse Histories. **Clinical Sciences: in Vitro Nuclear Medicine**, Los Angeles, v. 20, n. 7, p.748-752, jan. 1979.
- BELL, David et al. **Mixed-Mode SPE Improves Extraction of Pharmaceutical Compounds from Biological Fluids**. Disponível em:

<<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/reporter-eu/mixed-mode-spe-improves.html>>. Acesso em: 12 set. 2017.

BERG, Thomas et al. Determination of opiates and cocaine in urine by high pH mobile phase reversed phase UPLC–MS/MS. **Journal of Chromatography B**, [s.l.], v. 877, n. 4, p.421-432, fev. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.12.052>.

BERMEJO, Ana María et al. Solid-phase microextraction for the determination of cocaine and cocaethylene in human hair by gas chromatography–mass spectrometry. **Forensic Science International**, [s.l.], v. 156, n. 1, p.2-8, jan. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.09.007>.

BOTELHO, Élvio Dias. **Desenvolvimento de uma nova metodologia analítica para a identificação e quantificação de truxilinas em amostras de cocaína, baseada em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa (CLAE-EM)**. 2011. 174 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação do Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

BOUMBA, Vassiliki A.; ZIAVROU, Kallirro S.; VOUGIOUKLAKIS, Theodore. Hair as a Biological Indicator of Drug Use, Drug Abuse or Chronic Exposure to Environmental Toxicants. **International Journal of Toxicology**, [s.l.], v. 25, n. 3, p.143-163, maio 2006. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1080/10915810600683028>.

BRITO, Natilene Mesquita et al. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS: ESTRATÉGIA E DISCUSSÃO. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, [s.l.], v. 13, p.129-146, 31 dez. 2003. Universidade Federal do Paraná. <http://dx.doi.org/10.5380/pes.v13i0.3173>.

BRUNKER, James. **Magical Andes Photography**. 2012. Disponível em: <<http://www.magicalandes.com/-/galleries/agriculture-food-drink/coca-plants/-/medias/95743899-ae46-4fc2-a83f-5d49faee9234-semi-mature-coca-plants-erythroxylum-coca-yungas-region>>. Acesso em: 25 out. 2017.

CAMILLO, Eveline. **Desenvolvimento de método para a determinação de nicotina e clozapina em plasma humano utilizando CLAE-UV**. 2014. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

CARVALHO, Virgínia Martins. **Redistribuição da cocaína e sua influência na neuroquímica post mortem**. 2011. 203 f. Tese

(Doutorado) - Curso de Toxicologia e Análises Toxicológicas, Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

CEBRID - Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (São Paulo). Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina. **PREVENÇÃO - ALGUMAS DEFINIÇÕES**. Disponível em: <<http://www2.unifesp.br/dpsicobio/pergresp/defini.htm>>. Acesso em: 19 ago. 2017.

CEBRID - Centro Brasileiro de Informações Sobre Drogas. **VI Levantamento nacional sobre o consumo de drogas psicotrópicas entre estudantes do ensino fundamental e médio das redes pública e privada de ensino nas 27 capitais brasileiras**. Brasília: Senad, 2010.

CEFET – QUÍMICA RJ. Análise instrumental cromatografia líquida de alta resolução. Rio de Janeiro, 2000. 29 p. Disponível em: <http://www.ifrj.edu.br/webfm_send/546>. Acesso em: 09 maio 2015.

CHAMBERS, Erin et al. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. **Journal of Chromatography B**, [s.l.], v. 852, n. 1-2, p.22-34, jun. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.12.030>.

CHATTERTON, Craig. **Hair analysis in clinical and forensic toxicology**. 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/hair-analysis>>. Acesso em: 13 jan. 2018.

CHEN, Xiabin et al. A quantitative LC–MS/MS method for simultaneous determination of cocaine and its metabolites in whole blood. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 134, p.243-251, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.11.024>.

CHIAROTTI, Marcello et al. Evaluation of cocaine use during pregnancy through toxicological analysis of hair. **Journal of Analytical Toxicology**. Roma, p. 555-557. dez. 1996.]

CLAUWAERT, Karine M. et al. Segmental analysis for cocaine and metabolites by HPLC in hair of suspected drug overdose cases. **Forensic Science International**. Bélgica, p. 157-166. fev. 2000.

COGNARD, Emmanuelle et al. 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**, [s.l.], v. 826, n. 1-2, p.17-25, 5 nov. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.07.043>.

COLLINS, Carol H; BRAGA, Gilberto L; BONATO, Pierina S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 7. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1997

CONE, Edward J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cocaine. **Journal of Analytical Toxicology**, Baltimore, v. 19, n. 1, p.459-478, out. 1995

COOPER, Gail A.a.; KRONSTRAND, Robert; KINTZ, Pascal. Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair. **Forensic Science International**. Glasgow, p. 20-24. jan. 2012.

CORDERO, Rosa; LEE, Sooyeon; PATERSON, Sue. Distribution of concentrations of cocaine and its metabolites in hair collected postmortem from cases with diverse causes/circumstances of death. **Journal of Analytical Toxicology**. Londres, p. 543-548. dez. 2010.

CORRÊA, Jéssica Santos; TEIXEIRA, Valéria Maria Costa. Métodos analíticos para identificação de drogas de abuso em toxicologia forense. **Anais do VII Concepar: Congresso Científico da Região Centro-ocidental do Paraná**. Campo Mourão, p. 1-2. fev. 2016.

CROUCH, Dennis J. et al. Analysis of cocaine and its metabolites from biological specimens using solid-phase extraction and positive on chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Analytical Toxicology**, Salt Lake City, v. 19, n. 1, p.352-358, out. 1995.

DRUMMER, Olaf H. Postmortem toxicology of drugs of abuse. **Forensic Science International**, [s.l.], v. 142, n. 2-3, p.101-113, jun. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.02.013.L>

FANG, Jing et al. False EX1 signatures caused by sample carryover during HX MS analyses. **International Journal of Mass Spectrometry**, [s.l.], v. 302, n. 1-3, p.19-25, abr. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijms.2010.06.039>.

FAVRETTO, Donata et al. High performance liquid chromatography–high resolution mass spectrometry and micropulverized extraction for the quantification of amphetamines, cocaine, opioids, benzodiazepines, antidepressants and hallucinogens in 2.5mg hair samples. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1218, n. 38, p.6583-6595, set. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.050>.

FERIGOLO, Maristela; SIGNOR, Luciana. **Cocaína**. 2007. Disponível em:

<<http://www.ibb.unesp.br/Home/UnidadesAuxiliares/CentrodeAssistenciaToxicologica-CEATOX/cocaina.pdf>>. Acesso em: 09 nov. 2017.

FERNÁNDEZ, María del Mar Ramírez et al. A quantitative, selective and fast ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous analysis of 33 basic drugs in hair (amphetamines, cocaine, opiates, opioids and metabolites). **Journal of Chromatography B**, [s.l.], v. 965, p.7-18, ago. 2014. Elsevier BV.

FERNÁNDEZ, P. et al. Use of high performance liquid chromatography for the determination of cocaine and benzoylecgonine in human hair. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, [s.l.], v. 26, n. 12, p.2003-2012, jan. 2003. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1081/jlc-120021767>.

FERREIRA, Pedro Eugênio M; MARTINI, Rodrigo K. Cocaína: lendas, história e abuso. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, Porto Alegre, v. 2, n. 23, p.96-99, jan. 2001.

FRISON, Giampietro et al. Detection of 3-methylmethcathinone and its metabolites 3-methylephedrine and 3-methylnorephedrine in pubic hair samples by liquid chromatography–high resolution/high accuracy Orbitrap mass spectrometry. **Forensic Science International**, [s.l.], v. 265, p.131-137, ago. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.01.039>.

GARCIA, Raphael Caio Tamborelli. **Efeitos neurodegenerativos da metilecgonidina e da cocaína em cultura celular primária de hipocampo**. 2009. 138 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

GARCIA, Raphael Caio Tamborelli. **Envolvimento da metilecgonidina, produto de pirólise da cocaína, na farmacodependência**. 2014. 155 f. Tese (Doutorado) - Curso de Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

GENNARO, Alfonso R.; **Remington: the science and practice of pharmacy** – 19. ed.- Mack Publishing Company – Pennsylvania, Vol. II pg 1404,1995.

GHEORGHE, Adriana et al. Analysis of cocaine and its principal metabolites in waste and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography–ion trap tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 391, n. 4, p.1309-1319, 9 dez. 2007. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-007-1754-5>.

GIROD, Christèle; STAUB, Christian. Analysis of drugs of abuse in hair by automated solid-phase extraction, GC/EI/MS and GC ion trap/CI/MS. **Forensic Science International**, [s.l.], v. 107, n. 1-3, p.261-271, jan. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0379-0738\(99\)00169-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0379-0738(99)00169-3).

GORDO, José Miguel de Oliveira. **O cabelo como amostra biológica em toxicologia forense: colheita, análise e áreas de aplicação**. 2013. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2013.

HAN, Eunyong et al. Correlation of methamphetamine results and concentrations between head, axillary, and pubic hair. **Forensic Science International**, [s.l.], v. 147, n. 1, p.21-24, jan. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.03.035>.

HARDY, Emilie M. et al. Multi-residue analysis of organic pollutants in hair and urine for matrices comparison. **Forensic Science International**, [s.l.], v. 249, p.6-19, abr. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.12.003>.

HARRISON, Rebekah; FU, Shanlin. A Review of methodology for testing hair for cocaine. **Journal of Forensic Investigation**, Sydney, v. 1, n. 2, p.1-8, jan. 2014.

HERNÁNDEZ-BORGES, Javier et al. Sample treatments prior to capillary electrophoresis–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, [s.l.], v. 1153, n. 1-2, p.214-226, jun. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2006.10.070>.

HILL, Virginia; CAIRNS, Thomas; SCHAFFER, Michael. Hair analysis for cocaine: Factors in laboratory contamination studies and their relevance to proficiency sample preparation and hair testing practices. **Forensic Science International**, [s.l.], v. 176, n. 1, p.23-33, mar. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2007.08.011>.

ILAC. The Ilac Secretariat. **Guidelines for the selection and use of reference materials**. Austrália, 2005. 15 p.

INTERNATIONAL LABMATE (Reino Unido). **Why do I have carryover?** 2013. Disponível em: <<https://www.chromatographytoday.com/article/hplc-uhplc/31/the-chromatography-helpdesk/why-do-i-have-carryover/1490>>. Acesso em: 17 ago. 2017.

JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes. Extração em Fase Sólida: fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. **Scientia Chromatographica**, Campinas, v. 2, n. 1, p.13-25, jan. 2010.

KARCH, Steven B. The history of cocaine toxicity. **Human Pathology**, [s.l.], v. 20, n. 11, p.1037-1039, nov. 1989. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0046-8177\(89\)90220-7](http://dx.doi.org/10.1016/0046-8177(89)90220-7).

KARCH, Steven B. **Drug Abuse Handbook**. San Francisco: Crc, 1998. 1123 p.

KINTZ, Pascal. Value of hair analysis in postmortem toxicology. **Forensic Science International**, [s.l.], v. 142, n. 2-3, p.127-134, jun. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.02.027>.

LEE, Sooyeon et al. Detection of phentermine in hair samples from drug suspects. **Forensic Science International**, [s.l.], v. 207, n. 1-3, p.5-7, abr. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.11.004>.

LEONG, H. S. et al. Evaluation of ketamine abuse using hair analysis: concentration trends in a singapore population. **Journal of Analytical Toxicology**, [s.l.], v. 29, n. 5, p.314-318, 1 jul. 2005. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jat/29.5.314>.

LIMA, Ana Paula Soares de. **Desenvolvimento de métodos eletroforéticos e cromatográficos para a detecção de benzodiazepínicos como adulterantes em formulações fitoterápicas para emagrecimento**. 2009. 119 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

LIMA, Elizabete Campos de; SILVA, Clóvis Lúcio da. Cabelo como matriz analítica alternativa para a determinação de drogas de abuso. **NewsLab**, São Paulo, v. 82, n. 1, p.156-169, jan. 2007.

LOPER, Keith A. Clinical Toxicology of Cocaine. **Medical Toxicology and Adverse Drug Experience**, [s.l.], v. 4, n. 3, p.174-185, jun. 1989. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf03259995>.

LUCCI, Paolo et al. Current Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis. **Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis**, [s.l.], p.127-164, 24 out. 2012. InTech. <http://dx.doi.org/10.5772/47736>.

MALAFATTI, Lusiane; MARTINS, Isarita. Aspectos analíticos da determinação de cotinina em matrizes biológicas. **Revista Brasileira de Toxicologia**, Alfenas, v. 1, n. 22, p.9-20, jan. 2009.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Guia: Validação e Controle de Qualidade Analítica (Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários), Brasília, 2011.

MERCOLINI, Laura et al. Quantitative analysis of cocaine in human hair by HPLC with fluorescence detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 48, n. 2, p.456-461, set. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2008.02.007>.

MARKUS. **Instrumentos para Espectrofotometria**. 2014. Disponível em: <<http://www.c2o.pro.br/hackaguas/apjs02.html>>. Acesso em: 08 jan. 2018.

MOORE, Christine; COULTER, Cynthia; CROMPTON, Katherine. Determination of cocaine, benzoylecgonine, cocaethylene and norcocaine in human hair using solid-phase extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography B**, [s.l.], v. 859, n. 2, p.208-212, nov. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.09.037>

MOREAU, Regina Lúcia de M.; SIQUEIRA, Maria Elisa Pereira. B.; Ciências Farmacêuticas: Toxicologia Analítica, Editora Guanabara 2 ed. Koogan: Rio de Janeiro, 2016.

MUSSHOFF, Frank; MADEA, Burkhard. Analytical pitfalls in hair testing. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 388, n. 7, p.1475-1494, 8 maio 2007. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-007-1288-x>.

NAKAHARA, Yuji. Hair analysis for abused and therapeutic drugs. **Journal of Chromatography B**, Tokio, v. 1, n. 733, p.161-180, jan. 1999.

NAKAHARA, Yuji. Hair Analysis for Drug Abuse XIV. Identification of substances causing acute poisoning using hair root. I. Methamphetamine. **Forensic Science International**, Tóquio, v. 1, n. 84, p.157-164, jan. 1997.

NAKAHARA, Yuji; TAKAHASHI, Kazunori; KIKURA, Ruri. Hair Analysis for Drugs of Abuse. X. Effect of Physicochemical Properties of Drugs on the Incorporation Rates into Hair. **Biol. Pharm. Bull.** Japão, p. 1223-1227. maio 1995.

PANTALEÃO, Lorena do Nascimento. **Análise toxicológica de anfetaminas e benzodiazepínicos em amostras de cabelo por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas**. 2012. 151 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Toxicologia e Análises Toxicológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

PAWLIK, Evelyn et al. Analysis of adulterants from cocaine preparations in lung tissue and blood. **Toxichem Krimtech**. Düsseldorf, p. 173-178. jan. 2015.

PEGO, A.m.f. et al. Determination of cocaine and its derivatives in hair samples by liquid phase microextraction (LPME) and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). **Forensic Science International**, [s.l.], v. 274, p.83-90, maio 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forciint.2016.12.024>.

PERICOLO, Suellen. **Cocaína e cocaetileno em mortes violentas: levantamento da ocorrência e validação de metodologia para a identificação em humor vítreo com SPME por CG/EM**. 2016. 113 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

PHENOMENEX (California). **Tramadol on Lux 5µm Cellulose-1 in RP**. 2017. Disponível em: <http://www.phenomenex.com/Application/Detail/20240?culture=pt>. Acesso em: 20 ago. 2017.

PICHINI, Simona et al. Determination of Opiates and Cocaine in Hair as Trimethylsilyl Derivatives Using Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Analytical Toxicology**, Roma, v. 23, n. 1, p.343-348, out. 1999.

RANJBARI, Elias; GOLBABANEZHAD-AZIZI, Ali-asghar; HADJMOHAMMADI, Mohammad Reza. Preconcentration of trace amounts of methadone in human urine, plasma, saliva and sweat samples using dispersive liquid–liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography. **Talanta**, [s.l.], v. 94, p.116-122, maio 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.03.004>.

REGO JUNIOR, Francisco Xavier. **Dependência química: os efeitos da cocaína no Sistema Nervoso Central**. 2010. Publicada por Instituto de Pesquisa e Ensino Médico Psiquiátrico. Disponível em: <http://psiquiatriabh.com.br/wp/wp-content/uploads/2015/01/Os->

efeitos-da-cocaina-no-sistema-nervoso-central.pdf>. Acesso em: 9 nov. 2017.

DONNARUMMA, Fabrizio. RESEARCH GATE (Estados Unidos). **Is Recovery an essential parameter for method validation?** 2014. Disponível em: <https://www.researchgate.net/post/Is_Recovery_an_essential_parameter_for_method_validation>. Acesso em: 19 ago. 2017.

RIBEIRO, Fabiana Alves de Lima et al. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.164-171, 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422008000100029>.

ROMOLO, F.S et al. Optimized conditions for simultaneous determination of opiates, cocaine and benzoylecgonine in hair samples by GC–MS. **Forensic Science International**, [s.l.], v. 138, n. 1-3, p.17-26, dez. 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2003.07.013>.

RUPPENTHAL, Janis Elisa. **Toxicologia**. Santa Maria: Ministério da Educação; Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica, 2013. 128 p.

SÁNCHEZ-ORTEGA, A. et al. Solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography using on-line diode-array and electrochemical detection for the determination of fenitrothion and its main metabolites in environmental water samples. **Journal of Chromatography A**, [s.l.], v. 1094, n. 1-2, p.70-76, nov. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2005.07.089>.

SANTOS NETO, Álvaro José dos. Problemas com o formato dos picos em cromatografia líquida. **Scientia Chromatographica**, Alfenas, v. 1, n. 3, p.69-77, jan. 2009.

SCHAFFER, Michael et al. Analysis of cocaine and metabolites in hair: validation and application of measurement of hydroxycocaine metabolites as evidence of cocaine ingestion. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 408, n. 8, p.2043-2054, 12 fev. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-016-9354-x>.

SCHIWECK, H. et al. **Sugar Alcohols**. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 2012

SCHUG, Kevin; TAYLOR, Tony. **The Essential Chromacademy Guide: Mobile Phase Optimization Strategies for Reversed Phase HPLC**. Disponível em: <http://www.chromacademy.com/essential_guide_webcast/mobile_phase_optimization_strategies_for_reversed_phase_hplc/mobile_phase_optimization_strategies_for_reversed_phase_hplc.pdf>. Acesso em: 12 set. 2017.

SHAH, Iltaf et al. Hair-based rapid analyses for multiple drugs in forensics and doping: application of dynamic multiple reaction monitoring with LC-MS/MS. **Chemistry Central Journal**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.1-10, dez. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s13065-014-0073-0>.

SIGMA ALDRICH (Estados Unidos). **HPLC Troubleshooting Guide**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical/hplc-troubleshooting-guide.html>>. Acesso em: 25 out. 2017.

SIGMA ALDRICH. **Guide to Solid Phase Extraction**. 910. ed. Missouri, 2004. 12 p. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>>. Acesso em: 21 ago. 2017.

SKOOG, Douglas A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 8º ed. Thomson, 2006. 1026 p.

SLOMINSKI, Andrzej et al. Hair Follicle Pigmentation. **J Invest Dermatol**. Tennessee, Usa, p. 13-21. jan. 2005.

SoHT - Society of Hair Testing. Recommendations for hair testing in forensic cases. **Forensic Science International**, [s.l.], v. 145, n. 2-3, p.83-84, out. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.04.022>.

STANKOWSKI, Rachel V.; KLONER, Robert A.; REZKALLA, Shereif H. Cardiovascular consequences of cocaine use. **Trends in Cardiovascular Medicine**, [s.l.], v. 25, n. 6, p.517-526, ago. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcm.2014.12.013>.

SWGDRUG - SCIENTIFIC WORKING GROUP FOR THE ANALYSIS OF SEIZED DRUGS (Estados Unidos). **RECOMMENDATIONS**. Washington: Swgdrug, 2016.

SWGTOX- Scientific Working Group for Forensic Toxicology. Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. **Journal of**

Analytical Toxicology, [s.l.], v. 37, n. 7, p.452-474, 9 ago. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jat/bkt054>.

TANAKA, Einosuke et al. Simple and simultaneous determination for 12 phenothiazines in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, [s.l.], v. 854, n. 1-2, p.116-120, jul. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.04.004>

TEKNOKROMA (Espanha). **Vacuum Manifold**. Disponível em: <<http://www.teknokroma.es/en/Productos/filtrationextraction-purification/6/solid-phase-extraction-spe/106/433/vacuum-manifold.aspx>>. Acesso em: 11 nov. 2017.

TOLEDO, Fernanda Crossi Pereira de et al. Determination of cocaine, benzoylecgonine and cocaethylene in human hair by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, [s.l.], v. 798, n. 2, p.361-365, dez. 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.10.008>.

UNODC - United Nations Office on Drugs and Crime. **Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens**. Viena: United Nation, 2009. 67 p.

UNODC - United Nations Office on Drugs and Crime. **Guidelines for Testing Drugs under International Control in Hair, Sweat and Oral Fluid: Manual for Use by National Drug Analysis Laboratories**. Viena, 2014. 96 p.

UNODC -United Nations Office on Drug and Crime. **World Drug Report 2015**. Vienna: United Nations Office on Drugs and Crime, 2015. 162 p.

WALSH, Maëire C. Moving from official to traceable methods. **Trends in Analytical Chemistry**, Dublin, v. 18, n. 10, p.616-623, out. 1999

WATSON, Dawn Wallace; RAYNIE, Douglas E. Understanding and Improving Solid-Phase Extraction. **Chromatography Online**, Estados Unidos, v. 32, n. 12, p.908-915, dez. 2014. Disponível em: <<http://www.chromatographyonline.com/understanding-and-improving-solid-phase-extraction-1?pageID=3>>. Acesso em: 21 ago. 2017.

WELLS, J.M. Marthas. Essential guides to method development in solid method development in solid-phase extraction, phase extraction, in W


ILSON, I.D.; ADLARD E.R.; COOKE, M. and POOLE, C.F. Poole, eds., **Encyclopedia of Separation Science**, Vol. 10, Academic Press, London, 2000, pp. 4636-4643.

WOOD, Michelle et al. Quantitative analysis of multiple illicit drugs in preserved oral fluid by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Forensic Science International**, [s.l.], v. 150, n. 2-3, p.227-238, jun. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.11.027>

ZANINI, Tânia; ZANINI, Cristine. **Cabelo**. 2014. Disponível em: <<https://naomexenaminhabolsa.wordpress.com/tag/cabelos/>>. Acesso em: 09 jun. 2015.

ANEXO I

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO


 LPT _{ox}	Laboratório de Pesquisas Toxicológicas		
	Análise de cocaína em amostras de Cabelo		
	Código: POP 001	Revisão (1): 11/2017	Pág 1/8

MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

Envelopes de papel
 Tesoura
 Fita adesiva
 Becker
 Papel filtro
 Gral e pistilo de vidro
 Placa de petri
 Tubo de vidro (10mL)
 Espátula
 Tampas para tubo de vidro
 Plástico para vedação tipo parafilm
 Tubos de polipropileno de fundo cônico 2 e 6 mL
 Pipetas automáticas de 20 a 200 µL e de 100 a 1000 µL e suas ponteiros correspondentes
 Cartuchos para extração em fase sólida (EFS)
 Banho de ultrassom
 Concentrador de amostra
 Aparato para EFS
 Cromatógrafo Líquido (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) com Detector de Arranjos de Diodos (DAD)

REAGENTES UTILIZADOS

Água do tipo 1
 Tween 80 0,1%
 Diclorometano PA
 HCl 0,1M

	Laboratório de Pesquisas Toxicológicas		
	Análise de cocaína em amostras de Cabelo		
	Código: POP 001	Revisão (1): 11/2017	Pág 2/8

Metanol grau HPLC
 Tampão fosfato pH 6 (0,02M)
 Hidróxido de amônio 5% em metanol
 Acetonitrila (ACN) grau HPLC
 Acetato de amônio 0,01M
 Padrões de Cocaína e Benzoilecgonina


PROCEDIMENTO

COLETA DA AMOSTRA

1. Cortar o cabelo na região do vértice posterior o mais rente ao couro cabeludo possível.
2. Identificar a porção mais próxima do couro cabeludo com uma fita adesiva, passando-a ao redor da mecha cortada.
3. A quantidade a ser coletada é de aproximadamente 200 mg.
4. A amostra deve ser armazenada em envelopes de papel contendo o número do caso, data do óbito, data da coleta e nome do coletador.

LAVAGEM DA AMOSTRA

5. Transferir a amostra para um becker e acrescentar tween 80 a 0,1 % em quantidade suficiente para cobrir a amostra;
6. Colocar em banho de ultrassom por 5 min.
7. Descartar todo o volume de twenn 80.
8. Enxaguar abundantemente com água do tipo 1.
9. Adicionar diclorometano PA em quantidade suficiente para cobrir a amostra.
10. Colocar em banho de ultrassom por 5 min.
11. Descartar todo o volume de diclorometano.
12. Enxaguar abundantemente com água do tipo 1.

 LPT _{ox}	Laboratório de Pesquisas Toxicológicas		
	Análise de cocaína em amostras de Cabelo		
	Código: POP 001	Revisão (1): 11/2017	Pág 3/8


13. Colocar a amostra sobre papel filtro.
14. Deixar secar à temperatura ambiente.

FRAGMENTAÇÃO DA AMOSTRA

15. Em uma placa de Petri, cortar a amostra com uma tesoura em pequenos fragmentos, cerca de 1 mm, iniciando da parte mais próxima do couro cabeludo.
 - a. Obs: caso o cabelo seja comprido, cortar uma quantidade suficiente para a análise (100 mg), partindo sempre da região mais perto do couro cabeludo, e armazenar o restante da amostra conforme descrito no item 4.
16. Colocar os fragmentos cortados em um gral de vidro.
17. Macerar a amostra com o pistilo de vidro até que adquira uma coloração esbranquiçada.
18. Aliquotar 100 mg da amostra em um tubo de vidro de 10 mL.

DIGESTÃO DA AMOSTRA

19. Adicionar à amostra 2 mL de metanol grau HPLC cuidadosamente pelas paredes do tubo.
20. Adicionar 1 mL de HCl 0,1M cuidadosamente pelas paredes do tubo.
21. Adicionar 25 µL de articaína 50 µg/mL (padrão interno).
22. Tampar o tubo com uma tampa de borracha e vedar, nas laterais e na parte superior, por cima da tampa, com parafilm.
 - a. Obs: a vedação é necessária, pois o metanol ao ser aquecido evapora e a pressão do gás pode expulsar a tampa.

	Laboratório de Pesquisas Toxicológicas		
	Análise de cocaína em amostras de Cabelo		
	Código: POP 001	Revisão (1): 11/2017	Pág 4/8

23. Colocar o tubo em estufa a 45 °C por 16 h.
24. Retirar o sobrenadante e colocá-lo em tubo de polipropileno de aproximadamente 6 mL.
25. Evaporar em concentrador de amostra os 2 mL referentes ao metanol adicionado. Para concentrador de amostra à vácuo, deixar a temperatura em 45 °C por aproximadamente 45 min.
26. Ao restante do sobrenadante (1 mL), adicionar 1ml de tampão fosfato pH 6,0 (0,01 M)


EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

CONDICIONAMENTO

27. Montar o sistema para movimentação de fluidos (Manifold) para a extração.
28. Adicionar 3 mL de metanol grau HPLC com a válvula para controle do fluxo (logo abaixo do cartucho) fechada.
29. Ligar a bomba de vácuo e fechar aos poucos a válvula principal até que a pressão marque aproximadamente 5 mmHg.
30. Abrir aos poucos a válvula de controle de fluxo até que o metanol comece a gotejar lentamente.
31. Fechar a válvula de controle do fluxo antes que passe todo o conteúdo líquido pela fase estacionária.
32. Adicionar 3 mL de tampão fosfato pH 6,0 (0,01 M) e repetir os itens 29 e 30.

ADIÇÃO DA AMOSTRA

33. Adicionar todo volume da amostra.
34. Abrir aos poucos a válvula de controle de fluxo até que a amostra comece a gotejar de forma mais lenta que os dois solventes utilizados no condicionamento.

	Laboratório de Pesquisas Toxicológicas		
	Análise de cocaína em amostras de Cabelo		
	Código: POP 001	Revisão (1): 11/2017	Pág 5/8


35. Deixar que toda a amostra passe pela fase estacionária.

LAVAGEM DOS INTERFERENTES

36. Adicionar 2 mL de tampão fosfato pH 6 0,01 M.
37. Supervisionar a válvula de controle de fluxo para que a frequência do gotejamento seja o mais semelhante possível ao da etapa de condicionamento.
38. Deixar que todo tampão passe pela fase estacionária.
39. Adicionar 2 mL de HCl 0,1 M.
40. Deixar que todo volume de HCl passe pela fase estacionária.
41. Adicionar 2 mL de metanol grau HPLC.
42. Deixar que todo volume de metanol passe pela fase estacionária.
43. Fechar a válvula de controle de fluxo.
44. Desligar a bomba de vácuo e aguardar até a pressão cair a 0 mmHg para abrir o aparato.

ELUIÇÃO DA AMOSTRA

45. Colocar no aparato o suporte juntamente com um tubo cônico de polipropileno de 2 mL para que seja possível a coleta do eluato.
46. Adicionar 2 mL da solução de hidróxido de amônio 5 % em metanol.
47. Abrir aos poucos a válvula de controle de fluxo até que o eluente comece a gotejar de forma mais lenta que os solventes utilizados no condicionamento e na lavagem.
48. Desligar a bomba de vácuo e aguardar até a pressão cair a 0 mmHg para abrir.


	Laboratório de Pesquisas Toxicológicas		
	Análise de cocaína em amostras de Cabelo		
	Código: POP 001	Revisão (1): 11/2017	Pág 6/8

CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA E PREPARO PARA A ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

49. Secar a amostra. Caso seja utilizado um concentrador de amostra a vácuo, programá-lo para 1 h a 45 °C.
50. Ressuspender a amostra em 250 µL de acetato de amônio 0,01 M.

ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

51. Preparar previamente os solventes para fase móvel (FM) e para os procedimentos de lavagem da coluna e do amostrador automático. Dois frascos com acetonitrila (ACN) (um para FM e outro para a lavagem do amostrador automático), um com água do tipo 1 (lavagem da coluna) e um com acetato de amônio 0,01 M (FM). Filtrar todos os solventes e degaseificá-los por pelo menos 20 min.
52. Ligar o equipamento HPLC-DAD pelo menos 1 h antes da análise.
53. Ajustar o método para a seguinte configuração:
 - a. Fluxo da FM 0,6 mL/min;
 - b. Modo de eluição gradiente;
 - c. Iniciando em 0,01 min com 13 % de ACN;
 - d. Chegando até 13 min com 80 % de ACN;
 - e. Voltado para 13 % em 13,01 min e mantendo assim até 20 min;
 - f. Comprimento de onda de detecção 240 nm;
 - g. Volume de injeção 25 µL, em modo *full loop*;
 - h. *Wash e flush* do amostrador automático com volume de 5 mL de ACN.
54. Proceder a análise, iniciando pela curva de calibração.

 LPT _{ox}	Laboratório de Pesquisas Toxicológicas		
	Análise de cocaína em amostras de Cabelo		
	Código: POP 001	Revisão (1): 11/2017	Pág 7/8

- a. Os pontos da curva devem ser preparados em amostras brancas adicionadas nas concentrações de 0,5; 2,5; 5; 7,5 e 10 µg/mL de cocaína (COC) e benzoilecgonina (BE), e devem seguir todos os procedimentos já feitos com as amostras reais.


55. Após a realização das análises, iniciar a lavagem da coluna.

LAVAGEM DA COLUNA DO CROMATÓGRAFO

56. Aumentar o fluxo para 1 mL/min;
57. Alterar a proporção da FM para 20 % de ACN e 80 % de água do tipo 1.
58. Deixar correr em modo isocrático essa proporção por pelo menos 20 min, ou até observar uma linha horizontal no cromatograma.
59. Alterar a proporção aumentando em 10 % a ACN, e repetir item 58.
60. Repetir item 59 até que se atinja 100 % de ACN.

ANÁLISE DOS DADOS

61. Construir uma curva de calibração para cada analito, COC e BE.
 - a. A curva de calibração deve ser construída com as concentrações no eixo “x” e as áreas ajustadas (área do pico referente ao analito/área do padrão interno) relativas a cada uma das concentrações no eixo “y”.
62. Utilizar a equação da reta obtida com a curva de calibração para calcular a concentração desconhecida da amostra.
 - a. Utilizar, para o cálculo com a equação da reta, a área ajustada (área do pico referente ao analito/área do padrão interno) da amostra de concentração desconhecida.
63. Dividir o valor obtido por 4, para obter a concentração em µg/mL.

	Laboratório de Pesquisas Toxicológicas		
	Análise de cocaína em amostras de Cabelo		
	Código: POP 001	Revisão (1): 11/2017	Pág 8/8

64. Para obter a concentração em ng/mg de cabelo, multiplicar o valor obtido no item 63 por 10.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FERNÁNDEZ, P. et al. Use of High Performance Liquid Chromatography for the Determination of Cocaine and Benzoyllecgonine in Human Hair. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, [s.l.], v. 26, n. 12, p.2003-2012, jan. 2003. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1081/jlc-120021767>.

CLAUWAERT, Karine M. et al. Segmental analysis for cocaine and metabolites by HPLC in hair of suspected drug overdose cases. **Forensic Science International**. Bélgica, p. 157-166. fev. 2000.

Laboratório de Pesquisas Toxicológicas	Procedimento Operacional Padrão	
<u>Elaborado por:</u> Ana Caroline H. da Cruz	<u>Revisado por:</u> Maitê Perin	<u>Aprovado por:</u> Alcíbia Helena A Maia
<u>Frequência de revisão:</u> 12 meses	<u>Responsável pela atualização:</u> Maitê Perin	
<u>Meio de arquivamento:</u> eletrônico e físico (pasta geral de procedimentos própria do laboratório)		