

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

JOSÉ LUIZ DA COSTA

**Eletroforese capilar como ferramenta
analítica para toxicologia forense**

São Paulo
12/05/2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

JOSÉ LUIZ DA COSTA

**Eletroforese capilar como ferramenta analítica para
toxicologia forense**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do Título
de Doutor em Química (Química Analítica)*

*Orientadora: Profa. Dra. Titular Marina Franco Maggi Tavares
Co-Orientadora: Profa. Dra. Alice Aparecida. da Matta Chasin*

São Paulo
2008

José Luiz da Costa

Eletroforese capilar como ferramenta analítica para toxicologia forense

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do Título
de Doutor em Química (Química Analítica)*

Aprovado em: _____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

*Há um menino, há um moleque
Morando sempre no meu coração
Toda vez que o adulto balança
Ele vem pra me dar a mão*

*Há um passado no meu presente
Um sol bem quente lá no meu quintal
Toda vez que a bruxa me assombra
O menino me dá a mão*

*E me fala de coisas bonitas
Que eu acredito
Que não deixarão de existir
Amizade, palavra, respeito
Caráter, bondade alegria e amor
Pois não posso
Não devo
Não quero*

*Viver como toda essa gente insiste em viver
E não posso aceitar sossegado
Qualquer sacanagem ser coisa normal*

*Bola de meia, bola de gude
O solidário não quer solidão
Toda vez que a tristeza me alcança
O menino me dá a mão
Há um menino, há um moleque
Morando sempre no meu coração
Toda vez que o adulto fraqueja
Ele vem pra me dar a mão*

Milton Nascimento e Fernando Brant (1988)

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus avôs: Osmilda e Luiz Costa (in memoriam), Albertina (in memoriam) e José Ricci (in memoriam) pessoas de quem sempre me orgulhei muito. E estou certo que estiveram comigo desde sempre, principalmente nos momentos mais difíceis.

Agradecimentos

A Nossa Senhora Aparecida, que me protege, ilumina e guia em tudo na vida, principalmente nos estudos.

Aos meus pais Nelson e Teresa, e meus irmãos Thiago e Nathália, pelo apoio e amor incondicional.

A Erica, meu porto seguro. Por todo apoio e carinho que me deu nestes quatro anos de convivência/doutorado.

As professoras e amigas Marina Tavares e Alice Chasin, pelas oportunidades oferecidas, ensinamentos transmitidos, confiança depositada e pelo carinho que sempre dispensaram a mim.

Ao médico legista André Ribeiro Morrone, o capítulo 2 não teria sido possível sem sua dedicação e apoio. Agradeço

profundamente o que fez por este trabalho. Infelizmente, profissionais como você são cada vez mais raros.

Ao meu chefe e amigo Milton Sadawo que, assim como o André, se encantou e apoiou a idéia do humor vítreo desde a primeira vez em que lhe contei o tema desta tese.

Aos meus amigos de IQ/USP: Luiz (Porquinho), Rafael (Big Mac), Alexandre (Japonês), e à galera da Abadia dos Dourados e imediações: Igo (Naja), Rodrigo (Festa/Loko), Fernando (o Corvarde), Renato Lahos, José Antônio (Pernambuco), José Roberto (Zero), Israel (Peru) companheiros de bons momentos da vida.

E, como ensinou meu amigo Dr. Rodrigo Resende, tenho que agradecer principalmente ao povo brasileiro, que financiou minha formação da pré-escola até este título.

SUMÁRIO

RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	III
Capítulo 1: Introdução Geral	2
1.1. A Toxicologia Forense	2
1.2. A Eletroforese Capilar como ferramenta para Toxicologia Forense	5
1.2.1. A eletroforese capilar	5
1.2.2. Modos de separação em eletroforese capilar	13
1.2.3. Identificação de compostos por eletroforese capilar	18
1.3. Uso da eletroforese capilar para screening toxicológico	19
1.4. Referências Bibliográficas	26
Capítulo 2. Determinação de drogas de abuso em humor vítreo por eletroforese capilar com detecção por arranjo de diodos (CE-DAD).....	35
2.1. Introdução	35
2.1.1. Fluidos biológicos utilizados para caracterização da exposição humana a drogas de abuso	35
2.1.2. Métodos de extração e identificação de fármacos em material biológico.....	40
2.1.3. Fármacos e drogas de abuso de interesse forense	42
2.2. Objetivos	46
2.3. Materiais e métodos	47

2.3.1. Reagentes.....	47
2.3.2. Instrumentação analítica utilizada.....	49
<i>Eletroforese capilar com detecção por arranjo de diodos (CE/DAD)</i>	49
<i>Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS)</i> ...	50
2.3.4. Preparo de amostras.....	51
2.3.5. Validação dos métodos.....	52
2.4. Resultados e discussões	54
2.4.1. <i>Otimização da separação dos analitos por CE-DAD: a influencia de aditivos na separação eletroforética</i>	54
2.3.2. <i>Detecção dos analitos (detecção por arranjo de diodos)</i>	66
2.3.3. <i>Pré-concentração on-line dos analitos (stacking)</i>	70
2.3.4. Preparo de amostras.....	74
2.4. Conclusões	90
2.5. Referências bibliográficas	91
Capítulo 3. Método simples e rápido para determinação de cocaína e seus principais produtos de biotransformação por eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas	99
3.1. Introdução	99
3.1.1. <i>A cocaína, seus produtos de biotransformação e pirólise</i>	99
3.1.2. <i>Eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas (CE-MS)</i>	102
3.2. Objetivo	106
3.3. Materiais e métodos	106

3.3.1. Reagentes.....	106
3.3.2. Eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massas (CE-MS)	107
3.3.3. Preparo de amostras.....	108
3.3.4. Validação do método.....	109
3.4. Resultados e discussões	109
3.5. Conclusões	123
3.6. Referências bibliográficas	124

Capítulo 4. Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) em comprimidos de ecstasy por eletroforese capilar com detecção por arranjo de diodos (CE-DAD)

4.1. Introdução	129
4.2. Objetivo	132
4.3. Materiais e métodos	133
4.3.1. Reagentes.....	133
4.3.2. Instrumentação analítica	133
<i>Eletroforese capilar com detecção por arranjo de diodos (CE/DAD)</i>	133
<i>Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (HPLC/FD)</i>	134
4.3.4. Amostras de comprimidos de Ecstasy utilizadas.....	135
<i>Preparo das amostras</i>	137
4.3.5. Validação do método.....	137

4.4. Resultados e discussões	140
4.5. Conclusões	159
4.6. Referências bibliográficas	160
Capítulo 5. Considerações finais	165
SÚMULA CURRICULAR	168

RESUMO

Costa, J. L. **Eletoforese capilar como ferramenta analítica para toxicologia forense**. 2008. 170 p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química (Química Analítica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

No primeiro capítulo deste trabalho, são apresentados aspectos gerais sobre toxicologia forense e sobre a eletroforese capilar, onde se buscou mostrar como a técnica analítica pode ser útil para aplicações forenses.

O segundo capítulo apresenta o desenvolvimento de metodologia analítica baseada em eletroforese capilar com detecção por arranjo de diodos para determinação de drogas de abuso ou seus produtos de biotransformação em humor vítreo. Foram estudados parâmetros como a composição do eletrólito de corrida (com especial atenção ao fenômeno de eletrodispersão), pré-concentração *online* (*stacking*) e modo de extração dos analitos. Foi obtida completa separação eletroforética de 12 analitos investigados em menos de 10 minutos de corrida. Os parâmetros de confiança analítica do método mostraram este é perfeitamente aplicável às análises toxicológicas com finalidade forense.

O terceiro capítulo apresenta a elaboração de metodologia analítica baseada em eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massas para determinação de cocaína e cinco produtos de biotransformação em urina, com procedimento de preparo da amostra biológica simplificado. O procedimento desenvolvido apresentou sensibilidade adequada para verificação de intoxicações agudas por cocaína, e a espectrometria de massas acrescentou grande seletividade à análise, principalmente

quando a detecção foi realizada pela seleção do íon-pai e fragmentos gerados a 34% de energia de colisão.

O terceiro capítulo apresenta o desenvolvimento de método simples e rápido para determinação de MDMA em comprimidos de *Ecstasy* usando eletroforese capilar de zona. Na corrida eletroforética desenvolvida, é possível determinar a concentração de MDMA em menos de dois minutos (usando procaína com padrão interno). O método desenvolvido foi comparado ao utilizado rotineiramente no Núcleo de Análise Instrumental do Instituto de Criminalística de São Paulo, baseado em cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. O método eletroforético desenvolvido foi cinco vezes mais rápido do que o método de referência, permitindo maior produtividade sem que houvesse perda da qualidade do resultado.

Por fim, o capítulo 4 apresenta as considerações finais deste trabalho, onde se pode concluir que a eletroforese capilar, ainda que pouco utilizada em laboratórios forenses brasileiros, pode ser ferramenta de grande utilidade nas análises toxicológicas destinadas a esta finalidade.

Palavras Chave: eletroforese capilar, toxicologia forense, análises toxicológicas, espectrometria de massas, drogas de abuso.

ABSTRACT

Costa, J. L. **Capillary electrophoresis as analytical tool for forensic toxicology**. 2008. 170 p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry (Analytical Chemistry). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

In the first chapter of this thesis, general aspects on forensic toxicology and capillary electrophoresis are presented, aiming to show how the analytical technique can be useful for forensic applications.

The second chapter presents the development of analytical methodology based on capillary electrophoresis with diode array detection for determining drugs of abuse and/or their biotransformation products in vitreous humor. Parameters such as the composition of background electrolyte (with special attention to the phenomenon of electrodispersion), online pre-concentration (stacking) and sample preparation procedures were objects of study. The complete electrophoretic separation of 12 investigated analytes was obtained within 10 minutes of run. The validation parameters of the method have shown that this is perfectly applicable to toxicological analyses with forensic purposes.

The third chapter presents the elaboration of analytical methodology based on capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry for determining cocaine and five biotransformation products in urine, with simple sample preparation. The process developed presented adequate sensitivity for the verification of acute intoxications by cocaine, and mass spectrometry contributed with great selectiveness to the analysis, mainly when the detection was conducted by the selection of the molecular-ion and fragments generated at 34% of collision energy.

The fourth chapter presents the development of a simple and quick method for determining MDMA in tablets of Ecstasy using capillary zone electrophoresis. In the running condition, it is possible to determine the concentration of MDMA in less than two minutes (using procaine with internal standard). The method developed was compared with the one routinely used at Núcleo de Análise Instrumental do Instituto de Criminalística de São Paulo, based on high performance liquid chromatography with fluorescence detection. The electrophoretic method developed was five times faster than the reference one, allowing higher productivity without loss of quality in the result.

Finally, chapter five presents the final considerations of this thesis, where it is possible to conclude that capillary electrophoresis, even being little utilized in Brazilian forensic laboratories, can be a tool of great utility in toxicological analyses destined to this purpose.

Keywords: capillary electrophoresis, forensic toxicology, analytical toxicology, mass spectrometry, drugs of abuse.

Capítulo I:

Introdução Geral

*“You too can be a toxicologist in two
easy lessons, each of ten years.”*

Arnold Lehman (1955)

Capítulo 1: Introdução Geral

1.1. A Toxicologia Forense

Mathieu J. B. Orfila (1787-1853), médico espanhol que trabalhava para a corte francesa do século XIX, foi o primeiro toxicologista a utilizar materiais coletados durante sessões de necropsia, bem como a aplicar química analítica sistemática para comprovar cientificamente envenenamentos. Por sua enorme contribuição ao desenvolvimento da ciência, Orfila é conhecido como o “pai da toxicologia forense” (GALLO, 2001).

Ainda que atualmente as demais áreas da toxicologia tenham ganhado destaque e importância inquestionáveis, a toxicologia forense ainda é uma área desta ciência em franco desenvolvimento, uma vez que está sempre incorporando as novas tecnologias disponíveis na área analítica. Além desta modernização atrelada a avanços instrumentais, a toxicologia forense também se moderniza constantemente, pois novos “venenos” são descobertos diariamente, muitas vezes oriundos do modo de vida do homem moderno.

É impossível discutir a toxicologia forense sem antes discutir em detalhes a toxicologia analítica. A toxicologia analítica pode ser considerada a aplicação de técnicas inerentes à química analítica para identificação e/ou quantificação de substâncias que possam estar envolvidas em intoxicações de organismos vivos. Geralmente, a substância química que deve ser analisada (xenobiótico) é um analito presente em baixas concentrações em matrizes biológicas complexas, o que configura um grande desafio prático para o toxicologista analítico (POKLIS, 2001).

A toxicologia forense é uma manifestação clara de como a ciência e a legislação podem se sobrepor. Segundo o *American Board of Forensic Toxicology*, toxicologia forense é definida como “o estudo e aplicação prática da toxicologia com propósitos legais” (CRAVEY e BASELT, 2008). O termo forense remete imediatamente ao sistema judicial, as forças policiais e a tribunais, fornecendo uma visão e aplicação nova e diferente para a ciência *toxicologia*. Assim, pode ser definida como a aplicação da ciência toxicologia com propósitos legais. Ainda que esta definição envolva uma ampla faixa de aplicações, como a dopagem no esporte e os assuntos regulatórios, a principal característica da toxicologia forense é a identificação de substâncias químicas que possam estar relacionadas a um óbito ou dano à propriedade. Segundo Chasin (2001), a toxicologia forense trabalha com evidências em fluidos biológicos, diagnosticando intoxicações exógenas que podem estar relacionadas à práticas criminosas (CHASIN, 2001).

Os materiais disponíveis para análise forense são os mais diversos possíveis, o que aumenta muito o grau de dificuldade deste tipo de análise. Mesmo quando a matriz é conhecida (como por exemplo, sangue, urina, alimentos, resíduos de incêndio ou roupas), a quantidade de possíveis interferentes presentes no material encaminhado para exame é de grandeza ímpar. Por esta razão, as evidências examinadas em laboratórios forenses devem ser minuciosamente caracterizadas.

Assim como o químico analítico, o toxicologista forense tem sempre que escolher, entre as várias técnicas analíticas disponíveis, aquela que é mais conveniente (e factível) numa determinada análise toxicológica. Esta escolha deve ser embasada em critérios técnicos como a aplicabilidade, sensibilidade, seletividade, precisão e exatidão da técnica, além da disponibilidade e do custo da análise.

De um modo geral, para determinar a natureza e extensão do envolvimento de uma substância química (toxicante) em uma suposta intoxicação, deve-se seguir criteriosamente os passos abaixo (adaptado de Cravey e Baselt, 2008):

1. garantir que os procedimentos de coleta, transporte e armazenamento da amostra sejam adequados e rastreáveis;
2. isolar e identificar a substância no material (biológico) apropriado encaminhado para exame, utilizando técnicas analíticas adequadas;
3. atestar a ausência de outros possíveis toxicantes nas amostras analisadas;
4. quantificar a substância encontrada;
5. utilizar ensaios complementares para confirmação dos achados preliminares (quando necessário);
6. elaborar laudo que contenha, além dos resultados qualitativos e quantitativos, informações referentes aos métodos de análise utilizados, no que diz respeito à sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade do ensaio;
7. interpretar os achados laboratoriais, levando em consideração o tipo de substância envolvida na intoxicação, sua concentração no material analisado e qual seria a relação desta concentração com alterações de comportamento ou do estado de saúde do indivíduo;
8. quando possível, fornecer informações com relação a possível dose administrada, a via de introdução utilizada, a frequência de uso ou outros fatores

relacionados à exposição. Estas informações devem ser embasadas principalmente na toxicocinética e toxicodinâmica da substância encontrada;

9. apresentar uma conclusão final sobre a análise realizada, atrelando os resultados laboratoriais e as inferências toxicológicas com o histórico do caso periciado.

A comprovação de uma intoxicação, acidental ou intencional, requer do toxicologista forense além do conhecimento profundo de química analítica, bom domínio em fisiologia, farmacologia e principalmente toxicologia básica, para que os achados laboratoriais sejam interpretados de modo adequado e o laudo pericial seja conclusivo, pois só desta maneira todo procedimento analítico-pericial será útil para execução da justiça.

1.2. A Eletroforese Capilar como ferramenta para Toxicologia Forense

1.2.1. A eletroforese capilar

A eletroforese capilar (CE) é uma técnica de separação em fase líquida que se baseia na migração diferencial de espécies iônicas ou ionizáveis quando as mesmas são submetidas a um campo elétrico (TAVARES, 1996).

Nos últimos anos, a eletroforese capilar tem sido reconhecida como uma das maiores inovações na área de separações, com aplicação em diversos campos da química analítica. As publicações de Everaerts (1979) e de Jorgenson (1981) são comumente citadas como ponto inicial da eletroforese capilar moderna (MIKKERS et al., 1979; JORGENSON e LUKACS, 1981). Desde então, os instrumentos

comerciais de CE se desenvolveram e o número de aplicações e publicações que utilizam a técnica têm aumentado progressivamente.

Esta evolução e popularização da CE no meio científico pode ser observada também em sua aplicação à toxicologia forense. Até sua segunda edição, a obra *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons* - mais importante referência bibliográfica do toxicologista forense, não mencionava a CE em nenhum de seus capítulos. Já em sua última edição, publicada em 2003, a obra foi enriquecida com um capítulo dedicado exclusivamente à eletroforese capilar e suas aplicações na análise de fármacos, drogas e praguicidas (PERRETT, 2003).

O potencial desta técnica para análises forenses foi demonstrado pela primeira vez em 1991 por Weinberger e Lurie que aplicaram a CE para separação de uma ampla faixa de drogas de abuso ilícitas (WEINBERGER e LURIE, 1991; ANASTOS et al., 2005).

A CE apresenta-se como técnica analítica complementar à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e à cromatografia gasosa (GC). A Tabela 1.1. apresenta uma comparação racional entre estas três técnicas de separação. Deve-se ressaltar que a CE pode oferecer vantagens significativas sobre as técnicas cromatográficas: requer pequeno volume de amostra (apenas alguns μL), pode utilizar detecção por absorção da luz ultravioleta em comprimentos menores do que 200 nm sem que haja aumento de ruído ou *drift* de linha de base (problema comum em HPLC), além de permitir a análise de uma vasta gama de compostos desde íons até macromoléculas utilizando a mesma coluna capilar. Os instrumentos de CE e HPLC convencionais (utilizando detectores ópticos) possuem custo equivalente, mas o custo operacional é significativamente menor na CE, principalmente pelo baixo

consumo de solventes e com o baixo custo das colunas capilares (PERRETT, 2003; PICÓ et al., 2003; ANASTOS et al., 2005).

Tabela 1.1. Comparação entre as principais técnicas de separação utilizadas em toxicologia forense (adaptado de PICO et al., 2003).

Técnica	Vantagens	Desvantagens	Soluções
GC	<ul style="list-style-type: none"> - Alta capacidade de separação dos picos; - Alta sensibilidade e seletividade. 	<ul style="list-style-type: none"> - Inadequada para análise de compostos polares, termolábeis e de baixa volatilidade; - Consumo de gases de alta pureza 	<ul style="list-style-type: none"> - Uso de reações de derivatização.
HPLC	<ul style="list-style-type: none"> - Permite a análise de compostos orgânicos, mesmo os termoinstáveis; - Maior flexibilidade para otimização das separações, por permitir a variação tanto da fase móvel quanto da fase estacionária; - Facilidade de automação e acoplamento a sistemas de preparo de amostras “online”. 	<ul style="list-style-type: none"> - Menor capacidade de separação; - Grande consumo de solventes orgânicos; - Elevado custo operacional (exige o uso de colunas e solventes caros de alta pureza). 	<ul style="list-style-type: none"> - Desenvolvimento de colunas analíticas mais eficientes e de menor tamanho, permitindo melhores separações e menor consumo de solventes.
CE	<ul style="list-style-type: none"> - Alta capacidade de separação; - Baixo consumo de solventes; - Menor necessidade de preparo de amostras. 	<ul style="list-style-type: none"> - Baixa sensibilidade. 	<ul style="list-style-type: none"> - Preparo de amostras com etapa de pré-concentração; - Uso de procedimentos eletroforéticos de pré-concentração “online”; - Utilização de detectores altamente seletivos (como os detectores de fluorescência induzida a laser ou espectrômetros de massas).

Um aspecto bastante importante da eletroforese capilar é a simplicidade da instrumentação. A Figura 1.1 esquematiza um equipamento de eletroforese capilar, composto por uma fonte de alta tensão, capilares (normalmente de sílica fundida), eletrodos (geralmente de platina), um detector apropriado e um computador para o tratamento de dados.

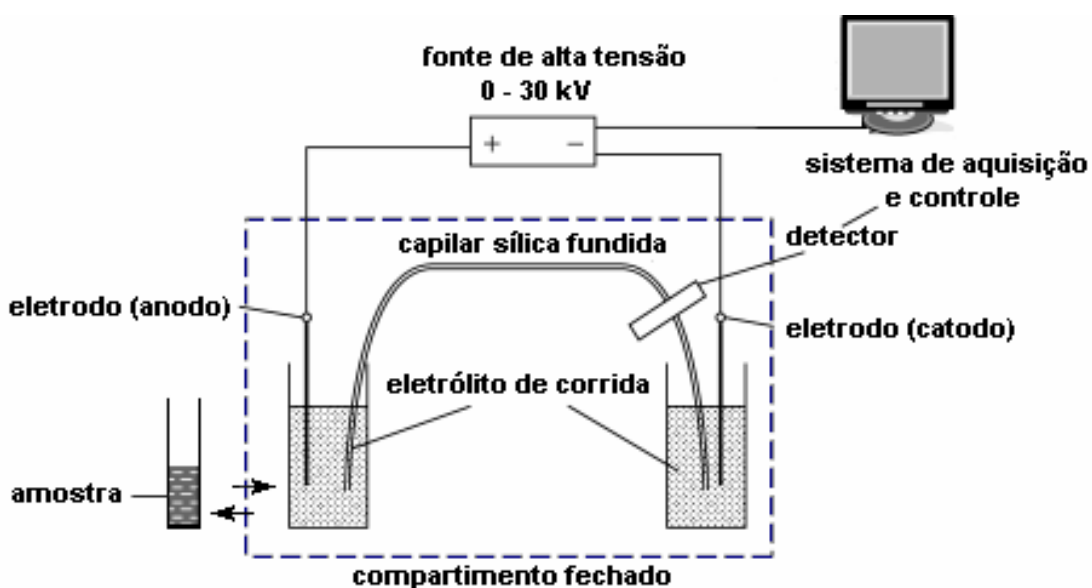


Figura 1.1. Representação esquemática de um equipamento de eletroforese capilar.

A fonte de alta tensão é usada para estabelecer um campo elétrico ao longo do capilar. As fontes, em geral, podem ser operadas à tensão constante ou corrente constante, com valores que variam de 0 – 30 kV e de 0 – 300 μ A, respectivamente. O capilar é mantido durante a separação a uma temperatura constante através da circulação de um líquido refrigerante ou por passagem de ar forçado. A injeção da amostra no capilar pode ser feita hidrodinamicamente, através da criação de um gradiente de pressão entre os reservatórios da amostra e do eletrólito de corrida,

enquanto as extremidades do capilar estão mergulhadas nestes reservatórios. Utilizando a injeção eletrocinética, um determinado valor de potencial é aplicado entre os reservatórios da amostra e eletrólito durante um intervalo de tempo definido, enquanto que a extremidade apropriada do capilar é inserida no reservatório da amostra, ao passo que a outra extremidade é colocada no reservatório do eletrólito de corrida (SILVA et al., 2007). A aquisição dos dados é feita através de um sistema interfaceado a um computador, responsável pela conversão do sinal analógico a digital.

As separações em eletroforese capilar são conduzidas em tubos de dimensões capilares, preenchidos com eletrólito condutor, e submetidos à ação de um campo elétrico. A utilização de capilares de sílica fundida proporciona algumas vantagens frente a outros meios utilizados em eletroforese (placas de gel, papel). Devido à relação entre a área superficial interna e volume apreciavelmente grande, o capilar possibilita a dissipação mais eficiente do calor gerado pela passagem de corrente elétrica (efeito Joule). A alta resistência elétrica do capilar possibilita o estabelecimento de campos elétricos elevados (100 a 500 V/cm), o que resulta em separações de alta eficiência, muitas vezes excedendo 10^5 pratos (PERRETT, 2003). Outras vantagens que podem ser citadas são: o volume de amostra necessário para análises é relativamente pequeno (1 a 10 nL, volume injetado), possibilidade de injeção e detecção em fluxo (TAVARES, 1996; PERRETT, 2003).

A utilização de capilares de sílica fundida na execução da técnica introduziu uma importante peculiaridade: a geração do chamado fluxo eletrosmótico. Este fluxo é consequência de uma interação entre a solução e as paredes do capilar. Quimicamente, a sílica fundida é caracterizada pela presença de vários tipos de grupo silanol (SiOH), os quais apresentam caráter ácido. Em contato com uma

solução aquosa, alguns desses grupos são dissociados e por isso a superfície do capilar torna-se negativamente carregada, gerando um saldo positivo de espécies carregadas positivamente no seio da solução. Quando um campo elétrico é imposto tangencialmente à superfície, forças elétricas causam um movimento unilateral de íons em direção ao eletrodo de carga oposta. Durante a migração, os íons transportam moléculas de água, induzindo o fluxo da solução como um todo, na direção do cátodo, conhecido como fluxo eletrosmótico normal (TAVARES, 1996; SILVA et al., 2007).

A existência do fluxo eletrosmótico tem importantes implicações na eletroforese capilar. Quando a velocidade eletrosmótica é de grande magnitude, o fluxo é responsável pela condução dos solutos, sem distinção de carga, em direção ao detector. Assim, a análise simultânea de amostras contendo tanto analitos catiônicos e neutros como aniônicos é possível, muito embora não haja discriminação temporal entre diferentes analitos neutros (TAVARES, 1996). Os analitos neutros requerem interações adicionais com espécies carregadas que os transportam até o detector.

Além disso, as características de alta eficiência da técnica estão, em parte, vinculadas ao perfil radial da velocidade eletrosmótica, pois sendo linear o mesmo componente de velocidade é adicionado a todos os analitos, independentemente de sua posição radial no interior do capilar. Esta peculiaridade distingue a eletroforese capilar dos demais métodos cromatográficos em fase líquida em coluna, que apresentam um perfil de velocidade parabólico, característico do fluxo induzido por pressão (Figura 1.2).

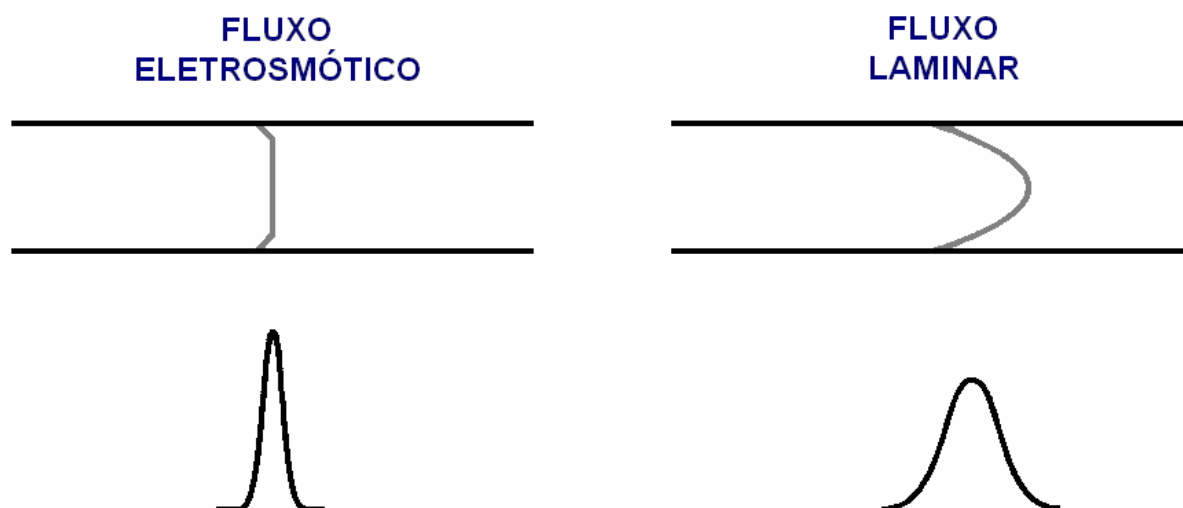


Figura 1.2. Perfil de velocidade radial para fluxo induzido por um campo elétrico (eletrosmótico) e um fluxo induzido por pressão (laminar), e correspondente efeito na variância da distribuição [Adaptado de Tavares (1996)].

Idealmente, efeitos de dispersão da zona durante a separação deveriam ocorrer apenas devido à difusão longitudinal. Entretanto, eletrodispersão (causada pelas diferenças de condutividade entre as zonas do eletrólito e da amostra), bem como os gradientes de temperatura no interior do capilar podem causar efeitos adicionais de alargamento das bandas. O tipo de técnica de introdução de amostra, volume injetado em excesso, tipo de matriz e fenômeno de adsorção na parede do capilar podem vir a ser fontes adicionais de alargamento das bandas. O controle da temperatura do capilar de separação, a escolha apropriada do tampão de corrida, as técnicas de tratamento da superfície do capilar, o tipo de amostra e o modo como é injetada podem ser cruciais para o sucesso de uma separação particular (SILVA et al., 2007). Considerações sobre o fenômeno da eletrodispersão serão feitas com maior detalhe no próximo capítulo.

1.2.2. Modos de separação em eletroforese capilar

Durante décadas passadas, a eletroforese capilar e suas muitas variantes têm demonstrado serem técnicas de grande poder de separação.

Eletroforese Capilar de Zona (CZE)

É a técnica de separação efetuada em capilares e baseada somente nas diferenças entre as mobilidades de espécies carregadas (analitos), em eletrólitos que podem ser aquosos ou orgânicos. Estes podem conter aditivos, como ciclodextrinas, complexantes ou ligantes, que interagem com os analitos e alteram suas mobilidades eletroforéticas (SILVA et al., 2007).

A CZE é um dos modos de separação eletroforética mais usados na prática, provavelmente em razão da facilidade de sua implementação, e otimização das condições experimentais. Em CZE, o tubo capilar é simplesmente preenchido com um eletrólito, geralmente com características tamponantes. A separação ocorre como resultado de duas estratégias: maximizar as diferenças entre as mobilidades efetivas dos solutos e minimizar as causas de alargamento das zonas.

As equações discutidas a seguir são aplicáveis à eletroforese capilar de zona praticada em capilares de sílica fundida.

Quando uma espécie carregada eletricamente é exposta a um campo elétrico, essa migra com velocidade (v_i) característica que é proporcional ao campo elétrico aplicado (E) e a soma das mobilidades eletroforéticas do analito (μ_{ep}) e do fluxo eletrosmótico (μ_{eof}), como mostra a Equação 1.1.

$$v_i = (\mu_{ep} + \mu_{eof}) E \quad [1.1]$$

Para soluções de eletrólitos compostos de um ácido ou base fracos, existem pelo menos duas espécies em equilíbrio, a molécula não ionizada (com mobilidade zero), e a base ou ácido conjugado, cada qual com um valor particular de mobilidade. Assim, da mesma forma que os íons simples são caracterizados por um valor de mobilidade iônica, o conceito de mobilidade efetiva é utilizado para descrever a migração de eletrólitos fracos. A mobilidade eletroforética efetiva (μ_{ef}) de um analito é dada pela somatória das mobilidades eletroforéticas (μ_j) de todas as n espécies relacionadas entre si por equilíbrios químicos, multiplicadas pela distribuição destas espécies (α_j):

$$\mu_{ef} = \sum_{j=1}^n \alpha_j \cdot \mu_j \quad [1.2]$$

A equação acima mostra que a mobilidade efetiva depende diretamente do grau de dissociação do composto que se apresente em equilíbrio ácido-base num dado pH. Por exemplo, a cocaína apresenta pKa igual a 8,6 - em uma solução aquosa de pH igual a este valor, metade das moléculas presentes na solução estarão dissociadas e por isso terão mobilidade, e as moléculas que estiverem não dissociadas não migraram. Assim, a mobilidade efetiva desta substância será 50% do valor de sua mobilidade iônica (se todas as espécies estivessem dissociadas).

A equação tradicional que descreve o tempo de migração em CZE pode ser escrita como:

$$t_i = \frac{L_{ef} \cdot L_{tot}}{(\mu_{ep} + \mu_{eof}) \cdot V} \quad [1.3]$$

Onde V é a diferença de potencial aplicada, L_{tot} é o comprimento do capilar, e o L_{ef} é a distância do ponto de injeção à posição do detector.

Cromatografia eletrocinética micelar (MEKC)

A cromatografia eletrocinética micelar (MEKC) foi introduzida por Terabe e colaboradores em 1984, voltada para separação de misturas contendo solutos neutros. Em MEKC, agentes tensoativos iônicos (dodecilsulfato de sódio – SDS), em condições favoráveis a formação de micelas são adicionados ao eletrólito de corrida, proporcionando um sistema cromatográfico de duas fases. Desse modo o eletrólito representa a fase primária, a qual é transportada eletrosmoticamente pela ação do campo elétrico, enquanto que as micelas que representam a fase secundária, são transportadas pela combinação da eletroforese e eletrosmose. A partição diferenciada de solutos neutros entre as duas fases é responsável pela seletividade da separação (SILVA et al., 2007).

Eletroforese Capilar em gel (CGE)

Esta técnica é muito utilizada na separação de proteínas e DNA, por diferenças de tamanho relativo. A separação ocorre preenchendo-se o capilar com uma matriz polimérica. A grande vantagem sobre a eletroforese clássica em placas é a obtenção de resultados quantitativos mais exatos, tempo de análise reduzido e a possibilidade de automação do processo (SILVA et al., 2007).

Eletrocromatografia capilar (CEC)

A eletrocromatografia capilar é uma técnica recente de separação que combina as vantagens da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com a eletroforese capilar. Nesta técnica, o transporte do solvente (fase móvel) é feito através do fluxo eletrosmótico ao longo da coluna. Os capilares utilizados para esse tipo de separação são recheados com uma fase estacionária, como C18 (octadecilsílica), monólitos, etc. (SILVA et al., 2007).

Isotacoforese capilar (CITP)

A isotacoforese é uma técnica em que são empregados dois tipos de eletrólito. Os solutos ficam confinados entre duas regiões compostas por estes eletrólitos. O primeiro eletrólito, que apresenta mobilidade eletroforética maior que todos os componentes da amostra é chamado de eletrólito líder. O segundo eletrólito, que apresenta mobilidade eletroforética menor que todos os componentes da amostra é conhecido como eletrólito terminador. Quando o potencial é aplicado

cria-se um estado estacionário no qual as zonas dos analitos migram em ordem decrescente de mobilidade, mas com velocidade constante e única. Outro aspecto importante é que todas as zonas adotam a concentração do eletrólito líder. Desse modo esse fenômeno pode ser utilizado para concentração de amostras no capilar (SILVA et al., 2007).

Focalização isoelétrica (CIEF)

Técnica eletroforética para separação de analitos anfóteros de acordo com seu ponto isoelétrico, através da aplicação de um campo elétrico ao longo de um gradiente de pH gerado no capilar (SILVA et al., 2007).

1.2.3. Identificação de compostos por eletroforese capilar

A identificação de xenobióticos por CE pode ser realizada de modo análogo ao que ocorre para as técnicas cromatográficas, ou seja, por comparação entre o tempo de migração do analito presente na amostra contra o fornecido por padrões analíticos injetados previamente. Pode ser utilizada também a migração relativa do analito frente a um padrão interno (tempo de migração relativo), opção mais reprodutível. Alternativamente, pode-se utilizar ainda a mobilidade eletroforética.

O uso de detectores espectrométricos, como o detector por arranjo de diodos ou espectrômetros de massas, contribuiu muito para a confiabilidade do dado qualitativo, por agregar ao tempo de migração outros importantes parâmetros de identificação de compostos orgânicos, os espectros de absorção UV/Visível e de massas, respectivamente. O uso destes sistemas de detecção e suas características principais serão discutidos com maiores detalhes nos capítulos seguintes. Além do uso de detectores espectrométricos, pode-se ainda lançar mão de reações de derivatização para magnificar alguma característica estrutural importante do analito investigado, procedimento também muito utilizado em cromatografia de fase gasosa e líquida (PERRETT, 2003; LANDERS, 2008).

Atualmente, a literatura científica internacional tem dado grande destaque ao acoplamento da eletroforese capilar à espectrometria de massas, que após longo período de desenvolvimento tecnológico, vem sendo aplicada a várias situações de diagnóstico clínico e forense (ANASTOS et al., 2005; GOTTARDO, BORTOLOTTI et al., 2007; GOTTARDO, FANIGLIULO et al., 2007; LANDERS, 2008; TAGLIARO e BORTOLOTTI, 2008). A hifenização entre eletroforese capilar e a espectrometria de massas será discutida com maior detalhe no capítulo 3 deste trabalho.

1.3. Uso da eletroforese capilar para screening toxicológico

Métodos de *screening* em análises toxicológicas, ou seja, procedimentos analíticos de triagem com capacidade para identificar grande número de substâncias (ou seus produtos de biotransformação) possivelmente envolvidas em uma intoxicação, são ferramentas de inquestionável valia em laboratórios forenses (VANHOENACKER et al., 2004).

A cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos é uma das técnicas mais comumente utilizadas para esta finalidade, por permitir análise de compostos polares e apolares, termolábeis e por fornecer informação espectral dos xenobióticos presentes no material (importante para identificação da substância, como será discutido nos próximos capítulos deste trabalho) (KUPIEC et al., 2003). O uso da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em métodos de *screening* toxicológico tem se difundido muito nos últimos anos, por aliar a versatilidade da cromatografia líquida à seletividade e sensibilidade da espectrometria de massas, por vezes sendo consideravelmente mais útil em laboratórios forenses do que a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (WEINMANN et al., 1999; MARALIKOVA e WEINMANN, 2004).

Devido a alta velocidade da análise, alta eficiência de separação, baixo consumo de solventes e amostras, a eletroforese capilar vem se tornando ferramenta popular em laboratórios forenses. Hudson e colaboradores (1995) desenvolveram um procedimento racional para *screening* de mais de 400 substâncias de caráter básico (fármacos, drogas de abuso e produtos de biotransformação) em amostras de sangue total (HUDSON et al., 1995). Posteriormente os autores ampliaram esta lista para 550 substâncias básicas e mais 100 de características

ácidas (HUDSON et al., 1998). Tagliaro e colaboradores (1998) publicaram um importante trabalho de revisão da literatura a respeito do uso da CE para análise de drogas lícitas e ilícitas de interesse forense em fluidos biológicos (TAGLIARO et al., 1998b). A Tabela 1.2 mostra algumas aplicações da eletroforese capilar na análise de drogas de abuso e outros xenobióticos de interesse forense.

Já a Tabela 1.3 apresenta cinco configurações de métodos para eletroforese capilar, que quando utilizados em conjunto podem possibilitar a análise de uma vasta gama de xenobióticos de diferentes classes químicas e/ou farmacológicas. Nos sistemas propostos nesta tabela, considerou-se que a substância que será analisada absorve a luz ultravioleta (detecção direta). Para substâncias desprovidas de grupamentos cromóforos é necessário uso de detecção indireta (TAVARES, 1996).

Tabela 1.2. Aplicações da eletroforese capilar na análise de drogas de abuso e outros xenobióticos de interesse forense.

Compostos	Matriz analisada	Modo de CE	Eletrólito utilizado	Limite de detecção	Referência
MDMA e MDA	urina e comprimidos	CZE-LIF (quiral)	T. fosfato 50 mmol/L (pH 3,0), 50 mmol/L β -CD, 3mol/L uréia	ND	(HUANG et al., 2003)
anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA, MBDB	comprimidos	CZE-DAD	T. fosfato 100 mmol/L (pH 3,0) ajustado com trietanolamina	ND	(PIETTE e PARMENTIER, 2002)
MDMA, MDA, HMMA	plasma e urina	CZE-DAD (quiral)	T. fosfato 50 mmol/L (pH 3,0), 10 mmol/L (2-hidroxi)propil- β -CD	11-33 ng/mL	(PIZARRO, NIEVES et al., 2002)
MDMA	urina	NACE-LIF	Colato de sódio 100 mmol/L, acetato de amônio 20 mmol/L em formamida:metanol (30:70, v/v)	50 ng/mL	(FANG et al., 2002)
anfetamina e morfina	urina	CE-MS	Acetato de amônio 20 mmol/L	10 ng/mL	(TSAI et al., 2000)
anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, metadona, 2-etilideno-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina (EDDP)	urina	CZE-UV e CE-MS	Acetato de amônio 20 mmol/L, ácido acético 20 mmol/L (pH 4,6)	50-200 ng/mL	(RAMSEIER et al., 2000)
codeína, dihidrocodeína, dihidromorfina, morfina, norcodeína, normorfina, nordihidrocodeína, nordihidromorfina	urina	CE-MS	Acetato de amônio 20 mmol/L (pH 9,0)	100-200 ng/mL	(WEY e THORMANN, 2001)
imipramina, desipramina, amitriptilina, nortriptilina	plasma e comprimidos	NACE-DAD	Acetato de amônio 50 mmol/L, ácido acético 1 mol/L em acetonitrila	20-30 ng/mL	(CANTÚ et al., 2004)
GHB	urina	CZE-deteção indireta	Ácido nicotínico 4 mmol/L, espermina 3 mmol/L, pH ajustado para 6,2 com histidina	2-24 μ g/mL	(BALDACCI et al., 2003)
GHB	urina e plasma	CZE-deteção indireta	Na_2HPO_4 5,0 mmol/L, barbital sódico 15 mmol/L, pH ajustado para 12 com NaOH	3 μ g/mL	(BORTOLOTTI et al., 2004)

Tabela 1.2. Continuação

Compostos	Matriz analisada	Modo de CE	Eletrólito utilizado	Limite de detecção	Referência
GHB	urina	CE-MS	Formiato de amônio 12,5 mmol/L, pH ajustado para 8,35 com dietilamina	5-20 µg/mL	(GOTTARDO et al., 2004)
Codeína, norcodeína, heroína, morfina, normorfina, 6-monoacetilmorfina	urina	CZE-UV CZE-LIF	T. borato 20 mmol/L, 10% isopropanol, 10% acetonitrila, 20 mmol/L β-CD	200 ng/mL (CZE-UV) 50-100 pg/mL (CZE-LIF)	(ALNAJJAR et al., 2004)
(-)-cocaína HCl, (+)-cocaína base, (-)-pseudococaína, (+)-pseudococaína	folhas de coca	CZE-DAD	T. fosfato 10 mmol/L (pH 3,0), 1% CD-sulfatada, 10% metanol	ND	(CABOVSKA et al., 2003)
feniletilamina, anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, efedrina, MBDB, MDEA, cocaína, heroína	drogas apreendidas	CZE-DAD	TRIS/fosfato 30 mmol/L (pH 2,8)	ND	(DAHLE´N e ECKARDSTEIN, 2006)
canabinol, canabidiol, Δ ⁹ -tetraidrocanabinol, ácido carboxílico 11-nor-Δ ⁹ -tetraidrocanabinol	cabelo	NACE-ED	NaOH 5 mmol/L em acetonitrila:metanol (1:1)	37 ng/mL	(BACKOFEN et al., 2002)
cocaína, prilocaína, cinchocaína, bupivacaína, mepivacaína, lidocaína, cetamina	soluções padrão	MEEKC-DAD	T. borato 10 mmol/L (pH 9,0), 50 mmol/L octano, 80 mmol/L SDS, 800 mmol/L 1-butanol	ND	(CHERKAOUI e VEUTHEY, 2002)
nitrazepam, oxazepam, alprazolam, flunitrazepam, temazepam, diazepam, 7-aminoflunitrazepam, 7-aminonitrazepam 7-aminoclonazepam	bebidas	CZE-DAD	Fosfato de amônio 25 mmol/L (pH 2,5)	2,7-41,5 µg/mL	(WEBB et al., 2007)
15 benzodiazepínicos	soluções padrão	CE-MS	Ácido cítrico 20 mmol/L (pH 2,5) com 15% metanol	5x10 ⁻⁷ à 4x10 ⁻⁶ mol/L	(MCCLEAN et al., 2000)

Legenda: LIF: fluorescência induzida à laser; ED: detecção eletroquímica; NACE: eletroforese capilar em meio não-aquoso; MEEKC: cromatografia electrocinética micelar por microemulsão; HMMA: 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina; GHB: ácido gama-hidroxibutírico. As demais siglas são explicadas ao longo do texto.

Tabela 1.3. Sistemas recomendados para *screening* de fármacos, drogas de abuso e produtos de biotransformação por eletroferese capilar⁺ [adaptado de Perret (2003)].

Composição	pH	Condições eletroforéticas			Analitos detectáveis
		Modo	Tensão aplicada (kV)	Temperatura (°C)	
Fosfato de sódio 25 mmol/L	2.5	CZE	25–30	25	Compostos hidrossolúveis de caráter básico
Tetraborato de sódio 20 mmol/L	9.2	CZE	20–25	25	Compostos hidrossolúveis de caráter ácido
Tetraborato de sódio 20 mmol/L + SDS 50 mmol/L	9.2	MEKC	15–25	20	Compostos ácidos, básicos e neutros hidrossolúveis e pouco solúveis
Tetraborato de sódio 20 mmol/L + SDS 50 mmol/L + 5 mmol/L β-ciclodextrina	9.2	CD-MEKC	18–22	25	Compostos ácidos, básicos e neutros hidrossolúveis e pouco solúveis
Metanol e acetonitrila em diferentes proporções,	**	NACE	20–30	25	Compostos apolares

⁺Outras condições: capilar de sílica fundida 50 μm × 48 cm (40 cm efetivo), injeção hidrodinâmica 50 mbar/3s, detecção em 195 nm.

** Ajuste de pH de acordo com o analito. Legenda: CZE: eletroforese capilar de zona; MEKC / CD-MEKC: cromatografia eletrocínica micelar; NACE: eletroforese capilar em meio não-aquoso; SDS: dodecil sulfato de sódio.

Tagliaro et al (1996) compararam dois sistemas de eletroforese capilar de zona (tampão borato 25 mmol/L pH=9,24 e tampão fosfato 50 mmol/L pH 2,35) e a cromatografia eletrocinética micelar (tampão borato 25 mmol/L pH 9,24 contendo SDS 100 mmol/L - metanol, 80:20) para análise de vinte fármacos e drogas de abuso de interesse forense. Os autores argumentam que, considerando que a CZE é baseada exclusivamente em separação eletroforética e a MEKC alia este princípio a interações com fases pseudo-estacionárias, em processos por vezes semelhantes à cromatografia líquida de fase reversa, estes modos eletroforéticos seriam ortogonais o suficiente para serem utilizados como modos complementares de análise. Os autores observaram grande falta de correlação entre os perfis de separação/migração dos analitos no sistema CZE-fosfato e MEKC (entre os tempos de migração dos analitos, usando teste de Spearman e análise de componentes principais), sugerindo que esta independência pode ser usada para confirmação de resultados, se os sistemas forem utilizados em conjunto. Já os sistemas CZE-borato e MEKC apresentaram perfis de separação migração pouco diferentes, tendo ortogonalidade menor e por isso menor aplicação na identificação em um *screening* toxicológico (TAGLIARO et al., 1996).

Lurie, Hays e Parker (2004) apresentaram método para *screening* de diversas substâncias de diferentes classes de drogas de abuso e grupos químicos (derivados anfetamínicos, cocaína, opiáceos, opióides, LSD, GHB, GBL) mudando apenas o eletrólito de corrida. As amostras de drogas de abuso apreendidas eram preparadas por diluição e agitação em banho ultrassônico, transferidas para *vials* de polipropileno e injetadas de modo seqüencial e automático em oito condições eletroforéticas diferentes. Com este procedimento padronizado, os autores afirmam

ser possível identificar várias substâncias ativas em drogas apreendidas utilizando o mesmo tubo capilar (LURIE et al., 2004).

1.4. Referências Bibliográficas

ALNAJJAR, A.; J. A. BUTCHER ; B. MCCORD. Determination of multiple drugs of abuse in human urine using capillary electrophoresis with fluorescence detection. **Electrophoresis**, v.25, n.10-11, p.1592-1600. 2004.

ANASTOS, N.; N. W. BARNETT ; S. W. LEWIS. Capillary electrophoresis for forensic drug analysis: A review. **Talanta**, v.67, p.269–279. 2005.

BACKOFEN, U.; F. M. MATYSIK ; C. E. LUNTE. Determination of cannabinoids in hair using high-pH* non-aqueous electrolytes and electrochemical detection - Some aspects of sensitivity and selectivity. **J. Chromatogr. A**, v.942, n.1-2, p.259-269. 2002.

BALDACCI, A.; R. THEURILLAT; J. CASLAVSKA; H. PARDUBSKÁ; R. BRENNEISEN ; W. THORMANN. Determination of gamma-hydroxybutyric acid in human urine by capillary electrophoresis with indirect UV detection and confirmation with electrospray ionization ion-trap mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v.990, p.99–110. 2003.

BORTOLOTTI, F.; G. DE PAOLI; R. GOTTARDO; M. TRATTENE ; F. TAGLIARO. Determination of gamma-hydroxybutyric acid in biological fluids by using capillary electrophoresis with indirect detection. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.800, n.1-2, p.239-244. 2004.

CABOVSKA, B.; A. B. NORMAN ; A. M. STALCUP. Separation of cocaine stereoisomers by capillary electrophoresis using sulfated cyclodextrins. **Anal. Bioanal. Chem.**, v.376, n.1, p.134-137. 2003.

CANTÚ, M. D.; S. HILLEBRAND; M. E. C. QUEIROZ; F. M. LANÇAS ; E. CARRILHO. Validation of non-aqueous capillary electrophoresis for simultaneous determination of four tricyclic antidepressants in pharmaceutical formulations and plasma samples. **J. Chromatogr. B**, v.799, p.127-132. 2004.

CHASIN, A. A. M. Parâmetros de confiança analítica e irrefutabilidade do laudo pericial em toxicologia forense. **Rev. Bras. Toxicol.**, v.14, n.1, p.40-46. 2001.

CHERKAOUI, S. ; J.-L. VEUTHEY. Micellar and microemulsion electrokinetic chromatography of selected anesthetic drugs. **J. Sep. Sci.** , v.25, p.1073–1078. 2002.

CRAVEY, R. H. ; R. C. BASELT. An introduction to forensic toxicology - the science of forensic toxicology. Disponível em: <<http://www.soft-tox.org/default.aspx?pn=Introduction>>. Acesso em: 17 abril 2008.

DAHLE´N, J. ; S. V. ECKARDSTEIN. Development of a capillary zone electrophoresis method including a factorial design and simplex optimisation for analysis of amphetamine, amphetamine analogues, cocaine, and heroin. **Forensic Sci. Int.**, v.157, p.93-105. 2006.

FANG, C.; Y.-L. CHUNG; J.-T. LIU ; C.-H. LIN. Rapid analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine: a comparison of nonaqueous capillary electrophoresis/fluorescence detection with GC/MS. **Forensic Sci. Int.**, v.125, p.142–148. 2002.

GALLO, M. A. History and scope of toxicology. In: C. D. KLAASSEN (Ed.). **Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons**, 2001. 1, p.2-10.

GOTTARDO, R.; F. BORTOLOTTI; G. DE PAOLI; J. P. PASCALI; I. MIKSIK ; F. TAGLIARO. Hair analysis for illicit drugs by using capillary zone electrophoresis-electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v.1159, n.1-2, p.185-189. 2007.

GOTTARDO, R.; F. BORTOLOTTI; M. TRETTENE; G. DE PAOLI ; F. TAGLIARO. Rapid and direct analysis of gamma-hydroxybutyric acid in urine by capillary electrophoresis-electrospray ionization ion-trap mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v.1051, n.1-2, p.207-211. 2004.

GOTTARDO, R.; A. FANIGLIULO; F. BORTOLOTTI; G. DE PAOLI; J. P. PASCALI ; F. TAGLIARO. Broad-spectrum toxicological analysis of hair based on capillary zone electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v.1159, n.1-2, p.190-197. 2007.

HUANG, Y.-S.; J.-T. LIU; L.-C. LIN ; C.-H. LIN. Chiral separation of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and related compounds in clandestine tablets and urine samples by capillary electrophoresis/fluorescence spectroscopy. **Electrophoresis**, v.24, p.1097-1104. 2003.

HUDSON, J. C.; M. GOLIN; M. MALCOLM ; C. F. WHITING. Capillary zone electrophoresis in a comprehensive screen for drugs of forensic interest in whole blood: an update. **Can. Soc. Forens. Sci. J.**, v.31, n.1. 1998.

HUDSON, J. C.; M. GOLIN ; M. MALCOM. Capillary zone electrophoresis in a comprehensive screen for basic drugs in whole blood. **Can. Soc. Forens. Sci. J.**, v.28, n.2, p.137-152. 1995.

JORGENSON, J. W. ; K. D. LUKACS. Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries. **Anal. Chem.**, v.53, p.1034-1043. 1981.

KUPIEC, K.; M. SLAWSON; F. PRAGST ; M. HERZLER. High performance liquid chromatography. In: A. C. MOFFAT, M. D. OSSELTON e B. WIDDOP (Ed.). **Clarke's analysis of drugs and poisons**. London: Pharmaceutical Press, v.1, 2003, p.500-534.

LANDERS, J. P. Introduction to capillary electrophoresis. In: J. P. LANDERS (Ed.). **Capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques**, 2007. 1, p.3-74.

LURIE, I. S. Application of micellar electrokinetic capillary chromatography to the analysis of illicit drug seizures. **J. Chromatogr. A**, v.780, p.265-284. 1997.

LURIE, I. S.; P. A. HAYS ; K. PARKER. Capillary electrophoresis analysis of a wide variety of seized drugs using the same capillary with dynamic coatings. **Electrophoresis**, v.25, p.1580–1591. 2004.

MARALIKOVA, B. ; W. WEINMANN. Confirmatory analysis for drugs of abuse in plasma and urine by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with respect to criteria for compound identification. **J. Chromatogr.**, v.811, n.1, p.21-30. 2004.

MCCLEAN, S.; E. J. O'KANE ; W. F. SMYTH. The identification and determination of selected 1,4-benzodiazepines by an optimised capillary electrophoresis - electrospray mass spectrometric method. **Electrophoresis**, v.21, n.7, p.1381-1389. 2000.

MIKKERS, F. E. P.; F. M. EVERAERTS ; P. E. M. VERHEGGEN. High-performance zone electrophoresis. **J. Chromatogr.**, v.169, p.11-20. 1979.

PERRETT, D. Capillary electrophoresis for drug analysis. In: A. C. MOFFAT, M. D. OSSELTON e B. WIDDOP (Ed.). **Clarke's analysis of drugs and poisons: Pharmaceutical Press**, v.1, 2003. 30, p.535-549.

PICÓ, Y.; R. RODRÍGUEZ ; J. MAÑES. Capillary electrophoresis for determination of pesticide residues. **Trends Anal. Chem.**, v.22, n.3, p.133-151. 2003.

PIETTE, V. ; F. PARMENTIER. Analysis of illicit amphetamine seizures by capillary zone electrophoresis. **J. Chromatogr. A**, v.979, p.345–352. 2002.

PIZARRO, N.; J. ORTUÑO; M. FARRÉ; C. HERNÁNDEZ-LÓPEZ; M. PUJADAS; A. LLEBARIA; J. JOGLAR; P. N. ROSET; M. MAS; J. SEGURA; J. CAMÍ ; R. D. L. TORRE. Determination of MDMA and its metabolites in blood and urine by gas chromatography-mass spectrometry and analysis of enantiomers by capillary electrophoresis. **J. Anal. Toxicol.**, v.26, p.157-165. 2002.

POKLIS, A. Analytic/Forensic toxicology. In: C. D. KLAASSEN (Ed.). **Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons**, 2001. 31, p.1089-1108.

RAMSEIER, A.; C. SIETHOFF; J. CASLAVSKA ; W. THORMANN. Confirmation testing of amphetamines and designer drugs in human urine by capillary electrophoresis-ion trap mass spectrometry. **Electrophoresis**, v.21, p.380-387. 2000.

SILVA, J. A. F. D.; W. K. T. COLTRO; E. CARRILHO ; M. F. M. TAVARES. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Quim. Nova**, v.30, n.3, p.740-744. 2007.

TAGLIARO, F. ; F. BORTOLOTTI. Recent advances in the applications of CE to forensic sciences (2005-2007). **Electrophoresis**, v.29, n.1, p.260-268. 2008.

TAGLIARO, F.; F. P. SMITH; S. TURRINA; V. EQUISETTO ; M. MARIGO. Complementary use of capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic capillary chromatography for mutual confirmation of results in forensic drug analysis. **J. Chromatogr. A**, v.735, n.1-2, p.227-235. 1996.

TAGLIARO, F.; S. TURRINA; P. PISI; F. P. SMITH ; M. MARIGO. Determination of illicit and/or abused drugs and compounds of forensic interest in biosamples by capillary electrophoresis/electrokinetic methods. **J. Chromatogr. B**, v.713, p.27-49. 1998.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Quim. Nova**, v.19, n.2, p.173-181. 1996.

TSAI, J. L.; W. S. WU ; H. H. LEE. Qualitative determination of urinary morphine by capillary zone electrophoresis and ion trap mass spectrometry. **Electrophoresis**, v.21, n.8, p.1580-1586. 2000.

VANHOENACKER, G.; F. DE L'ESCAILLE; D. DE KEUKELEIRE ; P. SANDRA. Dynamic coating for fast and reproducible determination of basic drugs by capillary electrophoresis with diode-array detection and mass spectrometry. **J. Chromatogr. B**, v.799, n.2, p.323-330. 2004.

WEBB, R.; P. DOBLE ; M. DAWSON. A rapid CZE method for the analysis of benzodiazepines in spiked beverages. **Electrophoresis**, v.28, n.19, p.3553-3565. 2007.

WEINBERGER, R. ; I. S. LURIE. Micellar electrokinetic capillary chromatography of illicit drug substances. **Anal. Chem.**, v.63, p.823-827. 1991.

WEINMANN, W.; A. WIEDEMANN; B. EPPINGER; M. RENZ ; M. SVOBODA. Screening for drugs in serum by electrospray ionization/collision-induced dissociation and library searching. **J. Am. Soc. Mass Spec.**, v.10, n.10, p.1028-1037. 1999.

WEY, A. B. ; W. THORMANN. Capillary electrophoresis-electrospray ionization ion trap mass spectrometry for analysis and confirmation testing of morphine and related compounds in urine. **J. Chromatogr. A**, v.916, n.1-2, p.225-238. 2001.

Capítulo II:

Determinação de drogas de abuso em humor vítreo por eletroforese capilar com detecção por arranjo de díodos (CE-DAD)

Capítulo 2. Determinação de drogas de abuso em humor vítreo por eletroforese capilar com detecção por arranjo de diodos (CE-DAD)

2.1. Introdução

2.1.1. Fluidos biológicos utilizados para caracterização da exposição humana a drogas de abuso

Nos últimos anos, o uso de amostras biológicas não convencionais (também chamadas de alternativas) em relação às tradicionais urina e sangue vêm sendo utilizadas com sucesso para verificação da exposição à xenobióticos. Materiais queratinizados como cabelo e unhas configuraram-se como ferramentas extremamente úteis em toxicologia clínica e forense, devido a sua capacidade de expressar exposições pregressas, podendo evidenciar exposições que ocorreram meses antes do exame laboratorial. O controle permanente de presos condenados ou de usuários de drogas em tratamento de reabilitação pode ser realizado continuamente coletando-se o suor através de dispositivos que podem ser colados de modo discreto e indolor no paciente, coletando material de modo passivo e sem constrangimento para o paciente.

Cada matriz biológica possui peculiaridades, vantagens e desvantagens. Conhecimentos sobre a estabilidade dos analitos no material biológico são de fundamental importância nas análises toxicológicas, uma vez que várias situações acabam por inserir intervalos de tempo variáveis entre a coleta do material, seu transporte até o laboratório e o momento da análise (JONES, 2003).

A urina constitui importante material biológico para a análise forense, pois neste material as concentrações dos fármacos e dos seus respectivos produtos de biotransformação são relativamente altas (RAIKOS et al., 2003). Além disso, a urina é (após o humor vítreo, que apresenta aproximadamente 98% de água em sua constituição), a matriz biológica com menor número de interferentes endógenos. Contudo, os resultados de análises realizadas em amostras de urina oferecem poucas vantagens com relação a inferência sobre os efeitos fisiológicos provocados por determinado fármaco identificado, pois os resultados obtidos em análises realizadas em urina estabelecem apenas que o fármaco/droga de abuso foi administrado, uma vez que a correlação com os efeitos é baixa devido à grande variedade de fatores que afetam a taxa de excreção de determinado composto e o volume urinário (SPINELLI, 1994; POKLIS, 2001; JONES, 2003).

Amostras de sangue ou seus derivados (soro ou plasma) são de especial importância nas análises toxicológicas, pois através dos níveis sanguíneos de determinado xenobiótico quase sempre é possível realizar correlações com os efeitos desta substância sobre o organismo (CHASIN, 1990). Estes achados, aliados aos conhecimentos sobre a toxicocinética do xenobiótico, ajudam na inferência sobre o momento de uso, quantidade de substância administrada e possíveis alterações fisiológicas e/ou psíquicas causadas pela substância.

Dentre os derivados do sangue, o soro possui como vantagem o fato de que nenhum aditivo foi adicionado à amostra, mantendo sua composição completamente inalterada.

Em indivíduos vivos, os efeitos fisiológicos da maioria dos fármacos possuem correlação direta com suas concentrações no sangue e seus derivados, fato que serve de base para a monitorização terapêutica de fármacos com estreita margem terapêutica. Entretanto, quando as amostras de sangue são coletadas *post-mortem* são necessárias ressalvas quanto a interpretação dos resultados, uma vez que fatores como o local de coleta (região anatômica), além de outros fatores relacionados à redistribuição (cinética post mortem) que eventualmente ocorreram quando cessados os fenômenos vitais, podem modificar os valores encontrados (POKLIS, 2001; JONES, 2003). Para evitar estas interferências, preconiza-se que as amostras de sangue cadavérico sejam obtidas por punção das veias subclávia e/ou femoral, uma vez que nestes sítios anatômicos a probabilidade de contaminação por difusão de outras regiões é significativamente menor. Deve-se tomar ainda cuidado com relação à homogeneidade do material, pois o sangue coletado *post-mortem* apresenta maior viscosidade, com presença de pequenos coágulos, demandando maiores cuidados para tomada de uma alíquota que seja representativa do material.

Dependo da finalidade da análise, cuidados especiais devem ser tomados durante o procedimento de coleta de amostras de sangue para análises toxicológicas. Quando o objetivo da análise é verificar os níveis sanguíneos de etanol (alcoolemia), a descontaminação da região não deve ser realizada utilizando produtos à base de alcoóis (etanol, propanol) ou iodo, para que não haja contaminação da amostra, propiciando resultados superestimados. Com o objetivo de evitar a hemólise do material, o recipiente de coleta deve ser manuseado com cuidado, sem agitação vigorosa, pois caso haja rompimento de hemácias as concentrações séricas de ferro ou potássio serão superestimadas.

O humor vítreo constitui matriz relativamente simples em termos analíticos, quando comparado à urina, sangue ou seus derivados (soro e plasma), e seu uso vem sendo indicado na análise de vários xenobióticos de interesse forense, principalmente nos casos de análise de corpos poli-traumatizados ou em estado de decomposição (SCOTT, 2001; JONES, 2003). Isto porque o humor vítreo encontra-se isolado em um compartimento relativamente protegido de contaminação externa e invasão de microorganismos, constituindo amostra privilegiada em relação aos fenômenos de putrefação. A passagem de xenobióticos para o humor vítreo dá-se por simples difusão através da barreira lipídica entre este fluido e o sangue. As correlações das concentrações de drogas de abuso entre humor vítreo e sangue não estão ainda estabelecidas (CHASIN, 1996). De modo geral, fármacos com pequena taxa de ligação a proteínas plasmáticas e com lipossolubilidade adequada para atravessar barreiras biológicas, mas que ainda apresentem-se hidrossolúveis, podem difundir prontamente da corrente sanguínea para o humor vítreo (ZIMINSKI et al., 1984).

O humor vítreo, fluido que se encontra na cavidade posterior do olho preenchendo o espaço entre o cristalino e a retina (Figura 2.1.) em quantidade de 2,0-2,5 mL, tem uma matriz sumamente simples e estável. Trata-se de um fluido gelatinoso, transparente e incolor, mantido coeso por uma delicada rede de fibrilas e cuja viscosidade é devida à presença de ácido hialurônico (COE, 1974). Por conter alta porcentagem de água (90-98%), propicia a troca de determinadas substâncias com o sangue, circunstância esta que permite uma boa correlação entre os níveis que se pode encontrar simultaneamente nos dois fluidos de um certo xenobiótico, em um dado momento. Além desta propriedade, sua posição anatomicamente isolada e de pouco contato com material passível de autólise, o humor vítreo é o

fluido biológico menos sujeito às alterações químicas dentre os comumente obtidos para análise *post mortem* (COE, 1974; CHASIN, 1996).

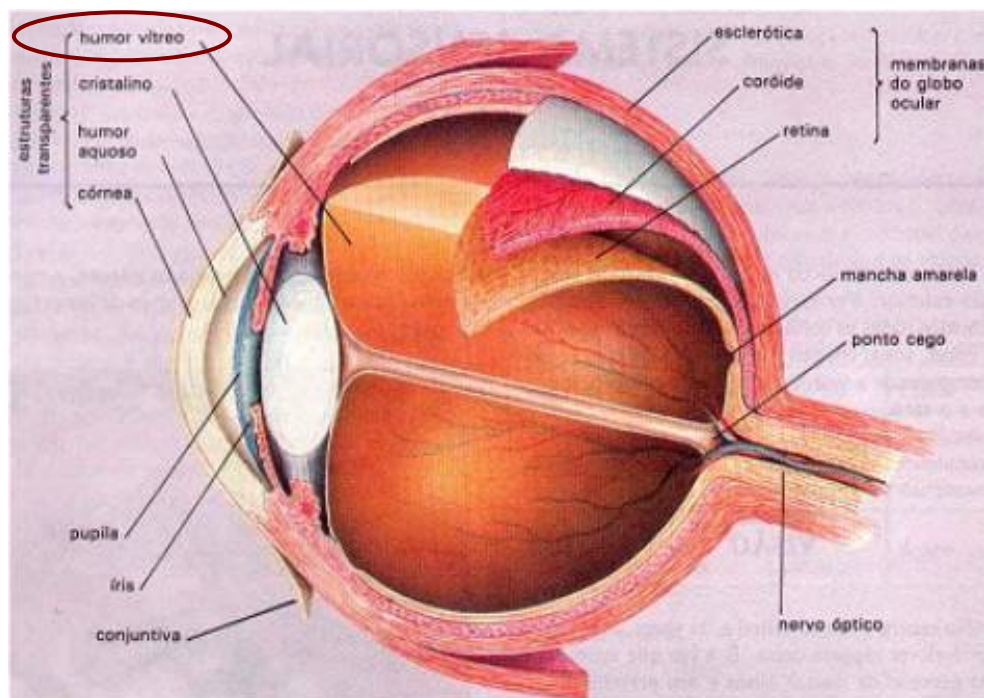


Figura 2.1. Esquema mostrando as partes componentes do olho humano (disponível em: <http://visaopsicologia.home.sapo.pt/>, acessado em 11/05/08).

Em análises toxicológicas *post mortem*, este fluido biológico oferece uma série de vantagens, como facilidade de obtenção, a condição do globo ocular estar em local anatomicamente isolado e protegido tem como consequência a preservação desse espécime a despeito de traumas cranianos, estando muito menos sujeito à contaminação ou putrefação quando comparado com o sangue. Apresenta boa estabilidade química, facilidade no manuseio, ou seja, adere-se pouco ao vidro ou a material plástico, é uma matriz bem menos complexa que o sangue total (COE, 1974; CHASIN, 1996; LIMA, 1996).

Embora o humor vítreo contenha glicose e outros substratos em níveis que se aproximam daqueles do sangue, a infiltração bacteriana para a cavidade que o contém não ocorre de maneira apreciável até mesmo quando o processo putrefativo está avançado, o que faz deste fluido uma amostra biológica privilegiada em relação a outras, sendo de inquestionável utilidade nas investigações *post mortem*, mormente nos casos onde os processos putrefativos são significantes (LIMA, 1996).

2.1.2. Métodos de extração e identificação de fármacos em material biológico

Os métodos utilizados na análise de drogas de abuso em materiais biológicos podem ser compostos a partir de diferentes procedimentos de extração, separação, identificação e quantificação dos analitos presentes na amostra. A seleção da técnica de extração a ser utilizada, bem como o tipo de equipamento empregado na identificação e quantificação, deve levar em consideração além da finalidade a que se destina a análise e, portanto, da sensibilidade requerida, o tipo de equipamento disponível para a execução dos trabalhos. Em análises forenses, deve-se buscar sempre a elaboração de métodos sensíveis, seletivos e específicos, permitindo ao analista a emissão de resultados inquestionáveis e irrefutáveis, uma vez que tais resultados com freqüência são utilizados como parte de processos judiciais, que poderão culminar com a condenação ou absolvição de um réu. Assim, o procedimento analítico empregado em determinações de xenobióticos deve garantir com qualidade e confiança adequada o valor do dado gerado durante as análises (CAUSON, 1997; CHASIN, 2001; PETERS e MAURER, 2002; SOFT/AAFS, 2006).

A determinação de substâncias presentes em fluidos biológicos geralmente requer etapas de pré-tratamento da amostra, que visam separar os analitos de interesse de demais compostos presentes na amostra, que podem ser incompatíveis com o equipamento usado para identificação e quantificação, além de servir como etapa de concentração das substâncias a serem analisadas, freqüentemente presentes em nível de traços (QUEIROZ et al., 2001). Com relação aos procedimentos de extração de fármacos, drogas de abuso e/ou seus produtos de biotransformação, destacam-se três processos: extração líquido-líquido (LLE), microextração em fase líquida (LPME), extração em fase sólida (SPE) e microextração em fase sólida (SPME).

Os métodos cromatográficos, como a cromatografia em fase gasosa (GC) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), são os mais utilizados para a determinação de fármacos e drogas de abuso em fluidos biológicos. Nos últimos anos, a eletroforese capilar (CE) vem ganhando espaço e se consagrando, à semelhança dos métodos cromatográficos, como técnica de separação de grande utilidade para análises de preparações farmacêuticas e de xenobióticos presentes em materiais biológicos (THORMANN et al., 1998; PIZARRO, N. et al., 2002). Dentre as principais vantagens desta técnica estão a alta eficiência, o mínimo consumo de solventes orgânicos e a grande versatilidade de modos de separação, o que permite a separação de grande variedade de solutos, incluindo compostos de alta polaridade, termolábeis e/ou não-voláteis em um mesmo capilar (LURIE, 1998; TAGLIARO et al., 1998a; SANTORO et al., 2000).

2.1.3. Fármacos e drogas de abuso de interesse forense

Anfetamina, metanfetamina e as metilenedioxianfetaminas

O uso de anfetamina e metanfetamina como drogas de abuso é antigo e muito popular em países no hemisfério norte com alguma diferença regional, sendo a anfetamina mais consumida na Europa e a metanfetamina é mais prevalente nos Estados Unidos da América, Japão e sudeste asiático (ONU, 1995). Estas substâncias são geralmente sintetizadas em laboratórios clandestinos, podendo muitas vezes estar contaminada com reagentes ou produtos intermediários utilizados na síntese, o que eleva o risco de intoxicações.

Estas drogas são administradas principalmente por via intranasal ou oral, como sais de sulfato ou fosfato, em doses que variam de 5 a 15 mg; usuários crônicos podem chegar a consumir de 100 a 2000 mg da droga por dia. O cloridrato de metanfetamina, conhecido popularmente como “ice” ou “cristal”, dada sua similaridade física com cristais de gelo, é usado comumente pela via endovenosa ou pulmonar (fumada), mas pode ser ainda encontrado na forma de comprimidos para administração oral.

Após administração oral de 2,5 a 5 mg de anfetamina, o pico de concentração plasmático é atingido em até duas horas, com concentrações variando de 30 a 170 $\mu\text{g/mL}$. Em situações de overdose a concentração sanguínea é geralmente acima de 500 $\mu\text{g/mL}$. A meia-vida plasmática é relativamente alta, variando de 8 a 12 horas (ONU, 1995).

As chamadas *designer drugs* estão entre as drogas de abuso mais consumidas no ocidente. Seus efeitos psicotrópicos específicos, e dos quais emanam sua utilização como drogas de abuso, são descritos como capacidade aumentada da comunicabilidade, empatia e auto-conhecimento, o que distingue esta classe de compostos das substâncias estimulantes e alucinógenas típicas. Nesta categoria de classificação encontram-se a 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA, *Ecstasy*), a 3,4-metilenodioxietilanfetamina (MDEA, *Eve*) e a 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA).

Estima-se que cerca de 0,2% da população global com idade acima de 15 anos consuma *Ecstasy*. Aproximadamente 40% do consumo mundial deste tipo de droga de abuso ocorre na Europa, seguido pela América do Norte onde cresce seu consumo, o mesmo ocorrendo no Leste Europeu e países em desenvolvimento das Américas, África do Sul e Sudeste Asiático (UNODC, 2003). Na Itália, o *Ecstasy* já se encontra em terceiro lugar na lista das substâncias ilícitas mais utilizadas (TAGLIARO et al., 2000).

No Brasil, é crescente sua divulgação pela mídia e o uso recreacional tem sido identificado em vários pacientes que buscam tratamento para farmacodependência nas clínicas de São Paulo (SILVA et al., 1998b). Segundo informações fornecidas pelo Núcleo de Exames em Entorpecentes do Instituto de Criminalística de São Paulo, durante o ano 2001 foram apreendidos 1061 comprimidos de *Ecstasy* pela Polícia Civil do Estado de São Paulo; no ano seguinte este número foi de 5677. A Organização das Nações Unidas preconiza que o aumento no número de apreensões de determinada classe de drogas de abuso é indicativo do aumento no consumo desta substância. Mesmo com o aumento no

número de apreensões e a notada presença das metilenedioxianfetaminas como fármacos de abuso no Brasil, até o momento não existem informações precisas sobre o consumo destas substâncias, bem como seu envolvimento em situações criminais.

Cocaína

A cocaína, metilbenzilecgonina, é um alcalóide presente em duas espécies do gênero *Erythroxylum*: a *novogranatense* e a *coca*, de uso milenar entre os indígenas latino-americanos através do mascamento das folhas da planta. É um poderoso agente simpatomimético com efeitos estimulantes no SNC, razão pela qual é usado como fármaco de abuso em todo mundo (CHASIN, 1990). Adquiriu importância cada vez maior devido aos graves problemas sociais e da dependência após a difusão do pó para inalação (cloridrato de cocaína) e como *crack* (base livre); esta última forma é causadora de sérias preocupações tanto para médicos quanto para autoridades policiais por ser uma forma que leva mais rapidamente à dependência, tornando o usuário comprador assíduo. O *crack* contém impurezas encontradas no material original que são oriundas da adulteração de cocaína ou ainda bicarbonato em excesso, devido ao processo de obtenção (ZANG e FOLTZ, 1990).

Segundo o CEBRID (Centro Brasileiro de Informações Sobre Drogas) com relação ao uso de drogas entre crianças e adolescentes em São Paulo no ano de 1997, o *crack* representa 24,6%, enquanto o cloridrato aspirado 2,6% (N=114).

Opiáceos

Os opiáceos representam uma classe de drogas de abuso de baixa prevalência no Brasil, mas muito comum no hemisfério norte, sendo agente de morbidade nos Estados Unidos, Europa e Ásia. O baixo uso desta classe de droga de abuso no Brasil deve estar relacionado à baixa disponibilidade “comercial” na América do Sul, que eleva muito o custo para o usuário. Diferentemente de outras plantas que produzem substâncias psicoativas como a *Erytroxylum coca* e a *Cannabis sativa*, a *Papaver somniferum* (de onde são extraídos os opiáceos), quando cultivada no americano, produz quantidades ínfimas de princípios psicoativos, o que inviabiliza seu cultivo com finalidade ilegal na região.

Dentre os opiáceos, a principal substância utilizada como droga de abuse é a heroína (diacetilmorfina). A heroína pode ser administrada por diversas vias de introdução, sendo as mais comuns a via endovenosa (dissolvida em água sob aquecimento), via pulmonar (fumada) ou intranasal. Após a administração, a heroína é rapidamente desacetilada originando a 6-monoacetilmorfina (6-MAM), que é lentamente hidrolisada para origina a morfina. Vinte e quatro horas após a administração endovenosa, os principais produtos de biotransformação da heroína encontrados na urina são a 6-MAM (1,3% da dose administrada), morfina livre (4,2%) e morfina conjugada com ácido glicurônico (38,2%). Apenas 0,1% da heroína administrada é excretada da forma inalterada na urina (ONU, 1995).

Dado seu rápido metabolismo (meia-vida de aproximadamente 3 minutos), praticamente não se encontra heroína em fluidos biológicos. A caracterização do uso desta droga é geralmente feita através da presença de morfina no material. A 6-

MAM é outro importante marcador do uso de heroína, mas infelizmente só pode ser detectada de duas e oito horas após o uso, por também ser rapidamente biotransformada a morfina.

Como o uso de heroína leva ao aparecimento de morfina no organismo, substância utilizada com finalidade terapêutica no tratamento de dor aguda, é necessário diferenciar sua presença na urina em situações terapêuticas das situações de uso da droga ilícita. Isso pode ser feito com base na concentração encontrada no fluido, pois no uso terapêutico a concentração urinária fica em torno de 10 $\mu\text{g/mL}$; já em situações de overdose por heroína esta concentração é freqüentemente maior do que 80 $\mu\text{g/mL}$. Outro modo de diferenciar o uso terapêutico de morfina do abusivo de heroína é identificar a presença de 6-MAM no material, tarefa relativamente difícil dado ao rápido metabolismo desta.

2.2. Objetivos

O presente trabalho tem por objetivo a elaboração de sistemática analítica para determinação de drogas de abuso e seus produtos de biotransformação em humor vítreo, empregando a técnica de eletroforese capilar para identificação e quantificação dos analitos. A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas foi utilizada como técnica de referência para confirmação dos resultados positivos.

2.3. Materiais e métodos

2.3.1. Reagentes

Soluções padrão na concentração de 1 mg/mL de anfetamina (ANF), metanfetamina (MET), 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA), 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), 3,4-metilenodioxietilamfetamina (MDEA), cetamina (KET), cocaína (COC), cocaetileno (CET), lidocaína (LIDO), morfina (MORF), 6-monoacetil-morfina (6-MAM), heroína (HER) e N-metil-1-(3,4-metilenodioxifenil)-2-butamina (utilizada como padrão interno, PI) foram adquiridas da Cerilliant (Austin, TX, EUA). Estas soluções foram utilizadas para preparar soluções de trabalho em diferentes concentrações. As estruturas químicas das substâncias analisadas são mostradas na Figura 2.2.

Ácido fosfórico e tris-hidroximetilaminometano (TRIS) grau analítico, trietilamina, metanol e acetonitrila grau-HPLC foram obtidos da empresa Merck (Darmstadt, Germany). Água ultra-pura foi obtida através de Milli-Q RG da Millipore (Bedford, MA, USA).

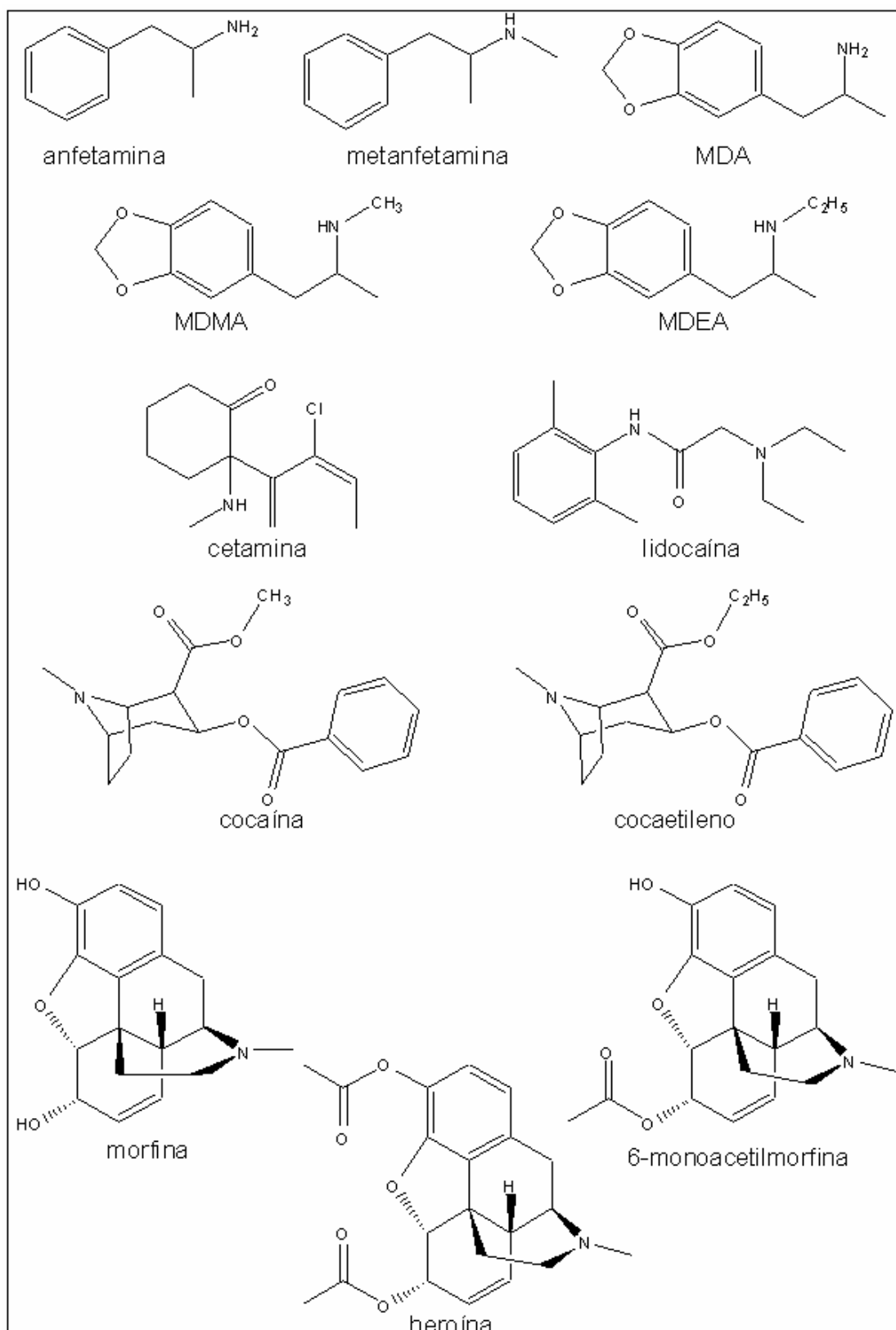


Figura 2.2. Estrutura química das drogas de abuso e produtos de biotransformação selecionados analisados.

2.3.2. Instrumentação analítica utilizada

Eletroforese capilar com detecção por arranjo de diodos (CE/DAD)

Neste trabalho foi utilizado um equipamento de eletroforese capilar Hewlett Packard® modelo HP^{3D}CE (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA), dotado de sistema de termostatização do capilar por ar forçado e detector de arranjo de diodos (DAD), controlado pelo software HP ChemStation versão 08.03 (Agilent Technologies). As separações foram realizadas utilizando capilar de sílica fundida de 75 µm de diâmetro interno e 48,5 cm de comprimento total (40 cm de comprimento efetivo até o detector), termostatizado a 25°C. A tensão aplicada para separação foi de 25 kV (corrente resultante de aproximadamente 90 µA).

Foram utilizados tubos capilares de sílica fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, EUA), revestidos externamente com polimida. Antes do primeiro uso, o capilar era condicionado pela passagem de solução aquosa de hidróxido de sódio 1 mol/L por 30 min. No início de cada dia de trabalho, o capilar era lavado com a mesma solução alcalina (5 min), água ultra-pura (5 min) e finalmente condicionado com o eletrólito de corrida (a ser descrito adiante) por 20 min.

As amostras e padrões foram introduzidos no sistema por injeção eletrocínética, onde inicialmente injeta-se um pequeno *plug* de água ultra-pura (50 mbar/2s) e em seguida a extremidade do capilar é mergulhada no vial contendo amostra/padrão e aplicava-se determinada tensão (15 kV / 10 s), para introdução dos compostos ionizados para o interior do capilar. Finalmente, as duas extremidades do capilar eram acomodadas em vials contendo o eletrólito de corrida, para assim dar início a separação eletroforética.

O detector por arranjo de diodos foi programado para adquirir espectros de absorção UV/visível na faixa de 190 a 400 nm, fornecendo importante informação qualitativa para as análises. As análises quantitativas foram feitas a partir de eletroferogramas obtidos em 195 nm, exceto para MORF, 6-MAM e HER que foram quantificados em 208 nm.

Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS)

Análises confirmatórias foram realizadas em sistema de LC-MS/MS empregando cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha), equipado com bomba quaternária e amostrador automático com sistema lavagem externa da agulha (necessário para eliminação de *carry over*), acoplado a espectrômetro de massas híbrido triplo quadrupólo – *ion trap* linear modelo 3200Qtrap (Applied Biosystems/MDS Sciex, Toronto, Canadá), com fonte de ionização Turbo VTM, operado no modo de ionização TurbolonSpray[®] (*electrospray*, ESI). A aquisição e tratamento dos dados foram realizados com o software Analyst[®] versão 1.4.2 (Applied Biosystems/MDS Sciex, Toronto, Canadá).

A eluição cromatográfica foi realizada em coluna Synergi Polar RP 4,0 µm, 150 x 2 mm d.i. com pré-coluna de 4,0 x 2,0 mm (Phenomenex, Aschaffenburg, Alemanha), sob temperatura de 40 °C, empregando o seguinte gradiente de eluição: inicialmente com 90% (v/v) da fase A (solução aquosa contendo 5,0 mmol/L de formiato de amônio com 0,1% de ácido fórmico) e 10% da fase B (acetonitrila contendo 5,0 mmol/L de formiato de amônio com 0,1% de ácido fórmico), com

rampa linear para 95% da fase B em 20 min e permanecendo nesta composição por mais 5 min. O tempo de equilíbrio da coluna foi de 10 min. A vazão da fase móvel foi mantida a 250 $\mu\text{L}/\text{min}$ e o volume de injeção foi de 30 μL .

O critério para identificação utilizado foi baseado no proposto por Mueller et al (2005), onde o espectrômetro de massas é programado para trabalhar em modo *Acquisition Dependent Information (IDA)*, sendo realizado o escaneamento transições íon molecular – fragmento de maior intensidade (*multiple reaction monitoring, MRM*) de 300 substâncias diferentes, entre fármacos, drogas de abuso e produtos de biotransformação. Quando a intensidade de uma das transições atingia valor maior do que 500 cps, o *ion trap* linear era acionado e coletava espectros de massas gerados em três energias de colisão diferentes (20, 35 e 50 eV). Os espectros de massas obtidos eram confrontados contra biblioteca espectral, considerando como resultado positivo similaridades entre os espectros maiores do que 90% nas três energias de colisão (MUELLER et al., 2005)

2.3.4. Preparo de amostras

Oitenta e sete amostras de humor vítreo foram coletadas por Médico-Legista do Instituto Médico-Legal do Estado de São Paulo e gentilmente cedidas para realização deste trabalho.

As amostras de humor vítreo foram coletadas sem distinção entre olho direito ou esquerdo, por punção utilizando seringa estéril e descartável. As amostras de humor vítreo foram transferidas para tubo de vidro de fechado por tampa de

borracha, sem a adição de preservantes. Para preservar a integridade do cadáver, após a coleta o formato do globo ocular era reconstituído por preenchimento com água. Todas as amostras foram armazenadas a -20°C até o momento da análise.

O preparo das amostras foi feito por partição com solventes orgânicos (extração líquido-líquido, LLE). Para tubos cônicos de polipropileno com tampa de mesmo material (capacidade do tubo = 2 mL), eram pipetados 200 µL de amostra de humor vítreo e 50 µL de solução metanólica de 3,4-metilenodioxo-alfa-etil-N-metilfeniletilamina (MBDB) concentração igual a 1 µg/mL (padrão interno, PI). A estes tubos eram adicionados 100 µL de tetraborato de sódio 100 mmol/L, 1 mL de acetato de etila, seguido por agitação em vortex (60 s) e centrifugação a 12500 rpm por 5 min. Após a centrifugação, 900 µL do sobrenadante foram transferidos para vial de polipropileno (próprio para o injetor automático do sistema CE). O extrato foi evaporado à secura sob fluxo de nitrogênio (temperatura ambiente) e reconstituído com 100 µL solução de ressuspensão (eletrólito de corrida diluído 1:100 em água ultra-pura).

Para a confirmação dos resultados no LC-MS/MS, as amostras de humor vítreo foram diluídas 10 vezes em água ultra pura e injetadas diretamente no sistema.

2.3.5. Validação dos métodos

Os métodos desenvolvidos foram validados de acordo com procedimentos e parâmetros de confiança analítica comumente utilizados em toxicologia forense

(PETERS e MAURER, 2002; SOFT/AAFS, 2006). Para construção das curvas analíticas, amostras de humor vítreo branco foram enriquecidas com padrão interno e com os analitos na faixa de concentração de 5 a 500 ng/mL, sendo então submetidas aos procedimentos preparados descritos anteriormente. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) dos métodos foram avaliados através de diluições seriadas da amostra enriquecida com padrões, até a obtenção de sinal analítico três vezes (LD) e dez vezes (LQ) maior que o ruído. A recuperação foi avaliada na concentração de 100 ng/mL (em triplicata), comparando-se os valores de área absoluta obtidos por amostras branco enriquecidas e submetidas a procedimento descrito acima, com amostras branco que foram submetidas ao preparo de amostra, sendo que os padrões só foram adicionados instantes antes da injeção no CE-DAD.

Para determinação da precisão foram analisadas três replicatas de amostras branco de humor vítreo enriquecidas nas concentrações 50, 100 e 500 ng/mL, e adicionadas de padrão interno. A precisão foi calculada através do coeficiente de variação (CV) das áreas relativas.

A exatidão foi determinada através da análise de três replicatas de amostras branco de humor vítreo enriquecidas nas concentrações 50, 100 e 500 ng/mL, e adicionadas de padrão interno. Os valores de área relativa obtidos foram convertidos de concentração através das respectivas equações de regressão linear obtidas das curvas analíticas. A concentração obtida foi comparada com a concentração “real” da substância presente no humor vítreo enriquecido.

2.4. Resultados e discussões

2.4.1. Otimização da separação dos analitos por CE-DAD: a influencia de aditivos na separação eletroforética

O desenvolvimento de método analítico por eletroforese capilar deve levar em consideração características físico-químicas do analito. Deve-se considerar a mobilidade eletroforética dos analitos, parâmetro diretamente relacionado com a estrutura química da molécula investigada, principalmente com sua constante de dissociação. Como já foi citado, todos os compostos estudados possuem características básicas, o que pode ser observado a partir de seus valores de pKa (Tabela 2.1.). Assim, todos se encontram ionizados com cargas positivas em meios ácidos, o que permite a análise dos mesmos por eletroforese capilar de zona, onde os analitos são separados de acordo com as respectivas mobilidades eletroforéticas, dispensando o uso de adjuvantes ionizados como micelas ou ciclodextrinas, ou mesmo de fases estacionárias.

Em CE, o controle do pH do eletrólito é aconselhável e a escolha da solução tampão adequada tem implicações diretas na otimização da separação, uma vez que o pH do eletrólito determina a mobilidade efetiva dos analitos por influenciar decisivamente no grau de dissociação (GALEANO-DÍAZ et al., 2005). Próximo a região do pKa a flutuação da mobilidade é muito pronunciada. Por isso, na escolha do eletrólito de corrida deve-se evitar o uso de soluções cujo pH seja próximo ao pKa dos analitos, pois nesta situação a flutuação da mobilidade eletroforética tenderá a ser grande, resultando em grande variação nos tempos de migração dos

analitos, a menos que o eletrólito seja tamponado. Pelos valores de pKa apresentados na Tabela 2.1, pode-se concluir que o eletrólito de corrida deve ter pH menor do que 5,5 para que esteja ao menos duas unidades abaixo do pKa de todos os analitos, garantindo assim que todas as moléculas estudadas estejam completamente dissociadas durante a análise eletroforética.

Tabela 2.1. Constantes de dissociação (pKa) dos analitos estudados.

Analito	Constante de dissociação (pKa)
Anfetamina	10,1
Metanfetamina	10,1
MDA	9,67
MDMA	9,0
MDEA	8,9*
Cetamina	7,5
Cocaína	8,6
Cocaetileno	8,3*
Lidocaína	7,9
Morfina	8,0 / 9,9
6-MAM	8,0*
Heroína	7,6

* Não disponíveis na literatura consultada. Valores calculados a partir de simulação computacional no software Pallas®.

Adicionalmente, a suscetibilidade do fluxo eletrosmótico a variações de pH requer que o eletrólito apresente constância no valor de pH. Outras propriedades desejáveis para um eletrólito incluem: baixo valor de absorvância no comprimento

de onda selecionado para análise e baixa mobilidade para minimizar a geração de efeito Joule (TAVARES, 1997). O ácido fosfórico, em concentrações entre 20 e 100 mmol/L, é o reagente de primeira escolha para analisar substâncias de características básicas por eletroforese capilar de zona, pois possui ação tamponante na faixa de 2 a 3 unidades de pH e baixa absorvidade na região do ultravioleta.

Para compostos básicos é recomendável que o pH do eletrólito de corrida seja em torno de 2,5, pois neste valor boa parte dos compostos pertencentes a este grupo encontram-se completamente ionizados e por isso suas mobilidades não seriam alteradas por pequenas variações no pH do eletrólito, fornecendo robustez ao método de separação. Outra vantagem importante é a seletividade que a escolha deste valor de pH oferece a análise, uma vez que nesta região possíveis interferentes de características ácidas ou neutros apresentariam mobilidade negativa ou simplesmente não apresentam mobilidade eletroforética, respectivamente, dificilmente sendo detectados (LURIE et al., 2004). Por estas razões e pelas características físico-químicas dos analitos estudados (Figura 2.2 e Tabela 2.1), o eletrólito de corrida desenvolvido inicialmente era composto por solução aquosa de ácido fosfórico 20 mmol/L, com valor de pH ajustado para 2,50 em peagâmetro digital por titulação com solução aquosa de hidróxido de sódio 1 mol/L.

Em eletroforese capilar em zona é bastante comum o uso de eletrólitos aditivados. O uso de aditivos é indicado em quatro situações: reduzir a interação de certos analitos com a parede do capilar (minimizar adsorção), para alterar a mobilidade dos analitos, modificar o fluxo eletrosmótico ou solubilizar os analitos

(TAVARES, 1997). Para o desenvolvimento do método aqui apresentado, três substâncias foram utilizadas como aditivos: trietilamina, TRIS e metanol.

A adsorção de analitos de características básicas (como os aqui estudados) a grupamentos silanóis do capilar ionizados em pH baixo (carga negativa) leva à formação de picos assimétricos e com cauda, o que acaba por interferir nas análises quantitativas por dificultar a integração adequada do pico eletroforético. Esta adsorção dificulta ainda as análises qualitativas por causar alargamento dos picos, diminuindo a resolução e por isso dificultando a identificação. Este inconveniente pode ser contornado adicionando ao eletrólito de corrida compostos como poliaminas ou sais de alquilamônio, pois o grupamento amina destas substâncias liga-se aos grupamentos silanóis da parede do capilar bloqueando os mesmos, dificultando a interação indesejada com os analitos. O uso deste tipo de aditivo é recomendado por diversos autores que discutem a análise de substâncias catiônicas por CZE (TAVARES, 1997; PIETTE e PARMENTIER, 2002; LURIE et al., 2004; DAHLE´N e ECKARDSTEIN, 2006). Neste trabalho, optou-se pela adição de 0,4% (v/v) de trietilamina ao eletrólito de corrida. Bloqueando os grupamentos silanóis a trietilamina contribui ainda para a reprodutibilidade do tempo de migração, pois praticamente elimina a presença do fluxo eletrosmótico na separação.

O desenvolvimento do melhor eletrólito de corrida para separação eletroforética está vinculado ainda a forma da banda (pico), pois via de regra, tampões contendo íons com mobilidade semelhante à do soluto previnem os fenômenos de eletrodispersão, fornecendo picos simétricos e delgados minimizando seu alargamento (TAVARES, 1997).

A eletrodispersão acontece principalmente devido a diferenças entre a condutividade do analito e dos íons do eletrólito de corrida. Quando um analito é injetado no interior do capilar, a banda desse analito tende a se dispersar devido a uma difusão longitudinal. Os íons do analito, que estão mais distantes do centro da zona da amostra, encontram-se numa região onde a condutividade predominante é a do eletrólito de corrida, enquanto que os íons que se encontram mais ao centro da banda estão numa região onde a condutividade predominante é a do próprio analito. Então, quando o campo elétrico é aplicado, três situações podem ser observadas, como mostrado na Figura 2.3.

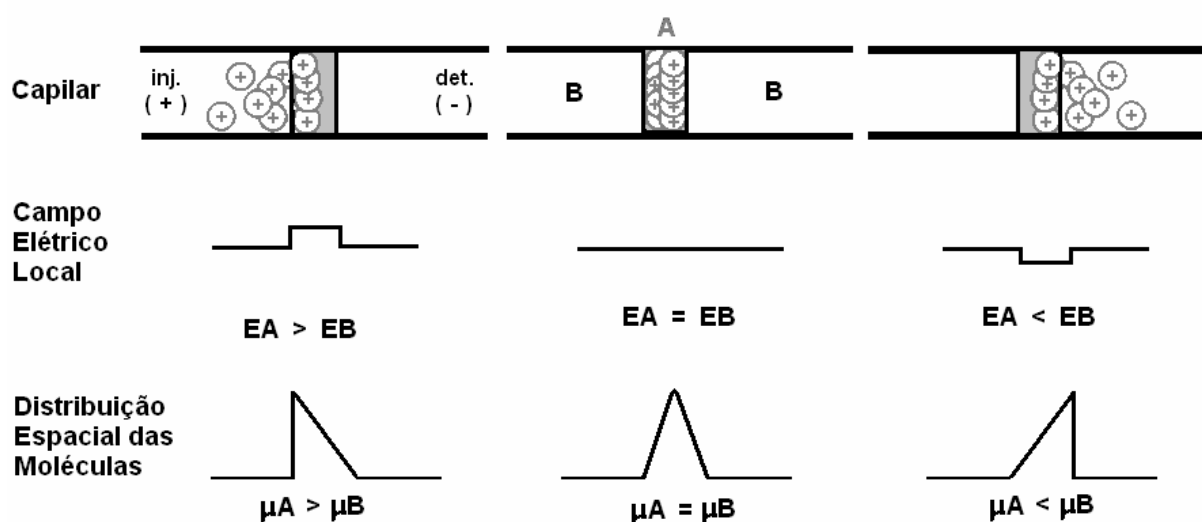


Figura 2.3. Representação esquemática da simetria de pico em função da similaridade das mobilidades do analito e do eletrólito (Adaptado de Tavares, 1997).

Na situação apresentada mais a esquerda da Figura 2.3, a condutividade da zona da amostra é menor que a condutividade do eletrólito. Os íons mais distantes do centro da banda da amostra são submetidos a um campo elétrico menor que os

íons que se encontram no centro da banda, e por isso possuem mobilidade eletroforética menor do que os íons do mesmo analito presentes na banda da amostra. Visualmente, esta dispersão é percebida como uma cauda no pico eletroforético (MICKE, 2004).

Já na situação mostrada à direita da Figura 2.3, a condutividade da zona da amostra é maior do que a condutividade do eletrólito de corrida. Sendo assim, os analitos que se encontram mais distantes do centro da banda (no sentido longitudinal) são submetidos a um campo elétrico maior que o campo elétrico do centro, portanto os íons que estão à frente, em relação ao detector, serão acelerados, se distanciando mais rapidamente da zona da amostra, que o restante dos íons. Os íons que estão atrás são acelerados e alcançam o centro da zona, enquanto que os íons mais ao centro migram sob um campo elétrico menor, tem-se então um caso de cauda frontal (MICKE, 2004).

A situação ideal é a apresentada no centro da Figura 2.3, onde a condutividade da região da amostra e do eletrólito de corrida são equivalentes atingindo, portanto, um campo elétrico constante em todo capilar, resultando na geração de picos simétricos (MICKE, 2004).

Como foi demonstrado, para evitar o fenômeno eletrodispersivo o eletrólito de corrida deve ter condutividade e, portanto mobilidade eletroforética semelhante à mobilidade do analito. O modo mais utilizado para evitar a eletrodispersão é adicionar ao eletrólito de corrida um co-íon de mobilidade eletroforética próxima a dos analitos estudados. Este tipo de eletrodispersão pode ser simulado computacionalmente no software Peakmaster, um simulador de eletroforese capilar

em solução livre desenvolvido por Boluslav Gas (Universidade Charles, República Tcheca) (GAS et al., 2001; STEDRY et al., 2002; STEDRY et al., 2003; MICKE, 2004). O software utiliza modelos matemáticos para simular a separação e eletrodispersão de substâncias por CZE. A Figura 2.4 apresenta quatro eletroferogramas sobrepostos obtidos por simulação computacional empregando-se o software Peakmaster versão 2.2, onde foi modificado apenas o co-íon do eletrólito de corrida. A substância escolhida como exemplo foi a cocaína.

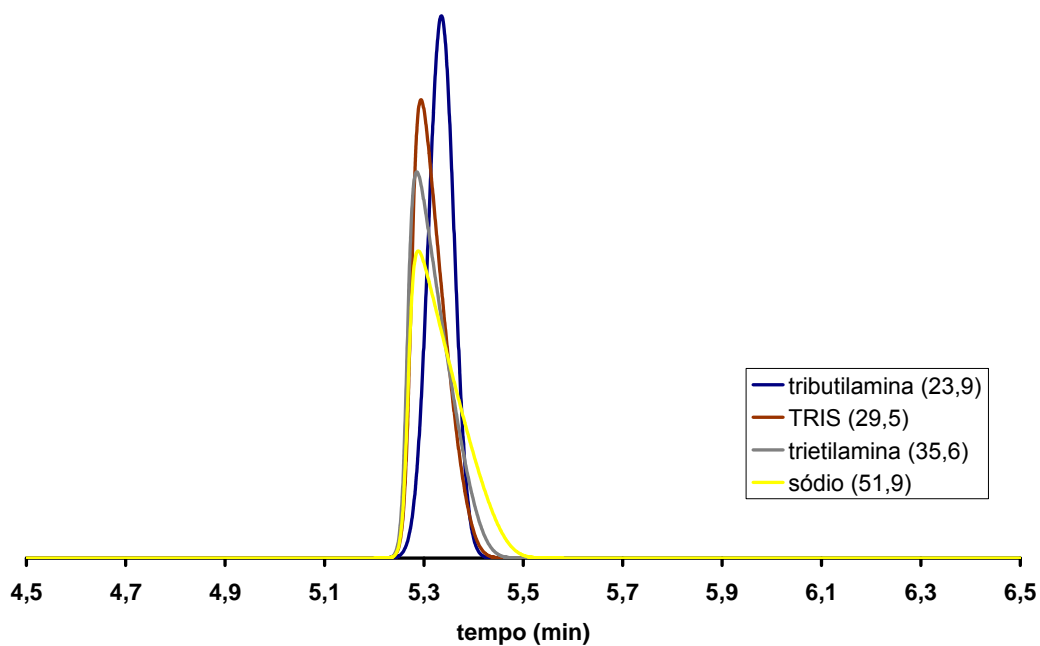


Figura 2.4. Eletroferogramas sobrepostos, obtidos por simulação no software Peakmaster. Condições eletroforéticas simuladas: capilar de sílica fundida 48 x 40 cm (efetivo), 25 kV, ausência de fluxo eletrosmótico. O eletrólito de corrida composto por ácido fosfórico 40 mM + 20 mM de cada co-íon mencionado na legenda (pH aproximadamente 2,5). Os valores numéricos apresentados entre parênteses é a mobilidade do co-íon no sistema simulado ($\times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

A mobilidade eletroforética da cocaína é $24,0 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Como pode ser observado na Figura 5.4, quanto maior é a diferença entre a mobilidade da cocaína e do co-íon presente no eletrólito, maior é a eletrodispersão (mais deformado é o pico). Pela observação dos eletroferogramas simulados conclui-se que o melhor aditivo nesta situação seria a tributilamina (mobilidade igual a $23,9 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), que proporcionaria o melhor formato de pico entre os aditivos estudados. Infelizmente este reagente não se encontrava disponível em nosso laboratório, e por esta razão o co-íon selecionado para este estudo foi o segundo candidato, o TRIS por possuir mobilidade ($29,5 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) mais próxima a do analito do que a trietilamina ou o sódio.

Com base em todos os fundamentos apresentados até aqui, o eletrólito de corrida mais adequado para análise das drogas de abuso de interesse deve apresentar como contra-íon o fosfato (proveniente do ácido fosfórico) por ter ação tamponante em pH 2,5 (o que favorece muito a reprodutibilidade do método), deve ser enriquecido com 0,4% de trietilamina para que ocorra revestimento dinâmico da parede do capilar, bloqueando grupos silanóis que causam deformações nos picos de bases fracas analisadas em pH baixo e, deve-se adicionar ainda 20 mM de TRIS como co-íon, para que os fenômenos eletrodispersivos sejam evitados ou minimizados.

A Figura 2.5 apresenta um eletroferograma obtido pela injeção de solução padrão contendo as onze drogas de abuso e/ou produtos de biotransformação estudados. Como esperado, as adições de trietilamina e de TRIS contribuíram significativamente para o formato dos picos obtidos.

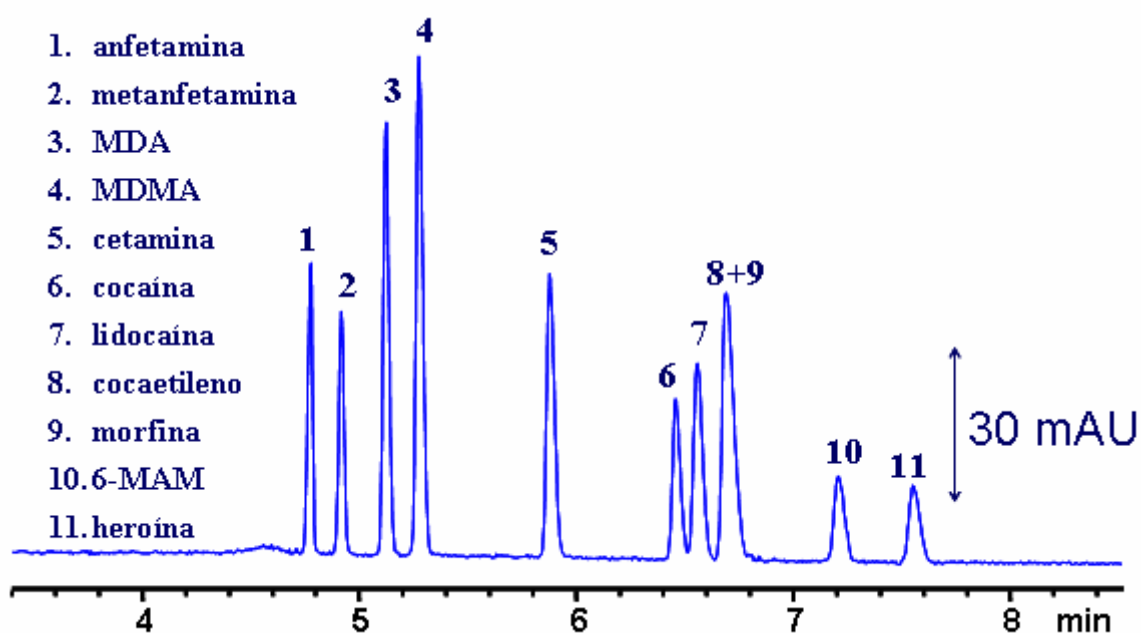


Figura 2.5. Eletroferograma obtido pela injeção de solução padrão dos analitos (200 ng/mL). Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida 75 μ m i.d., 48,5 x 40 cm (efetivo); eletrólito: 0,4% trietilamina, Tris 20 mM, pH 2,5 (ajustado com ácido fosfórico concentrado); 25 kV, 20°C, 195 nm; injeção eletrocínética: água ultra-pura 20 mbar/2s, seguido por 15 kV/10s.

Pela figura acima é possível observar que uma completa co-migração entre cocaetileno e morfina. Para solucionar este tipo de problema é necessário o uso de aditivos com capacidade de alterar diferencialmente a mobilidade dos compostos, resultando na separação dos mesmos. Tavares (1997) cita o uso de solventes orgânicos como aditivos para CZE, e menciona que este tipo de aditivo é capaz de aumentar a solubilidade de compostos orgânicos no eletrólito, reduzir a interação soluto-capilar, além de atuarem como modificadores do fluxo eletrosmótico. Landers (2007) afirma que o uso deste tipo de modificador pode levar a ganhos significativos

em resolução dos analitos, pela combinação de diminuição do fluxo eletrosmótico, diminuição da difusão térmica e alteração por vezes seletiva da solubilidade dos analitos investigados.

Neste trabalho, quando metanol foi adicionado ao eletrólito de corrida pode-se observar mudança na mobilidade dos analitos, muito mais pronunciadas para os compostos da classe dos opiáceos do que para os demais analitos. As Figuras 2.6 e 2.7 mostram o efeito da adição de metanol a mobilidade eletroforética dos analitos a consequente separação obtida, respectivamente.

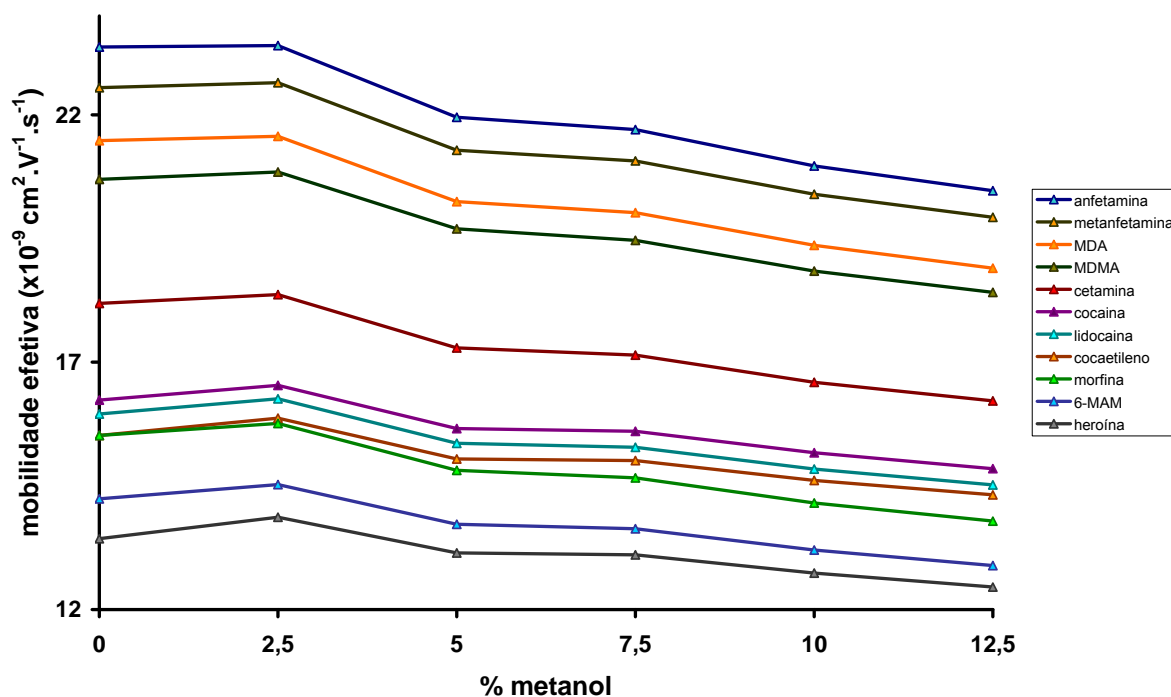


Figura 2.6. Efeito da adição de metanol sobre separação eletroforética dos analitos.

Composição do eletrólito e condições eletroforéticas como na Figura 2.5.

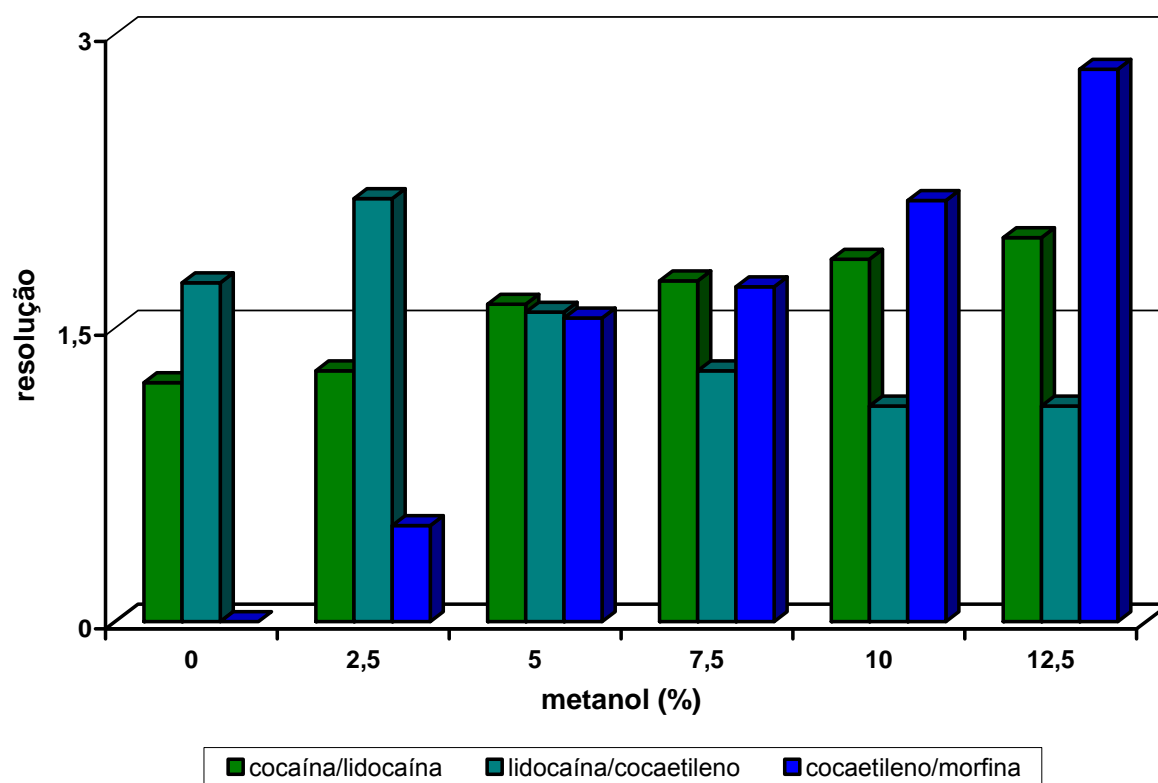


Figura 2.8. Resolução entre os picos de cocaína, lidocaína, cocaetileno e morfina em função da porcentagem de metanol adicionado ao eletrólito de corrida.

Pode-se observar que as mobilidades do cocaetileno e da morfina são iguais no eletrólito sem o modificador orgânico. Quanto maior a quantidade de metanol adicionado ao eletrólito, maior é a diferença entre a mobilidade entre estas substâncias. Deve-se observar ainda que, como era esperado, o comportamento da mobilidade do cocaetileno é praticamente igual ao desempenhado pela cocaína, sendo a diferença de mobilidade da droga e de seu produto de biotransformação praticamente constante. Já a mobilidade da lidocaína, que apresenta estrutura química apreciavelmente diferente da cocaína e do cocaetileno, não segue o mesmo perfil.

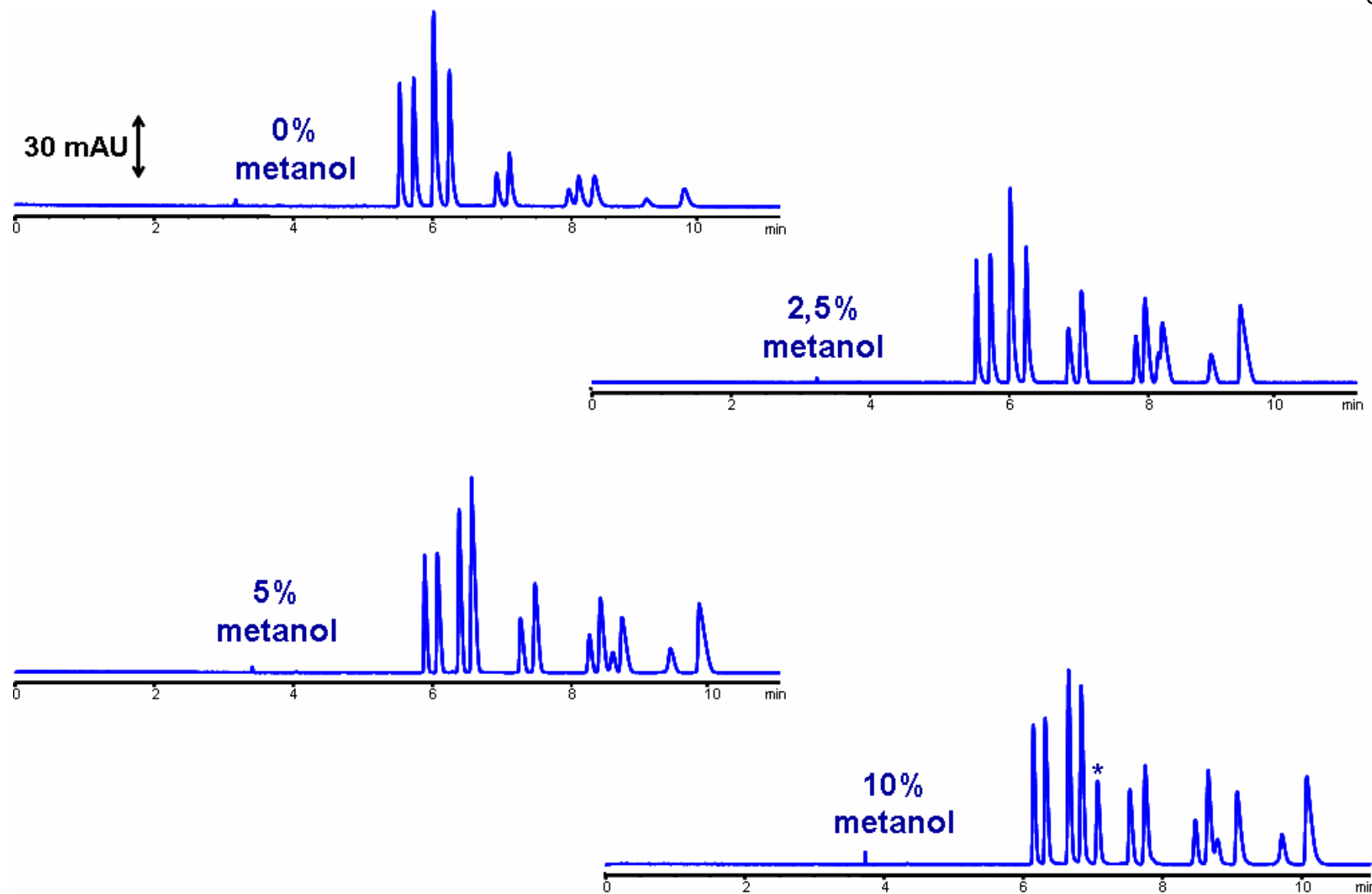


Figura 2.7. Eletroferogramas obtidos com concentração crescente de metanol no eletrólito de corrida. Condições eletroforéticas: idem figura 2.5, exceto pela porcentagem de solvente adicionado. * Pico relativo ao femproporex (testado como PI).

Com aumento da porcentagem de solvente orgânico no eletrólito o pico lidocaína começa a se sobrepor ao do cocaetileno, diminuindo de modo proibitivo a resolução entre eles (Figura 2.8).

Os resultados obtidos mostram que a porcentagem de metanol no eletrólito deve ser de até 5% para que se tenha completa resolução entre os pares cocaetileno/morfina e lidocaína/cocaetileno, sendo obtida assim a completa separação das 11 substâncias selecionadas para estudo em menos de 9 minutos de análise.

Após as considerações e ensaios descritos, concluiu-se que o eletrólito de corrida deveria ser composto por solução aquosa de Tris 20 mmol/L + 0,4% de trietilamina, com pH ajustado para 2,5 com ácido fosfórico concentrado (em peagâmetro) : metanol (95:5, v/v).

2.3.2. Detecção dos analitos (detecção por arranjo de diodos)

Para se trabalhar com detectores ópticos, como o detector por arranjo de diodos, todos os analitos investigados devem apresentar grupamentos cromóforos em sua estrutura química (que permitam a absorção de radiação eletromagnética na faixa de 190 à 650 nm) para detecção direta, ou devem ser derivatizados para posterior detecção do produto de derivação. Todos os analitos aqui estudados possuem grupamentos cromóforos em sua estrutura química, com significativa absorção da radiação eletromagnética na região do ultravioleta (190 a 350 nm) e regiões de máxima absortividade de entre 195 e 210 nm. Assim, para se obter

máxima sensibilidade, as análises quantitativas foram realizadas com eletroferogramas extraídos no comprimento de onda 195 nm (exceto para MOR, 6-MAM e HER onde a quantificação foi feita em 208 nm).

O detector por arranjo de diodos é o sistema óptico de escolha tanto para cromatografia líquida quanto para eletroforese capilar, quando a análise exige informações qualitativas mais refinadas do que as fornecidas apenas pelo tempo de retenção e/ou migração. A resposta gerada por este tipo de detector é um gráfico tridimensional onde se mostra concomitantemente o tempo de retenção, o espectro de absorção da luz ultravioleta/visível e a intensidade de luz absorvida pelo analito em um dado comprimento de onda. A Figura 2.9 apresenta um eletroferograma tridimensional obtido pela injeção de padrão dos analitos investigados, usando o eletrólito de corrida otimizado. Já a Figura 2.10 apresenta eletroferograma extraído em 195 nm com os espectros de absorção da luz ultravioleta das drogas de abuso e seus produtos de biotransformação estudados.

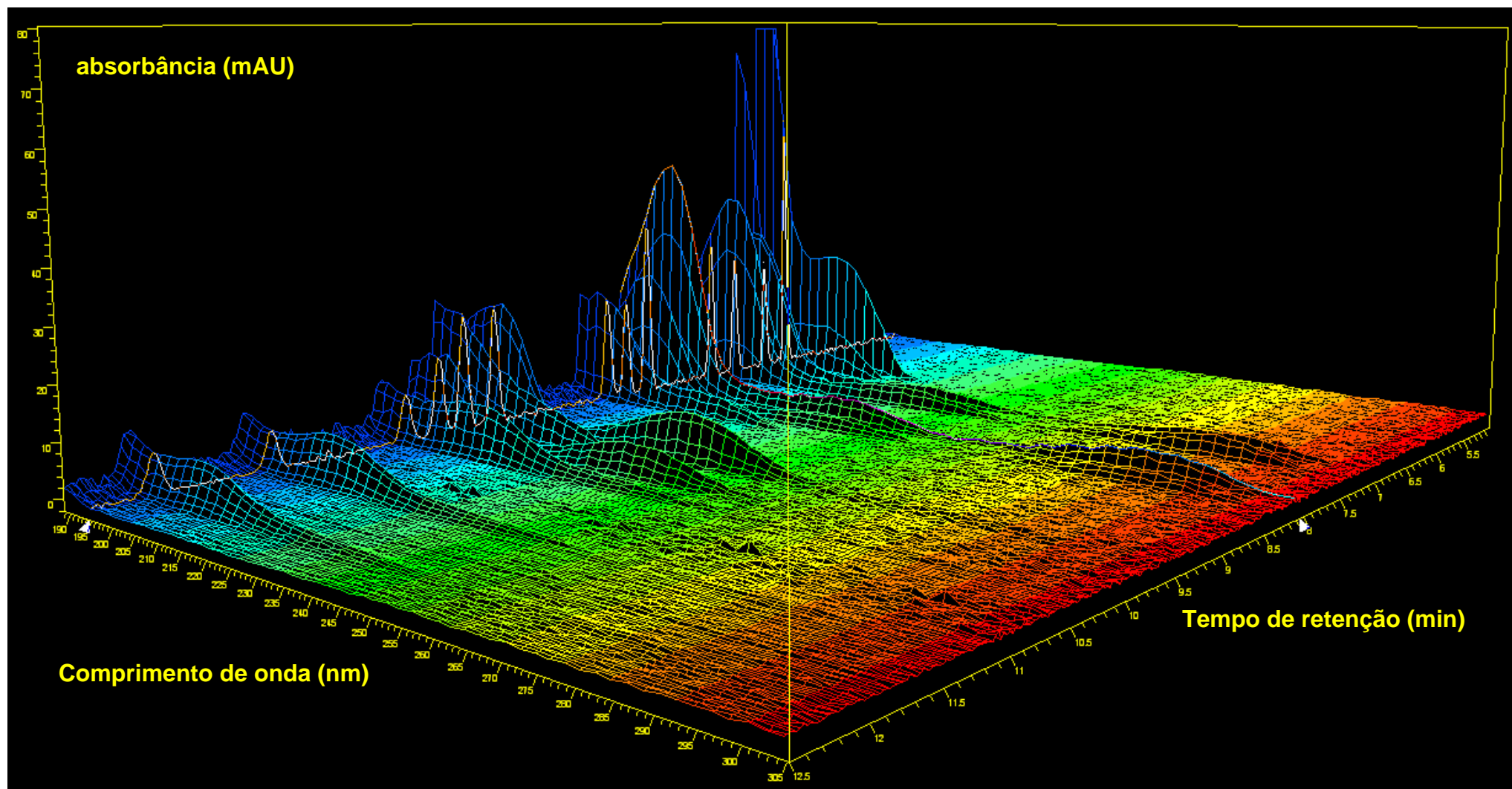


Figura 2.9. Eletroferograma tridimensional obtido pela injeção de padrão dos analitos investigados (200 ng/mL). Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida 75 μm i.d., 48,5 x 40 cm (efetivo); eletrólito: 0,4% trietilamina, Tris 20 mmol/L pH 2,5 (ajustado com ácido fosfórico concentrado) contendo 5% de metanol; 25 kV, 20°C, 195 nm; injeção electrocinética: água ultra-pura 20 mbar/2s, seguido por 15 kV/10s.

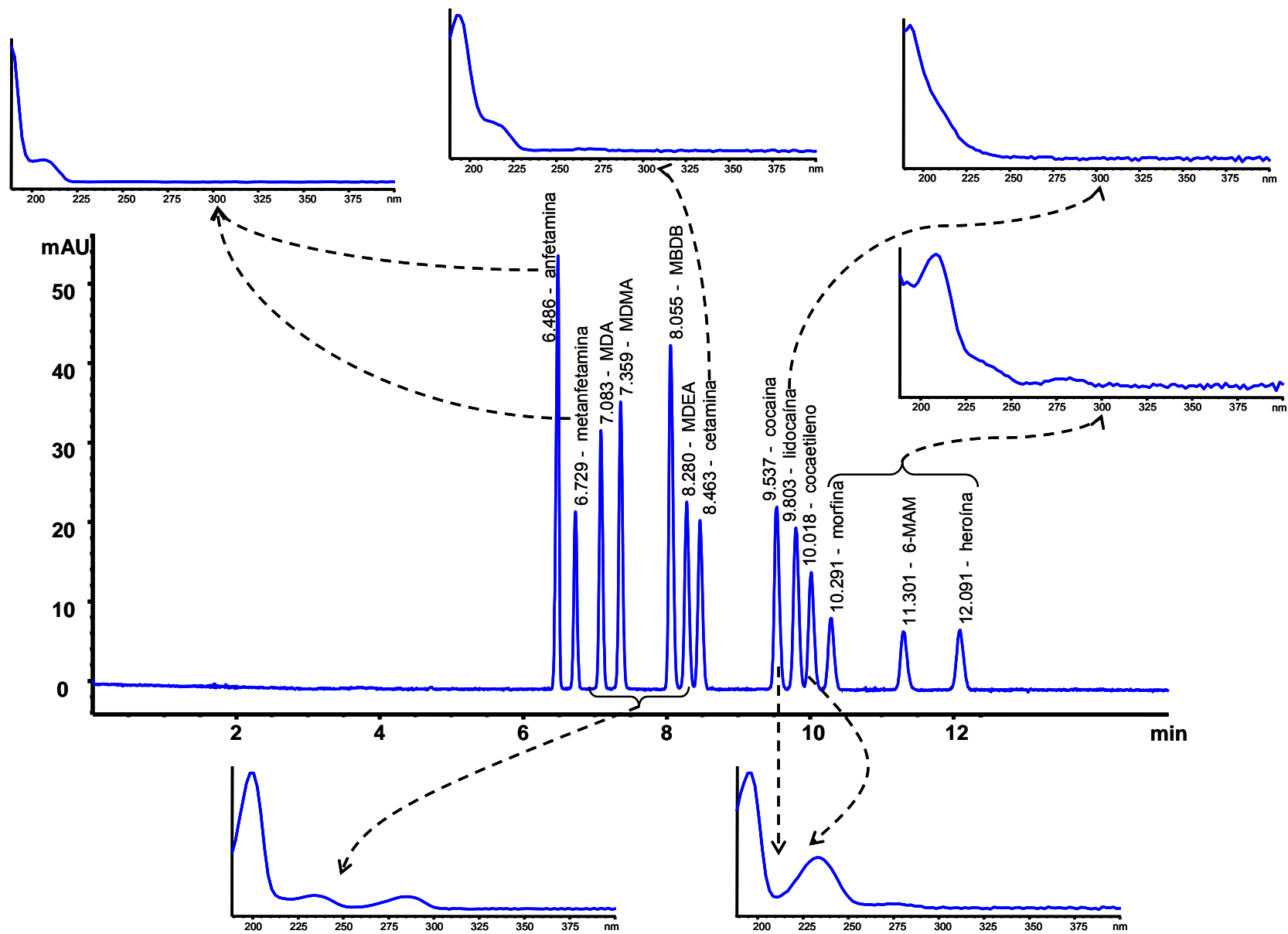


Figura 2.10. Eletroferograma obtido com eletrólito otimizado, com os espectros de absorção UV dos analitos. Condições eletroforéticas: idem anterior.

2.3.3. Pré-concentração on-line dos analitos (*stacking*)

Na análise de drogas de abuso em fluidos biológicos, principalmente com finalidade forense, a obtenção de baixos limites de detecção e quantificação frequentemente é exigida, colocando muitas vezes o toxicologista forense frente a grandes desafios analíticos.

Se por um lado a eletroforese capilar apresenta limitações quanto a sensibilidade, comprometida pelo pequeno caminho óptico disponível (uma vez que a detecção é feita diretamente através das paredes do capilar), esta técnica permite o uso processos de pré-concentração *on-line* de acordo com a mobilidade dos analitos (principalmente por injeção eletrocinética), procedimento que não pode ser executado em análises cromatográficas. Estes procedimentos de pré-concentração podem levar a aumentos de até 100 vezes da sensibilidade, gabaritando a técnica para análises de drogas de abuso mesmo quando baixos valores de limite de detecção precisam ser atingidos (MANETTO et al., 2000).

A injeção eletrocinética é feita aplicando-se um determinado potencial no vial que contem a amostra por um dado período de tempo. Analitos iônicos são injetados como resultado do fluxo eletrosmótico e de sua mobilidade eletroforética, os analitos neutros são introduzidos apenas devido à ação do fluxo eletrosmótico e as substâncias de carga contrária à apresentada pelos analitos não são introduzidas. Como no pH de trabalho o fluxo eletrosmótico é desprezível, a injeção eletrocinética apresenta-se como um procedimento de injeção muito seletivo (BECKERS e BOCEK, 2000; LANDERS, 2008).

Este tipo de injeção apresenta como inconveniente o fato de que a quantidade de analito introduzida no capilar está diretamente relacionada à condutividade da amostra. Se a condutividade da amostra for muito baixa como, por exemplo, uma solução padrão preparada em água ultra-pura, a mobilidade do próprio analito influenciará na quantidade injetada para dentro do capilar (MICKE, 2004). Landers (2007) recomenda que sempre que possível os extratos de amostras a serem analisados por CE devem ser reconstituídos com diluições do eletrólito de corrida, e não em água ultra-pura para evitar inconvenientes como alargamento dos picos, queda da corrente elétrica e aquecimento excessivo na ponta do capilar (e consequentemente na amostra) (LANDERS, 2008).

Pelas razões apresentadas, neste trabalho os extratos obtidos após a extração das amostras não foram ressuspensos com água ultra-pura, mas sim com uma solução aquosa preparada pela diluição do próprio eletrólito de corrida (1:100), para que a condutividade da amostra fosse independente da concentração do analito ali presente.

A injeção eletrocinética permite a realização de pré-concentração dos analitos no interior do próprio capilar de separação, fenômeno conhecido como *stacking* (MANETTO et al., 2000). O *stacking* baseia-se justamente a diferença de força iônica que deve existir entre dois meios, geralmente o eletrólito de corrida e a amostras a ser analisada. Se a condutividade da amostra (ou do extrato ressuspendido) é baixa, os íons ali presentes possuirão maior mobilidade do que em meios de maior condutividade, como o eletrólito de corrida. Quando a ponta do capilar é mergulhada no extrato da amostra e aplica-se tensão, os íons ali presentes são acelerados para o interior do capilar. Ao encontrarem o meio de alta

condutividade (eletrólito de corrida) estes íons são desacelerados formando um “empilhamento”, ficando concentrados em uma delgada banda do eletrólito (BECKERS e BOCEK, 2000; MANETTO et al., 2000).

Para melhor o ganho em sinal promovido pelo *stacking*, deve-se injetar um pequeno *plug* de água no capilar (por injeção hidrodinâmica), em seguida mergulhar o mesmo na amostra e aplicar tensão por determinado período de tempo. Para investigar a influência dos parâmetros envolvidos nesta injeção e concluir qual condição forneceria maior intensidade de sinal (altura do pico), as variáveis da injeção hidrodinâmica da banda de água, tensão aplicada e tempo de aplicação da tensão foram estudadas por planejamento fatorial do tipo 2^3 , com os valores apresentados na Tabela 2.2.

Uma vez que a sensibilidade de um método cromatográfico/eletroforético relaciona-se muito mais com a altura do que com a área do pico, foi escolhida a altura do pico de cocaína como resposta para o experimento. Cumpre ressaltar a altura dos picos dos demais analitos tiveram comportamento análogo ao da cocaína.

Tabela 2.2. Parâmetros estudados para otimização da injeção e seus respectivos níveis inferior e superior.

Parâmetro estudado	(-)	(+)
Banda de água (tempo de introdução, em s)*	2	4
Tensão (kV)	5	10
Tempo de aplicação da tensão (s)	5	15

* tempo de aplicação de 20 mbar de pressão no vial contendo água.

Tabela 2.3. Efeitos calculados para o planejamento fatorial 2^3 .

Média	20,9
Efeitos principais:	
1 (Banda de água)	-1,2
2 (Tensão)	13,3
3 (Tempo)	15,0
Interações de dois fatores:	
12	1,6
13	5,5
23	3,3
Interações de três fatores:	
123	4,2

Apenas o efeito *plug* de água é negativo, ou seja, quanto maior o tamanho da banda de água utilizado na injeção, menor é a altura do pico obtida. Os efeitos tensão e tempo são positivos, o que significa dizer que quanto maior a tensão e o

tempo de aplicação desta, maior é a altura do pico de cocaína. Infelizmente, este enriquecimento *online* sofre saturação, sendo que se a tensão ou seu tempo de aplicação forem prolongados para valores maiores do que 10 kV e 15 s, respectivamente, observa-se que a altura do pico deixa de aumentar e começa a haver aumento da largura do mesmo, havendo aumento na área do pico, mas não em sua altura (e conseqüentemente na relação sinal/ruído) Pelo resultado do planejamento fatorial, o procedimento adotado para injeção eletrocínética foi introdução de banda de água ultra-pura (20 mbar por 2 s), seguido por aplicação de 10 kV por 15 s no vial contendo o extrato da amostra.

2.3.4. *Preparo de amostras*

Como já foi citado anteriormente, em análises toxicológicas *post mortem*, o humor vítreo oferece uma série de vantagens, como facilidade de obtenção, a condição do globo ocular estar em local anatomicamente isolado e protegido tem como conseqüência a preservação desse espécime a despeito de traumas cranianos, estando muito menos sujeito à contaminação ou putrefação quando comparado com o sangue (uma vez que xenobióticos ficam protegidos dos fenômenos de putrefação), boa estabilidade química e facilidade no manuseio. Como este material é isento de enzimas ou microrganismos que pudessem degradar os analitos investigados, não foi necessária adição de preservantes.

O pequeno volume disponível do fluido biológico para realização das análises (menos de 2 mL para todas as amostras coletadas) foi determinante para o planejamento do procedimento adotado para extração. O volume aqui utilizado (200

μL) permitiu que outras alíquotas de uma mesma amostra fossem retiradas para análises em replicatas utilizando o mesmo método ou ainda para execução de método de confirmação.

Por ser uma amostra biológica limpa, inicialmente foram testados procedimentos de preparo baseados em simples diluição da amostra e injeção no sistema eletroforético. Este tratamento foi rejeitado por não produzir resultados quantitativos satisfatórios principalmente no que diz respeito aos limites de detecção obtidos. Estes resultados inadequados podem estar relacionados à composição da matriz biológica, pois ainda que sua composição seja predominantemente aquosa, o humor vítreo possui também grande quantidade de íons dissolvidos, principalmente Na^+ , K^+ e Cl^- , que diminuíram a eficiência da injeção eletrocinética (baseada na diferença de condutividade entre a amostra e o eletrólito de corrida).

A extração líquido-líquido é um procedimento simples e barato, e por vezes preterida pelo maior consumo de solventes orgânicos (quando comparada a técnicas como a SPE, por exemplo). No método desenvolvido, utilizou-se no máximo 2 mL de solvente orgânico por amostra analisada. Uma vez que todo processo extrativo foi realizado em tubos de polipropileno (tipo “*ependorf*”) descartáveis e foram utilizadas pipetas automáticas com ponteiros igualmente descartáveis, a possibilidade de contaminação acidental durante o processamento da amostra foi minimizada drasticamente, contribuindo assim para a confiabilidade exigida para um método com finalidade forense.

O rendimento (recuperação) da extração de fármacos de características básicas presentes em fluidos biológicos por extração líquido-líquido é aumentado

pela alcalinização do fluido por interferir no equilíbrio de dissociação dos fármacos, aumentando sua solubilidade no solvente orgânico (mais apolar do que a matriz biológica). Inicialmente testou-se a alcalinização da amostra pela adição de 100 μL de hidróxido de sódio 1 mol/L, e seguindo com o procedimento de extração como descrito anteriormente. Foi observado excelente rendimento para os fármacos pertencentes a classe dos derivados anfetamínicos (ANF, MET, MDA, MDMA, MDEA, KET) e para a lidocaína ($\geq 90\%$). Contudo, o rendimento para a cocaína, cocaetileno e para os opiáceos (MOR, 6-MAM e HER) ficou muito aquém deste valor, sendo que a 6-MAM e a HER nem mesmo foram detectadas pelo método. Isso pode ser explicado pela instabilidade química destas substâncias, todas dotadas de grupamentos éster (vide Figura 5.2), que sofre hidrólise com relativa facilidade se o meio for muito alcalino. A solução encontrada foi utilizar como alcalinizante para o processo extrativo a solução aquosa de tetraborato de sódio 100 mmol/L, suficiente para tamponar o pH do meio aquoso em torno de 9,1, e também suficiente para extrair todos os analitos com bom rendimento, sem que houvesse hidrólise dos compostos lábeis.

São inúmeros os solventes orgânicos que podem ser utilizados na LLE de drogas de abuso. Tradicionalmente, é requerido que o solvente seja imiscível com a água para facilitar a separação de fases quando em contato com o fluido biológico. Nos últimos tempos vem crescendo a utilização solventes orgânicos de maior polaridade, com a acetonitrila, em procedimentos de extração líquido-líquido a frio, onde a separação de fases passa a ser promovida pelo resfriamento da mistura (e por vezes centrifugação) (YOSHIDA et al., 2004; PAVLOVIC et al., 2007). Este tipo de procedimento parece ser muito interessante quando o procedimento analítico subsequente é realizado em fase líquida, como na cromatografia líquida ou na

eletroforese capilar. Contudo, deve-se ressaltar que na extração líquido-líquido a frio geralmente o solvente extrator não é evaporado, sendo assim não haverá pré-concentração dos analitos, o que pode ser fator excludente para a escolha da eletroforese capilar para leitura dos extratos.

O solvente extrator, acetato de etila, foi escolhido com base nos procedimentos recomendados pelo Programa Internacional de Controle de Drogas da Organização das Nações Unidas (ONU, 1995). Como o acetato de etila é mencionado como possível solvente extrator para todos os analitos aqui investigados, e possui relativa volatilidade (o que torna a etapa de evaporação mais rápida), optou-se por seu uso nas extrações de humor vítreo. Nesta escolha foi considerado ainda o fato de que o solvente empregado não é clorado (não forma resíduos persistentes no meio ambiente) e tem toxicidade menor do que outros possíveis candidatos, como o n-hexano e o tolueno.

Na escolha pelo melhor padrão interno (PI) para as análises, foram testadas algumas substâncias tais como procaína, femproporex, salbutamol e N-metil-1-(3,4-metilenodioxifenil)-2-butamina (MDBD). Inicialmente, a escolha do padrão interno foi baseado apenas na característica de base fraca dos compostos, similar aos analitos investigados, e que por isso certamente seriam extraídos durante a LLE e também possuiriam mobilidade eletroforética no pH escolhido. No início dos trabalhos, os candidatos a PI eram misturados aos analitos e os comportamentos eletroforéticos eram avaliados conjuntamente. Contudo, para que a escolha do melhor PI não aumentasse o grau de dificuldade da otimização do eletrólito de corrida, optou-se por escolher o PI depois que todas as variáveis do eletrólito tivessem sido estudadas.

O padrão interno escolhido, 3,4-metilenodioxi-alfa-etil-N-metilfeniletilamina (MBDB), cuja estrutura química é mostrada na Figura 2.11, mostrou-se adequado, pois apresenta grande semelhança estrutural e físico-química com a maioria dos analitos, além de mostrar-se completamente separado destes na condição eletroforética otimizada. Mesmo sendo classificado como *designer drug*, o MBDB raramente é encontrado como adulterante dos comprimidos de *Ecstasy* (SHERLOCK et al., 1999; BAGGOTT et al., 2000; BAGGOTT e JEROME, 2005), e sua presença nunca foi detectada em comprimidos apreendidos no Estado de São Paulo.

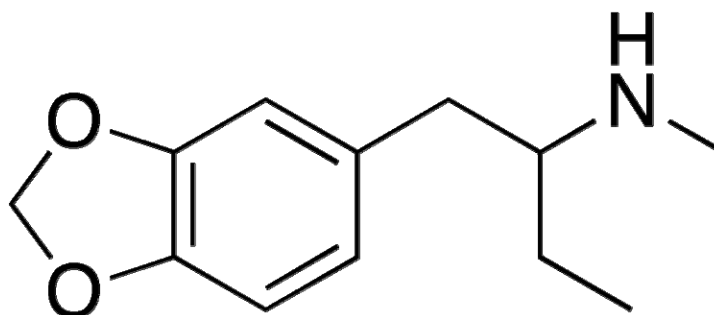


Figura 2.11. Estrutura química da 3,4-metilenodioxi-alfa-etil-N-metilfeniletilamina, substância utilizada como padrão interno.

A identificação dos analitos presentes nas amostras autênticas analisadas foi através do tempo de migração relativa ao padrão interno, uma vez que este é um parâmetro de identificação mais robusto que a avaliação dos tempos de migração de cada substância isolada. De modo análogo, a quantificação das substâncias foi realizada através da metodologia validada que utilizou a razão entre as áreas do analito e do padrão interno como variável dependente da concentração dos fármacos presentes no material biológico.

As Tabelas 2.4 e 2.5 apresentam os resultados obtidos durante a validação do método proposto. Obteve-se linearidade adequada para os analitos estudados ($r \geq 0,98$) utilizando-se a concentração do analito nas matrizes biológicas (em ng/mL) como variável independente e a razão entre a área do mesmo e a área do padrão interno como variável dependente.

Tabela 2.4. Coeficientes angular (a), linear (b) e de correlação (r) das equações de regressão linear obtidas para drogas de abuso e produtos de biotransformação em humor vítreo, por CE-DAD.

Analito	a	b	r	erro da regressão
anfetamina	0,00291	0,02484	0,99391	0,06208
metanfetamina	0,00195	0,03784	0,99829	0,02202
MDA	0,00468	0,00556	0,99864	0,0469
MDMA	0,00444	0,08308	0,99644	0,07214
MDEA	0,00304	0,02684	0,99928	0,02214
cetamina	0,00247	0,01654	0,99936	0,01695
cocaína	0,00242	0,04359	0,99927	0,01778
lidocaína	0,00247	0,05018	0,99972	0,01126
cocaetileno	0,00205	0,01318	0,99319	0,04629
morfina	0,000935	0,01991	0,99914	0,00745
6-monoacetilmorfina	0,000836	0,01839	0,98766	0,02547
heroína	0,000744	0,01294	0,98630	0,02394

Tabela 2.5. Parâmetros de confiança analítica do método validado para determinação de drogas de abuso e produtos de biotransformação em humor vítreo, por CE-DAD.

	ANF	MET	MDA	MDMA	MDEA	CET	COC	LIDO	CET	MORF	6-MAM	HER
Recuperação (%)												
100 ng/mL	93,1	92,5	90,0	92,4	91,7	92,2	94,7	87,2	92,8	82,6	78,9	76,4
Precisão (%CV)*												
50 ng/mL	6,8	7,5	3,4	2,9	4,2	4,2	5,7	6,8	4,5	10,3	9,0	12,3
100 ng/mL	4,5	3,8	2,7	3,3	3,1	3,4	2,7	4,7	3,5	8,8	7,5	8,4
500 ng/mL	5,3	4,7	4,9	5,3	8,1	8,6	3,2	7,9	8,4	7,3	5,6	5,1
Exatidão (%)												
50 ng/mL	89	86	101	96	86	101	100	95	111	89	101	115
100 ng/mL	92	100	100	94	104	100	97	104	99	105	118	115
500 ng/mL	98	99	100	99	99	100	99	100	97	101	103	104

* Coeficiente de variação (%).

Como citado anteriormente, em situações de overdose a concentração de xenobióticos no sangue e, provavelmente no humor vítreo, é significativamente alta (acima de 500 $\mu\text{g/mL}$). O método aqui apresentado é capaz de detectar a presença destas drogas em concentrações muito inferiores a este valor, e quantificar a partir deste valor até níveis 100 vezes menores. Optou-se por trabalhar em uma faixa de concentração menor do que a esperada em situações de overdose porque desta forma é possível identificar e quantificar não apenas as intoxicações agudas, mas também os usos recreacionais. As amostras positivas que apresentaram concentração maior do que limite superior da curva analítica foram diluídas com humor vítreo branco e reprocessada para quantificação confiável.

As Figuras 2.12 e 2.13 apresentam eletroferogramas de duas amostras reais de humor vítreo submetidas ao método analítico proposto, que apresentaram resultado positivo para cocaína (Figura 2.12) e para cocaína, lidocaína e cocaetileno (Figura 2.13). Já a Figura 2.14 apresenta cromatograma-extraído e espectro de massas obtido no método LC-MS/MS utilizado como referência para confirmação dos resultados positivos.

A Tabela 2.6 apresenta as amostras onde foi detectada a presença de pelo menos uma das substâncias investigadas por CE-DAD, bem como os resultados obtidos por LC-MS/MS

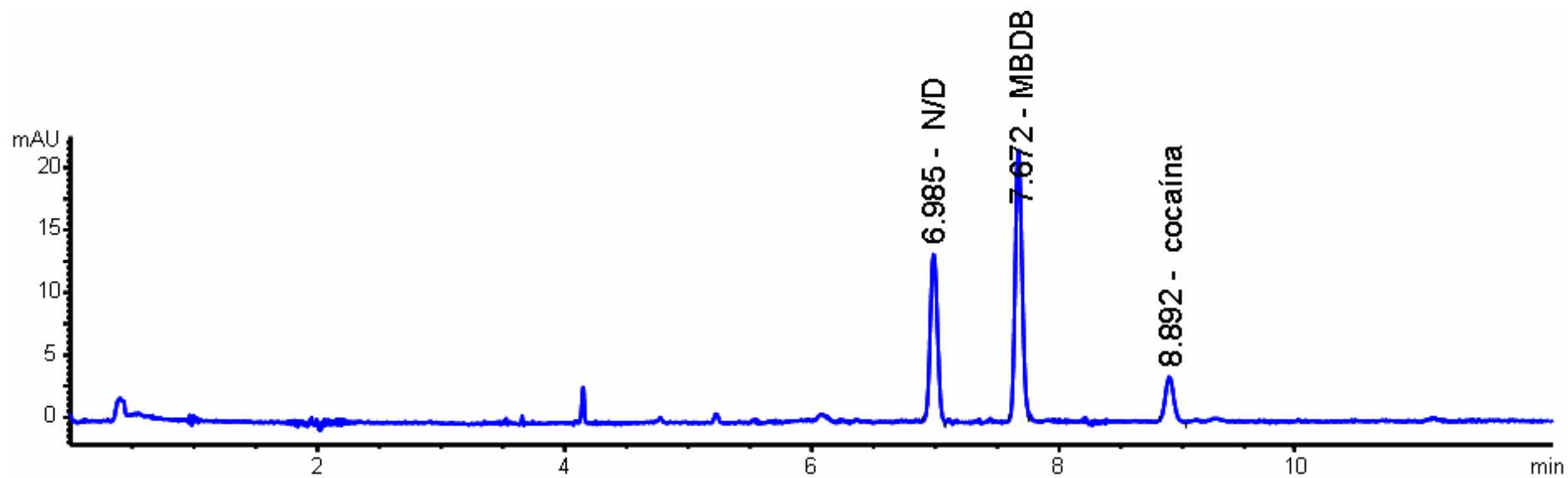


Figura 2.12. Eletroferograma de amostra de humor vítreo submetida ao método analítico proposto, com resultado positivo para presença de cocaína (22 ng/mL). Condições eletroforéticas, idem figura 2.9.

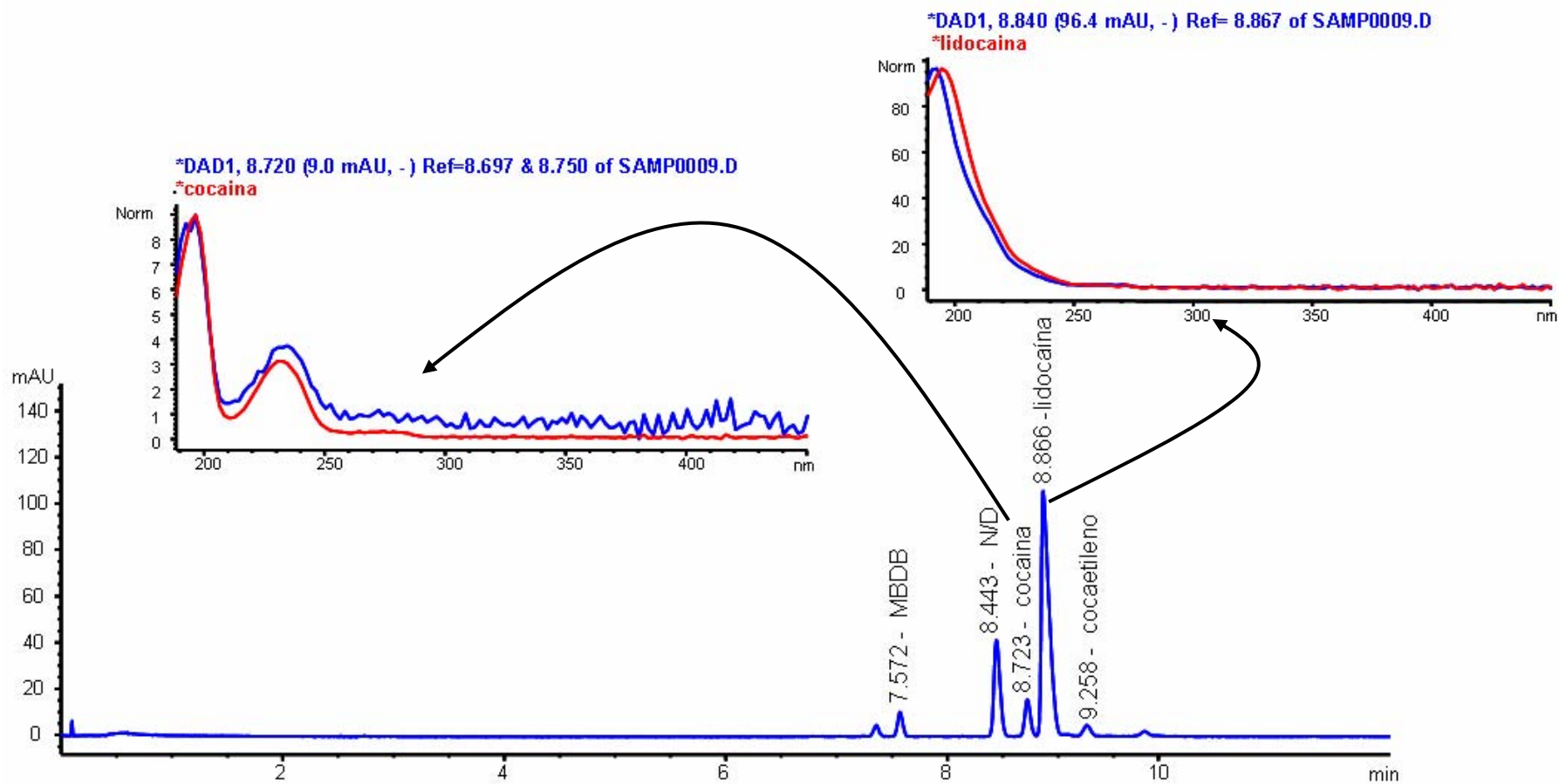


Figura 2.13. Eletroferograma e espectros UV de amostra de humor vítreo submetida ao método analítico proposto, com resultado positivo para presença de cocaína (119 ng/mL), lidocaína (1420 ng/mL) e cocaetileno (21 ng/mL). Condições eletroforéticas, idem figura 2.9.

■ XIC of +MRM (299 pairs): Exp 1, 304.1/182.1 amu from Sample 2 (HV_2300) of doc1.wiff (Turbo Spray)

Max. 3.5e4 cps.

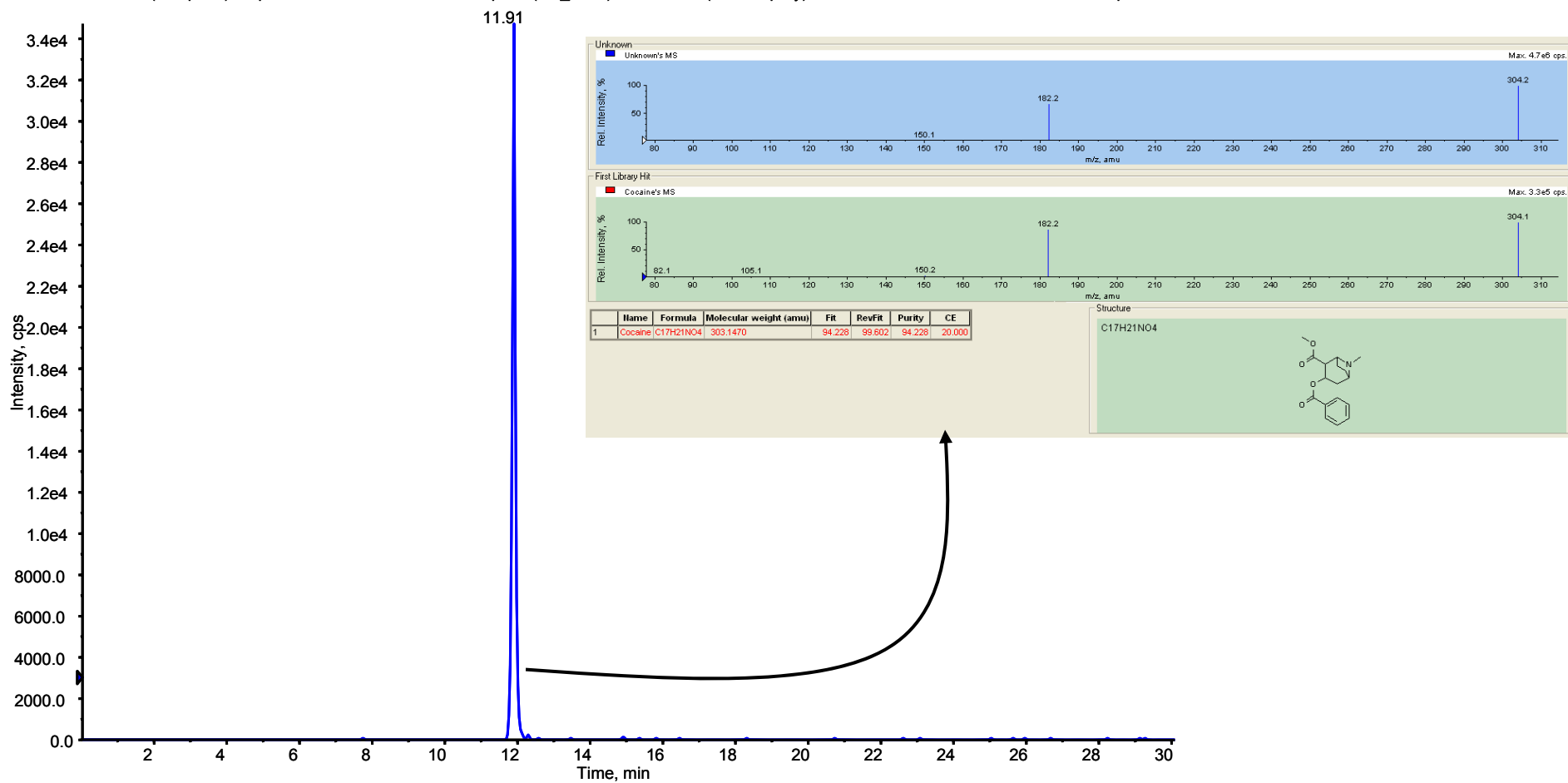


Figura 2.14. Cromatograma-extraído e resultado de busca na biblioteca de espectros de massas de uma amostra real de humor vítreo submetida ao método de confirmação (mesma amostra apresentada na Figura 2.12). Condições analíticas, vide item 2.3.2.

Tabela 2.6. Resultados obtidos nas análises de drogas de abuso e produtos de biotransformação em humor vítreo por CE-DAD e LC-MS/MS.

N. entrada	Ocorrência criminal	Resultado CE/DAD	Resultado LC-MS/MS
1	N/D	coc (28 ng/ml)	coc, bec, eme
2	acidente de transito	cetamina (630 g/ml)	cetamina
3	atropelamento	coc (52 ng/ml), cet (23 ng/ml)	coc, bec, eme, cet
4	homicídio	coc (6 ng/ml), cet (15 ng/ml)	coc, bec, eme, cet
5	homicídio	coc (119 ng/ml), lido (1420	coc, bec, eme, cet, lido
6	homicídio	ng/ml), cet (21 ng/ml) coc (15 ng/ml)	coc, bec, eme
7	resistência à prisão	coc (68 ng/ml)	coc, bec, eme

Continuação Tabela 2.6.

N. entrada	Ocorrência criminal	Resultado CE/DAD	Resultado LC-MS/MS
8	queda	lido (985 ng/ml)	lido, tramadol, bupivacaína,
9	encontro de cadáver	-	diltiazem
10	suicídio	-	aldicarbe
11	N/D	-	carbamazepina, oxicarbamazepina
12	N/D	-	carbamazepina, oxicarbamazepina
13	acidente de trânsito	-	midazolam, fentanil
14	homicídio	-	alprazolam
15	Queda	-	metoclopramida, tramadol
16	N/D	-	haloperidol

Legenda: coc: cocaína; lido: lidocaína; cet: cocaetileno; bec: benzoilecgonina; eme: éster metil ecgonina;

Pelos resultados apresentados na Tabela 2.6, observa-se que o método desenvolvido por CE-DAD detectou a presença de pelo menos um dos analitos investigados em 9,5% das amostras analisadas, sendo a cocaína detectada em 7,1%, o cocaetileno em 3,6%, a lidocaína em 2,4% e a cetamina em 1,2% do número total de amostras analisadas. A maior incidência de resultados positivos para cocaína era esperada, uma vez que esta substância é reconhecidamente relacionada a ocorrências criminais, por aumentar a vigília, a agressividade e causar dependência rapidamente do usuário, ou por desavenças ou disputas relacionadas ao narcotráfico.

De modo análogo, a ausência de resultados positivos para os derivados anfetamínicos (MDMA, MDA e MDEA) pode ser explicado pelos efeitos causados e pelas circunstâncias relacionadas ao uso, pois estas substâncias elevam o humor e a empatia dos usuários, sem aumentar a agressividade. São drogas de abuso ainda relacionadas à classe média, onde tanto os usuários quanto os traficantes são frequentemente jovens de bom poder aquisitivo, geralmente com menor envolvimento com outros tipos de delitos criminais.

A anfetamina, metanfetamina e heroína (consequentemente a 6-monoacetilmorfina e morfina) não foram detectadas provavelmente devido ao padrão de uso destas substâncias, que representam um grave problema de saúde pública nos Estados Unidos da América e na União Européia, mas ainda são pouco utilizadas no Brasil.

Deve-se ressaltar que todos os resultados positivos pelo método baseado em CE/DAD foram confirmados pelo método de LC-MS/MS. No caso das amostras

positivas para presença de cocaína, esta confirmação pode ser realizada pelos critérios expostos no item 2.3.2 (similaridade entre espectros de massas), quanto pela presença de outros produtos de biotransformação, a benzoilecgonina e a éster metil ecgonina, que também puderam ser detectadas por LC-MS/MS, corroborando os achados positivos por eletroforese capilarbenzoilecgonina e éster metil ecgonina não podem ser detectadas no método de CE/DAD por não possuírem mobilidade eletroforética e absorção na região do ultravioleta, respectivamente.

As amostras 9 a 16 foram apresentadas na Tabela 2.6 para mostrar que o humor vítreo pode ser também uma importante matriz biológica para triagem em toxicologia forense *postmortem*. Não foram encontrados na literatura consultada referências sobre a detecção das substâncias aldicarbe, carbamazepina, oxycarbamazepina, fentanil, metoclopramida, tramadol, e haloperidol em amostras de humor vítreo.

2.4. Conclusões

Através dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- a eletroforese capilar com detecção por arranjo de diodos pode ser utilizada para detecção e quantificação de drogas de abuso em humor vítreo, pois fornece limites de detecção, quantificação, precisão e exatidão adequados para esta finalidade. Corrobora ainda esta afirmação a alta positividade do método, quando comparado com método de referência baseado em cromatografia líquida-espectrometria de massas;

- o humor vítreo é um dos mais importantes fluidos biológicos disponíveis para as análises toxicológicas com finalidade forense, por ser matriz limpa, estável e que preserva os analitos ali presentes, devendo ser explorada como matriz de eleição para triagens em análises *postmortem*.

2.5. Referências bibliográficas

BAGGOTT, M.; B. HEIFETS; R. T. JONES; J. MENDELSON; E. SFERIOS ; J. ZEHNDER. Chemical analysis of ecstasy pills. **J. Am. Med. Assoc.**, v.284, n.17, p.2190. 2000.

BAGGOTT, M. ; L. JEROME. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA): a review of the english-language scientific and medical literature. Disponível em: <<http://www.maps.org/mdma/protocol/litreview.html>>. Acesso em: 21 abril 2008.

BECKERS, J. L. ; P. BOCEK. Sample stacking in capillary zone electrophoresis: principles, advantages and limitations. **Electrophoresis**, v.21, p.2747-2767. 2000.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis - Viewpoint and discussion. **J. Chromatogr. B**, v.689, n.1, p.175-180. 1997.

CHASIN, A. A. M. **Diagnóstico laboratorial da intoxicação aguda por cocaína: aspecto forense**. Dissertação (Mestrado em Toxicologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 109 p., 1990.

CHASIN, A. A. M. **Cocaína e cocaetilenó: influência do etanol nas concentrações de cocaína em sangue humano post mortem**. Tese (Doutorado em Toxicologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 141 p., 1996.

CHASIN, A. A. M. Parâmetros de confiança analítica e irrefutabilidade do laudo pericial em toxicologia forense. **Rev. Bras. Toxicol.**, v.14, n.1, p.40-46. 2001.

COE, J. I. Postmortem chemistry: practical considerations and a review of the literature. **J. Forensic Sci.**, v.19, n.1, p.13-32. 1974.

DAHLE'N, J. ; S. V. ECKARDSTEIN. Development of a capillary zone electrophoresis method including a factorial design and simplex optimisation for analysis of amphetamine, amphetamine analogues, cocaine, and heroin. **Forensic Sci. Int.**, v.157, p.93-105. 2006.

GALEANO-DÍAZ, T.; M.-I. ACEDO-VALENZUELA; N. MORA-DÍEZ ; A. SILVA-RODRÍGUEZ. Response surface methodology in the development of a stacking-sensitive capillary electrophoresis method for the analysis of tricyclic antidepressants in human serum. **Electrophoresis**, v.26, p.3518–3527. 2005.

GAS, B.; P. COUFAL; M. JAROS; J. MUZIKAR ; I. JELINEK. Optimization of background electrolytes for capillary electrophoresis I. Mathematical and computational model. **J. Chromatogr. A**, v.905, n.1-2, p.269-279. 2001.

JONES, G. Postmortem toxicology. In: A. C. MOFFAT, M. D. OSSELTON e B. WIDDOP (Ed.). **Clarke's analysis of drugs and poisons**: Pharmaceutical Press, v.1, 2003, p.94-108.

LANDERS, J. P. Introduction to capillary electrophoresis. In: J. P. LANDERS (Ed.). **Capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques**, 2007. 1, p.3-74.

LIMA, I. V. **Humor vítreo em toxicologia forense - determinação de álcool etílico em cadáveres de morte traumática e em estado de putrefação**. Tese (Doutorado em Toxicologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 96 p., 1996.

LURIE, I. S. Capillary electrophoresis of illicit drugs seizures. **Forensic Sci. Int.**, v.92, p.125-136. 1998.

LURIE, I. S.; P. A. HAYS ; K. PARKER. Capillary electrophoresis analysis of a wide variety of seized drugs using the same capillary with dynamic coatings. **Electrophoresis**, v.25, p.1580–1591. 2004.

MANETTO, G.; T. TAGLIARO; F. CRIVELLENTI; V. L. PASCALI ; M. MARIGO. Field-amplified sample stacking capillary zone electrophoresis applied to the analysis of opiate drugs in hair. **Electrophoresis**, v.21, p.2891-2898. 2000.

MICKE, G. A. **Otimização e simulação em eletroforese capilar**. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 227 p., 2004.

MUELLER, C. A.; W. WEINMANN; S. DRESEN; A. SCHREIBER ; M. GERGOV. Development of a multi-target screening analysis for 301 drugs using a QTrap liquid chromatography/tandem mass spectrometry system and automated library searching. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v.19, p.1332–1338. 2005.

ONU. Recommended methods for the detection and assay of heroin, cannabinoids, cocaine, amphetamine, methamphetamine and ring-substituted amphetamine derivatives in biological specimens. Disponível em: <http://www.unodc.org/unodc/en/scientists/recommended-methods-for-the-detection-and-assay-.html>. Acesso em: 17 abril 2008.

PAVLOVIC, D. M.; S. BABIC; A. J. M. HORVAT ; M. KASTELAN-MACAN. Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. **Trends Anal. Chem.**, v.26, n.11, p.1062-1075. 2007.

PETERS, F. T. ; H. H. MAURER. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology – a review. **Accred. Qual. Assur.**, v.7, p.441-449. 2002.

PIETTE, V. ; F. PARMENTIER. Analysis of illicit amphetamine seizures by capillary zone electrophoresis. **J. Chromatogr. A**, v.979, p.345–352. 2002.

PIZARRO, N.; J. ORTUNO; M. FARRE; C. HERNANDEZ-LOPEZ; M. PUJADAS; A. LLEBARIA; J. JOGLAR; P. N. ROSET; M. MAS; J. SEGURA; J. CAMI ; R. DE LA TORRE. Determination of MDMA and its metabolites in blood and urine by gas chromatography-mass spectrometry and analysis of enantiomers by capillary electrophoresis. **J. Anal. Toxicol.**, v.26, n.3, p.157-65. 2002.

POKLIS, A. Analytic/Forensic toxicology. In: C. D. KLAASSEN (Ed.). **Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons**, 2001. 31, p.1089-1108.

QUEIROZ, S. C. N.; C. H. COLLINS ; I. C. S. F. JARDIM. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Quim. Nova**, v.24, n.1, p.68-76. 2001.

RAIKOS, N.; K. CHRISTOPOULOU; G. THEODORIDIS; H. TSOUKALI ; D. PSAROULIS. Determination of amphetamines in human urine by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. **J. Chromatogr. B**, v.789, p.59-63. 2003.

SANTORO, M. I. R. M.; M. S. A. PRADO; M. STEPPE ; E. R. M. K. HACKMANN. Eletroforese capilar: teoria e aplicações na análise de medicamentos. **Rev. Bras. Ciências Farmacêuticas**, v.36, n.1, p.97-110. 2000.

SCOTT, K. S., OLIVER, J. S. . The use of vitreous humor as an alternative to whole blood for the analysis of benzodiazepines. **J. Forensic Sci.**, n.694-697. 2001.

SHERLOCK, K.; K. WOLFF; A. W. HAY ; M. CONNER. Analysis of illicit ecstasy tablets: implications for clinical management in the accident and emergency department. **J. Accid. Emerg. Med.**, v.16, n.3, p.194-197. 1999.

SILVA, O. A.; M. YONAMINE ; V. E. D. REINHARDT. Identificação de 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) e compostos relacionados por cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massas em comprimidos de ecstasy apreendidos em São Paulo. **Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo**, v.34, n.1, p.33-37. 1998.

SOFT/AAFS. Society of Forensic Toxicologists, American Academy of Forensic Sciences, Toxicology Section. **Forensic toxicology laboratory guidelines**. 2006.

SPINELLI, E. **Identificação de usuários de Cannabis por cromatografia em camada delgada de alta eficiência**. Dissertação (Mestrado em Toxicologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 111 p., 1994.

STEDRY, M.; M. JAROS ; B. GAS. Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis - I. System eigenpeaks and resonance in systems with strong electrolytes. **J. Chromatogr. A**, v.960, n.1-2, p.187-198. 2002.

STEDRY, M.; M. JAROS; K. VCELAKOVA ; B. GAS. Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: II. Eigenpeaks in univalent weak electrolytes. **Electrophoresis**, v.24, n.3, p.536-547. 2003.

TAGLIARO, F.; S. TURRINA; P. PISI; F. P. SMITH ; M. MARIGO. Determination of illicit and/or abused drugs and compounds of forensic interest in biosamples by capillary electrophoretic/electrokinetic methods. **J. Chromatogr. B**, v.713, p.27-49. 1998.

TAGLIARO, F.; R. VALENTINI; G. MANETTO; F. CRIVELLENTI; G. CARLI ; M. MARIGO. Hair analysis by using radioimmunoassay, high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis to investigate chronic exposure to heroin, cocaine and/ or ecstasy in applicants for driving licences. **Forensic Sci. Int.**, v.107, p.121-128. 2000.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Quim. Nova**, v.20, n.5, p.493-511. 1997.

THORMANN, W.; Y. AEBI; M. LANZ ; J. CASLAVSKA. Capillary electrophoresis in clinical toxicology. **Forensic Sci Int**, v.92, p.157-183. 1998.

UNODC. Global Illicit Drug Trends 2003. Disponível em: <http://www.unodc.org/pdf/trends2003_www_E.pdf>. Acesso em: 13 mar. 2004.

YOSHIDA, M.; A. AKANE; M. NISHIKAWA; T. WATABIKI ; H. TSUCHIHASHI. Extraction of thiamylal in serum using hydrophilic acetonitrile with subzero-temperature and salting-out methods. **Anal. Chem.**, v.76, p.4672-4675. 2004.

ZANG, J. Y. ; R. L. FOLTZ. Cocaine metabolism in man: identification of four previously unreported cocaine metabolites in human urine. **J. Anal. Toxicol.**, v.14, p.201-205. 1990.

ZIMINSKI, K. R.; C. T. WEMYSS; J. H. BIDANSET; T. J. MANING ; L. LUKASH.
Comparative study of postmortem barbiturates, methadone and morphine in vitreous
humor, blood and tissue. **J. Forensic Sci.**, v.29, n.3, p.903-909. 1984.

Capítulo III:

*Método simples e rápido para determinação de
cocaína e seus principais produtos de
biotransformação por eletroforese capilar
acoplada à espectrometria de massas*

Capítulo 3. Método simples e rápido para determinação de cocaína e seus principais produtos de biotransformação por eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas.

3.1. Introdução

3.1.1. A cocaína, seus produtos de biotransformação e pirólise

Em análises toxicológicas com finalidade forense, principalmente em análises que utilizam matrizes biológicas, é imprescindível que o laboratório tenha à disposição métodos de análise rápidos, confiáveis e que possibilitem a triagem do maior número de toxicantes possíveis (CARDONA et al., 2006).

A cocaína (COC) é uma das drogas de abuso mais consumidas no mundo, estando muito relacionada com situações criminais, quer por sua baixa dose letal (pode levar a situação de overdose com relativa facilidade), quer pelos efeitos desencadeados no usuário, que se torna mais agressivo e violento.

A COC pode ser administrada por diferentes vias no organismo. Qualquer que seja a via de introdução, a COC é rapidamente inativada pela ação de colinesterases plasmáticas, com hidrólise de seus grupamentos éster, originando seus produtos de biotransformação benzoilecgonina (BEC), éster metil ecgonina (EME) e ecgonina (EGC) (FANDIÑO et al., 2002). A BEC e a EME podem ser produzidas *in vitro* após a coleta da amostra biológica, se não houver cuidados especiais durante este procedimento ou em seu armazenamento. O complexo enzimático das colinesterases pode ainda biotransformar a COC por n-desmetilação, originando a norcocaína, um produto dotado de atividade biológica semelhante a do composto original.

Quando a COC é utilizada na forma de base livre (crack) através da via pulmonar (fumada), outros produtos de biotransformação podem ser produzidos. O aquecimento da COC no cachimbo do usuário leva à formação do éster metil anidroecgonina (AEME), um produto de pirólise que é rapidamente absorvido (juntamente com a COC remanescente) nos pulmões. Este produto de pirólise pode então ser hidrolisado no organismo, originando a anidroecgonina (AE) (CARDONA et al., 2006).

Quando o usuário faz uso concomitante de COC e etanol, uma parcela substancial da cocaína presente em seu plasma será convertida em cocaetileno (CET) através de reações de transesterificação mediada por carboxiesterases microsossomais hepáticas. Este produto de biotransformação é de suma importância na toxicidade da COC, uma vez que apresenta cardiotoxicidade muito superior ao composto original, aumentando de modo significativo o risco de infarto do miocárdio (ANTONILLI et al., 2001; FANDIÑO et al., 2002; BOATTO et al., 2005). A Figura 3.1. apresenta a estrutura química da cocaína e seus principais produtos de biotransformação e pirólise.

Pela presença de produtos de biotransformação específicos é possível então inferir sobre a via de introdução utilizada e os hábitos do usuário: se a AEME for detectada no fluido biológico, pode-se afirmar que a COC foi administrada por via pulmonar (fumada); se o CET for detectado no material biológico, há evidência de que além de utilizar COC, o usuário fez ainda uso de etanol (ANTONILLI et al., 2001; CARDONA et al., 2006).

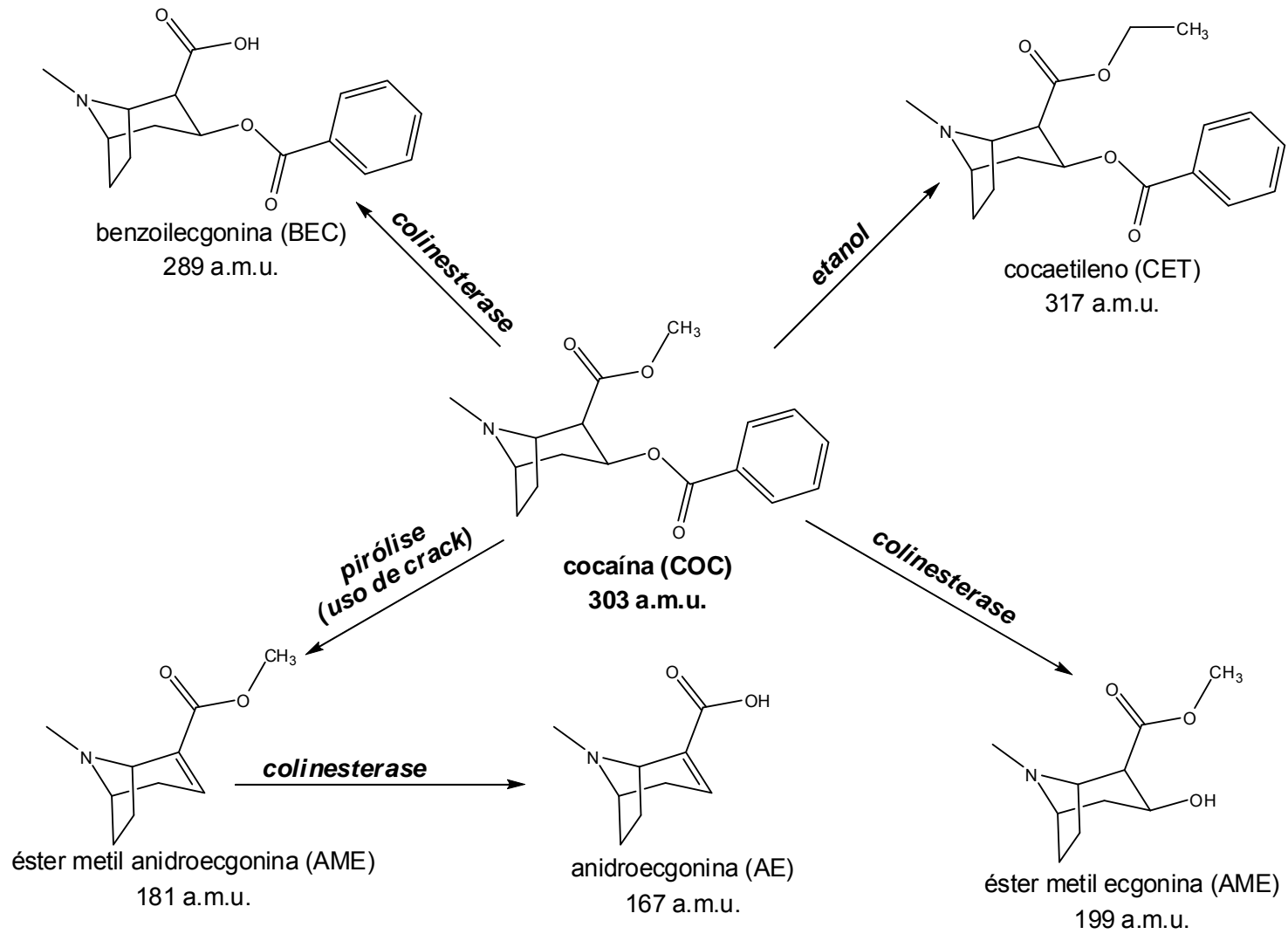


Figura 3.1. Estrutura química da cocaína e seus principais produtos de biotransformação e pirólise.

3.1.2. Eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas (CE-MS)

Várias técnicas analíticas para detecção de COC e seus produtos de biotransformação são citadas na literatura científica internacional, destacando-se a cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC) (ANTONILLI et al., 2001), cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta (ANTONILLI et al., 2001; BRUNETTO et al., 2005) ou fluorescência (CLAUWAERT et al., 2000; SUN et al., 2000) e a cromatografia em fase gasosa com detecção por ionização em chama (FERNANDEZ et al., 2006) ou acoplada à espectrometria de massas (CHASIN e MIDIO, 2000; YONAMINE e SILVA, 2002; YONAMINE e SAVIANO, 2006; GAYTON-ELY et al., 2007). Contudo, a análise destes compostos através das técnicas supra citadas requer sempre etapas de pré-tratamento da amostra biológica e/ou reações de derivatização, para que seja possível a extração e a detecção destes produtos de biotransformação, que são compostos orgânicos polares e termolábeis. Mesmo sendo a técnica analítica mais citada para análises de COC e seus produtos de biotransformação, a cromatografia gasosa deve ser utilizada com ressalvas quando se pretende analisar os produtos de pirólise (comprovar o uso de crack), pois já foi demonstrado que a COC sofre degradação térmica quando submetida a alta temperatura do bloco de injeção do cromatógrafo gasoso (GONZÁLEZ et al., 1995; TOENNES et al., 2003; GAYTON-ELY et al., 2007).

Por proporcionar análises rápidas, com alta eficiência de separação, baixo consumo de solventes e de amostra, a eletroforese capilar (CE) vem se tornando ferramenta analítica de grande importância em laboratórios forenses, trabalhando com ferramenta alternativa ou complementar as cromatografias líquida e gasosa.

Por fornecer informação estrutural inequívoca, por elucidar o íon molecular e o do perfil de fragmentação de um fármaco ou droga, a espectrometria de massas (MS) é ferramenta indispensável em laboratórios forenses (CARDONA et al., 2006), sendo considerada técnica “ouro”, sendo a única técnica aceita para confirmação de resultados por tribunais norte-americanos e europeus.

Assim, o acoplamento da CE com a espectrometria de massas (MS) mostra-se como uma combinação das mais promissoras em química analítica (principalmente com aplicações forenses), pois alia a alta eficiência e velocidade de análise da CE com a sensibilidade, seletividade e universalidade inerentes a MS (TAGLIARO e BORTOLOTTI, 2008).

Watson (2003) afirma que a interface para acoplamento da CE com a MS é um dos mais recentes avanços em espectrometria de massas. Este autor sugere ainda que a CE-MS poderá ter grande utilidade em exames como a obtenção do perfil de impurezas presentes em drogas de abuso sintéticas.

O acoplamento entre a eletroforese capilar e a espectrometria de massas difere dos existentes entre cromatografia líquida-espectrometria de massas (LC-MS) por exigir uma complementação do fluxo que chega até a interface de acoplamento dos equipamentos. O modo de ionização mais utilizado para o acoplamento eletroforese capilar-espectrometria de massas (CE-MS) é do tipo *electrospray* (ESI). Para uma ionização eficiente, a fonte de ionização para este acoplamento deve ser capaz de misturar ao baixíssimo fluxo eluente do capilar da CE (na ordem de nanolitros por minuto) um líquido auxiliar (*sheath liquid*) para que se possa obter um *electrospray* estável e reprodutível (WATSON, 2003).

Para que as separações por CE ocorram uma alta tensão é aplicada entre as extremidades do capilar. Portanto, em qualquer equipamento de CE-MS, o circuito elétrico do CE precisa ser fechado para que a separação ocorra corretamente. Em separações por eletroforese capilar que não envolvem espectrometria de massas, o contato é fechado mantendo solução condutora em vials nas duas extremidades do capilar (geralmente preenchido pela mesma solução) durante a separação. Já em CE-MS, uma das extremidades do capilar estará ligada a fonte ESI, onde deverá existir a combinação entre o efluente do capilar, um líquido auxiliar e um gás nebulizador: o líquido auxiliar é necessário por manter o contato eletroforético fechado (exigência para que ocorra a separação) e o gás nebulizador (normalmente nitrogênio) é responsável pela formação do spray durante o processo de dessolvatação e ionização da amostra (WATSON, 2003).

Este tipo de interface é conhecida como *nano-electrospray* (NESI) (Figura 3.2.), e emprega um sistema formado por três capilares, onde o mais ao centro é o capilar de sílica fundida de separação do CE, o segundo capilar reveste o primeiro e é responsável por fechar o contato do CE, conduzindo uma solução condutora que leva o nome de líquido auxiliar, bombeado em uma vazão que pode variar de 2 a 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. O terceiro capilar reveste os dois primeiros, e por ele passa o gás nebulizador responsável pela dessolvatação da fase líquida que sai do capilar.

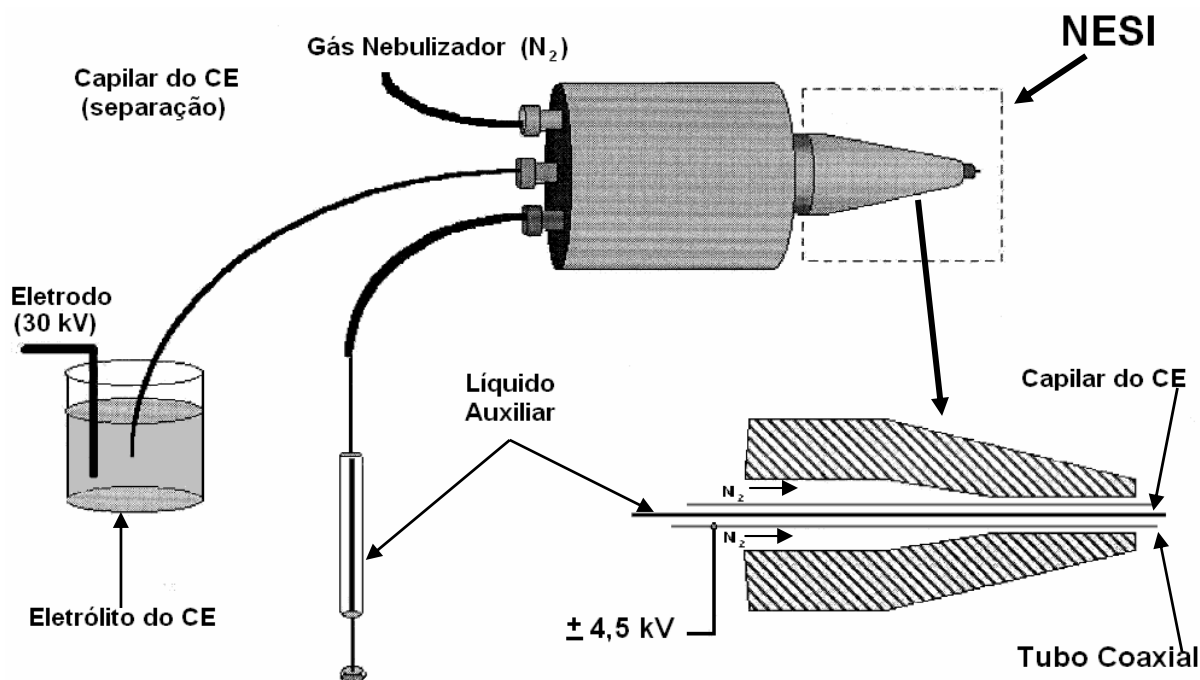


Figura 3.2. Representação esquemática da fonte de ionização no CE-NESI-MS

(adaptado de McClean, O’Kane e Smith, 2000).

Em um sistema CE-NESI-MS o analito ao sair do capilar sofre ionização a pressão atmosférica, passando por um capilar aquecido, sendo transferido para regiões de pressões reduzidas até uma zona de alto vácuo, passando por analisadores de massas que promovem a separação dos íons, chegando finalmente ao detector.

Na literatura científica internacional, a utilização de CE-MS para identificação e quantificação de drogas de abuso em fluidos biológicos é citada por diversos autores. Contudo, estes trabalhos são baseadas na análise de derivados anfetamínicos (GEISER et al., 2000; VANHOENACKER et al., 2004; BOATTO et al., 2005; RUDAZ et al., 2005), opiáceos (TSAI et al., 2000; WEY e THORMANN, 2001), e alcalóides (CHERKAOUI et al., 2001). Nenhuma referência sobre a utilização de

CE-MS para análise de COC e seus produtos de biotransformação foi encontrada na literatura consultada.

3.2. Objetivo

Face ao exposto, este trabalho tem por objetivo desenvolver um método simples e rápido para determinação de cocaína e cinco de seus produtos de biotransformação (EME, BEC, CET, AEME, AE) em urina, por eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas-ionização por *nano-electrospray* (CE-NESI-MS), com minimização da etapa de preparo da amostra.

3.3. Materiais e métodos

3.3.1. Reagentes

Soluções padrão na concentração de 1 mg/mL de COC, EME, BEC, CET, AEME, AE e benzoilecgonina isopropil éster (utilizada como padrão interno, PI) foram adquiridas da Cerilliant (Austin, TX, EUA). Estas soluções foram utilizadas para preparar soluções de trabalho em diferentes concentrações. Ácido fórmico grau analítico foi obtido da empresa Flurka (Buchs, Suíça). Metanol e acetonitrila grau-HPLC foram obtidos da empresa Merck (Darmstadt, Alemanha). Água ultra-pura foi obtida através de Milli-Q da Millipore (Bedford, MA, EUA).

3.3.2. Eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massas (CE-MS)

O sistema de eletroforese capilar utilizado neste trabalho foi um Beckman P/ACE MDQ (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA), controlado pelo software 32 Karat versão 7.0 (Beckman Coulter). As separações foram realizadas utilizando capilar de sílica fundida de 50 μm de diâmetro interno e 80 cm de comprimento total, termostaticado a 25°C pela circulação de líquido refrigerante. Solução aquosa de ácido fórmico 1 mol/L foi utilizada como eletrólito de corrida (BGE). Antes de cada corrida eletroforética o capilar era lavado com BGE pela aplicação de 25 psi durante 3 minutos. A amostra e padrões foram introduzidos no sistema por injeção hidrodinâmica (4 psi/10s). A tensão aplicada para separação foi de 30 kV (corrente resultante de aproximadamente 40 μA).

O espectrômetro de massas utilizado neste trabalho foi um iontrap LCQ Deca XP MAX da empresa Finnigan (Finnigan MAT, San Jose, CA, EUA) equipado com fonte de ionização do tipo *nano-electrospray* (NESI), que operava em modo positivo de ionização (5 kV), funcionando ainda como o catodo do sistema de CE. O gás auxiliar utilizado foi nitrogênio (N_2) com pressão ajustada para 35 unidades arbitrárias (o gás auxiliar era acionado 0,25 min após o início da corrida eletroforética), e uma mistura de metanol-água (50:50, v/v) contendo 0,25% de ácido fórmico com fluxo de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ foi utilizada como líquido auxiliar coaxial da fonte de ionização NESI. A temperatura do capilar do espectrômetro de massas foi mantida a 200°C. Antes das análises, o equipamento foi ajustado para fornecer o melhor resultado para o íon molecular da cocaína através do ajuste da voltagem das lentes, primeiro e segundo octapolos e das lentes interoctapolos. O íon moleuclar (íon pai) da cocaína e seus produtos de biotransformação foram detectados e quantificados

por *full scan* (140-400 m/z) e sua presença na amostra foi então confirmada por experimentos de fragmentação seriada (MS-MS), utilizando energia de colisão relativa de 34%. O espectrômetro de massas era controlado pelo software Xcalibur (Finnigan).

3.3.3. *Preparo de amostras*

Amostras de urina “branco” foram coletadas de voluntários do laboratório do próprio laboratório, e foram então enriquecidas com alíquotas das soluções de trabalho para serem utilizadas durante a validação. Todas as amostras de urina foram armazenadas a -20°C até o momento da análise. O método validado foi aplicado a amostras de urina coletadas por Médico-Legista do Instituto Médico-Legal do Estado de São Paulo e encaminhadas para exame toxicológico (n=15).

O preparo das amostras foi baseado na precipitação de proteínas-peptídeos presentes na urina, seguido por diluição antes da injeção no sistema CE-MS. Resumidamente, 500 µL de amostra de urina e 50 µL do padrão interno (solução metanólica do benzoilecgonina isopropil éster, concentração 10 µg/mL) foram transferidos para tubo cônico de polipropileno, dotado de tampa de mesmo material, com capacidade para 2 mL. A este tubo foram adicionados 500 µL de acetonitrila, seguido por agitação em vortex (30 s) e centrifugação a 10000 rpm por 5 min. Após a centrifugação, 1 mL do sobrenadante foi transferido para vial de vidro que continha 500 µL de BGE, sendo então acondicionado no injetor automático do sistema CE-MS mantido a temperatura ambiente.

3.3.4. Validação do método

O método desenvolvido foi validado de acordo com procedimentos e parâmetros de confiança analítica comumente utilizados em toxicologia forense (PETERS e MAURER, 2002; SOFT/AAFS, 2006). Para construção das curvas analíticas, amostras de urina branco foram enriquecidas com COC e seus produtos de biotransformação na faixa de concentração de 250 a 5000 ng/mL e submetidas ao procedimento preparo descrito anteriormente. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método foram avaliados através de diluições seriadas de amostra enriquecida com padrões, até a obtenção de sinal analítico três vezes (LD) e dez vezes (LQ) maior que o ruído. A recuperação foi avaliada em três níveis de concentração (500-1500-4000 ng/mL), comparando-se os valores de área absoluta obtidos por amostras branco enriquecidas e submetidas a procedimento descrito acima com amostras branco que foram submetidas ao preparo de amostra, mas os padrões só foram adicionados instantes antes da injeção no CE-MS. A precisão do método foi avaliada nos mesmos níveis de concentração estudados na recuperação (triplicatas de cada concentração).

3.4. Resultados e discussões

A análise de drogas de abuso em urina com injeção direta do fluido biológico em sistemas cromatográficos e eletroforéticos vem sendo estudada por diversos grupos de pesquisa. A vantagem mais notória deste procedimento é a economia de tempo, uma vez que o procedimento de extração é eliminado do processo (LLOYD, 1996).

No presente trabalho, o preparo da amostra biológica mostrou-se muito simples. A adição de acetonitrila a amostra de urina foi utilizada para precipitação de peptídeos e proteínas, que poderiam aderir à parede interna do capilar, encurtando sua vida útil. A segunda diluição da amostra, com BGE foi importante para o controle da força iônica da amostra, permitir que todos os analitos estivessem em seu estado catiônico, além de contribuir para que a corrente elétrica permanecesse constante durante a corrida eletroforética.

Normalmente, os eletrólitos utilizados em CE-MS devem ser compostos por sais voláteis para prevenir a precipitação dos mesmos na fonte NESI. Por esta razão, neste trabalho, o eletrólito de corrida escolhido foi solução aquosa de ácido fórmico 1 mol/L (pH=1,86). Este eletrólito foi escolhido ainda baseado na característica eletroforética dos analitos. Alguns produtos de biotransformação da COC, como a BEC e a AE são compostos zwitteriônicos, dotados de cargas elétricas unitárias de sinais opostos em uma ampla faixa de pH. Para analisar estes compostos por CE, o pH do eletrólito de corrida deve ser ajustado a valores abaixo da constante de ionização do grupamento amina ($pK_a=9,0$) ou acima da constante de ionização do grupamento carboxílico ($pK_a=2,1$), para que a substância possa ser analisada como cátion ou como ânion, respectivamente.

Em CE-MS, o líquido auxiliar é composto geralmente por mistura de água e modificadores orgânicos. Para ionização positiva, deve-se dar preferência a modificadores orgânicos como metanol, pois os álcoois contribuem para o processo de formação de analitos protonados na ionização por electrospray (TSAI et al., 2000). Por esta razão, neste trabalho foi utilizado uma mistura de metanol-água (50:50, v/v) contendo 0,25% de ácido fórmico.

Além da composição e vazão do líquido auxiliar, a vazão do gás de nebulização e a tensão aplicada para formação do *electrospray* também podem influenciar o sinal obtido, por afetarem diretamente a formação dos íons moleculares. A fim de otimizar a ionização dos analitos na fonte do espectrômetro de massas, realizou-se um planejamento fatorial 2^3 , escolhendo-se como fator de resposta a intensidade do sinal dos analitos. Foi realizada infusão de solução padrão de cocaína 5 µg/mL preparada em uma mistura metanol-água (50:50, v/v) contendo 0,25% de ácido fórmico. A Tabela 3.1 apresenta as variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial, e a Tabela 3.2 mostra os resultados obtidos para cada nível estudado.

Tabela 3.1. Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial 2^3 para otimização da fonte NESI.

Fatores		(-1)	(+1)
A	Tensão do spray (kV)	3	5
B	Gás de nebulização (arb)	35	55
C	Líquido auxiliar (µL/min)	2	5

Tabela 3.2. Valores da intensidade de sinal do íon molecular da cocaína ($m/z=304$) para os experimentos do planejamento fatorial 2^3 .

Ensaio	A	B	C	Sinal obtido para o íon molecular da cocaína ($\times 10^4$ cps)
1	-1	-1	-1	2,2
2	1	-1	-1	15,6
3	-1	1	-1	28,1
4	1	1	-1	21,5
5	-1	-1	1	18,1
6	1	-1	1	137,0
7	-1	1	1	95,1
8	1	1	1	49,1

Os resultados mostrados na Tabela 3.2 mostram que na fonte NESI a intensidade do sinal da cocaína é maior se aplicada maior tensão no spray, menor vazão do gás de nebulização utilizado e uma maior vazão do líquido auxiliar. Mesmo tendo sido observado que o aumento da vazão do líquido auxiliar contribuía de certa forma para uma melhor ionização dos analitos no *electrospray*, sua vazão não foi extrapolada para valores maiores do que $5 \mu\text{L}/\text{min}$, pois durante a corrida eletroforética a maior quantidade de líquido auxiliar acabaria por diluir os analitos na ponta do capilar.

O tempo de corrida no método apresentado é menor do que 8 minutos, com tempo de migração dos analitos em torno de 7 minutos (Figura 3.3). Observou-se considerável variação do tempo de migração absoluta dos analitos, possivelmente causada por fatores intrínsecos da interface NESI (discutidos mais adiante neste capítulo). O uso do padrão interno para obtenção de tempos de migração relativos foi suficiente para correção deste problema (variação nunca maior do que 6%).

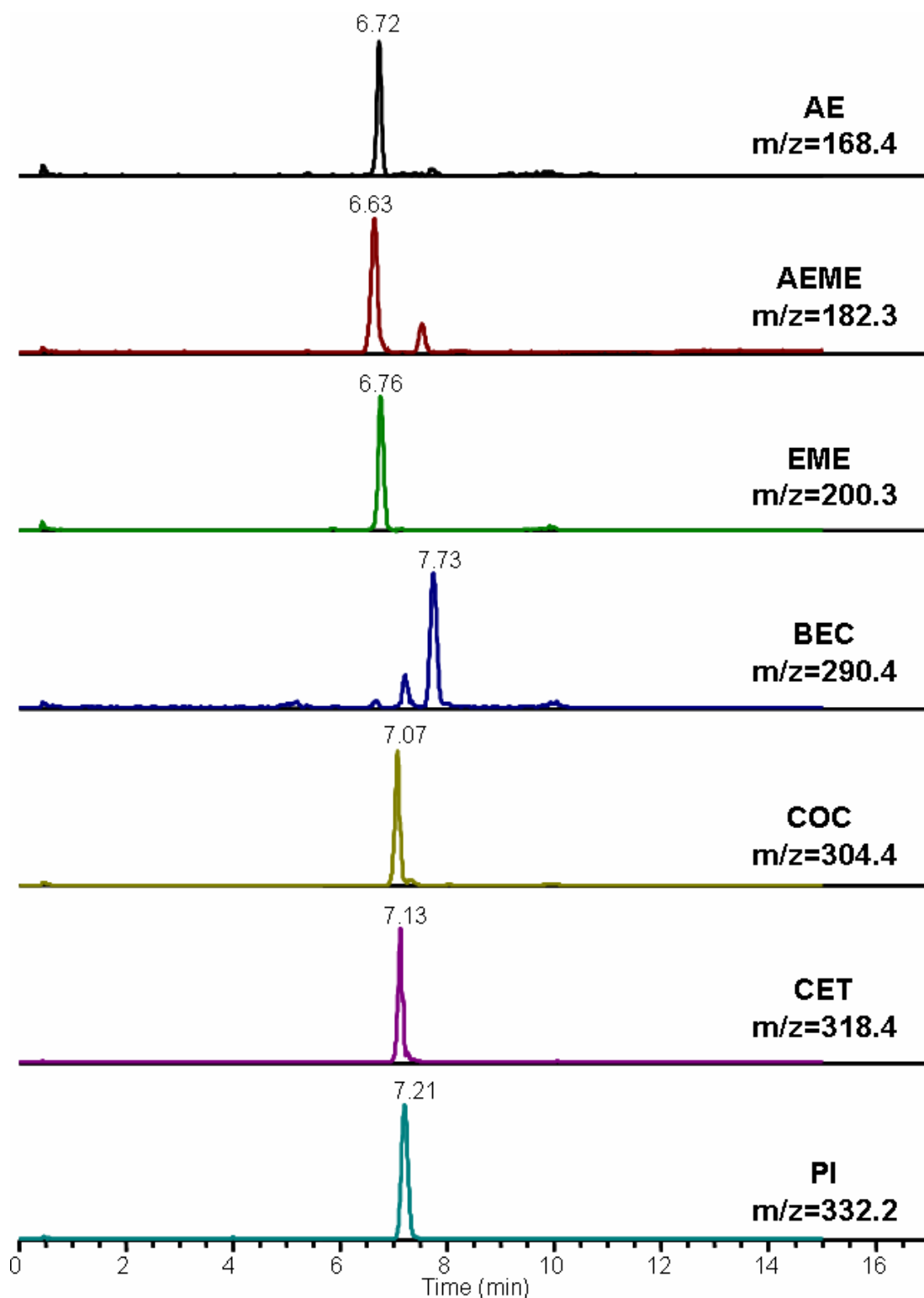


Figura 3.3. Eletroferograma íon-extraído de amostra de urina branco enriquecida com cocaína e seus produtos de biotransformação e pirólise (5 µg/mL). Condições experimentais: capilar de sílica fundida de 50 µm ID x 80 cm; eletrólito: ácido fórmico 1 mol/L; 30 kV, 25°C, injeção hidrodinâmica 4 psi/10s. Líquido auxiliar: metanol-água (50:50, v/v) contendo 0,25% de ácido fórmico, fluxo de 5 µL/min. Espectrômetro de massas trabalhando em modo *full scan* (140-400 m/z).

Embora não ocorra resolução em linha de base dos analitos, condição essencial para correta identificação e/ou quantificação por eletroforese capilar com detecção por absorção da luz ultravioleta (CE-UV), a espectrometria de massas permite que os íons moleculares e fragmentos gerados sejam detectados separadamente. A Tabela 3.3 apresenta o íon molecular e o fragmento mais abundante (gerado a partir de energia de colisão igual a 34%) de cada substância estudada. A análise utilizando transições íon molecular-fragmento conferiram boa seletividade ao método proposto, como pode ser observado nas Figuras 3.4 e 3.5.

Tabela 3.3. Íon molecular e fragmentos gerados no experimento MS/MS.

Analito	Íon molecular (m/z)	Fragmento MS-MS* (m/z)
anidroecgonina	168	137
éster metil anidroecgonina	182	150
éster metil ecgonina	200	182
benzoilecgonina	289	168
cocaína	304	182
cocaetileno	318	196
benzoilecgonina isopropil éster (PI)	332	210

* Fragmento majoritário de cada analito, obtido utilizando 34% de energia de colisão.

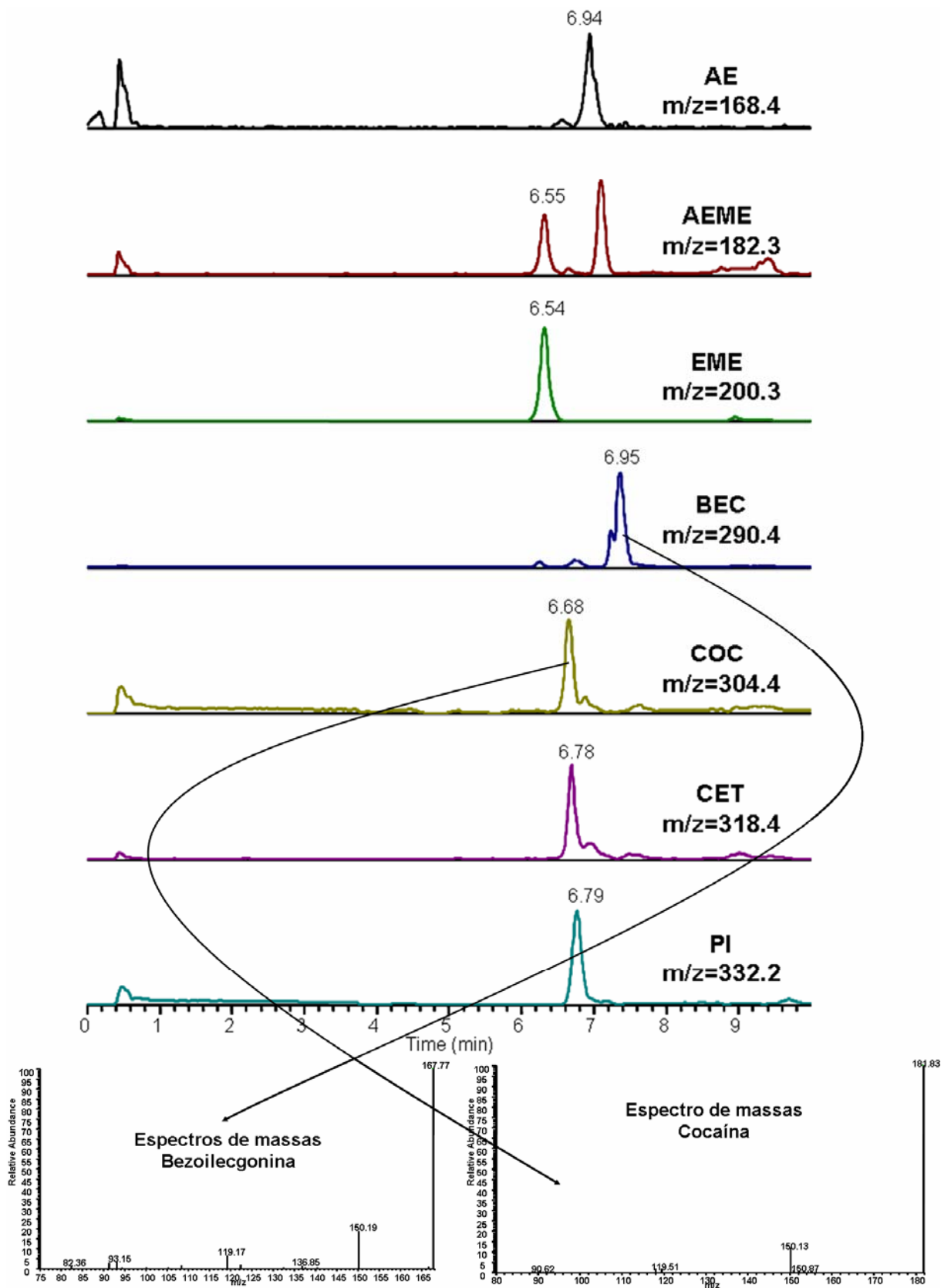


Figura 3.4. Eletroferograma íon-extraído de amostra de urina positiva para todos os analitos investigados, mostrando também os espectros de massas da COC e BEC gerados a partir de energia de colisão relativa de 34%, utilizados como critério de identificação do método desenvolvido. Condições experimentais, idem figura 3.3.

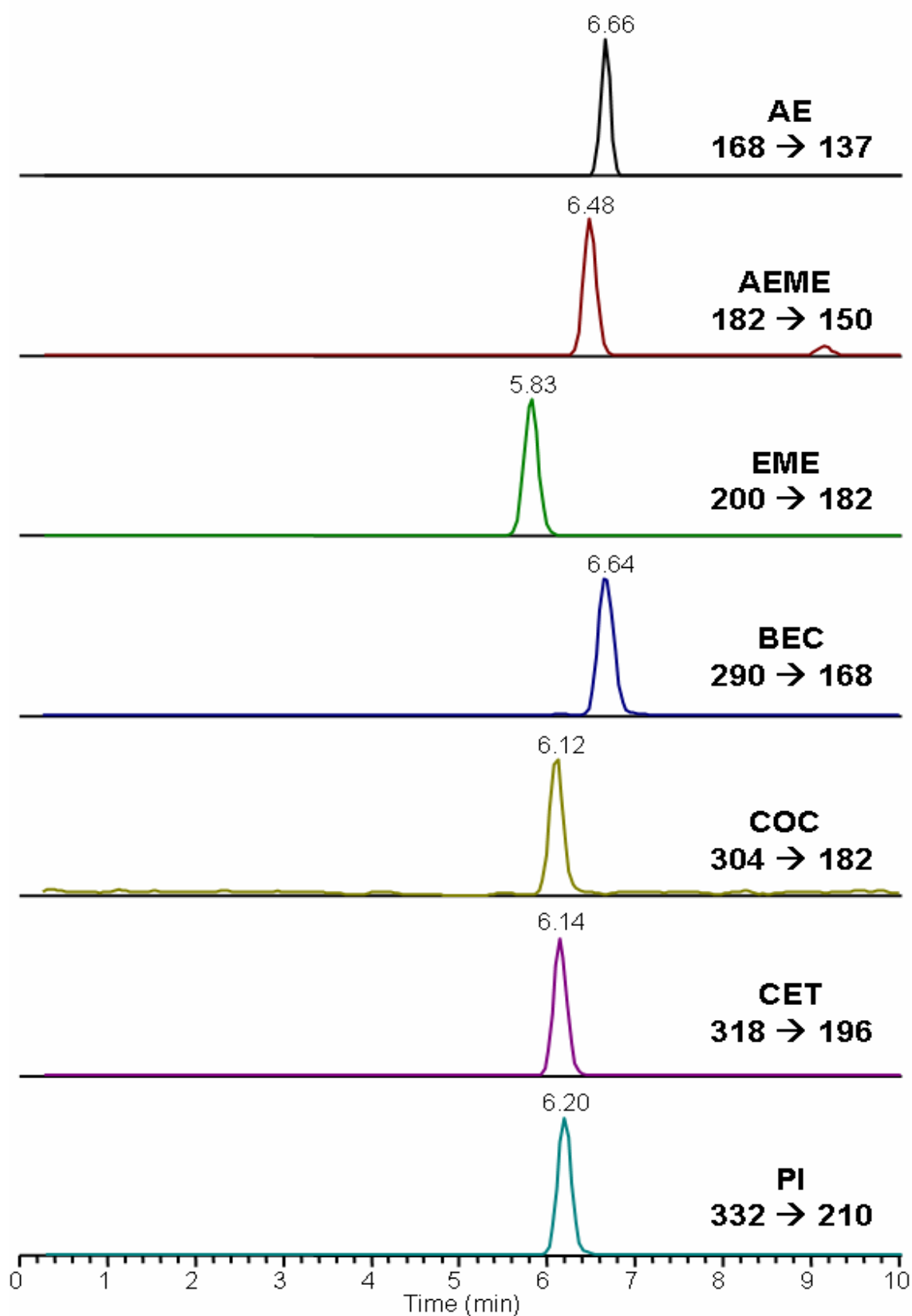


Figura 3.5. Eletroferograma ion-extraído confirmatório (transições geradas a partir de energia de colisão de relativa de 34%) da mesma amostra de urina mostrada na figura 3.4. Condições experimentais, idem figura 3.3.

A diminuição na resolução quando é utilizada interface com líquido auxiliar coaxial em CE-MS pode ser explicada pela difusão que ocorre na ponta do capilar onde o líquido auxiliar é misturado ao eletrólito de corrida, causando alargamento dos picos.

Consideram que em CE-MS são utilizados capilares longos, de 80 a 100 cm de comprimento, seria esperado que o tempo de migração dos analitos fosse significativamente mais longo do que os que fossem obtidos por CE-UV, que frequentemente emprega capilares de até 60 cm de comprimento. Durante os experimentos práticos com CE-MS, os tempos de migração foram relativamente pequenos para o tamanho do capilar utilizado, indicando que outro fator contribui para a mobilidade eletroforética dos analitos, fato também observado por outros autores (TSAI et al., 2000). Este outro fator deve ser o fluxo de gás nebulizador (N_2) utilizado no NESI. Este fluxo de gás cria uma força de sucção na ponta na extremidade de saída do capilar criando um fluxo laminar no interior do mesmo, assim aumentando a mobilidade aparente dos analitos. Ainda que este fato colabore por diminuir o tempo de análise, este contribui para a diminuição da resolução entre os picos. Foi observado ainda que a sucção causada pelo gás nebulizador pode ainda mover o eletrólito de corrida presente no interior do capilar, permitindo a entrada de bolhas de ar durante a troca de vials no instante da injeção da amostra, o que levava a quedas da corrente elétrica e o interrupção das análises. Este problema foi solucionado desligando-se o fluxo do gás nebulizador durante a seqüência de injeção, e religando este fluxo 0,25 min após o início da corrida.

As Tabelas 3.4 e 3.5 apresentam os resultados obtidos durante a validação do método proposto. Obteve-se linearidade adequada para os analitos estudados ($r \geq 0,98$) utilizando-se a concentração do analito na urina (em ng/mL) como variável independente e a razão entre a área do mesmo e a área do padrão interno como variável dependente.

Tabela 3.4. Coeficientes angular (a), linear (b) e de correlação (r) das equações de regressão linear obtidas para COC e seus produtos de biotransformação em urina, por CE-MS.

Analito	a	b	r
anidroecgonina	0,0129	0,0008	0,978
éster metil anidroecgonina	0,0787	-0,0272	0,999
éster metil ecgonina	0,1688	-0,0159	0,980
benzoilecgonina	0,0864	0,0001	0,991
cocaína	0,2137	0,0667	0,991
cocaetileno	0,2262	-0,0006	0,998

Tabela 3.5. Parâmetros de confiança analítica do método validado para determinação de COC e seus produtos de biotransformação em urina por CE-MS.

	AE	AEME	EME	BEC	COC	CET
Recuperação (%)						
500 ng/mL	94.8	88.4	77.9	86.4	83.0	93.3
1500 ng/mL	84.3	102.8	76.5	99.0	104.0	91.2
5000 ng/mL	83.3	87.6	79.9	98.5	108.9	96.8
Precisão (%CV)*						
500 ng/mL	18.0	6.2	6.3	9.5	9.7	7.5
1500 ng/mL	10.2	1.6	7.3	5.2	4.2	3.4
5000 ng/mL	3.5	8.7	6.9	5.9	6.3	5.2
LD (ng/mL)	250	250	250	250	100	100
LQ (ng/mL)	500	500	500	500	250	250

* Coeficiente de variação (%).

Cone et al (1998) realizaram estudo onde foi administrado cloridrato de cocaína em concentrações terapêuticas a 6 homens com histórico de uso da droga, pelas vias intravenosa (25 mg), intranasal (25 mg) e pulmonar (42 mg de cocaína na forma básica) (CONE et al., 1998). As concentrações urinárias da cocaína e seus produtos de biotransformação são mostrados na Tabela 3.6.

Tabela 3.6. Concentração de cocaína e seus produtos de biotransformação em urina após administração a voluntários usuários da droga por diferentes vias de introdução no organismo (adaptada de CONE et al., 1998).

	Intravenosa (n=6) ⁺		Intranasal (n=6) ⁺		Pulmonar(n=5) ⁺	
	Concentração (ng/L)	Tempo (h)*	Concentração (ng/L)	Tempo (h)*	Concentração (ng/L)	Tempo (h)*
COC	775	3,9	412	5,1	707	2,6
BEC	15611	5,6	13681	7,8	9395	4,1
EME	4968	5,0	5831	5,0	3193	4,1
AEME	0	n/d	0	n/d	23	2,3

⁺ n = número de voluntários testados por esta via de introdução.

* Tempo decorrido entre a administração e a coleta da amostra.

Pelos resultados obtidos durante a validação do método e frente aos dados presentes na Tabela 3.6., pode-se afirmar que o método desenvolvido é, além de simples e rápido, capaz de detectar a presença de cocaína e seus produtos de biotransformação em urina, mesmo após o uso de concentrações terapêuticas. A AEME é uma substância lábil, que pode sofrer hidrólise no organismo e mesmo no

fluido biológico após a coleta, originando a AE que será encontrada no material em concentração superior ao precursor. Assim, para melhor avaliação do uso de crack através de seus produtos de pirólise, o método analítico deve ser capaz de detectar as duas substâncias. Assim, ainda que a sensibilidade do método proposto seja insuficiente para detectar a quantidade encontrada por Cone et al. (1998) para AEME, ele se presta para comprovar uso do crack por monitorar ainda o produto de biotransformação mais estável desta via (AE).

Como a meia-vida da cocaína é significativamente menor que a de seus produtos BEC e EME, quando a amostra de urina é coletada dias após o uso da droga, é esperado que esta amostra contenha apenas os produtos de biotransformação, informação suficiente para comprovar o uso da droga. Considerando-se um valor de *cutoff* de 300 ng/mL, é possível detectar BEC na urina de usuários por até 60 h (2,5 dias) após um único uso recreacional (JONES, 1998). O eletroferograma apresentado na Figura 3.6. é um exemplo de resultado esperado quando a amostra é coletada dias após o uso (ausência de COC e presença de BEC e EME).

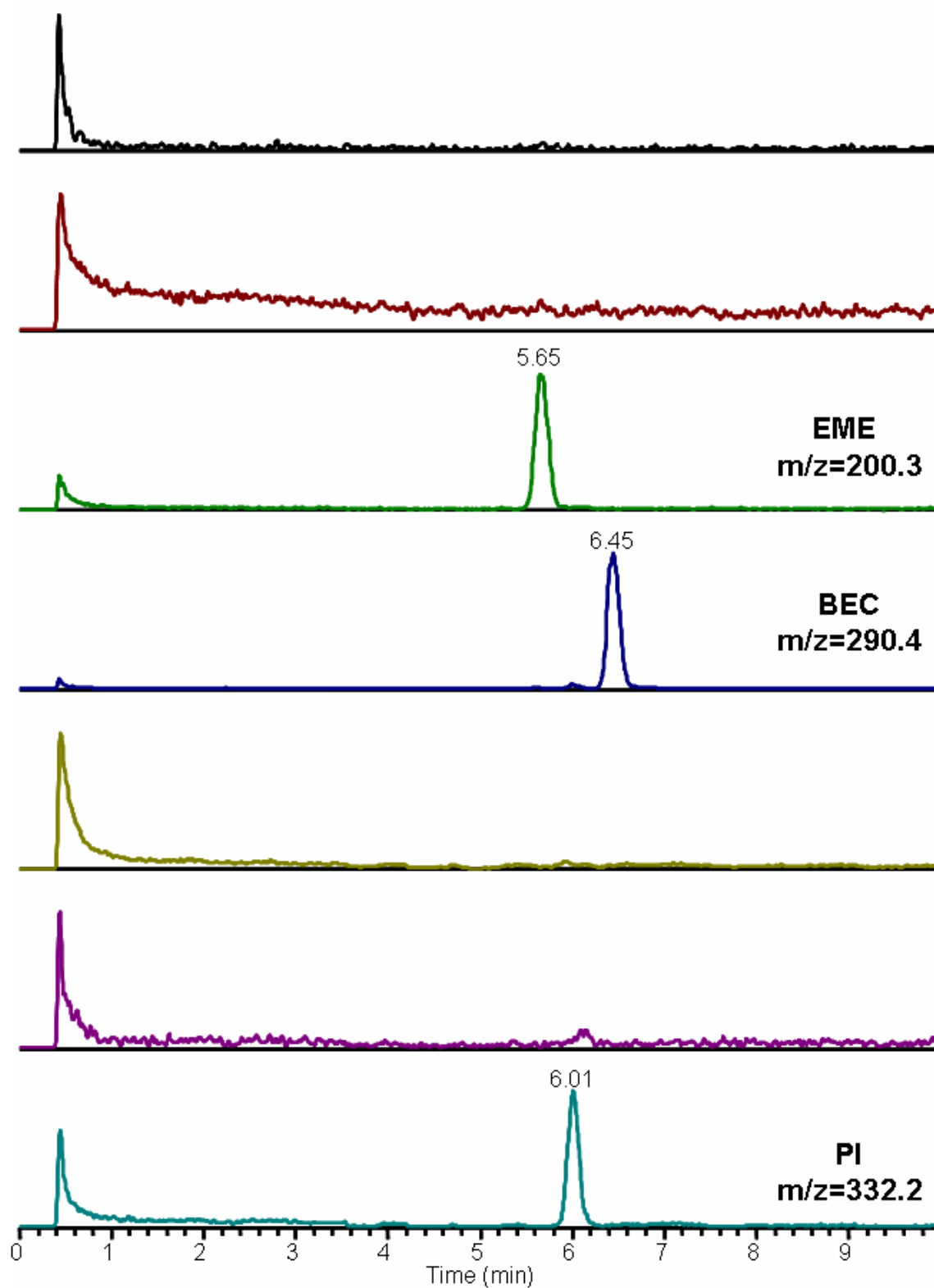


Figura 3.6. Eletroferograma íon-extraído de amostras de urina positiva para presença dos produtos de biotransformação EME e BEC. Condições experimentais, idem figura 3.3.

3.5. Conclusões

O método apresentado permite a confirmação do uso de cocaína, por diferentes vias de introdução no organismo, empregando procedimento de preparo da amostra muito simples e análise utilizando CE-MS, sem a necessidade das etapas prévias de extração e derivatização, procedimentos essenciais quando se pretende analisar cocaína e seus produtos de biotransformação através de técnicas cromatográficas tradicionais.

3.6. Referências bibliográficas

ANTONILLI, L.; C. SURIANO; M. C. GRASSI ; P. NENCINI. Analysis of cocaethylene, benzoylecgonine and cocaine in human urine by high-performance thin-layer chromatography with ultraviolet detection: a comparison with high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. B**, v.751, p.19-27. 2001.

BOATTO, G.; M. NIEDDU; A. CARTA; A. PAU; M. PALOMBA; B. ASPRONI ; R. CERRI. Determination of amphetamine-derived designer drugs in human urine by SPE extraction and capillary electrophoresis with mass spectrometry detection. **J. Chromatogr. B**, v.814, n.1, p.93-98. 2005.

BRUNETTO, M. R.; Y. D. CAYAMA; L. G. GARCIA; M. GALLIGNANI ; M. A. OBANDO. Determination of cocaine and benzoylecgonine by direct injection of human urine into a column-switching liquid chromatography system with diode-array detection. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.37, n.1, p.115-120. 2005.

CARDONA, P. S.; A. K. CHATURVEDI; J. W. SOPER ; D. V. CANFIELD. Simultaneous analyses of cocaine, cocaethylene, and their possible metabolic and pyrolytic products. **Forensic Sci. Int.**, v.157, n.1, p.46-56. 2006.

CHASIN, A. A. D. ; A. F. MIDIO. Validation of an ion-trap gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of cocaine and metabolites and cocaethylene in post mortem whole blood. **Forensic Sci. Int.**, v.109, n.1, p.1-13. 2000.

CHERKAOUI, S.; K. BEKKOUCHE; P. CHRISTEN ; J. L. VEUTHEY. Non-aqueous capillary electrophoresis with diode array and electrospray mass spectrometric detection for the analysis of selected steroidal alkaloids in plant extracts. **J. Chromatogr. A**, v.922, n.1-2, p.321-328. 2001.

CLAUWAERT, K. M.; J. F. V. BOCXLAER; W. E. LAMBERT ; A. P. LEENHEER. Segmental analysis for cocaine and metabolites by HPLC in hair of suspected drug overdose cases. **Forensic Sci. Int.**, v.110, p.157–166. 2000.

CONE, E. J.; A. TSADIK; J. OYLER ; W. D. DARWIN. Cocaine metabolism and urinary excretion after different routes of administration. **Ther. Drug Monit.**, v.20, n.5, p.556–560 1998.

FANDIÑO, A. S.; M. KARAS; S. W. TOENNES ; G. KAUERT. Identification of anhydroecgonine methyl ester N-oxide, a new metabolite of anhydroecgonine methyl ester, using electrospray mass spectrometry. **J. Mass. Spectrom.**, v.37, n.5, p.525-532. 2002.

FERNANDEZ, P.; M. ALDONZA; A. BOUZAS; M. LEMA; A. M. BERMEJO ; M. J. TABERNERO. GC-FID determination of cocaine and its metabolites in human bile and vitreous humor. **J. Appl. Toxicol.**, v.26, n.3, p.253-257. 2006.

GAYTON-ELY, M.; D. M. SHAKLEYA ; S. C. BELL. Application of a pyroprobe to simulate smoking and metabolic degradation of abused drugs through analytical pyrolysis. **J. Forensic Sci.**, v.52, n.2, p.473-478. 2007.

GEISER, L.; S. CHERKAOUI ; J. L. VEUTHEY. Simultaneous analysis of some amphetamine derivatives in urine by nonaqueous capillary electrophoresis coupled to electrospray ionization mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v.895, n.1-2, p.111-121. 2000.

GONZÁLEZ, M. L.; M. CARNICERO; R. DE LA TORRE; J. ORTUÑO ; J. SEGURA. Influence of the injection technique on the thermal degradation of cocaine and its metabolites in gas chromatography. **J. Chromatogr. B**, v.664, p. 317–327. 1995.

JONES, R. T. Pharmacokinetics of cocaine: considerations when assessing cocaine use by urinalysis. **NIDA Research Monograph: Medication development for the treatment of cocaine dependence: issues in clinical efficacy trials**. Disponível em: <http://www.nida.nih.gov/pdf/monographs/monograph175/221-234_Jones.pdf>. Acesso em: 18 mar 2008.

LLOYD, D. K. Capillary electrophoretic analyses of drugs in body fluids: sample pretreatment and methods for direct injection of biofluids. **J. Chromatogr. A**, v.735, p.29-42. 1996.

PETERS, F. T.; H. H. MAURER. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology – a review. **Accred. Qual. Assur.**, v.7, p.441-449. 2002.

RUDAZ, S.; L. GEISER; S. SOUVERAIN; J. PRAT ; J. L. VEUTHEY. Rapid stereoselective separations of amphetamine derivatives with highly sulfated gamma-cyclodextrin. **Electrophoresis**, v.26, n.20, p.3910-3920. 2005.

SOFT/AAFS. Society of Forensic Toxicologists, American Academy of Forensic Sciences, Toxicology Section. **Forensic toxicology laboratory guidelines**. 2006.

SUN, L.; G. HALL ; C. E. LAU. High-performance liquid chromatographic determination of cocaine and its metabolites in serum microsamples with fluorimetric detection and its application to pharmacokinetics in rats. **J. Chromatogr. B**, v.745, n.2, p.315-323. 2000.

TAGLIARO, F.; F. BORTOLOTTI. Recent advances in the applications of CE to forensic sciences (2005-2007). **Electrophoresis**, v.29, n.1, p.260-268. 2008.

TOENNES, S. W.; A. S. FANDIÑO; F. HESSE ; G. F. KAUERT. Artifact production in the assay of anhydroecgonine methyl ester in serum using gas chromatography–mass spectrometry. **J. Chromatogr. B**, v.792, p.345-351. 2003.

TSAI, J. L.; W. S. WU ; H. H. LEE. Qualitative determination of urinary morphine by capillary zone electrophoresis and ion trap mass spectrometry. **Electrophoresis**, v.21, n.8, p.1580-1586. 2000.

VANHOENACKER, G.; F. DE L'ESCAILLE; D. DE KEUKELEIRE ; P. SANDRA. Dynamic coating for fast and reproducible determination of basic drugs by capillary electrophoresis with diode-array detection and mass spectrometry. **J. Chromatogr. B**, v.799, n.2, p.323-330. 2004.

WATSON, D. Mass spectrometry. In: A. C. MOFFAT, M. D. OSSELTON e B. WIDDOP (Ed.). **Clarke's analysis of drugs and poisons**: Pharmaceutical Press, v.1, 2003. 26, p.CONFERIR.

WEY, A. B.; W. THORMANN. Capillary electrophoresis-electrospray ionization ion trap mass spectrometry for analysis and confirmation testing of morphine and related compounds in urine. **J. Chromatogr. A**, v.916, n.1-2, p.225-238. 2001.

YONAMINE, M.; A. M. SAVIANO. Determination of cocaine and cocaethylene in urine by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Biomed. Chromatogr.**, v.20, n.10, p.1071-1075. 2006.

YONAMINE, M.; O. A. SILVA. Confirmation of cocaine exposure by gas chromatography-mass spectrometry of urine extracts after methylation of benzoylecgonine. **J. Chromatogr. B**, v.773, n.1, p.83-87. 2002.

Capítulo IV:

Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) em comprimidos de Ecstasy por eletroforese capilar com detecção por arranjo de diodos (CE-DAD)

Capítulo 4. Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) em comprimidos de ecstasy por eletroforese capilar com detecção por arranjo de diodos (CE-DAD)

4.1. Introdução

A química analítica aplicada às ciências forenses é geralmente dividida em duas áreas: a área que constitui a parte analítica da toxicologia, exemplificada nos dois capítulos anteriores, e a química forense propriamente dita. Embora esta divisão seja muito tênue e muitas vezes confluyente, pode-se tentar delinear estas áreas. A toxicologia forense trabalha com evidências em fluidos biológicos, diagnosticando intoxicações exógenas que podem estar relacionadas a práticas criminosas (CHASIN, 2001). A química forense trabalha com evidências físicas (não biológicas), geralmente coletadas em cenas de crimes ou em locais onde se suspeita que um delito esteja sendo cometido. Entre os objetos de exame, podem estar os mais diversos tipos, como drogas, tintas, resíduos de incêndio, combustíveis, resíduos de disparo de armas de fogo, explosivos, polímeros, vidro, etc. (ALWARD, 1996).

A química analítica pode ser definida como a área da química responsável por caracterizar a composição da matéria, nos aspectos qualitativos (o que está presente no material) e quantitativos (quanto presente no material) (HARVEY, 2000). Já a química forense pode ser definida como uma ciência aplicada relacionada à busca de evidências para materialização de um crime, com o objetivo de ajudar a elucidar

situações criminais, muitas vezes fornecendo subsídios indispensáveis para a condução de um processo judicial. É um dos aspectos da aplicação da ciência química onde a natureza da amostra e os conhecimentos químicos analíticos são de fundamental importância para que o analista possa escolher ou excluir os ensaios apropriados para condução de sua perícia (ALWARD, 1996).

As drogas sintéticas estão entre as substâncias controladas mais consumidas no ocidente, sendo os principais representantes desta classe a 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA, *Ecstasy*), a 3,4-metilenodioxietilamfetamina (MDEA, *Eve*) e a 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA). Estas substâncias são estruturalmente semelhantes à anfetamina e a algumas fenilaquilaminas de atividade alucinógena. Contudo, a atividade farmacológica destas substâncias não se restringe apenas à simples atividade estimulante ou alucinógena, sendo classificada por alguns autores como entactógenos, nome que designaria substâncias cujos efeitos estariam relacionados com a indução de um estado emocional agradável, com aumento da empatia, comunicabilidade e sociabilidade (NICHOLS, 1986).

O consumo e o tráfico internacional de *Ecstasy* aumentou geometricamente durante a década de 1990. Esta droga de abuso ocupa o segundo lugar no ranking de consumo de drogas na maioria dos países europeus sendo superado somente pela maconha (LANDRY, 2002). Durante o ano 2000 a Europol (*European Police Office*) apreendeu 17,4 milhões de comprimidos de *Ecstasy* nos países membros da União Europeia, o que corresponde a um aumento de 50% quando comparado com o número de apreensões que aconteceram durante o ano de 1999 (GIMENO et al., 2003). No

Brasil, é crescente sua divulgação pela mídia e o uso recreacional tem sido identificado em vários pacientes que buscam tratamento para farmacodependência nas clínicas de São Paulo (SILVA et al., 1998a; BAPTISTA et al., 2002; LAPACHINSKE et al., 2004).

Este crescente aumento no consumo pode ainda estar associado ao fato de que o tráfico de *Ecstasy* oferece vantagens quando comparado com drogas tradicionais, como maconha, cocaína e heroína, relacionadas principalmente ao fato de se tratar de uma droga sintética, que não precisa de grande espaço para o cultivo de plantas utilizadas como matéria prima. Outra vantagem está no fato de que vias de síntese da MDMA são relativamente simples, amplamente difundidas na internet, e não requerem conhecimentos avançados em síntese orgânica.

O *Ecstasy* é comercializado comumente na forma de comprimidos de bom aspecto, de grande variedade de cores, formas e tamanhos, estampados com vários tipos de figuras e logotipos. À semelhança de outras drogas vendidas no mercado ilícito, não existe controle sobre a composição destes comprimidos, podendo existir grande variação no que diz respeito à quantidade de princípio ativo (MDMA) e à presença de adulterantes, substâncias adicionadas ao comprimido para mimetizar e/ou potencializar os efeitos induzidos pelo MDMA (FERIGOLO et al., 1998; GREEN et al., 2003).

4.2. Objetivo

O presente capítulo tem por objetivos:

1. desenvolver metodologia analítica rápida e precisa para determinação da concentração de MDMA presente em comprimidos de *Ecstasy* apreendidos pela polícia. A metodologia desenvolvida foi aplicada na análise de sete diferentes grupos de comprimidos de *Ecstasy*, encaminhados para exame pericial no Núcleo de Análise Instrumental do Instituto de Criminalística – Superintendência da Polícia Técnico Científica do Estado de São Paulo.

2. comparar o método desenvolvido por eletroforese capilar com a metodologia desenvolvida, validada e utilizada rotineiramente no órgão de segurança pública (baseada em cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência).

3. avaliar a concentração de MDMA nos comprimidos de *Ecstasy*, bem como a variação desta em comprimidos provenientes de uma mesma apreensão e de apreensões diferentes.

4.3. Materiais e métodos

4.3.1. Reagentes

Soluções padrão na concentração de 1 mg/mL de 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) (analito de interesse), procaína (padrão interno, PI), anfetamina (ANF), metanfetamina (MET), 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA), 3,4-metilenodioxietilanfetamina (MDEA), N-metil-1-(3,4-metilenodioxifenil)-2-butamina (MBDB) e cetamina (KET) (testados como possíveis interferentes) e foram adquiridas da Cerilliant (Austin, TX, EUA). Estas soluções foram utilizadas para preparar soluções de trabalho em diferentes concentrações.

Ácido fosfórico e tris-hidroximetilaminometano (TRIS) grau analítico, trietilamina, metanol e acetonitrila grau-HPLC foram obtidos da empresa Merck (Darmstadt, Alemanha). Água ultra-pura foi obtida através de Milli-Q RG da Millipore (Bedford, MA, EUA).

4.3.2. Instrumentação analítica

Eletroforese capilar com detecção por arranjo de diodos (CE/DAD)

Neste trabalho foi utilizado um equipamento de eletroforese capilar Hewlett Packard® modelo HP^{3D}CE (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA), dotado de sistema de termostatização do capilar por ar forçado e detector de arranjo de diodos

(DAD), controlado pelo software HP ChemStation versão 08.03 (Agilent Technologies). As separações foram realizadas utilizando capilar de sílica fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, EUA), revestidos externamente com poliimida, de 50 μm de diâmetro interno e 38,5 cm de comprimento total (30 cm de comprimento efetivo até o detector), termostaticado a 30°C. Antes do primeiro uso, o capilar era condicionado pela passagem de solução aquosa de hidróxido de sódio 1 mol/L por 30 min. No início de cada dia de trabalho, o capilar era lavado com a mesma solução alcalina (5 min), água ultra-pura (5 min) e finalmente condicionado com o eletrólito de corrida por 20 min. O eletrólito de corrida era composto por solução aquosa de Tris 20 mmol/L com pH ajustado em 7,50 com ácido fosfórico concentrado. As amostras e padrões foram introduzidos no sistema por injeção hidrodinâmica (50 mbar/3s). A tensão aplicada para separação foi de 30 kV (corrente resultante de aproximadamente 20 μA).

O detector por arranjo de diodos foi programado para adquirir espectros de absorção UV/visível na faixa de 190 a 400 nm, fornecendo importante informação qualitativa para as análises. As análises quantitativas foram feitas a partir de eletroferogramas obtidos em 195 nm.

*Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência
(HPLC/FD)*

Foi utilizado equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência modelo LaChrom (Merck, Darmstadt, Alemanha) composto por bomba quaternária, injetor

automático, forno de coluna e detector por fluorescência. O controle do equipamento e aquisição dos dados foi feito através do software HSM[®] (Merck, Darmstadt, Alemanha). As análises foram realizadas utilizando-se uma coluna cromatográfica LiChrospher[®] 100 (RP-18, 250 x 4,6 mm, com partículas de 5 µm, Merck, Darmstadt, Alemanha), mantida a 30 °C. A fase móvel utilizada era constituída por mistura isocrática de tampão fosfato 25 mM pH 3,0 e acetonitrila (95:5 v/v), com vazão de 1,0 mL/min. A detecção do analito valeu-se da capacidade intrínseca desta substância de emitir fluorescência. Por esta razão foi utilizado detector de fluorescência, com comprimento de onda de excitação (λ_{ex}) e de emissão (λ_{em}) ajustados em 288 nm e 324 nm, respectivamente.

O método baseado em HPLC/FD foi desenvolvido, validado e é utilizado rotineiramente no Núcleo de Análise Instrumental do Instituto de Criminalística do Estado de São Paulo para quantificação de MDMA em comprimidos de *Ecstasy*, por esta razão foi escolhido como método de referência deste trabalho.

4.3.4. Amostras de comprimidos de Ecstasy utilizadas

Foram selecionados para análise noventa e quatro comprimidos que apresentaram resultado positivo para MDMA em ensaios de triagem (reações colorimétricas e/ou cromatografia em camada delgada) encaminhados para exame pericial no Núcleo de Análise Instrumental do Instituto de Criminalística – Superintendência da Polícia Técnico Científica do Estado de São Paulo para confirmação e quantificação do princípio ativo MDMA nos mesmos. Estes comprimidos

foram divididos em cinco diferentes grupos, de acordo com suas características físicas (cor, tamanho e formato):

Grupo 1: dez comprimidos de cor branca, de forma arredondada, de 8 mm de diâmetro, com uma das faces lisas e a outra apresentando o desenho as inscrições “TOP”.

Grupo 2: doze comprimidos de cor laranja, de forma arredondada, de 7 mm de diâmetro, com uma das faces lisas e a outra apresentando uma figura semelhante a um morcego.

Grupo 3: cinco comprimidos de cor branca, de forma arredondada, de 7 mm de diâmetro, com uma das faces contendo uma fissura mediana e a outra apresentando as inscrições “D & G”.

Grupo 4: oito comprimidos de cor bege, de forma arredondada, de 9 mm de diâmetro, com uma das faces lisas e a outra apresentando as inscrições “LV”.

Grupo 5: doze comprimidos de cor branca, de forma arredondada, de 9 mm de diâmetro, com uma das faces contendo uma fissura mediana e a outra apresentando uma figura semelhante a um pombo.

Grupo 6: vinte e dois comprimidos de cor verde, de forma arredondada, de 8 mm de diâmetro, com uma das faces contendo uma fissura mediana e a outra apresentando uma figura semelhante a uma coroa.

Grupo 7: vinte e cinco comprimidos de cor branca, de forma arredondada, de 7 mm de diâmetro, com uma das faces contendo uma fissura mediana e a outra face lisa.

Preparo das amostras

Inicialmente, os comprimidos foram pesados em balança analítica para determinação do peso médio de cada grupo. Após a pesagem, os comprimidos foram pulverizados utilizando-se almofariz de porcelana. A partir do pó obtido, uma alíquota de 10 mg foi pesada e transferida para balão volumétrico com capacidade de 10 mL, ao qual foi adicionado 9 mL de metanol. O balão foi então submetido a agitação mecânica em banho ultrassônico (10 minutos), sendo posteriormente completado seu volume com o mesmo solvente. Desta solução, uma alíquota de 1 mL foi então transferida para o balão volumétrico com capacidade para 10 mL e o volume completado com água ultrapura (para análise por HPLC/FD a diluição realizada nesta etapa foi 1:100 dada a maior sensibilidade do detector por fluorescência). Esta solução foi homogeneizada por inversão do balão volumétrico e uma alíquota de 450 μ L foi transferida para vial de polipropileno adequado para o sistema de eletroforese capilar e a esta solução foi adicionada uma alíquota de 50 μ L de procaína 250 μ g/mL em água (padrão interno, preparo diário).

4.3.5. Validação do método

O método desenvolvido foi validado de acordo com procedimentos e parâmetros de confiança analítica comumente utilizados em toxicologia forense (PETERS e

MAURER, 2002; SOFT/AAFS, 2006). Como o tipo de amostra deste estudo difere consideravelmente das amostras utilizadas nos capítulos anteriores (fluidos biológicos), alguns parâmetros de confiança analítica foram embasados nas proposições da ICH. Durante a validação foram considerados os seguintes parâmetros analíticos: seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), recuperação (exatidão).

Seletividade

A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes (RIBANI et al., 2004). A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Para avaliar a seletividade do método, soluções padrão de MDA, MDEA, cafeína, cetamina, cocaína, dextrometorfano, dietilpropiona, efedrina e femproporex (25 µg/mL) foram injetadas no sistema eletroforético descrito anteriormente. Considerou-se o método como seletivo se não houvesse a presença de picos no mesmo tempo de migração da MDMA.

Linearidade

O estudo de linearidade foi conduzido pela injeção em triplicata de 6 concentrações da solução-padrão de MDMA, de 1 a 100 µg/mL, correspondente a

correspondente a faixa de 1 a 100% (m/m) de MDMA nas amostras analisadas. A linearidade foi estimada pela análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

Precisão

Para a determinação da repetibilidade foram analisadas, em triplicata e no mesmo dia, amostras de comprimidos de mesmo grupo. Na determinação da precisão intermediária foram analisadas, em triplicata e em três dias diferentes, amostras de comprimidos pertencentes a um mesmo grupo. Nas duas situações considerou-se como uma “amostra” uma alíquota retirada do pó obtido pela pulverização de um dado lote de comprimidos. Cada amostra aqui mencionada foi preparada do mesmo modo descrito no item 4.3.4.

Recuperação (exatidão)

A exatidão foi avaliada pelo teste de recuperação analisando-se, em triplicata, utilizando-se amostras de comprimidos do mesmo grupo. Quantidades conhecidas de MDMA (em três níveis de concentração) foram adicionadas as amostras pulverizadas, que foram então submetidas ao método analítico proposto. O percentual de recuperação (exatidão) foi calculado adotando a quantidade adicionada mais a quantidade já presente no material (quantificada previamente) como 100% e a quantidade encontrada neste teste correspondendo a porcentual de recuperação do método.

4.4. Resultados e discussões

O presente trabalho teve por objetivo desenvolver métodos simples e rápido capaz de determinar a concentração de MDMA presente nos comprimidos de *Ecstasy*, que possibilite, por exemplo, observar a variação na composição dos comprimidos de um mesmo grupo e grupos diferentes, por eletroforese capilar com detecção por arranjo de diodos.

Empregando a eletroforese capilar em solução livre o analista pode trabalhar no desenvolvimento do método de separação de acordo com sua necessidade. O método desenvolvido no Capítulo 2 buscava a completa resolução de uma série de 12 analitos de características estruturais significativamente diferentes, o que exigiu o uso de aditivos para que os picos obtidos tivessem bom formato, fossem delgados e estivessem completamente separados entre si. Naquela oportunidade, optou-se por trabalhar em pH igual a 2,5, região onde o fluxo eletrosmótico já estava praticamente extinto pois quase todos os grupos silanóis da parede do capilar de sílica encontravam-se não dissociados. Nesta situação, o tempo de migração dos analitos (tempo entre o instante da injeção e o ápice do pico eletroforético) era determinado apenas pelo comprimento do capilar, pela tensão aplicada e pela mobilidade do próprio analito, como descrito pela equação 1.5 descrita no Capítulo 1.

Já no desenvolvimento deste método para determinação de MDMA em comprimidos de *Ecstasy* o objetivo principal era obter análises rápidas, reprodutíveis e seletivas. Um modo simples de encurtar o tempo de análise em eletroforese capilar é trabalhar de modo que o tempo de migração do analito seja resultado da soma da

mobilidade intrínseca do analito com a mobilidade do fluxo eletrosmótico, que nesta situação irá “empurrar” os analitos na direção do detector.

Em um pH igual a 7,5 o valor do fluxo eletrosmótico é significativo e adiciona um novo vetor à velocidade de migração do MDMA. Novamente o Tris foi escolhido como co-íon para a separação eletroforética, pois possui mobilidade próxima a do analitos investigado e seu padrão interno. Além disso, seu pKa é igual a 8,08, o que confere ação tamponante ao eletrólito de corrida. Uma vez que o co-íon possui mobilidade adequada e já produz efeito tampão, a escolha do contra-íon ficou condicionada apenas à comodidade e disponibilidade do analista e do laboratório. Assim, o eletrólito de corrida utilizado foi composto por solução aquosa de Tris 20 mmol/L, com pH da solução ajustado para 7,5 com ácido fosfórico concentrado (ajuste realizado em peagâmetro digital).

A Figura 4.1 apresenta eletroferograma obtido pela injeção de solução padrão de MDMA adicionada de padrão interno procaína (25 $\mu\text{g/mL}$).

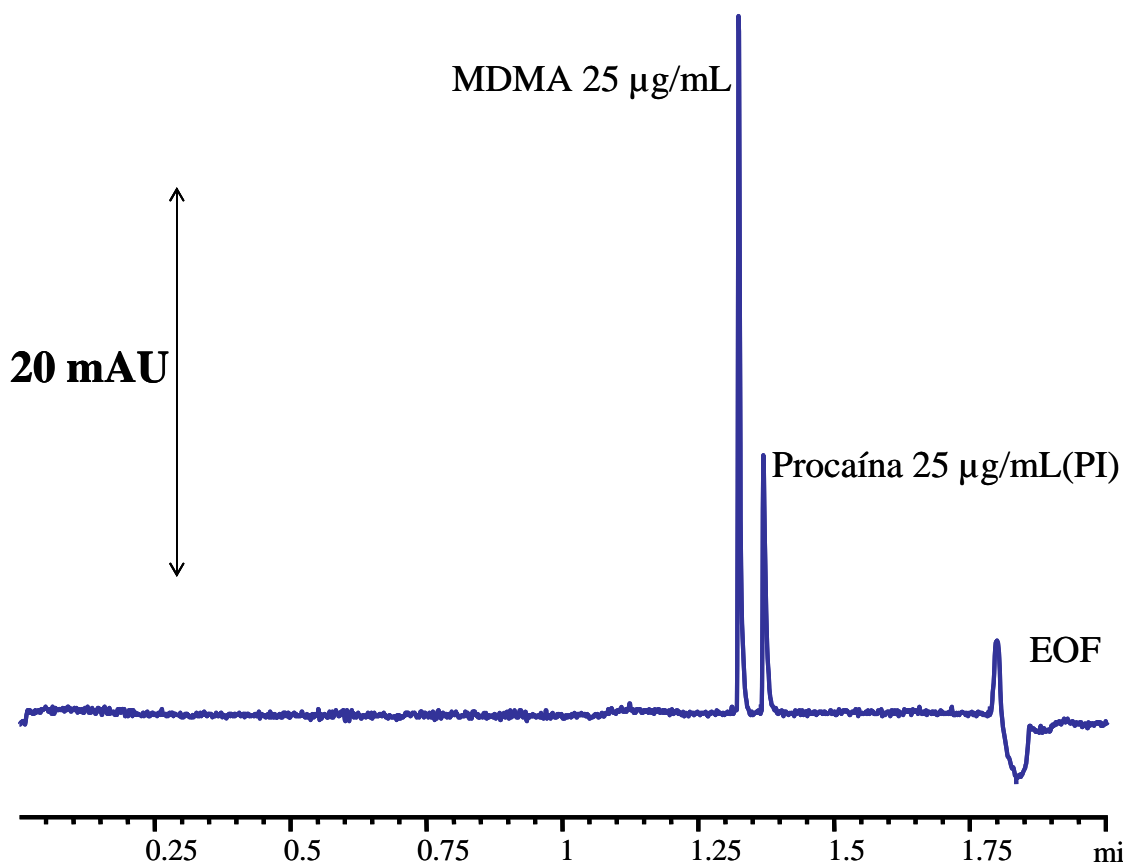


Figura 4.1. Eletroferograma obtido pela injeção de solução padrão de MDMA e procaína (25 µg/mL). Condições eletroforéticas: Capilar 38,5 cm x 30 cm (efetivo), 50 µm; eletrólito: Tris 20 mmol/L pH 7,50; 30 kV, 25°C, 195 nm, injeção hidrodinâmica: 50 mbar/3s. EOF = fluxo eletrosmótico.

Vários autores (SILVA et al., 1998a; SHERLOCK et al., 1999; BAGGOTT et al., 2000; COLE et al., 2002; GIMENO et al., 2003) referem que, dentre os principais adulterantes presentes nos comprimidos comercializados no mercado ilícito como sendo *Ecstasy* estão MDEA, MDA, PMA (para-metoxianfetamina), efedrina, pseudoefedrina, ácido acetilsalicílico, cafeína, dextrometorfano, cetamina, cocaína dentre outras substâncias. Alguns desses adulterantes podem ser até mais tóxicos que a própria MDMA. Essa variabilidade de composição dos comprimidos e o fato de que usuários de

Ecstasy também podem ser consumidores de outras drogas como maconha, cocaína, alucinógenos e álcool, eleva o risco de intoxicações. Este trabalho não objetivou a identificação de possíveis adulterantes presentes nos comprimidos, apenas a verificação de possíveis substâncias que poderiam ser consideradas interferentes do método analítico desenvolvido.

O uso de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência para determinação de metilendioximetanfetaminas é considerada técnica analítica de escolha, uma vez que estas substâncias são termolábeis e requerem etapa prévia de derivatização para análise das mesmas por cromatografia em fase gasosa, implicando no uso de reagentes caros, de significativa toxicidade, além de aumentar significativamente o tempo necessário para realização da análise. Deve-se considerar ainda que este detector confere ao método alta seletividade e sensibilidade, pois estes analitos são compostos naturalmente fluorescentes.

Se por um lado a detecção por fluorescência confere grande sensibilidade e seletividade ao método analítico, como no método utilizado por HPLC, a detecção por arranjo de diodos, utilizada no método por eletroforese capilar, fornece informação espectral (espectro de absorção da luz ultravioleta) fundamental para caracterização do analito, e que permite diferencia-lo de alguns possíveis interferentes.

A Figura 4.2 apresenta cromatogramas obtidos pela injeção de mistura de padrões de MDMA e possíveis adulterantes (MDA, MDEA, anfetamina, metanfetamina e cetamina) no sistema HPLC/FD. Apenas as metilendioxianfetaminas apresentaram picos, pois somente estes compostos, dentre os estudados, são naturalmente

fluorescentes. Nesta situação, a seletividade do método é uma função direta do sistema de detecção utilizado.

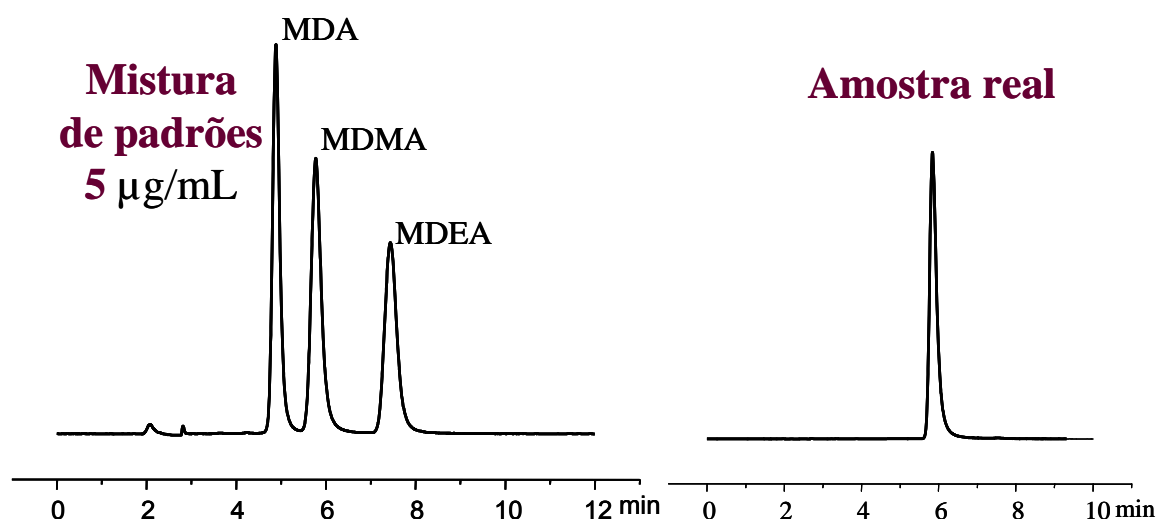


Figura 4.2. Cromatogramas obtidos pela injeção de mistura de padrões de MDMA e possíveis adulterantes (MDA, MDEA, anfetamina, metanfetamina e cetamina) e de amostra de comprimido de *Ecstasy* analisado no sistema HPLC/FD. Condições cromatográficas: coluna C-18 (125 x 4 mm, 5 µm); Fase móvel: tampão fosfato-trietilamina 20 mM pH 3,0 : acetonitrila (90:10, v/v); $\lambda_{exc.}=285$ nm, $\lambda_{emis.}=324$ nm.

Já a boa seletividade obtida no método por eletroferese capilar esta vinculada a alta eficiência de separação da técnica. Pelas curvas de mobilidade apresentadas na Figura 4.3. pode-se constatar que a separação eletroforética do MDMA e seus interferentes mais prováveis (anfetamina, metanfetamina, MDA, MDEA e cetamina) podem ser separados em uma vasta faixa de pH, como na região escolhida (pH=7,5) (observar região ampliada do gráfico).

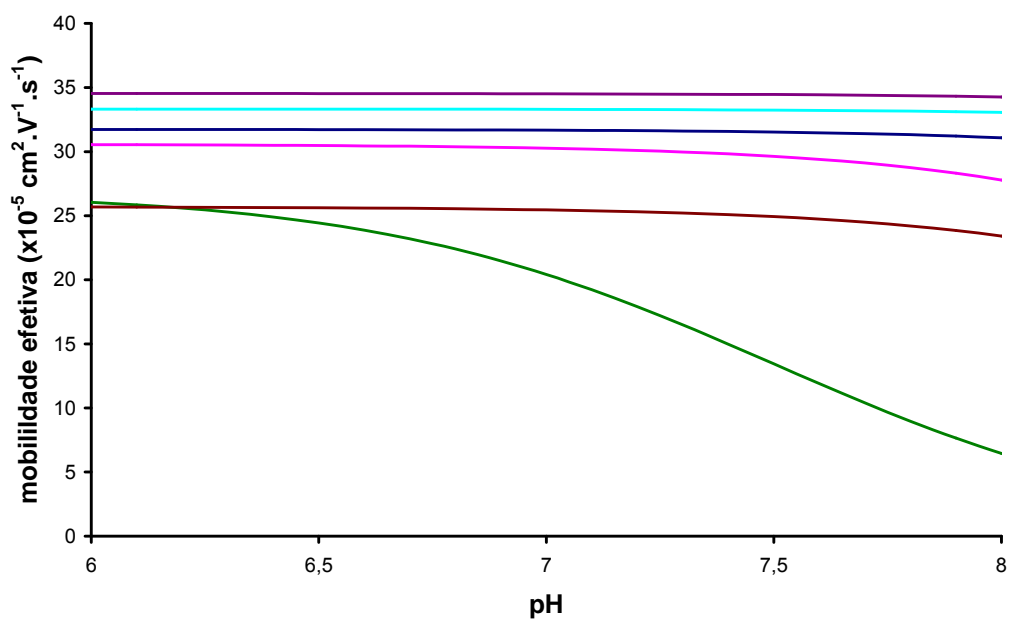
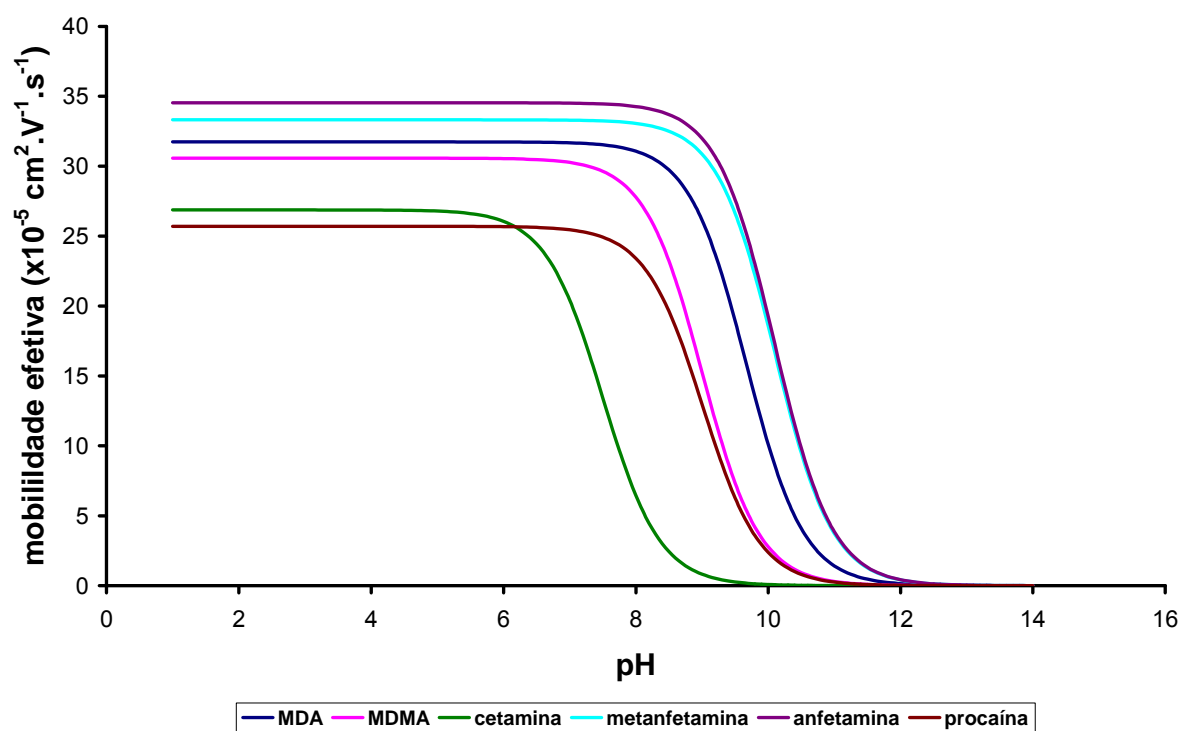


Figura 4.3. Curvas de mobilidade efetiva em função do pH para a MDMA e possíveis interferentes presentes em comprimidos de *Ecstasy*.

A Figura 4.4 apresenta eletroferograma obtido pela injeção de mistura de padrões de MDMA e os interferentes mais relevantes a serem investigados. É possível observar completa separação entre as substâncias testadas.

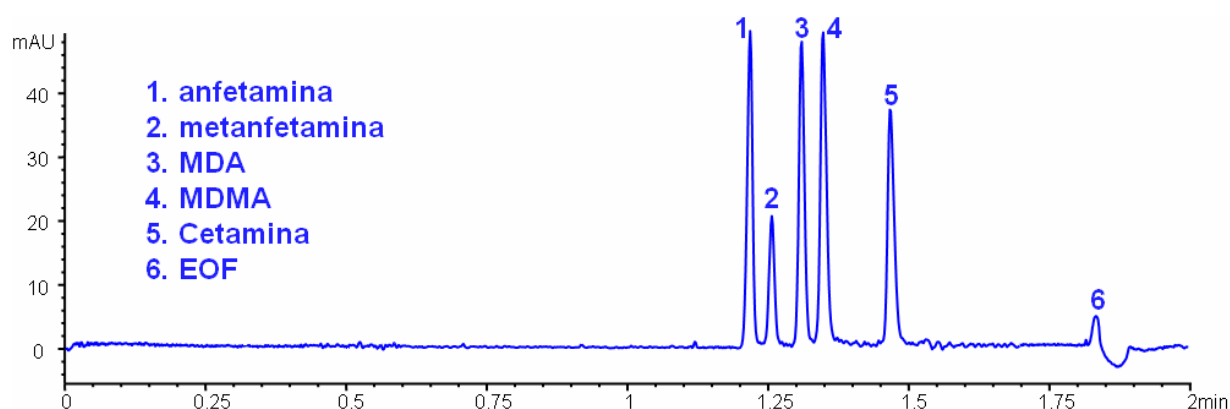


Figura 4.4. Eletroferograma obtido pela injeção de mistura de padrões de MDMA, anfetamina, metanfetamina, MDA e cetamina ($25 \mu\text{g/mL}$) mostrando a seletividade do método proposto para análise de MDMA em comprimidos de *Ecstasy*. Condições eletroforéticas: idem Figura 4.1.

Como pode ser observado, tanto o método cromatográfico quanto eletroforético possuem seletividade adequada para identificar o analito de interesse (MDMA).

A Figura 4.5 permite comparar o tempo de análise necessário para determinação da 3,4-metilenodioximetanfetamina por HPLC e CE. Fica evidente que a análise eletroforética é significativamente mais rápida do que a cromatográfica (cinco vezes mais rápido).

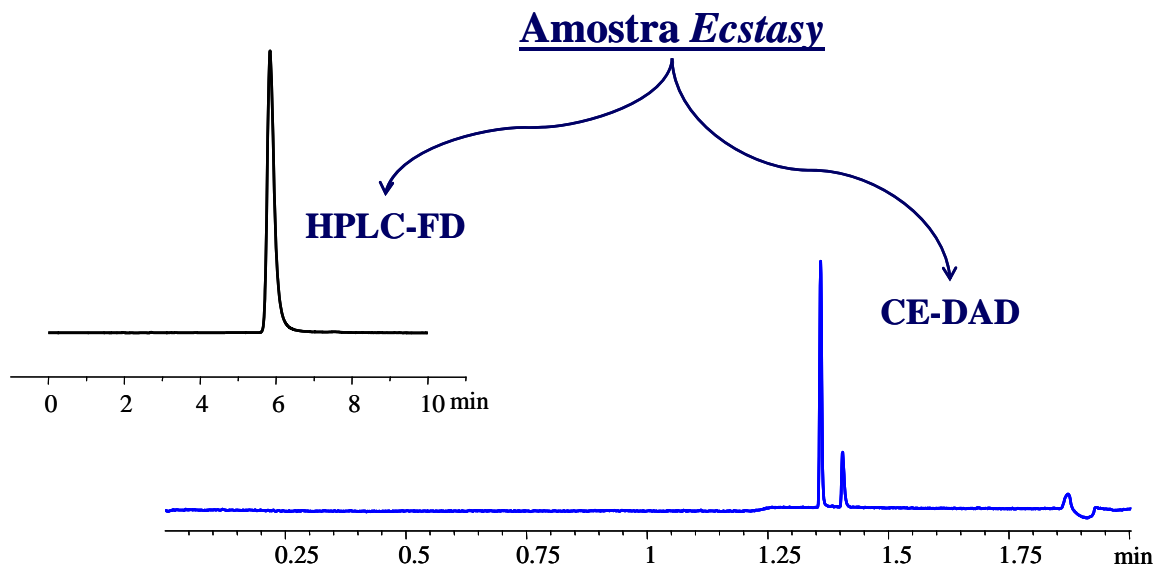


Figura 4.5. Cromatograma e eletroferograma mostrando a diferença do tempo de corrida entre os métodos cromatográfico e eletroforético para análise de MDMA em comprimidos de *Ecstasy*.

Quando comparado a outros métodos cromatográficos e/ou eletroforéticos descritos na literatura, o elaborado neste trabalho também mostra-se vantajoso no que diz respeito ao tempo de análise. Metodologias baseadas em cromatografia gasosa (LAPACHINSKE et al., 2004; HAN et al., 2005; VILLAMOR et al., 2005; LASMAR e LEITE, 2007) e cromatografia líquida (CONCHEIRO et al., 2005) utilizavam pelo menos 7,5 minutos de corrida cromatográfica. Piette e Parmentier (2002) propuseram método para análise de derivados anfetamínicos baseado em CZE em pH baixo (3,0) utilizando trietanolamina para praticamente extinguir o fluxo eletrosmótico, com tempo de corrida de aproximadamente 8,0 minutos (PIETTE e PARMENTIER, 2002). Ressalta-se que não está sendo discutido aqui o tempo requerido para o preparo das amostras uma vez que o tempo dispensado nesta etapa deve ser praticamente o mesmo para qualquer técnica de

separação seguinte ao preparo (considerando os comprimidos de *Ecstasy* como amostra a ser analisada).

O preparo de amostra, que se consistiu basicamente de dissolução de uma alíquota do comprimido macerado em metanol, com posterior diluição em água foi escolhida por ser um processo simples, de baixo custo, que requer baixo consumo de solvente orgânico.

A identificação do analito foi feita através do tempo de migração relativo ao padrão interno (procaína), e a quantificação também foi realizada por padronização interna.

A partir da injeção de soluções-padrão de concentrações conhecidas de MDMA (de 1 a 100 $\mu\text{g/mL}$), e conseqüente obtenção das respectivas áreas relativas ao padrão interno procaína, foi construída curva analítica que apresentou linearidade satisfatória na faixa de trabalho escolhida, com coeficiente de determinação (r^2) igual a 0,999. Os coeficientes angular, linear e de determinação do método são mostrados na Tabela 4.1.

A avaliação da precisão foi realizada através do coeficiente de variação (%CV), que apresentou valores abaixo de 5%, estando perfeitamente de acordo para análises forenses. A exatidão do método, avaliada através da recuperação, apresentou valores entre 94% e 102% (vide Tabela 4.2).

A exatidão do método, avaliada através do teste de recuperação, mostrou que o preparo de amostra proposto é capaz de extrair praticamente todo MDMA presente no pó obtido pela maceração dos comprimidos, obtendo-se recuperação maior do que 97% nos

três níveis de concentração estudados. Os resultados referentes a precisão e exatidão do método validado são mostrados na Tabela 4.2.

Tabela 4.1. Coeficientes angular, linear e de determinação do método proposto para análise de MDMA em comprimidos de *Ecstasy* por CE-DAD.

Analito	Coeficientes		
	angular (a)	linear (b)	determinação (r^2)
MDMA	0,0841	0,059	0,999

Tabela 4.2. Resultados de precisão e exatidão (recuperação) do método proposto para análise de MDMA em comprimidos de *Ecstasy* por CE-DAD.

MDMA	Níveis de concentração estudados		
	5 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$
Precisão (%CV)	2,1	1,0	1,2
Exatidão (%)	97,2	98,9	99,0

A dosagem típica para uso recreacional de MDMA presente em um comprimido pode variar de 50 a 150 mg, com variações de concentração que podem chegar a 70%

ou mais (LARANJEIRA et al., 1996; KALANT, 2001). Cole et al. (2002) analisaram 136 amostras de comprimidos apreendidos no Reino Unido durante o ano de 2001 e observaram que a quantidade de MDMA presente nestes comprimidos possui grande variação (entre 20 e 109 mg de MDMA por comprimido).

Nas amostras analisadas, a concentração de MDMA presente nos comprimidos de *Ecstasy* apresentou acentuada variabilidade, levando-se em consideração que a massa dos comprimidos não apresenta essa variabilidade. Comprimidos de mesmo grupo apresentaram concentrações de 2,63 a 137,59 (em miligramas de MDMA por comprimido). Comparando-se a concentração de MDMA em comprimidos de lotes diferentes, essa variação também é muito acentuada: a média das concentrações encontrada nos diferentes lotes variou de 8,45 a 124,36 miligramas por comprimido, conforme os resultados apresentados nas Tabelas 4.3 a 4.9 e na Figura 4.6.

Tabela 4.3. Concentração de MDMA encontrada nos comprimidos do Grupo 1.

Grupo 1	Concentração % (m/m)	Concentração (mg/cp)
A	3,27	8,10
B	3,23	8,26
C	3,63	9,23
D	3,49	8,56
E	3,43	8,48
F	3,48	8,71
G	3,45	8,42
H	3,51	8,94
I	3,20	7,89
J	3,27	7,89
Média	3,40	8,45
Desvio padrão	0,14	0,44
C. V. (%)	4,2	5,2

Tabela 4.4. Concentração de MDMA encontrada nos comprimidos do Grupo 2.

Grupo 2	Concentração % (m/m)	Concentração (mg/cp)
A	5,21	10,46
B	9,77	19,60
C	7,95	15,81
D	8,12	15,77
E	6,41	12,87
F	2,53	4,83
G	25,55	50,18
H	22,01	41,44
I	28,35	60,42
J	16,34	32,75
K	25,99	51,69
L	20,00	38,52
Média	14,85	29,53
Desvio padrão	9,20	18,70
C. V. (%)	62,1	63,2

Tabela 4.5. Concentração de MDMA encontrada nos comprimidos do Grupo 3.

Grupo 3	Concentração % (m/m)	Concentração (mg/cp)
A	14,62	29,02
B	14,87	30,28
C	16,49	31,51
D	14,99	29,41
E	14,78	28,20
Média	15,15	29,68
Desvio padrão	0,76	1,20
C. V. (%)	5,0	4,3

Tabela 4.6. Concentração de MDMA encontrada nos comprimidos do Grupo 4.

Grupo 4	Concentração % (m/m)	Concentração (mg/cp)
A	3,13	7,74
B	1,06	2,63
C	1,05	2,69
D	2,36	5,95
E	12,24	30,43
F	12,11	30,46
G	8,02	20,26
H	4,92	12,66
Média	5,61	14,10
Desvio padrão	4,63	11,61
C. V. (%)	82,7	82,3

Tabela 4.7. Concentração de MDMA encontrada nos comprimidos do Grupo 5.

Grupo 5	Concentração % (m/m)	Concentração (mg/cp)
A	20,39	62,48
B	21,44	66,17
C	19,97	58,71
D	22,23	65,19
E	21,13	64,38
F	21,50	65,40
G	12,38	35,45
H	13,01	39,71
I	20,72	63,07
J	21,29	67,18
K	20,90	62,25
L	20,29	63,70
Média	19,60	59,47
Desvio padrão	3,29	10,50
C. V. (%)	16,8	17,7

Tabela 4.8. Concentração de MDMA encontrada nos comprimidos do Grupo 6.

Grupo 6	Concentração % (m/m)	Concentração (mg/cp)
1	35,24	107,38
2	39,30	120,27
3	37,88	121,38
4	37,90	115,33
5	40,21	123,90
6	40,19	114,87
7	38,94	120,35
8	40,13	122,92
9	39,69	125,07
10	35,58	110,84
11	36,48	111,24
12	39,63	123,08
13	39,57	122,86
14	40,39	123,96
15	38,31	119,94
16	35,34	102,88
17	37,94	119,08
18	39,49	121,46
19	37,79	110,28
20	38,47	120,27
21	39,62	120,93
22	47,62	81,52
Média	38,90	116,36
Desvio padrão	2,52	9,84
C. V. (%)	6,5	8,5

Tabela 4.9. Concentração de MDMA encontrada nos comprimidos do Grupo 7.

Grupo 7	Concentração % (m/m)	Concentração (mg/cp)
1	36,73	113,17
2	40,63	125,86
3	36,09	108,35
4	39,80	121,58
5	38,77	119,88
6	38,94	120,41
7	40,00	124,25
8	35,08	108,83
9	39,10	120,00
10	41,04	129,37
11	41,58	127,71
12	39,41	120,33
13	41,57	121,97
14	40,32	123,42
15	42,64	129,88
16	43,64	130,87
17	41,12	127,89
18	44,72	137,59
19	40,93	123,05
20	44,10	133,76
21	44,01	137,18
22	40,41	123,10
23	42,01	131,17
24	42,61	131,82
25	41,39	88,00
Média	40,67	123,18
Desvio padrão	2,41	10,51
C. V. (%)	5,9	8,5

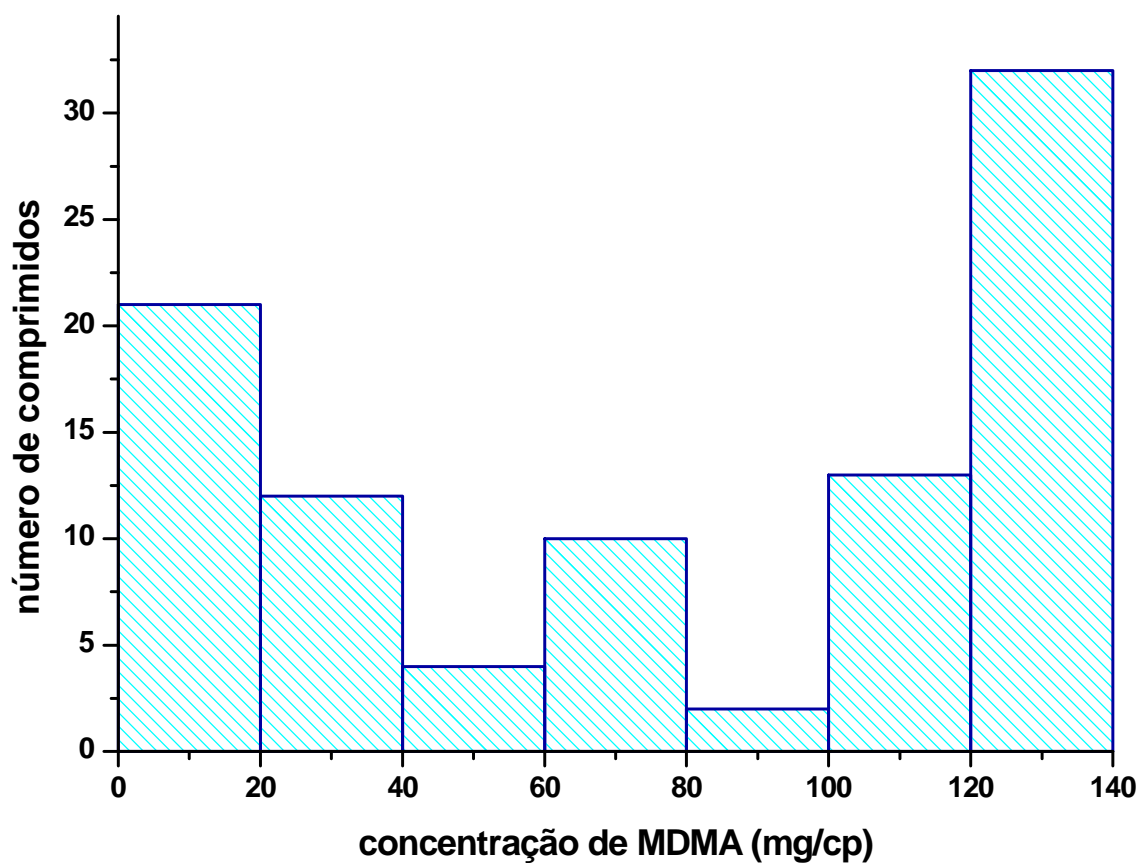


Figura 4.6. Histograma mostrando a distribuição da concentração de MDMA nos comprimidos de *Ecstasy* analisados.

Comprimidos do mesmo lote podem apresentar variação da concentração de princípio ativo de até 82,3%. Deve-se notar que esta variação intra-lote não se reproduziu em todas as amostras analisadas, havendo lotes com variação relativamente baixa (5,2%).

Com era esperado, concentração de MDMA em comprimidos de lotes diferentes, a variação na dosagem da droga torna-se ainda mais pronunciada, o que pode estar relacionado aos modos de preparo dos comprimidos por diferentes laboratórios clandestinos.

Estas variações nas concentrações devem estar relacionadas ao fato de não existir controle na produção dos comprimidos, sendo que processos farmacotécnicos simples, como a homogeneização do ingrediente ativo com os excipientes, foram pouco eficientes. Deve-se considerar que esta variação na quantidade de MDMA presente nos comprimidos pode estar relacionada, aliada a fatores como farmacodependência e tolerância, com o aumento do consumo de comprimidos de *Ecstasy* pelos usuários, que chegam a ingerir vários comprimidos numa festa, inconscientemente suprimindo a baixa dosagem presente nos comprimidos. Se houver mudança no fornecedor, para comprimidos mais concentrados em MDMA e se mantiver o mesmo padrão de uso, uma superdosagem pode ocorrer, aumentando o risco de intoxicações (LAPACHINSKE et al., 2004).

4.5. Conclusões

Pelo exposto acima, pode-se concluir que a eletroforese capilar pode substituir com vantagem a cromatografia líquida na análise de MDMA em comprimidos de *Ecstasy*, uma vez que o método desenvolvido apresentou boa linearidade, precisão e exatidão, além de permitir análises 5 vezes mais rápidas quando comparado com o método utilizado rotineiramente pelo laboratório responsável pelos exames.

A concentração de MDMA presente nos comprimidos de *Ecstasy* mostrou acentuada variabilidade, levando-se em conta que a massa dos comprimidos não apresenta essa variabilidade.

4.6. Referências bibliográficas

ALWARD, M. R. Trends in forensic chemistry. **Trends Anal. Chem.**, v.15, n.5, p.VI-VII. 1996.

BAGGOTT, M.; B. HEIFETS; R. T. JONES; J. MENDELSON; E. SFERIOS ; J. ZEHNDER. Chemical analysis of ecstasy pills. **J. Am. Med. Assoc.**, v.284, n.17, p.2190. 2000.

BAPTISTA, M. C.; A. R. NOTO; S. NAPPO ; E. A. CARLINI. O uso de êxtase (MDMA) na cidade de São Paulo e imediações: um estudo etnográfico. **J. Bras. Psiquiatria**, v.51, n.2, p.81-89. 2002.

CHASIN, A. A. M. Parâmetros de confiança analítica e irrefutabilidade do laudo pericial em toxicologia forense. **Rev. Bras. Toxicol.**, v.14, n.1, p.40-46. 2001.

COLE, J. C.; M. BAILEY; H. R. SUMNALL; G. F. WAGSTAFF ; L. A. KING. The content of ecstasy tablets: implications for the study of their long-term effects. **Addiction**, v.97, n.12, p.1531-1536. 2002.

CONCHEIRO, M.; A. D. CASTRO; O. QUINTELA; M. LOPEZ-RIVADULLA ; A. CRUZ. Determination of MDMA, MDA, MDEA and MBDB in oral fluid using high performance liquid chromatography with native fluorescence detection. **Forensic Sci. Int.**, v.150, p.221–226. 2005.

FERIGOLO, M.; F. B. MEDEIROS ; H. M. T. BARROS. "Êxtase": revisão farmacológica. **Rev. Saúde Pública**, v.32, n.5. 1998.

GIMENO, P.; F. BESACIER ; H. CHAUDRON-THOZET. Optimization of extraction parameters for the chemical profiling of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) tablets. **Forensic Sci. Int.**, v.132, p.182-194. 2003.

GREEN, R.; A. O. MECHAN; J. M. ELLIOT; E. O'SHEA ; I. COLADO. The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy"). **Pharmacol. Rev.**, v.55, n.3, p.463-508. 2003.

HAN, E.; W. YANG; J. LEE; Y. PARK; E. KIM; M. LIM ; H. CHUNG. The prevalence of MDMA/MDA in both hair and urine in drug users. **Forensic Sci. Int.**, v.152, p.73–77. 2005.

HARVEY, D. Modern Analytical Chemistry. New York: McGraw-Hill. 2000. 798 p.

KALANT, H. The pharmacology and toxicology of "ecstasy"(MDMA) and related drugs. **Can. Med. Assoc. J.**, v.165(7), p.917-928. 2001.

LANDRY, M. MDMA: a review of epidemiologic data. **J. Psychoactive Drugs**, v.34, n.2, p.163-169. 2002.

LAPACHINSKE, S. F.; M. YONAMINE ; R. L. D. M. MOREAU. Validação de método para determinação de 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) em comprimidos de ecstasy por cromatografia em fase gasosa. **Rev. Bras. Ciências Farm.**, v.40, n.1. 2004.

LARANJEIRA, R.; J. DUNN; R. RASSI ; M. FERNANDES. "Êxtase (3,4-metilenodioximetanfetamina, MDMA): uma droga velha e um problema novo. **Rev. ABP-APAL**, v.18, n.3, p.77-81. 1996.

LASMAR, M. C. ; E. M. A. LEITE. Desenvolvimento e validação de um método cromatográfico em fase gasosa para análise da 3,4-metilenodioximetanfetamina (ecstasy) e outros derivados anfetamínicos em comprimidos. **Rev. Bras. Ciências Farm.**, v.43, n.2, p.223-230. 2007.

NICHOLS, D. E. Differences between the mechanism of action of MDMA, MBDB and classic hallucinogens. Identification of a new therapeutic class: entactogens. **J. Psychoact. Drugs**, v.18, p.305-313. 1986.

PETERS, F. T. ; H. H. MAURER. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology – a review. **Accred. Qual. Assur.**, v.7, p.441-449. 2002.

PIETTE, V. ; F. PARMENTIER. Analysis of illicit amphetamine seizures by capillary zone electrophoresis. **J. Chromatogr. A**, v.979, p.345–352. 2002.

RIBANI, M.; C. B. G. BOTTOLI; C. H. COLLINS; I. C. S. F. JARDIM ; L. F. C. MELO. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v.27, n.5, p.771-780. 2004.

SHERLOCK, K.; K. WOLFF; A. W. HAY ; M. CONNER. Analysis of illicit ecstasy tablets: implications for clinical management in the accident and emergency department. **J. Accid. Emerg. Med.**, v.16, n.3, p.194-197. 1999.

SILVA, O. A.; M. YONAMINE ; V. E. REINHARDT. Identificação de 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) e compostos relacionados por cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massa em comprimidos de ecstasy apreendidos em São Paulo. **Rev. Farm. Bioquím. Univ. São Paulo**, v.34, n.1, p.33-37. 1998.

SOFT/AAFS. Society of Forensic Toxicologists, American Academy of Forensic Sciences, Toxicology Section. **Forensic toxicology laboratory guidelines**. 2006.

VILLAMOR, J. L.; A. M. BERMEJO; P. FERNÁNDEZ ; M. J. TABERNERO. A new GC-MS method for the determination of five amphetamines in human hair. **J. Anal. Toxicol.**, v.29, p.135-139. 2005.

Capítulo V:

Considerações Finais

Capítulo 5. Considerações finais

A toxicologia forense, ainda que secular, continua sendo a área mais fascinante e cativante da toxicologia. Por ser relacionada a situações criminais, esta área sempre despertou interesse de cientistas e pensadores ao longo da história, e nos dias atuais vem cativando também a população em geral que passou a ter contato com seu aspecto investigativo através da mídia.

Nas análises toxicológicas com finalidade forense são usadas na identificação e quantificação de agentes tóxicos para fins médico-legais, em fluidos biológicos ou em outros materiais diversos como água, alimentos, medicamentos, drogas, etc., envolvidas em ocorrências policiais/legais. Deve-se considerar o enorme número de substâncias químicas conhecidas atualmente, sempre considerar uma boa parte destas substâncias podem estar envolvidas em situações intoxicações acidentais ou intencionais. Neste contexto, a toxicologia forense constantemente lança desafios à química analítica para elucidação de exposição humana a diversas substâncias químicas, que podem ter sido utilizadas como adjuvantes na prática de delitos.

Mesmo sendo utilizada em diversos laboratórios forenses no mundo, no Brasil a eletroforese capilar ainda é pouco difundida nos Institutos Médico-Legais e de

Criminalística do Brasil, o que pode ser confirmado pelo fato de que apenas um Instituto de Criminalística do território nacional possui instrumento deste tipo instalado, até o presente momento. Assim, este trabalho teve por objetivo mostrar a relevância do uso da eletroforese capilar como ferramenta analítica para investigações em toxicologia forense, apresentando como esta técnica pode colaborar de modo significativo para o diagnóstico laboratorial de intoxicações.

Pelos resultados apresentados, foi mostrado que esta técnica tem grande valor para as análises forenses, pois constitui uma ferramenta extremamente versátil e confiável por fornecer diversos critérios de identificação relativos à separação, como tempo de migração e/ou mobilidade eletroforética em diferentes eletrólitos, e espectrais quando se utiliza a detecção por arranjo de diodos ou o acoplamento com a espectrometria de massas.

Pode-se afirmar também que a eletroforese capilar permite a realização de análises rápidas e reprodutíveis, fatores muito relevantes considerado que o número de exames solicitados aos laboratórios de toxicologia forense de todo Brasil aumenta em escala geométrica a cada ano.

Por último, deve-se considerar que a janela de detecção quando se utiliza detectores ópticos seja estreita, constituindo uma clara limitação física à técnica

analítica em estudo, limites de detecção adequados para finalidade forense podem ser atingidos trabalhando-se com características intrínsecas da eletroforese, que permitem a pré-concentração em linha dos xenobióticos.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: José Luiz da Costa

Local e data de nascimento: Mogi Mirim, SP, em 19 de junho de 1978

EDUCAÇÃO

E.E.P.G. “Dr. Oscar Rodrigues Alves”, Mogi Mirim, SP, de 1983 a 1992. Primeiro grau.

E.E.P.S.G. “Monsenhor Nora”, Mogi Mirim, SP, de 1993 a 1996. Segundo grau.

Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas (atual Universidade Federal de Alfenas), Alfenas, MG, de 1997 a 2001. Graduação em Farmácia Bioquímica.

Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, de 2001 a 2004. Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas.

OCUPAÇÃO

Perito Criminal do Núcleo de Análise Instrumental do Instituto de Criminalística – Superintendência da Polícia Técnico-Científica do Estado de São Paulo, de 2002 até o presente.

Professor das disciplinas Análise Instrumental e Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Bioquímicas Oswaldo Cruz, São Paulo, SP, de 2004 até o presente.

PUBLICAÇÕES

1. COSTA, J. L., WANG, A. Y., MICKE, G. A., MALDANER, A. O., ROMANO, R. L., MARTINS-JUNIOR, H. A., NEGRINI NETO, O., TAVARES, M. F. M. Chemical identification of 2,5-dimethoxy-4-bromoamphetamine (DOB). **Forensic Science International**, v.173, p.130-106, 2007.

2. COSTA, A. C. O., COSTA, J. L., TONIN, F. G., TAVARES, M. F. M., MICKE, G. A. Development of a fast capillary electrophoresis method for determination of creatinine in urine samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1171, p. 140-143, 2007.

3. ANDERSEN, M. L., PERRY, J. C., BATTISTI, M. C., CALZAVARA, M. B., COSTA, J. L., NEGRINI NETO, O., FRUSSA-FILHO, R., TUFIK, S. Association of paradoxical sleep deprivation and ecstasy (MDMA) enhances genital reflexes in male rats. **Behavioural Brain Research**., v.170, p.287 - 292, 2006.

4. COSTA, J. L., Urias, T.S., Siqueira, M.E.P.B. Cocaína em urina: estudo e comparação de técnicas de extração do analito. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.18, p.117 - 122, 2005.

5. COSTA, J. L., CHASIN, A. A. M. Determination of MDMA, MDEA and MDA in urine by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v.811, p.41 - 45, 2004.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)