

Henrique Silva Bombana

**Substâncias psicoativas no sangue: métodos de análises
toxicológicas e prevalência do uso em pacientes com lesões
traumáticas**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor
em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Vilma Leyton

São Paulo

2021

Henrique Silva Bombana

**Substâncias psicoativas no sangue: métodos de análises
toxicológicas e prevalência do uso em pacientes com lesões
traumáticas**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor
em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Vilma Leyton

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Bombana, Henrique Silva
Substâncias psicoativas no sangue : métodos de
análise toxicológicas e prevalência do uso em
pacientes com lesões traumáticas / Henrique Silva
Bombana. -- São Paulo, 2021.
Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientadora: Vilma Leyton.

Descritores: 1.Toxicologia forense 2.Análise
química do sangue 3.Drogas ilícitas 4.Anfetaminas
5.Cocaína 6.Cannabis 7.Acidentes de trânsito
8.Ferimentos e lesões

USP/FM/DBD-104/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Apoio Financeiro

A presente tese foi realizada contando com o auxílio das seguintes bolsas de estudo:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP
 - Processo nº: 2017/13882-2

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES
 - Processo nº: 1712321

Normatização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

1. Introdução	17
2. Objetivo geral.....	21
2.1 Objetivos específicos	21
3. Revisão da Literatura	23
3.1 Métodos de extração e microextração	23
3.2 Química Analítica Verde	24
3.3 Microextração em fase sólida – SPME	26
3.4 Microextração em fase líquida – LPME	28
3.5 Matrizes biológicas para análises toxicológicas.....	32
4. Materiais e métodos	38
4.1 Materiais.....	38
4.1.1 Equipamentos	38
4.1.2 Reagentes e outros materiais.....	38
4.1.3 Amostras de sangue negativas	40
4.2 Métodos	40
4.2.1 Otimização dos métodos de LPME para extração de compostos anfetamínicos e cocaína e derivados	40
4.2.2 Otimização do método de SPME para extração de Δ^9 - tetraidrocanabionol	43
4.2.3 Condições cromatográficas.....	45
4.2.4 Validação dos métodos de LPME e SPME.....	46
4.2.5 Aplicação dos princípios da química analítica verde.....	51
4.2.6 Aplicação dos métodos em amostras reais	51
5. Resultados e discussão.....	53
5.1 Otimização dos métodos de LPME e SPME.....	53
5.2 Avaliação da aplicação dos princípios da Química Analítica Verde 65	
5.3 Validação dos métodos de extração por LPME e SPME.....	67
5.3.1 Limite de detecção e quantificação	67
5.3.2 Seletividade.....	68
5.3.3 Linearidade e heteroscedasticidade	69
5.3.4 Precisão intra e interdias e exatidão.....	72
5.3.5 <i>Carryover</i>	76
5.3.6 Recuperação	77

5.3.7	Integridade da diluição.....	79
5.4	Aplicação dos métodos em amostras reais.....	82
6.	Considerações finais – Parte I.....	87
7.	Revisão da literatura.....	90
7.1	Substâncias psicoativas.....	90
7.1.1	Prevalência do uso.....	90
7.1.2	Riscos de lesões associados ao uso de substâncias psicoativas	93
7.1.3	Prevalência de substâncias psicoativas em pacientes atendidos em salas de emergência.....	97
8.	Pacientes e Métodos	100
8.1	Coleta de amostras	100
8.2	Dados sociodemográficos	101
8.2.1	Critérios de inclusão	101
8.2.2	Critérios de exclusão	101
8.3	Análises toxicológicas.....	102
8.4	Análises estatísticas	102
9.	Resultados	103
10.	Discussão.....	111
11.	Conclusões	120
12.	Referências	121

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema das extrações A: microextração em gota única (SDME) e B: microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME).....	30
Figura 2. Esquema de microextração em fase líquida (LPME) sistema bifásico (A) e sistema trifásico (B). No sistema A, o solvente impregnado na fibra é o mesmo utilizado como fase aceptora. Já no sistema B, um solvente é impregnado na fibra, e como fase aceptora é utilizada uma solução aquosa.....	31
Figura 3. Esquema do procedimento de extração de compostos anfetamínicos de amostra de sangue total pela técnica de microextração em fase líquida (LPME).	41
Figura 4. Esquema do procedimento de extração de Δ 9-tetraidrocanabinol de amostras de sangue total pela técnica de microextração em fase sólida (SPME).	44
Figura 5. Efeito do tempo de agitação magnética do sistema sobre a extração de compostos anfetamínicos de amostras de sangue total utilizando a técnica de microextração em fase líquida (LPME). ANF: anfetamina, MET: metanfetamina, MDA: 3,4-metilenodioxianfetamina, FEM: Femproporex, MDMA: 3,4-metilenodioximetanfetamina, MDEA: 3,4-Metilenodioxietilanfetamina.	56
Figura 6. Efeito do tempo de agitação magnética do sistema sobre a extração de anidro ecgonina metil éster (AEME), cocaína e cocaetileno de amostras de sangue total utilizando a técnica de microextração em fase líquida (LPME).....	57
Figura 7. Cromatograma obtido após microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME) e detecção por GC-MS de compostos anfetamínicos em amostras de sangue total. A: Amostra fortificada com analitos nas concentrações referentes ao Limite de Quantificação e padrões internos (50 ng/mL), B: Amostra branca, sem adição de analitos e padrões internos. Cada composto está identificado com o respectivo íon quantificador (m/z). ANF: anfetamina, MET: metanfetamina, MDA: 3,4-metilenodioxianfetamina, FEM: femproporex, MDMA: 3,4-metilenodioximetanfetamina, MDEA: 3,4-metilenodioxietilanfetamina.	58
Figura 8. Cromatograma obtido após microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME) e detecção por GC-MS de anidro ecgonina metil éster (AEME), cocaína (COC) e cocaetileno (CE) em amostras de sangue total. A: Amostra fortificada com analitos nas concentrações referentes ao Limite de Quantificação e padrões internos (50 ng/mL), B: Amostra branca, sem adição de analitos e padrões internos. Cada composto está identificado com o respectivo íon quantificador (m/z).	59
Figura 9. Cromatograma obtido após microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME) e detecção por GC-MS de Δ 9-tetraidrocanabionol (THC), 11-hidroxi- Δ 9-tetraidrocanabionol (THC-OH) e ácido 11-nor-9-carboxil- Δ 9-tetraidrocanabionol (THC-COOH) em amostras de sangue total. A: Injeção direta de 50 ng/mL de padrões certificados de THC, THC-OH e THC-COOH após derivatização com BSTFA; B: Amostra de sangue total após extração com a técnica de HF-LPME trifásica; C: Amostra de sangue total após extração com HF-LPME bifásica. Cada composto está identificado com o fragmento utilizado para sua identificação (m/z).....	62
Figura 10. Efeito da temperatura e tempo de agitação do sistema sobre a extração de Δ 9-tetraidrocanabinol de amostras de sangue total utilizando a técnica de microextração em fase sólida (SPME).....	64
Figura 11. Cromatograma obtido após microextração em fase sólida (SPME) e detecção por GC-MS de Δ 9-tetraidrocanabinol em amostras de sangue total. A: Amostra fortificada com o analito na concentração referente ao Limite de	

Quantificação. B : Amostra branca, sem adição de analitos e padrões internos. Cada composto está identificado com o respectivo íon quantificador (m/z).	64
Figura 12. Verificação do enquadramento dos métodos de microextração em fase líquida para a detecção de compostos anfetamínicos (A), cocaína e derivados (B) e microextração em fase sólida para a detecção de THC (C), utilizando o software AGREE (Pena-Pereira et al. 2020).....	65
Figura 13. Porcentagem de recuperação para os controles de qualidade baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA), determinado durante a validação do método de microextração em fase líquida (LPME) para determinação de compostos anfetamínicos em amostras de sangue total. MDA: 3,4-metilenodioxianfetamina; MDMA: 3,4-metilenodioximetanfetamina; MDEA: 3,4-metilenodioxietilamfetamina.	77
Figura 14. Porcentagem de recuperação para os controles de qualidade baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA), determinado durante a validação do método de microextração em fase líquida (LPME) para determinação de anidro ecgonina metil éster, cocaína e cocaetileno de amostras de sangue total.....	78
Figura 15. Porcentagem de recuperação (expressos em porcentagem - %) para os controles de qualidade baixo, médio e alto, determinado durante a validação do método de SPME para determinação de Δ^9 -tetraidrocannabinol em amostras de sangue total.	79
Figura 16. Fluxograma de pacientes atendidos no Pronto Socorro Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (PSC – HCFMUSP) no período de junho de 2018 a junho de 2019 e as respectivas situações de desfecho.....	103
Figura 17. Pacientes vítimas de acidente de trânsito atendidos e internados no Pronto Socorro Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (n=209), estratificados entre condutores, passageiros e pedestres e entre os respectivos veículos envolvidos nos acidentes.....	106
Figura 18. Pacientes vítimas de violência interpessoal atendidos e internados no Pronto Socorro Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (n=48), divididos de acordo com o mecanismo de lesão. FAF: ferimento por arma de fogo; FAB: ferimento por arma branca.....	106
Figura 19. Prevalência de substâncias psicoativas em amostras de sangue de pacientes atendidos no Pronto Socorro Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (n=376), divididas de acordo com o tipo de acidente.....	108
Figura 20. Número de amostras positivas para pelo menos uma substância psicoativa, álcool, cocaína e cannabis entre os pacientes apresentando lesões traumáticas atendidos e internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (n=376). Casos estão divididos entre os dias da semana.	109
Figura 21. Porcentagem de amostras positivas de vítimas de acidentes com lesões traumáticas atendidas e internadas no Pronto Socorro Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (n=376). Estão divididos entre tipo de vítima e mecanismo de lesão em cada tipo de acidente.	110

Lista de Tabelas

Tabela 1. Média e desvio padrão (DP) para a inclinação, intercepto e coeficiente de determinação obtidos das curvas de calibração dos analitos durante os testes de linearidade. Fatores de ponderação utilizados para aqueles analitos que apresentaram heteroscedasticidade. Resultados obtidos durante a validação do método de microextração em fase líquida (LPME) para determinação de estimulantes anfetamínicos em amostras de sangue total.	70
Tabela 2. Média e desvio padrão (DP) para a inclinação, intercepto e coeficiente de determinação obtidos das curvas de calibração dos analitos durante os testes de linearidade. Fatores de ponderação utilizados para aqueles analitos que apresentaram heteroscedasticidade. Resultados obtidos durante a validação do método de microextração em fase líquida (LPME) para determinação de anidrococgonina metil éster, cocaína e cocaetileno em amostras de sangue total.	71
Tabela 3. Média e desvio padrão (DP) para a inclinação, intercepto e coeficiente de determinação obtidos das curvas de calibração do analito durante os testes de linearidade. Fator de ponderação utilizado. Resultados obtidos durante a validação do método de microextração em fase sólida (SPME) para determinação de Δ 9-tetraidrocanabinol (THC) em amostras de sangue total.	71
Tabela 4. Resultados de precisão intra e inter-dia (expresso como coeficiente de variação - %) para controles de qualidade baixo, médio e alto, determinados durante validação do método de LPME para determinação de compostos anfetamínicos em amostras de sangue total.	72
Tabela 5. Resultados de exatidão (expresso como porcentagem - %) para controles de qualidade baixo, médio e alto, determinados durante validação do método de LPME para determinação de compostos anfetamínicos em amostras de sangue total.	73
Tabela 6. Resultados de precisão intra e inter-dia (expresso como coeficiente de variação - %) para controles de qualidade baixo, médio e alto, determinados durante validação do método de LPME para determinação de anidro ecgonina metil éster (AEME), cocaína e cocaetileno em amostras de sangue total.	73
Tabela 7. Resultados de exatidão (expresso como porcentagem - %) para controles de qualidade baixo, médio e alto, determinados durante validação do método de LPME para determinação de anidro ecgonina metil éster (AEME), cocaína e cocaetileno em amostras de sangue total.	74
Tabela 8. Resultados de precisão (intra e inter-dia) e exatidão (expressos como porcentagem - %) para controles de qualidade baixo, médio e alto, determinados durante validação do método de SPME para determinação de Δ 9-tetraidrocanabinol em amostras de sangue.	75
Tabela 9. Coeficientes de variação (CV) calculados para precisão intra e inter-dia e exatidão para os analitos analisados pelo método de LPME para determinação de compostos anfetamínicos, após diluição com sangue livre de analitos na proporção de 1:2, 1:5 e 1:10. Dados estão apresentados em porcentagem.	80
Tabela 10. Coeficientes de variação (CV) calculados para precisão intra e inter-dia e exatidão para os analitos analisados pelo método de LPME para determinação de cocaína e derivados, após diluição com sangue livre de analitos na proporção de 1:2, 1:5 e 1:10. Dados estão apresentados em porcentagem.	81
Tabela 11. Coeficientes de variação (CV) calculados para precisão intra e inter-dia e exatidão para os analitos analisados pelo método de SPME para determinação Δ 9-	

tetraidrocanabinol, após diluição com sangue livre de analitos na proporção de 1:5, 1:10 e 1:20. Dados estão apresentados em porcentagem.....	81
Tabela 12. Aplicação do método de microextração em fase líquida (LPME) para a detecção de compostos anfetamínicos em amostras de sangue total de indivíduos suspeitos de terem feito o uso de ecstasy. Resultados estão apresentado em ng/mL.82	
Tabela 13. Aplicação do método de microextração em fase líquida (LPME) para a detecção de cocaína e derivados em amostras de sangue total de indivíduos suspeitos de terem feito o uso de cocaína e/ou crack. Resultados estão apresentado em ng/mL.	84
Tabela 14. Aplicação do método de microextração em fase sólida (SPME) para a detecção de Δ 9-tetraidrocanabinol (THC) em amostras de sangue total de indivíduos que relataram terem feito o uso de maconha. Resultados estão apresentado em ng/mL.....	85
Tabela 15. Dados sociodemográficos referentes aos pacientes incluídos no estudo (n=376), separados de acordo com o tipo de acidente.....	104
Tabela 16. Substâncias pesquisadas, valores de limite de quantificação (LOQ) utilizados e prevalência das substâncias nas amostras de pacientes incluídos no estudo (n=376).....	107

Lista de Quadros

Quadro 1. Características das principais matrizes biológicas utilizadas na determinação de substâncias psicoativas.	37
Quadro 2. Íons (m/z) e tempo de retenção (minutos) de cada analito analisado. Os íons quantificadores de cada analitos estão apresentados sublinhados.	42
Quadro 3. Íons (m/z) e tempo de retenção (minutos) de cada analito analisado. Os íons quantificadores de cada analitos estão apresentados sublinhados.	43
Quadro 4. Condições de elevação e controle de temperatura no cromatógrafo gasoso para o método de detecção de compostos anfetamínicos.	45
Quadro 5. Condições de elevação e controle de temperatura no cromatógrafo gasoso para o método de detecção de cocaína e compostos derivados.	46
Quadro 6. Condições de elevação e controle de temperatura no cromatógrafo gasoso para o método de detecção de Δ^9 -tetraidrocanabinol.	46
Quadro 7. Controles de qualidade, faixa de trabalho utilizada na avaliação da linearidade e concentrações utilizadas na avaliação do carryover para cada método desenvolvido. Concentrações estão expressas em ng/mL.	49
Quadro 8. Fatores de diluição e concentração inicial de cada analito, anterior à diluição, utilizados durante os ensaios de integridade da diluição para cada um dos métodos desenvolvidos.	51
Quadro 9. Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) estabelecidos para o método de microextração em fase líquida (LPME) para determinação de compostos anfetamínicos em amostras de sangue total.	67
Quadro 10. Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) estabelecidos para o método de microextração em fase líquida (LPME) para determinação de anidro ecgonina metil éster, cocaína e cocaetileno em amostras de sangue total.	68

Lista de abreviações

AEME: Anidro ecgonina metil éster

ANVISA: Agência de Vigilância Sanitária

BSTFA: Bistrifluoroacetamida

BZE: Benzoilecgonina

CBD: Canabidiol

CQA: Controle de qualidade alto

CQB: Controle de qualidade baixo

CQM: Controle de qualidade médio

CTB: Código de Trânsito Brasileiro

CV: Coeficiente de variação

DLLME: Do inglês: *Dispersive liquid-liquid micro extraction* (microextração líquido-líquido dispersiva)

EME: Ecgonina metil éster

FAB: Ferimento por arma branca

FAF: Ferimento por arma de fogo

FID: Do inglês: *flame ionization detector* (detector por ionização de chama)

GC-MS: Do inglês: *Gas chromatography-mass spectrometry* (Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas)

IC: Intervalo de confiança

LLE: Do inglês: *liquid-liquid extraction* (extração líquido-líquido)

LOB: Do inglês: *Limit of Blank* (Limite do branco)

LOD: Do inglês: *Limit of Detection* (Limite de detecção)

LOQ: Do inglês: *Limit of Quantification* (Limite de Quantificação)

LPME: Do inglês: *Liquid phase micro extraction* (microextração em fase líquida)

MDA: 3,4-metilenodioxianfetamina

MDEA: 3,4-metilenodioxietilamfetamina

MDMA: 3,4-metilenodioximetamfetamina

OMS: Organização Mundial da Saúde

ONU: Organização das Nações Unidas

OR: Do inglês: *odds ratio* (razão de chances)

PDMS: Polidimetilsiloxano

SDME: Do inglês: *single drop microextraction* (microextração em gota única)

SIM: Do inglês: *Selected ion monitoring* (monitoramento selecionado de íons)

SNC: Sistema Nervoso Central

SPE: Do inglês: *Solid phase extraction* (extração em fase sólida)

SPME: Do inglês: *Solid phase microextraction* (microextração em fase sólida)

SUS: Sistema Único de Saúde

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TFAA: Do inglês: *trifluoroacetic anhydride* (ácido trifluoro acético)

THC: Δ^9 -tetraidrocanabinol

THC-COOH: 11-nor-9-carboxil- Δ^9 -tetraidrocanabinol

THC-OH: 11-hidroxi- Δ^9 -tetraidrocanabinol

UNODC: Do inglês: *United Nations Office on Drugs and Crime* (Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime)

UHPLC: Do inglês: *Ultra-high performance liquid chromatography* (Cromatografia Líquida de ultra eficiência)

Resumo

Bombana HS. *Substâncias psicoativas no sangue: métodos de análises toxicológicas e prevalência do uso em pacientes com lesões traumáticas* [Tese]. São Paulo. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2021.

A toxicologia forense e a analítica estão comumente atreladas, fazendo com que uma análise robusta e confiável seja necessária para obtenção de um resultado fidedigno. A Química Analítica Verde prega pela diminuição da utilização de solventes tóxicos. Neste contexto, novas metodologias surgiram como as microextrações em fase líquida e em fase sólida. O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e validação de metodologias de microextração em fase líquida e sólida para a determinação de compostos anfetamínicos (anfetamina, metanfetamina, femproporex, 3,4-metilenodioximetanfetamina – MDMA, 3,4-metilenodioxianfetamina – MDA e 3,4-metilenodioxietiltanfetamina – MDEA), cocaína e produtos de biotransformação (anidro ecgonina metil éster – AEME, cocaetileno e benzoilecgonina) e canabinoides (Δ^9 -tetraidrocanabinol) em amostras de sangue total com detecção por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Além disso, os métodos desenvolvidos foram aplicados em amostras de sangue de pacientes com lesões traumáticas atendidos e internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) a fim de verificar a prevalência do consumo dessas substâncias, bem como o perfil dos pacientes atendidos. Todos os métodos foram validados seguindo as normas de guias internacionais de validação de métodos analíticos. As amostras de sangue dos pacientes internados no HCFMUSP foram coletadas de julho de 2018 a junho de 2019 e foram incluídos apenas pacientes com lesões graves, decorrente de acidentes de trânsito, quedas e violência interpessoal. Foram desenvolvidos três métodos para a determinação de cada uma das classes de substâncias (anfetaminas, cocaína e canabinoides). A técnica de microextração em fase líquida foi utilizada para a determinação de compostos anfetamínicos e cocaína, enquanto a técnica de microextração em fase sólida para a determinação de canabinoides. Todos os três métodos apresentaram parâmetro de validação dentro dos limites preconizados na literatura, apresentando ótimos resultados de precisão, exatidão, linearidade, recuperação e integridade da diluição. Foi identificada uma prevalência total de 31,4%, sendo o álcool a substância mais consumida (22,9%), seguida da cocaína (12,2%) e maconha (5%). Os acidentes de trânsito foram a causa de trauma mais comum, perfazendo 55,5% dos pacientes atendidos, sendo os motociclistas os principais pacientes. Dentre os motoristas, um terço havia consumido alguma substância. Os pacientes do sexo masculino, jovens, solteiros e com ensino médio completo eram a maioria dentre aqueles com resultados positivos. Os acidentes envolvendo o consumo de qualquer substância eram mais prováveis de acontecerem durante o período noturno.

Descritores: Toxicologia forense; Análise química do sangue; Drogas ilícitas; Anfetaminas; Cocaína; Cannabis; Acidentes de trânsito; Ferimentos e lesões.

Abstract

Bombana HS. *Psychoactive substances in blood: methods of toxicological analysis and prevalence of use on patients with traumatic injuries* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”, 2021.

Forensic and analytical toxicology are, most of the times, combined. Therefore, a robust and trustworthy analysis is required. Green Analytical Chemistry aims for the reduction on the use of toxic solvents. In this field many novel analytical methods gained attention, such as liquid and solid phase microextractions. The present work aimed on the development and validation of methods using liquid and solid phase microextraction using whole blood samples for the determination of amphetamine-type stimulants (amphetamine, methamphetamine, fenproporex, 3,4-metilendioximethamphetamine – MDMA, 3,4-metilendioxiamphetamine – MDA and 3,4-metilendioxiethylamphetamine – MDEA), cocaine and products of biotransformation (anhydroecgonine methyl ester – AEME, cocaethylene and benzoylecgonine) and cannabinoids and detection by gas chromatography-mass spectrometry. Besides, the validated methods were applied on blood samples from patients attended and hospitalized at the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), in order to assess the consumption of those substances by trauma patients, also to verify the profile of the injured patients. Liquid phase microextraction were used for the amphetamine-like stimulants and cocaine and its derivatives, while solid phase microextraction for the determination of cannabinoids. All the analytical methods were developed and validated accordingly to international guidelines and all the parameters were within the values requested. Therefore, all the three methods presented good results for precision, bias, linearity, recovery, and dilution integrity. Both techniques are easy to perform and could be introduced in a laboratory routine. The analysis of the samples of the injured patients pointed that 31.4% of them used at least one substance before injury. Alcohol was the most prevalent (22.9%) followed by cocaine (12.2%) and cannabis (5%). No amphetamine-type stimulants were detected. Road traffic crashes corresponded for the main injury mechanism (55.5% of the included patients) and motorcyclists were the majority of the patients. Among drivers, one in each three, resented positive results for at least one substance. Patients that consumed any substance before injury were mostly young males, with a high school degree and were mostly single. Traumas involving the consumption of drugs were more likely to happen during nighttime.

Descriptors: Forensic toxicology; Blood chemical analysis; Illicit drugs; Amphetamines; Cocaine; Cannabis; Traffic accidents; Wounds and injuries.

1. Introdução

A toxicologia forense, uma área das ciências forenses, engloba toda aplicação da ciência e estudo de intoxicantes para a elucidação de questões ocorridas em âmbito judicial¹. A aplicação mais comum desta área ocorre na identificação de qualquer substância química que possa causar a morte ou danos à saúde do ser humano ou ao patrimônio. Entretanto, no campo da toxicologia forense a aplicação dos conhecimentos tanto teóricos quanto analíticos é mais ampla. Análises toxicológicas com finalidade forense podem ser realizadas para identificar agentes químicos que causaram efeitos nocivos em várias situações em que estão envolvidos processos judiciais como no campo da agricultura, industrial e saúde pública². Podem auxiliar nas investigações de suicídios e homicídios por intoxicação exógena, em questões civis e criminais relacionados ao uso de drogas; nos exames de abuso de drogas em ambientes correcionais; na segurança viária, no ambiente de trabalho, em questões envolvendo crimes relacionados à poluição ambiental, na avaliação de dopagem nos esportes, entre outras³.

Existe uma estreita relação da toxicologia forense com a toxicologia analítica, a qual diz respeito à utilização de técnicas de química analítica para a detecção, identificação e quantificação de drogas e seus produtos de biotransformação, sendo diversas as substâncias a serem analisadas, com diferentes propriedades físico-químicas. Uma vez que as informações toxicológicas necessárias para a conclusão de diferentes investigações podem requerer exames em uma variada gama de amostras biológicas e não-biológicas, o escopo e desafios da toxicologia analítica são elevados. Além disso, os compostos podem ser alterados por biotransformação ou degradação química, portanto, conhecimentos a respeito da farmacocinética e farmacodinâmica dessas substâncias são de suma importância ao toxicologista forense⁴.

Ganham principal destaque e preocupação nos laboratórios de toxicologia forense as drogas ilícitas. O consumo de substâncias como *cannabis*, cocaína e

estimulantes anfetamínicos, aumenta a cada ano em todo o mundo⁵. Estima-se que em 2018, 269 milhões de pessoas fizeram uso de drogas ilícitas pelo menos uma vez, sendo a maconha a droga mais consumida, seguida pelos estimulantes anfetamínicos e cocaína. Nos últimos anos novas drogas têm surgido no mercado, sendo denominadas novas substâncias psicoativas (NSP). As NSP são substâncias sintéticas, análogas às “drogas clássicas”. São classificadas de acordo com sua estrutura molecular sendo em sua maioria canabinoides sintéticos. Em sua maioria apresentam efeitos farmacológicos mais potentes do que outras drogas, aumentando os riscos para os usuários^{6,7}.

Em contrapartida, a tecnologia de identificação e caracterização dessas substâncias também se desenvolvem constantemente. O surgimento de novas tecnologias como a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em tandem (UHPLC-MS/MS), aumentou consideravelmente a sensibilidade e especificidade das análises toxicológicas em comparação às análises realizadas em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Entretanto, tecnologias mais sensíveis, muitas vezes requerem uma preparação de amostras mais sofisticada, a fim de serem retirados interferentes que possam comprometer a análise, além de danificar os aparelhos utilizados⁸.

Para a escolha de uma técnica de preparação de amostras deve-se levar em consideração alguns fatores como: o tipo de amostra, as propriedades físico-químicas dos analitos de interesse, a necessidade de um extrato com maior pureza, maximização de recuperação dos analitos, número de amostras a ser analisado e a redução de custos e tempo de trabalho⁹. Classicamente são utilizadas duas técnicas principais para a extração dos analitos de amostras: extração líquido-líquido e extração em fase sólida. Entretanto, ambas produzem grandes quantidades de resíduos e normalmente são utilizados reagentes tóxicos tanto para o analista, como para o meio ambiente¹⁰.

Nas últimas décadas, um novo ramo foi criado dentro da química analítica, sendo denominada “Química Analítica Verde”. Esta nova área ganhou destaque devido à preocupação com a segurança do analista, bem como a manutenção do meio ambiente livre de contaminantes¹¹. As técnicas clássicas utilizadas nas

análises toxicológicas vêm sendo modificadas visando a diminuição ou total exclusão do uso de solventes e soluções que sejam prejudiciais à saúde. As denominadas microextrações estão cada vez mais presentes na realidade dos laboratórios de toxicologia.

Vários métodos envolvendo a utilização de microextração já foram desenvolvidos e publicados para a determinação de inúmeros compostos em diferentes matrizes biológicas. Entretanto, sua aplicação em amostras sanguíneas ainda apresenta algumas lacunas no âmbito da detecção de drogas de abuso¹².

O sangue é uma das únicas matrizes biológicas capazes de refletir os efeitos farmacológicos de uma substância psicoativa, no momento da coleta, ou seja, para verificar se um indivíduo estava sob efeito de alguma substância no momento da coleta, o sangue deve ser analisado¹³. Outras matrizes, como fluido oral, urina ou cabelo, podem não ser invasivas na realização de sua coleta, entretanto podem ser facilmente adulteradas (como o caso da urina), não apontarem o uso recente (cabelo), ou o resultado pode não refletir o real estado do indivíduo em alguns casos (fluido oral)¹³.

O uso de substâncias psicoativas, causa prejuízos cognitivos e motores importantes, aumentando significativamente o risco para a ocorrência de lesões^{14,15}. O álcool é uma das principais substâncias causadoras de prejuízos, sendo o risco de envolvimento em acidentes de trânsito diretamente proporcional à quantidade de álcool ingerida. Estima-se que para cada dose o risco aumente 13 vezes¹⁶. Além disso, o uso de outras substâncias psicoativas, como cocaína, maconha e estimulantes anfetamínicos também causa importantes prejuízos para os usuários, podendo contribuir com o acontecimento de lesões traumáticas¹⁷.

Apesar de atualmente a utilização de equipamentos como o UHPLC-MS/MS ser o padrão-ouro nas análises toxicológicas, seu custo elevado impede muitas vezes sua utilização. Em muitos laboratórios de países de média e baixa-renda normalmente estão disponíveis apenas GC-MS para a análise. Desta forma, a preparação de amostras deve ser realizada com maior atenção e

cuidado para que baixos Limites de Quantificação e Detecção sejam alcançados e resultados precisos e exatos sejam obtidos.

Assim sendo, o presente estudo propôs preencher a lacuna da utilização das microextrações em sangue total para a determinação das principais drogas ilícitas consumidas no cenário brasileiro. Após o desenvolvimento e validação das metodologias para identificação dessas drogas, foram aplicadas em amostras de sangue de pacientes, vítimas de lesões traumáticas, atendidos e internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). Os dados obtidos e apresentados nesta tese podem, além de disponibilizar novas metodologias de análises toxicológicas, auxiliar na elaboração de políticas públicas visando a diminuição tanto do uso prejudicial de substâncias ilícitas, como as consequências sociais, pessoais e de saúde decorrentes deste abuso.

Para facilitar a apresentação dos resultados e discussão apropriada, esta tese foi dividida em duas partes. Na Parte I são apresentadas as metodologias utilizadas no desenvolvimento dos novos métodos de extração e detecção de estimulantes anfetamínicos, cocaína e derivados e Δ^9 -tetraidrocanabinol, bem como os resultados encontrados. Na Parte II são apresentados estudos toxicológicos e epidemiológicos a respeito do uso de substâncias psicoativas por pacientes, vítimas de lesões traumáticas graves, atendido e internados no HCFMUSP.

2. Objetivo geral

Desenvolver novas metodologias de análises de substâncias psicoativas em amostras de sangue total e aplicar as técnicas em amostras coletadas de pacientes, com lesões traumáticas graves, atendidos no Pronto Socorro Central e internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP).

2.1 Objetivos específicos

Parte I

- Desenvolver metodologias analíticas utilizando técnicas de microextração em fase líquida e em fase sólida para determinação de compostos anfetamínicos (anfetamina, metanfetamina, femproporex, 3,4-metilenodioximetanfetamina – MDMA, 3,4-metilenodioxianfetamina – MDA e 3,4-metilenodioxietilanfetamina – MDEA), cocaína e subprodutos (anidro ecgonina metil éster – AEME e cocaetileno) e Δ^9 -tetraidrocanabinol de amostras de sangue total com posterior detecção por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas;

Parte II

- Coletar amostras de sangue de pacientes com lesões traumáticas decorrentes de acidentes de trânsito, violência interpessoal e quedas, atendidos no Pronto Socorro Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP;
- Aplicar os métodos desenvolvidos nas amostras coletadas dos pacientes incluídos no estudo;
- Verificar a prevalência do uso de substâncias psicoativas e traçar o perfil dos pacientes atendidos e internados no HCFMUSP com lesões traumáticas.

Parte I

3. Revisão da Literatura

3.1 Métodos de extração e microextração

Em pouco mais de 200 anos, desde a primeira publicação no âmbito da toxicologia forense por Mathieu Orfila em 1813, o número de xenobióticos e tipos de matrizes analisadas cresceu exponencialmente. Esse crescimento também foi acompanhando pelo desenvolvimento de métodos mais robustos, precisos e específicos, aliando a tecnologia à elucidação de casos antes sem solução^{1,18}.

A determinação e quantificação dos analitos de interesse não pode ser realizada sem um pré-tratamento das amostras que, geralmente, são compostas de matrizes complexas e heterogêneas¹⁹. A preparação de amostras é um dos procedimentos cruciais e mais importantes para uma análise toxicológica confiável. A escolha errônea de uma técnica de extração ou utilização de materiais não apropriados podem ocasionar resultados não condizentes com a realidade. Normalmente são realizadas múltiplas etapas durante o processamento de amostras e a técnica adotada pode apresentar diversos objetivos como: remoção de substâncias endógenas interferentes, liberação dos analitos da matriz, extração, concentração de analitos e procedimentos para aumento da seletividade e sensibilidade, como derivatizações^{18,20}.

As principais técnicas de extração utilizadas para diversos tipos de analitos e matrizes são a extração líquido-líquido (*liquid-liquid extraction* – LLE) e a extração em fase sólida (*solid phase extraction* – SPE)²¹. A LLE tem como princípio a migração dos analitos da matriz para um solvente orgânico imiscível em água, sendo uma de suas vantagens a facilidade de execução e reprodutibilidade. Entretanto, não é uma técnica analito-específica, podendo extrair, além dos analitos de interesse, interferentes que podem comprometer a exatidão da análise⁹. Já na SPE, são utilizados cartuchos preenchidos com uma fase estacionária para a separação dos analitos-alvo da matriz. Esta fase sólida pode apresentar característica polar e/ou apolar de acordo com as características físico-químicas das moléculas a serem analisadas. Apesar de serem mais específicas do que a LLE, a quantidade de solventes orgânicos e outros reagentes utilizados durante a extração é mais elevada, além de

necessitar de diversas etapas, o que poderia comprometer a recuperação dos analitos. Cada cartucho precisa ser, antes da introdução da amostra, condicionado. Somente após o condicionamento, a amostra é inserida no cartucho, então é necessária uma lavagem do cartucho para eliminação de interferentes e só então é realizada a eluição dos analitos. Todo o processo demanda a utilização de vários mililitros de solventes e reagentes, aumentando o custo das análises e resíduos a serem descartados²².

Além dos grandes volumes de resíduos gerados pela LLE e SPE, os solventes utilizados são muitas vezes prejudiciais à saúde dos analistas e para o meio ambiente, podendo ser cancerígenos, corrosivos, inflamáveis e explosivos. Somando-se a isto, as técnicas clássicas possuem diversas etapas, o que pode favorecer o aparecimento de erros analíticos como perda de parte dos analitos, além de consumirem tempo, energia e insumos.

3.2 Química Analítica Verde

No final da década de 1990, Paul Anastas apresentou à comunidade científica o que ele denominou de “Química Verde”, consistindo em uma abordagem para a síntese, processamento e utilização de produtos químicos que reduzam riscos para o ser humano e ambiente¹¹. O ideal da química verde possui laços profundos com o desenvolvimento sustentável, tendo como objetivo a redução ou eliminação dos riscos de uma atividade química, através da diminuição ou até mesmo da anulação do perigo da equação:

$$\text{riscos} = \text{perigo} \times \text{exposição}$$

A “Química Analítica Verde” traz as ideias e fundamentos da química verde para o âmbito de laboratórios analíticos, incluindo a toxicologia. O uso dos princípios descritos por Anastas no desenvolvimento de novos métodos analíticos é de fundamental importância e necessidade. Galuszka e colaboradores em 2013, adotando os princípios da química verde e adaptando para a realidade de laboratórios analíticos, criaram, então, doze princípios da

química analítica verde que devem ser seguidos, na medida do possível, em todas as metodologias aplicadas²³:

- Análise direta deve ser realizada para evitar tratamento de amostras;
- objetivos são diminuir volume e quantidade de amostras;
- medidas *in situ* devem ser realizadas;
- integração de processos analíticos e operacionais economizam energia e uso de reagentes;
- métodos automatizados e miniaturizados devem ser selecionados;
- derivatização deve ser evitada;
- geração de grandes quantidades de resíduos deve ser evitada e devem ser descartados de acordo com recomendações;
- métodos multianalitos são preferíveis;
- uso de energia deve ser minimizado;
- reagentes obtidos de fontes renováveis devem ser utilizados;
- reagentes tóxicos devem ser eliminados ou substituídos;
- a segurança do analista deve ser intensificada.

A forma ideal de análise, seguindo os princípios acima descritos, seria a análise direta da matriz, sem qualquer tipo de tratamento. Entretanto, mesmo com a modernização dos equipamentos de detecção (GC-MS, LC-MS/MS, UHPLC) estas análises seriam inviáveis devido às possíveis deteriorações ocorridas no equipamento como contaminações, diminuição da vida útil de colunas cromatográficas e de outros consumíveis. Desta maneira, a forma mais prática e fácil de adoção da química analítica verde seria a substituição de solventes prejudiciais, para aqueles menos nocivos, ou a miniaturização dos métodos clássicos de extração visando a redução da quantidade ou completa eliminação de solvente utilizado, além da diminuição dos resíduos gerados e simplificação das etapas analíticas^{24,25,26}. Com a miniaturização da LLE e SPE, surgiram duas principais técnicas de microextração, a microextração em fase sólida (SPME) e a microextração em fase líquida (LPME).

3.3 Microextração em fase sólida – SPME

Em 1990 foi descrito o primeiro uso da SPME em métodos analíticos²⁷. Desde então, diversas metodologias, utilizando-se de matrizes em diferentes estados da matéria, para a determinação dos mais variados analitos foram descritos²⁸. A SPME foi apresentada como uma metodologia simples, versátil, fácil de ser replicada e que eliminava várias etapas, consolidando-as em uma única, diminuindo o tempo de extração²⁹. Além disso, apresenta possibilidade de automatização e direto acoplamento à instrumentos analíticos como cromatógrafo gasoso ou líquido. A SPME, apresenta ainda, um escopo de aplicabilidade que vai além da bancada de laboratórios de toxicologia. Já foram descritos usos *in vivo*, por exemplo, no monitoramento da função de órgãos durante transplantes e em modelos animais e culturas celulares³⁰.

O princípio da técnica baseia-se na exposição de uma fase extratora, dispersa em um suporte sólido à matriz a ser analisada³¹. Uma vez que a fase extratora é exposta, a captura dos analitos se dá pela adsorção dos analitos nesta fase, até que o equilíbrio entre a concentração na amostra e na fase extratora seja atingido. Este equilíbrio está diretamente relacionado com a quantidade de amostra e a superfície de contato com a fase extratora. Como é considerada uma técnica não exaustiva, pode ser realizada diretamente em grandes volumes de amostra, como por exemplo, ar, água fluvial ou pluvial e até mesmo em fluxo de produção de algum bem³². Desta forma, elimina-se a etapa de coleta e os problemas relacionados ao armazenamento das amostras, como deterioração de analitos³¹.

Existem diversas configurações da fase extratora para SPME, sendo a mais tradicional e conhecida a fibra revestida de polímeros. O revestimento da fibra é o fator determinante para a seletividade e eficiência da extração, e a natureza química do analito-alvo determina o tipo de revestimento a ser empregado. Para a extração de analitos apolares o revestimento mais comumente empregado é o polidimetilsiloxano (PDMS), já para analitos polares, o poliácrlato^{20,33}.

A SPME pode ser subdividida em duas configurações, a imersão direta (DI-SPME) e *headspace* (HS-SPME). Na DI-SPME, a fibra é inserida diretamente na amostra e a extração é realizada pela adsorção dos analitos de interesse na fibra até que o equilíbrio entre a fase estacionária e a amostra seja atingido. Esta técnica é uma das mais utilizadas, entretanto, deve-se atentar para a utilização em amostras com muitos interferentes e sólidas, pois podem danificar a fibra inviabilizando a extração²⁹.

Alguns trabalhos foram além da forma clássica da DI-SPME. Para aumentar a taxa de recuperação e rapidez da extração, sem danificar a fibra exposta à matriz, foi desenvolvida uma técnica na qual o polímero para adsorção dos analitos fosse revestido em uma barra magnética, sendo conhecida como extração de barra de agitação (*Stir Bar Sorptive Extraction* – SBSE). Isso possibilitaria um aumento na velocidade de agitação do sistema e, devido à maior superfície de contato entre os analitos e a fase extratora, uma maior recuperação^{34,35}. Apesar de, ainda apresentar algumas limitações, como custo da fibra, limitação de analitos possíveis de extração (devido à pouca opção de polímeros na barra magnética), esta técnica tem sido aplicada em várias áreas da toxicologia com êxito^{34,35}.

Já na técnica de HS-SPME, a fibra é alocada na região gasosa existente acima da matriz. Esta configuração é bastante útil para determinação de analitos voláteis e em matrizes sólidas e viscosas, como o sangue. Além de proteger a fibra de danos causados por interferentes, a extração costuma ter um tempo reduzido devido à maior interface entre a fibra e matriz e ao coeficiente de difusão ser maior em fases gasosas comparado a fases líquidas^{31,36}.

A versatilidade da SPME pode ser reconhecida por diferentes trabalhos publicados envolvendo diversas áreas analíticas que vão desde análises alimentícias³⁷, avaliação de atividade microbiana através da produção de CO₂ por leveduras³⁸ e monitoramento de solo e água³⁹. No âmbito da toxicologia forense a utilização da SPME também é ampla. Matrizes diversas são analisadas através de HS-SPME ou DI-SPME. Toledo et al. (2003), analisaram cocaína e produtos de biotransformação em amostras de cabelo utilizando a técnica de SPME⁴⁰. Da mesma maneira, Gentili et al. (2004)⁴¹ e Merola et al. (2010)³⁶

detectaram drogas ilícitas recreacionais também em amostras de cabelo. Já amostras de fluido oral foram utilizadas na detecção tanto de canabinoides⁴², quanto na análise de cocaína, anfetamina e tetraidrocanabinol (THC)⁴³. Urina⁴⁴ e suor⁴⁵ também puderam ser analisados através da técnica de DI-SPME e HS-SPME respectivamente para a detecção de drogas de abuso. Devido a fragilidade da fibra, as amostras sólidas (como o cabelo) só podem ser analisadas por HS-SPME ou após passarem por um procedimento de digestão para liberação dos analitos para uma fase aquosa.

3.4 Microextração em fase líquida – LPME

Juntamente com a SPME, a LPME também revolucionou os métodos analíticos, eliminando procedimentos e insumos prejudiciais à saúde. Foi descrita pela primeira vez em 1996⁴⁶ e, desde então, seu uso tem sido observado de diferentes formas. A LPME pode ser dividida em três principais categorias: LPME em gota única (*single drop microextraction* – SDME), microextração líquido-líquido dispersiva (*dispersive liquid-liquid microextraction* – DLLME) e microextração em fase líquida com fibra oca (*hollow-fibre liquid phase microextraction* – HF-LPME)^{47,48}.

A SDME baseia-se na migração dos analitos da matriz para uma única gota de solvente orgânico. Normalmente volumes de até 5 µL de solvente orgânico são expostos em uma ponta de seringa, formando uma gota deste solvente, que é então exposta à amostra a ser analisada (Figura 1). Pode ser tanto exposta imersa na solução quanto ao espaço gasoso acima dela (*headspace*)^{47,49}. Apesar de ter sido apresentada como uma técnica promissora, a SDME tem algumas desvantagens. Esta configuração possibilita somente que analitos apolares ou com pouca polaridade sejam extraídos. Além disso, dependendo da velocidade ou força de agitação a gota pode se tornar instável e romper-se. O mesmo acontece com matrizes complexas e particuladas que podem inviabilizar a permanência da gota de solvente orgânico⁴⁷. A forma de *headspace*-SDME apresenta algumas vantagens sobre a imersão direta. Uma maior gama de analitos podem ser isolados e solventes utilizados, uma vez que

a imiscibilidade em água não é mais uma necessidade obrigatória, além de possibilitar a utilização de qualquer tipo de matriz^{47,50}.

Em 2006, uma nova forma de extração utilizando solvente foi proposta por Rezaee et al. (2006), denominada de microextração líquido-líquido dispersiva, sendo apresentada como uma alternativa mais rápida e eficiente do que HF-LPME e SDME^{51,52}. Nesta técnica são utilizados dois solventes, um extrator e um dispersivo. O solvente extrator será o responsável pela extração dos analitos da amostra enquanto o solvente dispersivo será responsável pela separação do solvente extrator da matriz aquosa. Os solventes são misturados e rapidamente injetados na amostra aquosa, produzindo uma solução turva após agitação. A solução é então centrifugada, a emulsão quebrada, ocorrendo a precipitação do solvente extrator que é retirado e analisado⁵².

Os solventes utilizados devem respeitar algumas características. O extrator deve, além de permitir a solubilidade dos analitos, ser insolúvel em água, mas apresentar solubilidade no solvente dispersivo. Além disso, sua densidade deve ser diferente da água para que a separação seja bem-sucedida. Já o solvente dispersivo deve ser solúvel em água, sendo os mais usuais, acetona, acetonitrila e metanol^{52,53}.

Os solventes extratores mais utilizados eram os clorados como clorobenzeno, o que diminuía sua capacidade de ser apresentado como um método verde. Em vista disso, foram substituídos por álcoois e hidrocarbonetos, entretanto apresentavam densidade menor do que a água tornando-se difícil sua recuperação da solução aquosa⁵². Para que a DLLME seja aplicada é necessário que a matriz utilizada seja uma solução aquosa. Desta maneira matrizes sólidas e/ou com alto grau de proteínas precisam de um pré-tratamento como diluição, precipitação de proteínas ou digestão⁵³. A utilização da DLLME para detecção de substâncias psicoativas já foi bastante utilizada em matrizes biológicas, como sangue^{54,55,56}, urina⁵⁷, cabelo^{58,59} e fluido oral⁶⁰, mostrando-se uma técnica promissora para o âmbito da toxicologia forense. Na Figura 1 está apresentado esquematicamente a extração por SDME (A) e a DLLME (B).

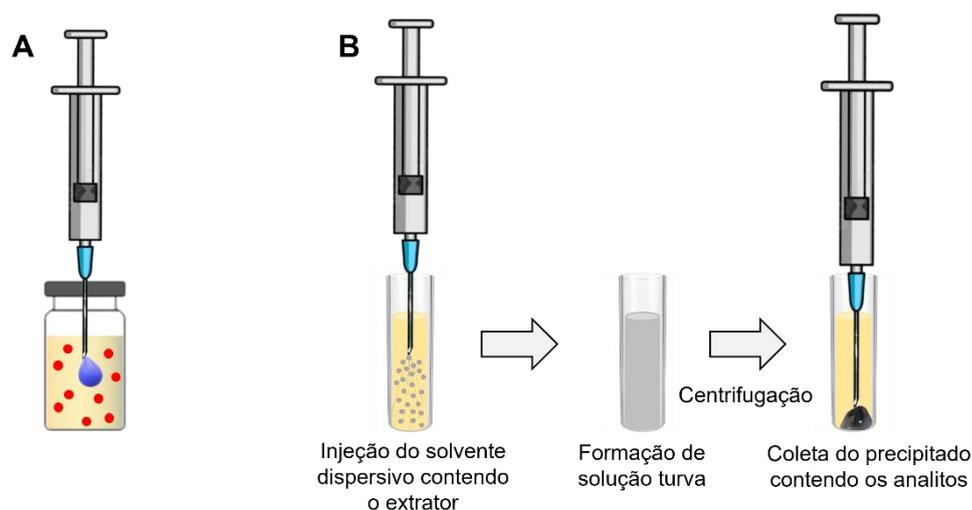


Figura 1. Esquema das extrações A: microextração em gota única (SDME) e B: microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME).

A terceira configuração da LPME, baseada em membrana, é a forma mais conhecida. Utiliza-se de uma membrana semipermeável, porosa, separando fisicamente as fases doadoras e receptoras, impedindo que moléculas não desejáveis migrem para a fase receptora do sistema e impossibilitando a dissolução da fase receptora na matriz aquosa^{61,62}. A LPME em membrana porosa é a que apresenta melhores resultados, sendo mais facilmente replicada. A técnica da utilização de uma membrana porosa oca na LPME foi descrita pela primeira vez por Pedersen-Bjergaard e Rasmussen em 1999, com o nome de microextração líquido-líquido-líquido⁶³.

Na HF-LPME, uma pequena fibra porosa oca é mantida em contato direto com a amostra liquefeita. Os poros da fibra são preenchidos com solvente orgânico imiscível em água, que age como uma fina membrana líquida suportada, enquanto no interior da fibra é colocado o líquido receptor. Quando o líquido receptor é o próprio solvente orgânico que impregna os poros, o sistema resultante é denominado bifásico. Se a fase receptora é uma solução aquosa diferente do solvente utilizado nos poros, então, o sistema é denominado trifásico (Figura 2)⁶². A configuração trifásica requer um maior tempo para que o equilíbrio entre as fases doadora e receptora seja atingido, pois o analito deve difundir-se primeiramente da fase doadora para o solvente nos poros e somente então, para a fase receptora no interior do lúmen da fibra oca⁶¹. Como fase receptora, utiliza-

se uma solução ácida ou básica (dependendo das características do analito a ser extraído), com pH contrário ao do analito, para que sirva de armadilha para a molécula que se torna ionizada ao entrar em contato com esta solução, impossibilitando sua difusão para o exterior da fibra⁶².

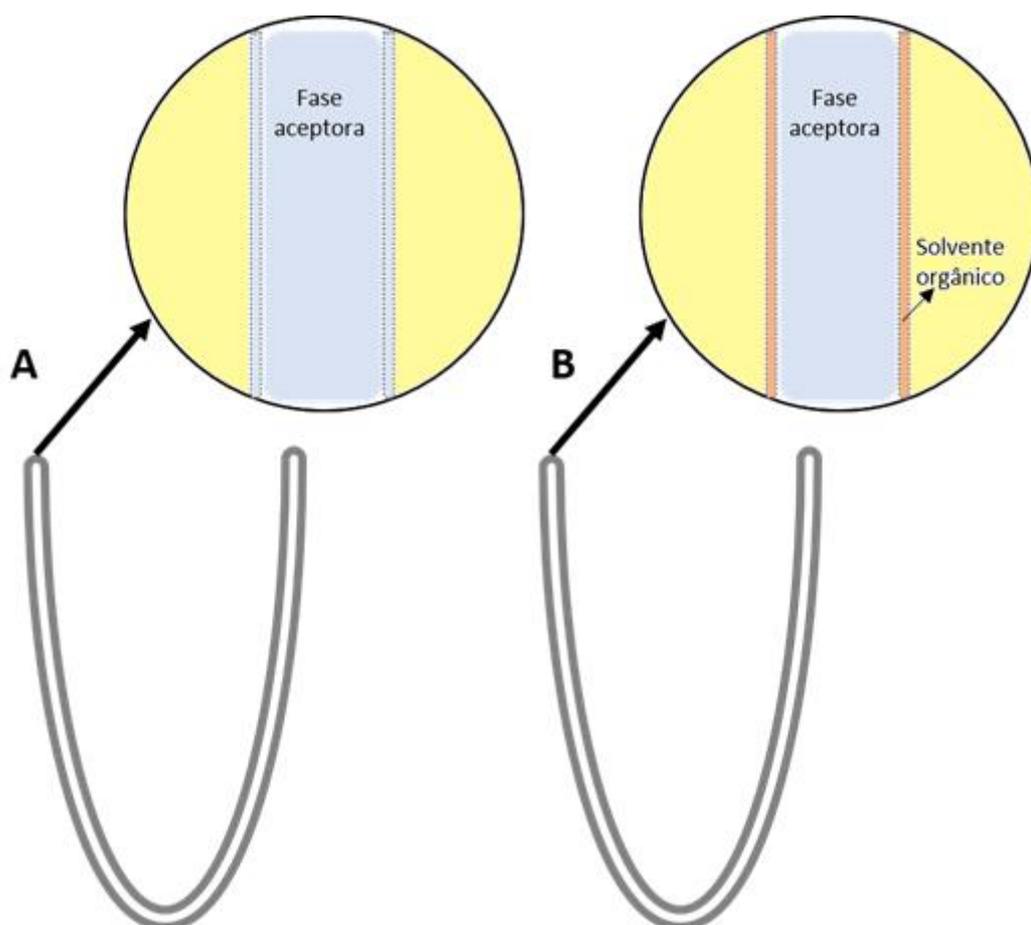


Figura 2. Esquema de microextração em fase líquida (LPME) sistema bifásico (A) e sistema trifásico (B). No sistema A, o solvente impregnado na fibra é o mesmo utilizado como fase aceptora. Já no sistema B, um solvente é impregnado na fibra, e como fase aceptora é utilizada uma solução aquosa.

Uma das principais vantagens da HF-LPME, principalmente na configuração trifásica, é a capacidade de produzir um extrato límpido, com poucos interferentes, podendo ser analisado diretamente, dependendo do equipamento analítico utilizado, sem a necessidade de evaporação para concentração dos analitos. Além disso, durante todo o procedimento, utiliza-se

volumes extremamente pequenos de solvente orgânico, não passando de 40-50 μL em cada extração⁶². Alguns trabalhos inclusive demonstraram a possibilidade da utilização de óleos essenciais em substituição aos solventes orgânicos, resultando em uma extração com menor toxicidade e em concordância com os princípios da química analítica verde⁶⁴.

A LPME, como todos os outros tipos de extração, também possui desvantagens. Como se trata de uma técnica não exaustiva, ou seja, o princípio não se trata da extração de toda a quantidade do analito da amostra, mas sim visa-se atingir o equilíbrio entre as concentrações na fase doadora e aceptora, esse tempo de equilíbrio pode se tornar longo, podendo atingir cerca de 45 minutos ou mais de extração⁶⁵. Em vista deste problema foi criada uma alternativa para diminuição do tempo de extração. Insere-se um eletrodo juntamente com a fase aceptora no lúmen da fibra oca e outro eletrodo na fase doadora. Desta maneira é criado um campo eletromagnético capaz de auxiliar na migração do analito por entre a membrana, fazendo com que o tempo até o equilíbrio seja consideravelmente menor em comparação à LPME tradicional^{65,66}, sendo esta técnica conhecida como extração por eletromembrana.

3.5 Matrizes biológicas para análises toxicológicas

As análises toxicológicas podem ser realizadas em qualquer fluido ou tecido orgânico, sendo que a escolha depende do objetivo e resultados esperados em cada abordagem. No âmbito da toxicologia forense, as matrizes são as mais variadas podendo compreender desde cabelo, unhas, até humor vítreo e conteúdo estomacal¹³. A escolha da matriz biológica a ser utilizada está muito relacionada com o contexto em que está inserido. Numa análise *postmortem* a gama de matrizes a disposição do analista é muito maior do que com um indivíduo vivo. Entretanto, antes de a amostra ser escolhida e coletada, devem ser verificados quesitos como: facilidade de coleta, custo da análise, concentração do analito, estabilidade e deterioração da amostra, bem como o propósito da análise. Além disso, o toxicologista deve conhecer a

farmacocinética e biotransformação da substância a ser investigada para que tanto a coleta de amostras como a análise sejam bem-sucedidas. Outro importante aspecto a ser considerado é a janela de detecção das matrizes, ou seja, o tempo em que uma substância apresenta níveis detectáveis de seu consumo ou administração^{67,68}.

Dentre as matrizes utilizadas, as mais clássicas são a urina e o sangue. Nas últimas décadas o fluido oral vem ganhando destaque como uma matriz promissora e provável substituta ao sangue em alguns contextos⁶⁹. Além disso, o cabelo também tem sido bastante utilizado em diversas abordagens, devido à sua extensa janela de detecção.

A urina é uma das matrizes biológicas mais utilizadas tanto para a detecção de drogas ilícitas, como para monitoramento de medicamentos e controle de uso de substâncias proibidas (doping). A maioria das substâncias é excretada principalmente pela via renal, tornando a urina um excelente reflexo do padrão de consumo de todos os tipos de substâncias⁷⁰. Entretanto, para a análise toxicológica em urina, o conhecimento das vias de metabolismo e os produtos de biotransformação são essenciais, uma vez que a concentração da droga inalterada é baixa, devendo a detecção ser focada nos principais produtos de biotransformação¹³. A concentração de uma substância na urina está muito relacionada, além da dose consumida, com fatores fisiológicos, como fluxo sanguíneo e *clearance* de cada droga. Sua janela de detecção costuma ser de alguns dias para a maioria das substâncias, podendo chegar a algumas semanas para casos de uso frequente de *cannabis*¹³, ou seja, a urina pode não refletir um uso recente da substância, mas sim de alguns dias anteriores à coleta da amostra.

Uma das principais desvantagens da utilização desta matriz é a alta possibilidade de adulteração. Como a coleta pode ser constrangedora, precisando ser realizada em um banheiro ou local reservado, muitas vezes não é supervisionada, podendo o doador misturar água, produtos químicos ou até mesmo urina artificial, na tentativa de omitir o uso de qualquer substância não permitida^{13,67,71}.

As análises toxicológicas em cabelo tiveram seu início nas décadas de 1960 e 70, no âmbito da toxicologia ocupacional, com a determinação de metais pesados⁷². Nos últimos anos, a discussão da utilização de cabelo como matriz biológica para detecção de drogas de abuso tem aumentado, com a implementação de novas e modernas técnicas de análise⁷³. É uma matriz de larga janela de detecção que possibilita a verificação do uso retrógrado de substâncias, a depender do comprimento do fio. O cabelo tem uma média de crescimento de 1 cm por mês, portanto uma análise de segmentos dos fios coletados pode delinear um padrão de consumo de substâncias¹³.

O mecanismo de incorporação de substâncias ao cabelo ainda não está totalmente claro, mas aparentemente são incorporadas durante o crescimento dos fios, por meio do sangue, sebo ou suor nos bulbos capilares, podendo ainda ser incorporadas por contaminação externa^{13,72}. Entretanto, esta incorporação é lenta e a substância não será detectada nessa amostra em casos de consumo recente ou esporádico. Outro ponto é a diferença nos tipos capilares; dependendo da etnia do indivíduo, podem ocorrer diferenças na concentração de substâncias conforme a concentração de melanina⁷². Além disso, procedimentos estéticos e cosméticos podem influenciar negativamente a concentração de drogas no cabelo. Evidências apontam que tingimento, alisamento e realização de procedimentos estéticos podem causar uma diminuição de 50 a 80% na concentração de substâncias na matriz⁷². Além disso, para evitar que a contaminação externa prejudique a análise são necessários diversos processos para descontaminação da matriz, elevando o custo e tempo necessário para análise^{13,67}. Atualmente, o cabelo é utilizado no Brasil para realização de exames toxicológicos para a obtenção e renovação de Carteira Nacional de Habilitação (CNH) nas categorias C, D e E (Lei nº 13.103/2015). Foi implementada com a justificativa de impedir que usuários de drogas ilícitas obtivessem a CNH, diminuindo, desta maneira o número de acidentes de trânsito causados pelo uso de substâncias psicoativas. Entretanto, não há comprovação científica que o uso desta matriz desta maneira possa diminuir a accidentalidade no trânsito⁷⁴. Além disso, essa matriz identifica uso passado da substância, não havendo, desta maneira, qualquer relação entre um resultado positivo e efeitos farmacológicos ativos.

O fluido oral ocupou, nas últimas décadas, lugar de destaque como uma das mais promissoras matrizes biológicas para a detecção de drogas de abuso em diversos contextos. A coleta desta matriz é fácil, rápida, não invasiva, podendo ser realizada com supervisão sem constrangimento¹³. A coleta é realizada com dispositivos absorventes inseridos na boca do doador. Existem diversos coletores, sendo os mais apropriados os que não apresentam estimulantes de salivação e aqueles que contém tampão próprio de conservação e estabilização da amostra após a coleta. A estimulação da salivação pode acarretar um aumento do pH bucal, alterando a cinética de migração das substâncias através das glândulas salivares, aumentando ou diminuindo sua concentração no fluido oral⁶⁹.

As glândulas salivares são bastante perfundidas, o que facilita a migração das substâncias do sangue para o fluido oral apresentando janela de detecção similar ao sangue⁷⁵. Apesar disso, estabelecer uma correta correlação entre as concentrações de substâncias entre fluido oral e sangue torna-se um desafio. Devido ao pH mais baixo do fluido oral, este tende a acumular uma maior quantidade de substâncias alcalinas, enquanto substâncias ácidas tendem a reterem-se mais no sangue^{76,77}. Mais ainda, algumas drogas podem ficar impregnadas na cavidade bucal, aumentando a concentração dessas no fluido oral, como é o caso daquelas consumidas via nasal ou fumadas⁷⁸.

O fluido oral hoje vem sendo utilizado na verificação do uso de substâncias psicoativas por motoristas. Existem diversos dispositivos imunocromatográficos para a testagem rápida de drogas em fluido oral, sendo utilizados em abordagens policiais nas vias. Entretanto, vários desses dispositivos ainda apresentam baixa sensibilidade e especificidade para algumas classes de substâncias, devendo uma segunda amostra de fluido oral, ou uma amostra sanguínea ser coletada para confirmação dos resultados positivos^{79,80}.

Apesar do número crescente de estudos envolvendo outras matrizes, o sangue ainda é a matriz de escolha para quantificação de analitos, uma vez que é uma das únicas matrizes em que os níveis de xenobióticos encontrados e os efeitos psicofarmacológicos podem ser correlacionados¹³. Em situações em que se deseja a verificação da influência dessas substâncias no momento da coleta,

como a direção sob influência de substâncias psicoativas, ou a verificação da influência de drogas em acidentes, o sangue deve ser coletado e analisado¹³. Durante a coleta alguns detalhes devem ser observados para que a análise não seja prejudicada. Deve-se sempre que possível coletar o sangue utilizando conservantes para prevenir a degradação dos analitos e uma possível produção endógena de etanol por bactérias. O conservante mais utilizado é o fluoreto de sódio que age inibindo a ação de algumas enzimas que poderiam degradar alguns analitos como a cocaína⁸¹.

Em casos *postmortem*, a coleta de sangue deve ser realizada adequadamente. O sangue cardíaco é o mais fácil de ser coletado no momento da necrópsia. Entretanto, devido ao fenômeno denominado redistribuição *postmortem* a concentração sanguínea pode sofrer alterações. Após o óbito, os analitos existentes em outros órgãos ao entorno da câmara cardíaca podem, por difusão, migrar para o coração, aumentando a concentração da substância neste órgão. A amostra mais recomendada para a coleta é o sangue periférico, coletado da veia femoral. Por outro lado, é matrix de difícil obtenção, devido à dificuldade no acesso à veia e aos pequenos volumes disponíveis⁸¹. Além de todas as dificuldades, a coleta sanguínea necessita de flebotomistas treinados e experientes.

Na realização de em estudos epidemiológicos a taxa de recusa em fornecimento de sangue é grande, tornando um viés metodológico importante¹³. Apesar de todas as dificuldades e empecilhos, o sangue é uma matriz valiosa e deve ser coletada sempre que possível em casos de investigações e pesquisa no âmbito da toxicologia forense.

No Quadro 1 estão resumidas e comparadas algumas características das principais matrizes utilizadas na detecção do uso de drogas ilícitas.

Quadro 1. Características das principais matrizes biológicas utilizadas na determinação de substâncias psicoativas.

	Urina	Cabelo	Fluido oral	Sangue
Janela de detecção	3 – 4 dias	3 – 6 meses	1 – 2 dias	1 – 2 dias
Coleta invasiva	Sim	Sim	Não	Sim
Possibilidade de adulteração	Alta	Média	Baixa	Não
Contaminação externa	Não	Sim	Não	Não
Possibilidade de resultado negativo após uso da substância	Baixa	Alta	Baixa	Baixa
Custo da análise	Médio	Alto	Médio	Médio
Taxa de recusa na doação de amostra	Média	Alta	Baixa	Alta

Apesar da utilização das matrizes clássicas como urina, sangue, fluido oral e cabelo serem inquestionáveis, nos últimos anos surgiram as chamadas matrizes alternativas como opção para análises toxicológicas⁸². Apesar de serem matrizes biológicas pouco utilizadas, muitas vezes têm grande importância em alguns casos. São elas: humor vítreo, mecônio, suor, ossos, leite materno, cordão umbilical, placenta entre outras. O objetivo no estudo dessas matrizes são vários, desde verificação do uso de drogas ilícitas por gestantes (mecônio, cordão umbilical e placenta), até mesmo em casos *postmortem* em que o sangue, e outros fluidos estão ausentes ou contaminados.

Assim sendo, apresentamos a seguir métodos de extração de algumas classes de analitos, utilizando o sangue como matriz biológica, afim de preencher a lacuna existente na literatura científica.

4. Materiais e métodos

4.1 Materiais

4.1.1 Equipamentos

- Cromatógrafo gasoso, modelo GC 2010, equipado com coluna capilar HP – 5MS (Hewlett Packard) com as seguintes dimensões: 30 m x 0,25 mm x 0,10 μ m, acoplado a espectrômetro de massas quadrupolo modelo QP 2010 ambos da Shimadzu®, Japão.
- Agitador magnético com aquecimento multiestações da marca IKA™, modelo RT 10 Power;
- Agitador magnético 752 A – Fisatom, São Paulo, Brasil;
- Centrífuga modelo BE – 2300 – Bio Eng, Brasil;
- Concentrador TE-019 – Tecnal, Brasil;
- Agitador de tubos tipo vórtex modelo 251 – Fanem, São Paulo, Brasil;
- Bloco de aquecimento Reacti-Therm – Pierce, Rockford, IL, EUA.

4.1.2 Reagentes e outros materiais

- Fibras ocas de microextração em fase líquida (*hollow-fiber*) de polipropileno, com 600 μ m diâmetro interno, 200 μ m de espessura de parede e 0,20 μ m tamanho do poro, adquirido da 3M, (Wuppertal, Alemanha);
- Fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) 100 μ m, adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA);
- Reagentes (solventes, sais) foram obtidos da Merck® (Darmstadt, Alemanha);
- Gases especiais para cromatografia foram obtidos da Messer Gases, Brasil;

- Vidrarias especiais e outros itens para as análises cromatográficas foram adquiridos de empresas especializadas existentes no mercado brasileiro;
- Os seguintes padrões de referência foram obtidos da Cerilliant Corporation (Round Rock, Texas, EUA), em metanol ou acetonitrila na concentração de 1 mg/mL (exceto cocaetileno-d3, adquirido na concentração de 100 µg/mL):
 - Cocaína
 - Cocaína-d3
 - Cocaetileno
 - Cocaetileno-d3
 - Anidro ecgonina metil éster (AEME)
 - Benzoilecgonina
 - Benzoilecgonina-d3
 - Anfetamina
 - Anfetamina-d5
 - Metanfetamina
 - Metanfetamina-d5
 - 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA)
 - MDMA-d5
 - 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA)
 - MDA-d5
 - 3,4-metilenodioxietilanfetamina (MDEA)
 - MDEA-d5
 - Δ 9-tetraidrocanabinol (THC)
 - Δ 9-THC-d3
 - 11-hidroxi- Δ 9-Tetraidrocanabinol (THC-OH)
 - THC-OH-d3
 - 11-nor-9-carboxil- Δ 9-tetraidrocanabinol (THC-COOH)
 - THC-COOH-d3
 - Femproporex

Todos os padrões foram diluídos em metanol ou acetonitrila em soluções de trabalho nas concentrações de 100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL e 0,1 µg/mL

4.1.3 Amostras de sangue negativas

A Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, cedeu ao Laboratório de Toxicologia do Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho da Faculdade de Medicina USP duas bolsas de sangue total. A essas amostras foram adicionadas concentrações conhecidas e desejadas dos analitos para avaliação de cada parâmetro durante a otimização e validação dos métodos de extração propostos.

4.2 Métodos

4.2.1 Otimização dos métodos de LPME para extração de compostos anfetamínicos e cocaína e derivados

Os métodos de extração de composto anfetamínicos e de cocaína e derivados foram realizados utilizando-se a técnica de microextração em fase líquida (LPME) trifásica com auxílio de fibra oca. Foram otimizados, variando-se os seguintes parâmetros: tempo de agitação (25, 30, 35, 40) min, solvente orgânico utilizado para submersão da fibra oca (diexil éter, dodecano e nonanol), fase doadora (NaOH e água destilada) e fase aceptora no lúmen da fibra (HCl e ácido fórmico) em diferentes concentrações (0,05, 0,1 e 0,3 mol/L). O efeito *salting-out* também foi avaliado adicionando 200 mg de $\text{NaHCO}_3/\text{K}_2\text{CO}_3$ (2:1) à fase doadora. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

Após os experimentos de otimização chegou-se à seguinte condição ótima para extração dos compostos anfetamínicos: em um vial de vidro de 4 mL adicionar 0,5 mL de sangue total, contendo 50 ng/mL de padrões internos (anfetamina-d5, metanfetamina-d5, MDA-d5, MDMA-d5 e MDEA-d5), adicionar 2,5 mL de NaOH 0,1 mol/L e submergir a fibra oca (9 cm) em diexil éter por 10 segundos retirando o excesso com auxílio de papel absorvente. Inserir 50 μL de HCl 0,1 mol/L no lúmen da fibra e inseri-la em forma de “U” ao vial de vidro. Agitação com auxílio de barra magnética por 30 min a 1.500 rpm a 45 °C, decorrido o tempo, retirar a fase aceptora do lúmen da fibra, evaporar sob fluxo

de N₂ a 40 °C e re-suspender em 25 µL de acetato de etila e adicionar 25 µL de anidro trifluoro acético (TFAA) para derivatização por 15 min a 70 °C em bloco de aquecimento. Realizar evaporação novamente e re-suspensão com 50 µL de acetato de etila e injetar 2 µL no GC-MS (Figura 3)

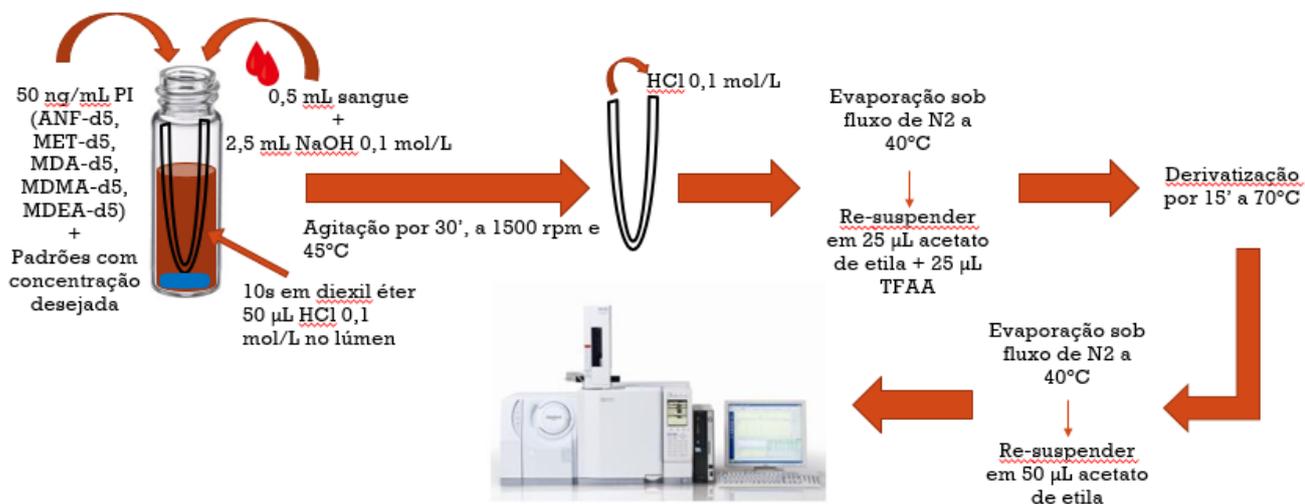


Figura 3. Esquema do procedimento de extração de compostos anfetamínicos de amostra de sangue total pela técnica de microextração em fase líquida (LPME).

No Quadro 2 estão apresentados os íons pesquisados (relação massa/carga – m/z) e o tempo de retenção de cada analito. Estão sublinhados os íons utilizados para quantificação de cada analito.

Quadro 2. Íons (m/z) e tempo de retenção (minutos) de cada analito analisado. Os íons quantificadores de cada analitos estão apresentados sublinhados.

Analito	Íons (m/z)	Tempo de retenção (min)
Anfetamina	<u>140</u> , 118, 91	6,31
Anfetamina-d5	<u>144</u> , 123, 96	6,29
Metanfetamina	<u>154</u> , 118, 110	7,06
Metanfetamina-d5	<u>158</u> , 120, 113	7,04
MDA	<u>275</u> , 135, 162	8,50
MDA-d5	<u>280</u> , 167, 136	8,48
Femproporex	<u>193</u> , 140, 118	9,15
MDMA	<u>162</u> , 154, 110	9,32
MDMA-d5	<u>164</u> , 136, 113	9,29
MDEA	<u>168</u> , 140, 303	9,65
MDEA-d5	<u>173</u> , 141, 308	9,62

Para o método de extração de cocaína e derivados foram obtidas as seguintes condições ótimas de extração:

A um frasco de vidro de 4 mL contendo 200 mg de NaHCO₃/K₂CO₃ (2:1) foi adicionado 0,5 mL de sangue fortificado com 50 ng/mL de uma solução de padrão interno contendo cocaína-d3 e cocaetileno-d3. Em seguida foi adicionado 2,5 mL de NaOH 0,1 mol/L. A fibra oca (9 cm) foi submersa em dodecano por 10 segundos e em seguida colocada em um papel absorvente para retirada do excesso de solvente. Ao lúmen da fibra foi adicionado 50 µL de HCl 0,1 mol/L e a fibra foi adicionada em forma de “U” dentro do vial que então foi deixado em agitação com auxílio de uma barra magnética por 35 min a 45°C a 1.500 rpm. Após decorrido esse tempo a fibra foi retirada do vial e o HCl retirado e adicionado a um frasco de fundo cônico para evaporação sob fluxo de N₂ a 40°C. Após completa secagem, o resíduo foi re-suspendido em 50 µL de acetato de etila e, então, injetados 2 µL no GC-MS.

No Quadro 3 estão apresentados os íons pesquisados (relação massa/carga – m/z) e o tempo de retenção de cada analito. Sublinhado estão apresentados os íons quantificadores.

Quadro 3. Íons (m/z) e tempo de retenção (minutos) de cada analito analisado. Os íons quantificadores de cada analitos estão apresentados sublinhados.

Analito	Íons (m/z)	Tempo de retenção (min)
AEME	<u>152</u> , 166, 181	5,94
Cocaína	<u>182</u> , 272, 303	11,90
Cocaína-d3	<u>185</u> , 275, 306	11,89
Cocaetileno	<u>196</u> , 272, 317	12,26
Cocaetileno-d3	<u>199</u> , 275, 320	12,25

4.2.2 Otimização do método de SPME para extração de $\Delta 9$ -tetraidrocanabionol

Para a extração de $\Delta 9$ -THC de sangue total foi utilizada a técnica de microextração em fase sólida (SPME). Para se chegar à melhor condição de extração foram avaliados os seguintes parâmetros: tempo de agitação (10, 15, 20 e 25 min), fase doadora (NaOH – 0,01; 0,05; 0,1 e 0,3 mol/L), solvente utilizado para precipitação de proteínas anteriormente realizado à SPME (metanol [MeOH], acetonitrila [ACN], ACN:MeOH [2:1] e ACN:MeOH [85:15]) e efeito *salting-out* pela adição de 200 mg de NaHCO₃/K₂CO₃ (2:1) à fase doadora. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

Após os experimentos de otimização chegou-se às seguintes condições de extração:

Em um tubo de ensaio de vidro de 5 mL foram adicionados 300 μ L de sangue total fortificado com 50 ng/mL de $\Delta 9$ -THC-d3 e 0,5 mL de acetonitrila gelada (-20°C) para precipitação das proteínas. O tubo foi então agitado com auxílio de vórtex por 20 segundos e centrifugado por 10 min a 3.000 rpm. O sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta do tipo pasteur e adicionado a um vial de vidro de 4 mL, contendo 200 mg de NaHCO₃/K₂CO₃ (2:1) e uma barra magnética. Foram então, adicionados 1,5 mL de NaOH 0,1 mol/L. O suporte da fibra de PDMS foi então preso acima do frasco e a fibra exposta à solução por 20 min à 50°C durante agitação magnética (Figura 4). Após

decorrido o tempo de agitação, a fibra de PDMS foi inserida manualmente na porta de injeção do GC e deixada durante todo o tempo de separação cromatográfica para adsorção total dos analitos. Para qualificação e quantificação (sublinhados) dos analitos foram utilizados os seguintes íons (m/z): THC: 299, 231 e 314; THC-D3: 302, 234 e 317, cujos tempos de retenção são respectivamente 7,8 min e 7,78 min.

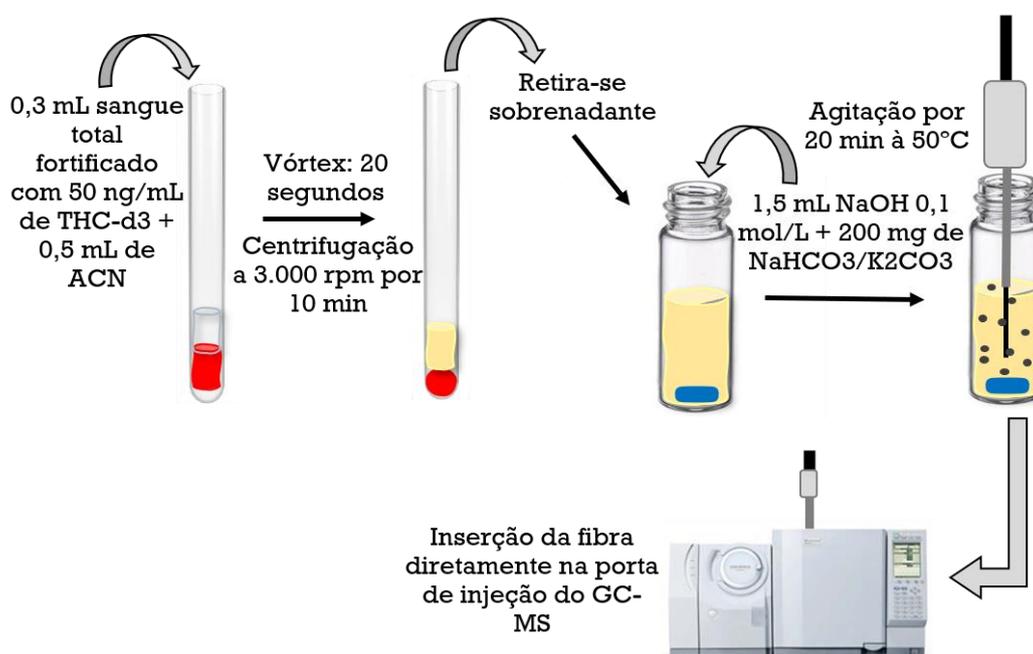


Figura 4. Esquema do procedimento de extração de Δ^9 -tetraidrocanabinol de amostras de sangue total pela técnica de microextração em fase sólida (SPME).

4.2.3 Condições cromatográficas

4.2.3.1 Método de LPME para compostos anfetamínicos

Para a análise dos compostos anfetamínicos as seguintes condições cromatográficas foram estabelecidas. A temperatura do injetor foi mantida em 220°C. A temperatura do forno e a rampa de aquecimento está demonstrada no Quadro 4. O gás de arraste utilizado foi o hélio num fluxo de 0,6 mL/min. A temperatura da interface entre o cromatógrafo gasoso e o espectrômetro de massas foi mantida em 250°C e a da fonte de íons em 260°C. Após detecção dos analitos e verificado o tempo de retenção de cada substância pelo modo SCAN, o detector foi operado por ionização eletrônica em 70eV no método SIM.

Quadro 4. Condições de elevação e controle de temperatura no cromatógrafo gasoso para o método de detecção de compostos anfetamínicos.

Taxa de aumento da temperatura (°C/min)	Temperatura final (°C)	Permanência em minutos na temperatura final
	80	2
20	200	5
25	275	1
Tempo total de separação cromatográfica: 17 min		

4.2.3.2 Método de LPME para cocaína e derivados

Para a análise da cocaína e compostos derivados, foram estabelecidas as seguintes condições cromatográficas. A temperatura do injetor foi mantida em 250°C. A temperatura do forno e a rampa de aquecimento está demonstrada no Quadro 5. O gás de arraste utilizado foi o hélio num fluxo de 0,6 mL/min. A temperatura da interface entre o cromatógrafo gasoso e o espectrômetro de massas foi mantida em 280°C e a da fonte de íons em 260°C. O detector foi operado por ionização eletrônica em 70 eV no método SIM.

Quadro 5. Condições de elevação e controle de temperatura no cromatógrafo gasoso para o método de detecção de cocaína e compostos derivados.

Taxa de aumento da temperatura (°C/min)	Temperatura final (°C)	Permanência em minutos na temperatura final
	90	1
15	250	2
25	280	2
Tempo total de separação cromatográfica: 16,87 min		

4.2.3.3 Método de SPME para $\Delta 9$ -tetraidrocanabinol

Para a análise de THC, foram estabelecidas as seguintes condições cromatográficas. A temperatura do injetor foi mantida em 220°C. A temperatura do forno e a rampa de aquecimento está demonstrada no Quadro 6. O gás de arraste utilizado foi o hélio num fluxo de 0,8 mL/min. A temperatura da interface entre o cromatógrafo gasoso e o espectrômetro de massas foi mantida em 250°C e a da fonte de íons em 260°C. O detector foi operado por ionização eletrônica em 70 eV no método SIM.

Quadro 6. Condições de elevação e controle de temperatura no cromatógrafo gasoso para o método de detecção de $\Delta 9$ -tetraidrocanabinol.

Taxa de aumento da temperatura (°C/min)	Temperatura final (°C)	Permanência em minutos na temperatura final
	150	1
20	290	5
20	300	1
Tempo total de separação cromatográfica: 14,5 min		

4.2.4 Validação dos métodos de LPME e SPME

Os métodos de extração foram validados seguindo recomendação de manuais internacionais de validação de métodos^{83,84} sendo estabelecidos valores de limite de detecção, limite de quantificação, seletividade, precisão, exatidão, linearidade, recuperação, *carryover* e integridade da diluição.

4.2.4.1 Limite de detecção e quantificação

Limite de detecção (LOD) é definido como a menor concentração que pode ser diferenciada, de forma confiável, da linha de base do aparelho após análise de uma amostra branca (sem adição de qualquer padrão). Limite de quantificação (LOQ) é definido como a menor concentração que pode ser quantificada, de forma confiável, mantendo-se valores aceitáveis de precisão e exatidão⁸⁴.

Inicialmente foi determinado o limite do branco (LOB)⁸⁵, através de uma série de injeções de amostras sem adição de qualquer padrão. Foram analisadas 20 replicatas, de duas fontes diferentes de sangue total (10 replicatas de cada fonte), para se estimar a linha de base de detecção do aparelho.

Após a determinação do LOB, o limite de detecção foi estimado realizando uma série de injeções com concentrações decrescentes (15; 10; 7; 5; 4; 3, 2 e 1 ng/mL). Quatro replicatas de cada concentração foram analisadas e aquela que apresentou um sinal três vezes maior que o LOB foi considerado LOD.

Para a determinação do limite de quantificação foi realizado o mesmo procedimento do LOD. A menor concentração que apresentou um coeficiente de variação menor que 10% foi definido como o LOQ.

4.2.4.2 Seletividade

O estudo de seletividade garante que não haja qualquer interferente, endógeno ou exógeno, capaz de comprometer a correta detecção e quantificação do analito alvo durante a análise. Para a verificação de componentes endógenos interferentes, foram analisadas dez amostras de sangue total, de fontes diferentes.

A verificação de interferentes exógenos foi realizada, adicionando-se drogas de abuso e medicamentos (benzodiazepínicos e antidepressivos tricíclicos) a amostras brancas de sangue total.

4.2.4.3 Precisão intra e interdias

Os estudos de precisão foram realizados analisando uma série de amostras de sangue total adicionadas com padrões dos analitos de interesse de cada método. Foram utilizados três controles de qualidade com concentrações baixas, médias e altas dos analitos (Quadro 7). As análises foram realizadas em três dias consecutivos e em seis replicatas para cada controle. Foi determinada a precisão intradia e interdia, determinando-se indiretamente a imprecisão do método pelo cálculo do coeficiente de variação (CV), sendo o valor máximo aceitável $\pm 10\%$.

As fórmulas utilizadas nos cálculos foram:

$$\text{Precisão intradias} = \left(\frac{(\sqrt{\text{Média dentro dos grupos}})}{\text{Média geral}} \right) \times 100$$

$$\text{Precisão interdias} = \left(\frac{\frac{\sqrt{\text{Média entre grupos} + (n - 1) \times \text{Média dentro dos grupos}}}{n}}{\text{Média geral}} \right) \times 100$$

4.2.4.4 Exatidão

Exatidão é definido como a concordância entre a média de resultados encontrados experimentalmente e o valor real de uma amostra. Foi determinada analisando-se os controles CQB, CQM e CQA em seis replicatas, sendo que o valor máximo aceitável é $\pm 20\%$.

A fórmula utilizada nos cálculos foi:

$$\text{Inexatidão (\%)} = \left(\frac{\text{concentração obtida} - \text{concentração real}}{\text{concentração real}} \right) \times 100$$

4.2.4.5 Linearidade e heteroscedasticidade

O estudo da linearidade foi realizado analisando uma faixa de trabalho com concentrações conhecidas de cada analito (Quadro 7). Cada concentração foi analisada em seis replicatas. Uma curva de calibração foi montada e o coeficiente de determinação (r^2) calculado. A heteroscedasticidade da curva de calibração foi analisada a partir do teste- f^{86} .

4.2.4.6 Carryover

Este parâmetro refere-se à contaminação de uma amostra com resquícios de analitos de uma amostra anteriormente analisada. A verificação da existência de *carryover* foi verificada pela análise de uma amostra branca logo após análise de uma amostra com alta concentração dos analitos de interesse. Nenhuma concentração acima do LOD pode ser verificada na amostra branca.

Foi determinado analisando-se amostras com concentrações acima do limite superior da faixa de trabalho e logo em seguida, uma amostra branca. No Quadro 7 estão demonstradas as concentrações utilizadas para cada analito. A análise foi realizada em triplicata.

Quadro 7. Controles de qualidade, faixa de trabalho utilizada na avaliação da linearidade e concentrações utilizadas na avaliação do carryover para cada método desenvolvido. Concentrações estão expressas em ng/mL.

	CQB, CQM e CQA	Linearidade	Carryover
Estimulantes anfetamínicos	30, 180 e 390	5, 50, 150, 250, 350 e 500	600
Cocaína e derivados	100, 400 e 650	5, 150, 300, 450, 600 e 750	900
THC	15, 90 e 125	5, 25, 50, 75, 100 e 150	300

CQB: controle de qualidade baixo
CQM: controle de qualidade médio
CQA: controle de qualidade alto

4.2.4.7 Recuperação

A recuperação mede o quanto do analito o método é capaz de detectar após o procedimento de extração. A análise é realizada medindo-se a concentração do analito sendo adicionado antes e após a extração. A um vial “A” adiciona-se apenas padrão interno, sendo adicionado o analito ao final da extração anteriormente à injeção no equipamento. A outro vial “B” adiciona-se padrão interno juntamente com o analito e a recuperação é calculada pela razão entre a concentração encontrada entre B e A, sendo que a variação máxima aceitável é $\pm 20\%$ ⁸⁴.

Para o caso do método de SPME, uma vez que não é possível obter um extrato seco após o procedimento, este parâmetro foi avaliado apenas levando em consideração a recuperação do analito após a precipitação de proteínas. Para tanto, foram avaliadas duas diferentes amostras sanguíneas, uma fortificada com THC anteriormente à precipitação de proteínas pela ACN (A) e à outra foi adicionado o analito ao sobrenadante obtido após a fase de precipitação das proteínas (B). A recuperação foi então calculada pela razão entre A e B. Todas as análises foram realizadas utilizando os três controles de qualidade e em triplicata.

4.2.4.8 Integridade da diluição

A integridade da diluição deve ser verificada toda vez que a amostra precisar ser diluída por apresentar concentrações dos analitos superiores àqueles referentes ao limite superior da faixa de trabalho ou quando apresentar volume insuficiente para análise. Com o estudo deste parâmetro é possível assegurar que a precisão e a exatidão do método não são afetadas com a diluição da amostra.

As análises foram realizadas, para cada método, repetindo os estudos de precisão e exatidão com amostras diluídas utilizando sangue sem adição de qualquer concentração dos analitos em questão (sangue branco). Cada fator de diluição foi analisado em cinco replicatas e em três dias consecutivos. As

diluições e as concentrações iniciais para cada métodos estão apresentadas no Quadro 8.

Quadro 8. Fatores de diluição e concentração inicial de cada analito, anterior à diluição, utilizados durante os ensaios de integridade da diluição para cada um dos métodos desenvolvidos.

Analitos	Fatores de diluição	Concentração inicial (ng/mL)
Compostos anfetamínicos	1:2, 1:5, 1:10	800
Cocaína e derivados	1:2, 1:5, 1:10	1000
Δ^9 -THC	1:5, 1:10, 1:20	600

4.2.5 Aplicação dos princípios da química analítica verde

Após o desenvolvimento e otimização dos métodos, foi verificado se atendiam aos princípios preconizados pela Química Analítica Verde. Para isso foi utilizado um *software* desenvolvido por Pena-Pereira et al. (2020), chamado *Analytical GREENness calculator (AGREE)*⁸⁷. Com este *software* cada um dos doze princípios é pontuado de 0 a 1, sendo 1 o mais próximo do ideal e de acordo com os princípios.

4.2.6 Aplicação dos métodos em amostras reais

Todos os três métodos, após devidamente validados, foram aplicados em amostras reais de sangue total. Foram obtidos sangue de indivíduos suspeitos de terem feito uso de cocaína, anfetaminas e/ou maconha. Todas as análises foram realizadas em duplicatas.

Para o método de LPME para a detecção de compostos anfetamínicos, foram doadas alíquotas de amostras de casos suspeitos de ingestão de ecstasy, pelo Núcleo de Toxicologia Forense da Superintendência da Polícia Técnico Científica do Estado de São Paulo. Para a aplicação dos outros dois métodos,

foram utilizadas amostras de sangue de pacientes internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, vítimas de acidentes com lesões traumáticas. As coletas de amostras de sangue fizeram parte do projeto intitulado “Fatores relacionados com os acidentes de trânsito com vítimas atendidas no Pronto Socorro Central e que ficaram internadas no Hospital das Clínicas da FMUSP”.

A utilização das amostras dos pacientes do referido projeto, no presente estudo, foi aprovada pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina sob parecer número 1.967.799 (Anexo A).

5. Resultados e discussão

5.1 Otimização dos métodos de LPME e SPME

O princípio da técnica de HF-LPME trifásica, aqui proposta, é extração de um analito de uma fase doadora aquosa através de um solvente orgânico imobilizado nos poros da fibra oca, até uma fase aceptora inserida no lúmen desta fibra. Esta configuração garante um extrato límpido pela separação física entre as fases doadora e aceptora, mesmo sendo utilizada em matrizes complexas, como é o caso do sangue total. Além disso, os volumes de solvente orgânico imobilizado nos poros da fibra não passam da ordem de poucos microlitros⁸⁸, diminuindo o contato do analista com produtos que poderiam causar riscos à saúde, além de reduzir os resíduos químicos a serem descartados ao final da extração.

Um dos pontos críticos para uma extração bem-sucedida com a aplicação da LPME é a escolha do solvente orgânico utilizado como membrana líquida suportada. Estes podem ser os mais variados, entretanto necessitam apresentar algumas características específicas. Precisam ser verificadas características como volatilidade, densidade, constante de partição octanol/água (LogP), viscosidade e tensão de superfície. Além disso, como nas metodologias aqui propostas, a fase doadora consiste em uma solução aquosa, se faz necessário a imiscibilidade entre o solvente imobilizado nos poros da fibra oca e a água, para que não haja extravasamento para a matriz. Por fim, a eficiência do solvente dependerá das forças de interação entre o solvente e analitos⁸⁹. Respeitando estas obrigatoriedades, foram testados diferentes solventes orgânicos para cada um dos métodos de HF-LPME. Para o método de extração dos compostos anfetamínicos o diétil éter apresentou melhores resultados. Por outro lado, para o método de extração de cocaína e derivados o dodecano apresentou uma resposta superior. Ambos os solventes apresentam características similares de viscosidade, LogP e volatilidade, sendo a escolha de cada um deles sendo feita principalmente pela área absoluta do pico que cada analito apresentou após a extração.

Em trabalhos prévios utilizando a técnica de HF-LPME para a extração de compostos anfetamínicos de amostras de urina⁹⁰ e cabelo⁹¹, o diexil éter também foi utilizado como solvente orgânico. Este solvente orgânico apresenta coeficiente de partição octanol/água (LogP) de 4,7, superior ao dos compostos anfetamínicos extraídos por este método (variam de 1,6 a 2,5), garantindo uma boa transferência dos analitos da fase doadora para a fase aceptora. De maneira similar, a AEME, cocaína e cocaetileno também possuem coeficientes de partição octanol/água de 1,1, 2,3 e 2,7, respectivamente, inferiores ao coeficiente do dodecano (LogP = 6,1). Entretanto, em metodologias previamente publicadas para a extração de cocaína e derivados em amostras de leite materno e cabelo, foram utilizados octanol⁹² e diexil éter⁹³, respectivamente, como membrana líquida suportada na HF-LPME.

Para uma extração bem-sucedida, os analitos de interesse devem permanecer em seu estado molecular, ou seja, não apresentar ionização. Para isto, a fase doadora deve estar alcalina para analitos de caráter básico. Na LPME é recomendável que o pH da fase doadora esteja três unidades acima do pKa dos analitos (em casos de analitos básicos) ou 3 unidades abaixo do pKa em casos de analitos com caráter ácido⁶². Os compostos anfetamínicos, aqui analisados, são moléculas com caráter básico apresentando valores de pKa variando de 9,6 a 10,1. Portanto, foram adicionados 2,5 mL de hidróxido de sódio 0,1 mol/L para ajuste do pH entre 12 e 13. Da mesma maneira, a cocaína, cocaetileno e AEME também possuem caráter alcalino, sendo o NaOH também adicionado na fase doadora para a extração destes analitos, mantendo o pH da fase doadora entre 10 e 11. Desta maneira, garante-se um meio no qual as moléculas não se ionizam, possibilitando sua migração para o solvente orgânico e posteriormente para a fase aceptora. Além de ajustar o pH, o NaOH também auxiliou na diminuição da viscosidade do sangue total, possibilitando uma melhor agitação pela barra magnética.

Além do efeito do pH, alguns outros fatores podem influenciar em uma migração mais eficiente dos analitos entre as fases do sistema de extração. Um desses fatores é o efeito *salting-out*. Esta técnica consiste na adição de compostos, normalmente sais inorgânicos, à fase doadora com o intuito de

aumentar-se a força iônica, diminuindo, desta forma, a solubilidade do analito na fase aquosa e facilitando sua migração para a fase orgânica¹⁸. Como consequência das alterações do *salting-out*, pode-se observar melhora na recuperação dos analitos e aumento da sensibilidade da técnica. Portanto, foi verificada se a adição de 200 mg de NaHCO₃/K₂CO₃ (2:1) ao vial, juntamente com a fase doadora, aumentaria a eficiência da extração em ambos os métodos de LPME aqui descritos. No caso do método para a extração dos compostos anfetamínicos não foi observada nenhuma melhora significativa na extração dos analitos, optando-se, portanto, pela não adição do sal. Já no caso do método para a extração de cocaína e derivados, houve um aumento considerado na recuperação dos analitos e eficiência da técnica, sendo, portanto, o sal adicionado na fase doadora do sistema.

A principal diferença entre a LPME de duas e três fases é a possibilidade de aprisionamento dos analitos no interior da fibra oca na configuração trifásica. Neste modelo utiliza-se uma solução com pH contrário ao dos analitos para que, ao entrar em contato com um meio ácido (no caso dos analitos básico) ionize-se, impossibilitando, desta forma, uma nova difusão para fora da fibra. Este sistema foi avaliado com a utilização de dois ácidos diferentes em ambos os métodos: ácido clorídrico e fórmico, em diferentes concentrações. Apesar de já existirem métodos publicados com a utilização de ácido fórmico como fase acceptora em sistemas de HF-LPME trifásico⁹⁴, este é um ácido relativamente com menor força do que o HCl, portanto com menor potencial de ionização. A utilização do ácido fórmico não apresentou resultados satisfatórios, sendo seu uso descartado, focando-se na avaliação da concentração do HCl. Em ambos os métodos, o HCl na concentração de 0,1 mol/L apresentou recuperações superiores dos analitos.

A LPME é uma extração considerada não exaustiva, ou seja, não extrai completamente os analitos da matriz analisada, mas sim, baseia-se no equilíbrio das concentrações entre as fases doadora e acceptora. Assim sendo, quando o equilíbrio é atingido a difusão dos analitos entre as fases é interrompida. A avaliação do tempo necessário para que o equilíbrio seja atingido é essencial para uma ótima extração, para evitar dispêndio desnecessário de tempo, por

outro lado, extrações com tempo reduzido poderiam causar uma detecção subestimada dos analitos. Além do tempo de agitação, também foi avaliado se o aquecimento da amostra durante a extração influenciaria de maneira positiva nas extrações. Em ambos os métodos foi verificado que o aquecimento a 50°C auxiliava na obtenção de melhores respostas. Em temperaturas mais elevadas as moléculas tendem a ter maior movimentação, auxiliando em sua migração através dos poros da fibra. Como observado nas Figuras 5 e 6 os equilíbrios foram atingidos após 35 e 30 min de agitação para os compostos anfetamínicos e cocaína e derivados, respectivamente.

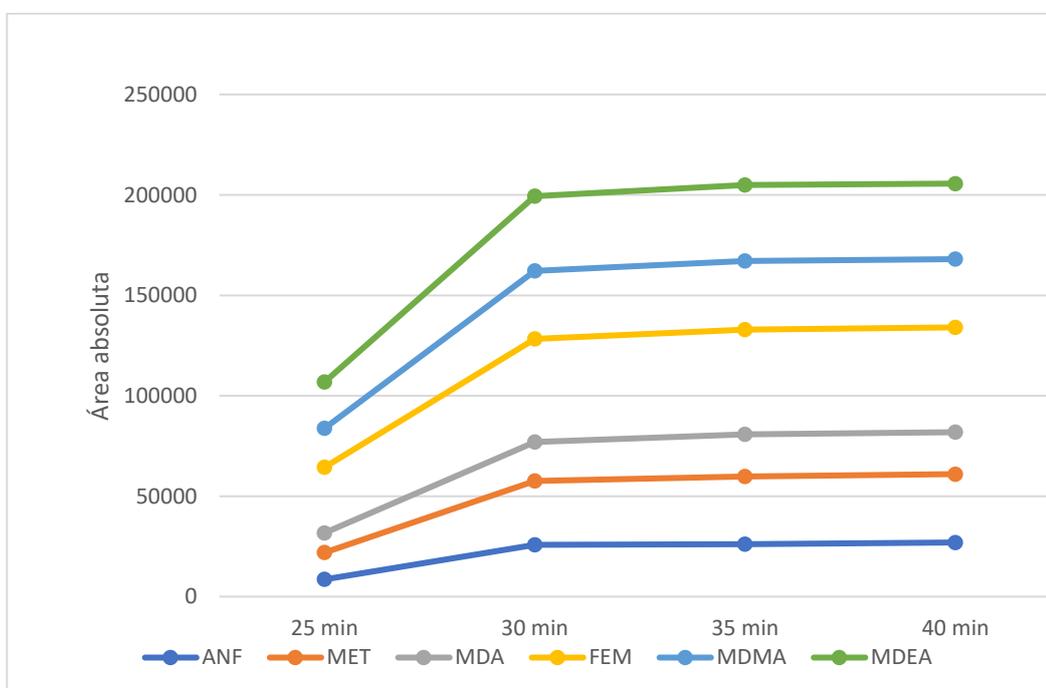


Figura 5. Efeito do tempo de agitação magnética do sistema sobre a extração de compostos anfetamínicos de amostras de sangue total utilizando a técnica de microextração em fase líquida (LPME). ANF: anfetamina, MET: metanfetamina, MDA: 3,4-metilenodioxianfetamina, FEM: Femproporex, MDMA: 3,4-metilenodioximetanfetamina, MDEA: 3,4-Metilenodioxietilanfetamina.

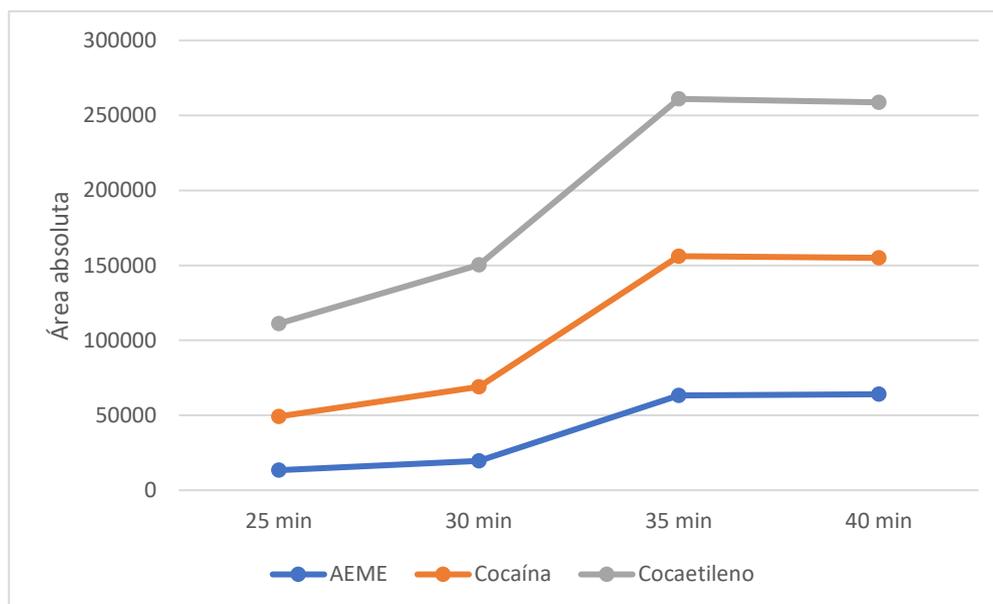


Figura 6. Efeito do tempo de agitação magnética do sistema sobre a extração de anidro ecgonina metil éster (AEME), cocaína e cocaetileno de amostras de sangue total utilizando a técnica de microextração em fase líquida (LPME).

O sangue total é uma matriz complexa, com uma viscosidade relativamente maior em comparação a outras matrizes aquosas, fazendo com que a agitação do sistema seja comprometida, aumentando o tempo necessário para que o equilíbrio entre as fases seja atingido⁹⁵. Alguns métodos, também utilizando HF-LPME para a extração de compostos anfetamínicos de amostras de cabelo e urina apresentaram tempos superiores de agitação: 60 e 45 min, respectivamente^{90,91}. Existe na literatura, relato de extração de compostos anfetamínicos de amostras de sangue total com apenas 15 min de agitação. Entretanto, os autores relataram que o equilíbrio entre as fases não foi atingido após decorrido esse tempo⁹⁶. Para a extração de cocaína e derivados de amostras de leite materno também foram relatados tempos similares aos aqui apresentados, 30 min⁹². Entretanto, o tempo de agitação de 10 min foi apresentado por Pego et al. (2017), para a extração de cocaína de amostras de cabelo⁹³. O tempo necessário para o equilíbrio entre as fases pode ser reduzido com aumento da superfície de contato entre a fibra oca e a fase doadora do sistema⁹⁵. A utilização de duas fibras ocas em cada extração pode ter auxiliado

para uma redução no tempo necessário para que o equilíbrio fosse atingido, diminuindo, desta maneira, o tempo total da extração.

Os cromatogramas obtidos após a extração de compostos anfetamínicos e cocaína e derivados utilizando a técnica de HF-LPME, otimizadas para cada extração, estão apresentados nas Figuras 7 e 8, respectivamente.

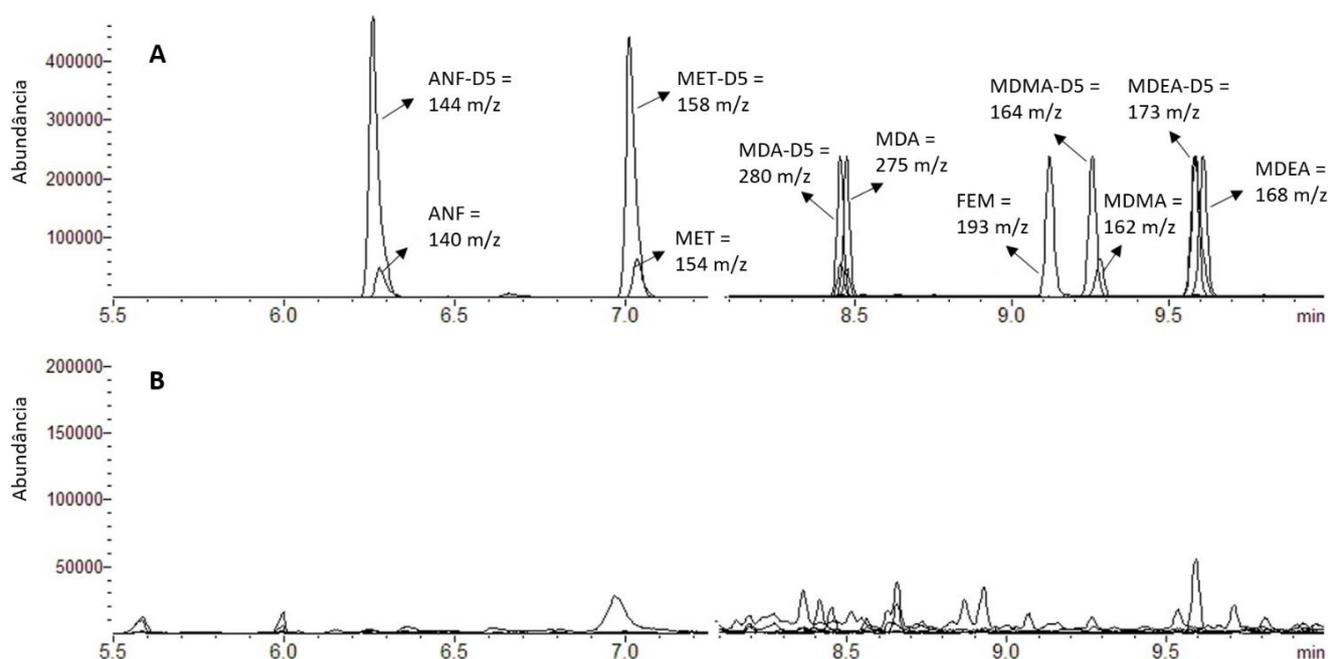


Figura 7. Cromatograma obtido após microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME) e detecção por GC-MS de compostos anfetamínicos em amostras de sangue total. **A:** Amostra fortificada com analitos nas concentrações referentes ao Limite de Quantificação e padrões internos (50 ng/mL), **B:** Amostra branca, sem adição de analitos e padrões internos. Cada composto está identificado com o respectivo íon quantificador (m/z). ANF: anfetamina, MET: metanfetamina, MDA: 3,4-metilenodioxianfetamina, FEM: femproporex, MDMA: 3,4-metilenodioximetanfetamina, MDEA: 3,4-metilenodioxietilanfetamina.

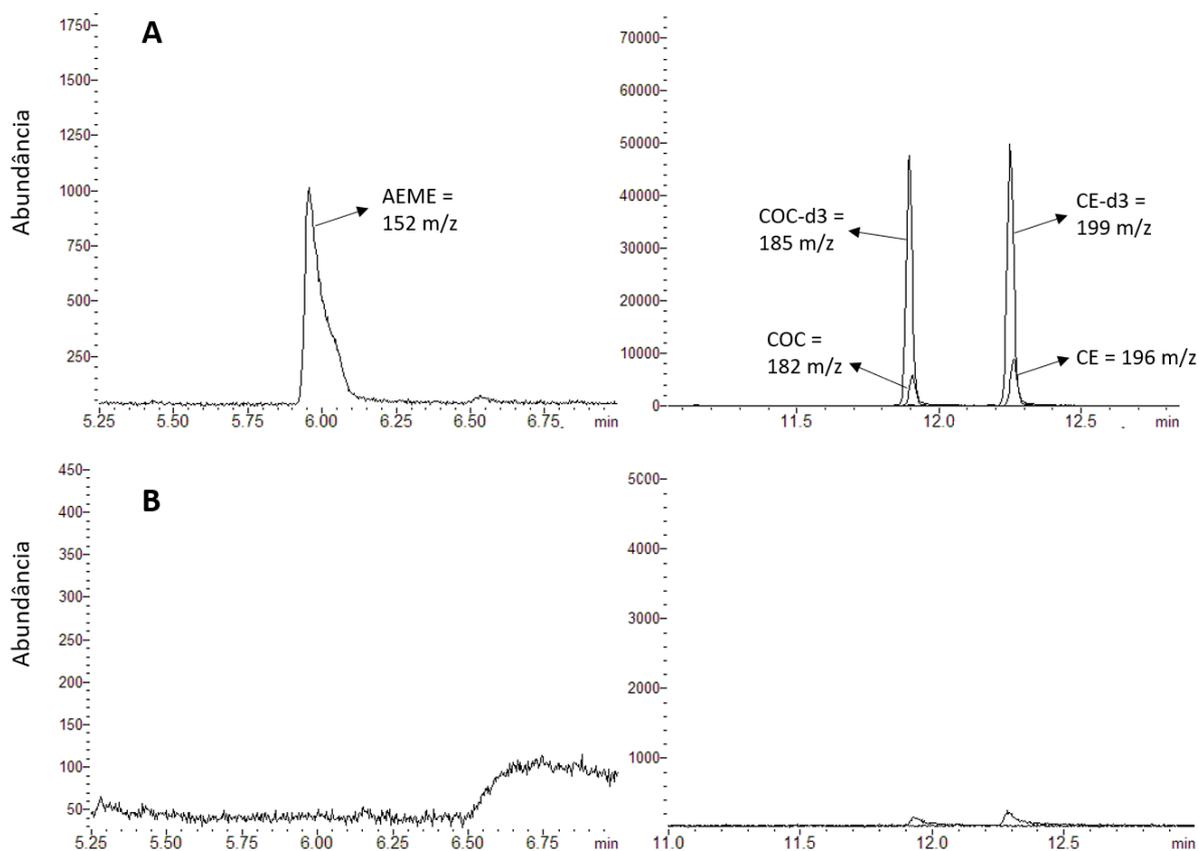


Figura 8. Cromatograma obtido após microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME) e detecção por GC-MS de anidro ecgonina metil éster (AEME), cocaína (COC) e cocaetileno (CE) em amostras de sangue total. **A:** Amostra fortificada com analitos nas concentrações referentes ao Limite de Quantificação e padrões internos (50 ng/mL), **B:** Amostra branca, sem adição de analitos e padrões internos. Cada composto está identificado com o respectivo íon quantificador (m/z).

A benzoilecgonina (BZE) é o principal produto de biotransformação da cocaína, sendo esta convertida em BZE minutos após o consumo através de enzimas hepáticas e hidrólise espontânea⁹⁷. Portanto, a detecção da BZE torna-se importante para casos cujo objetivo é a verificação do consumo da cocaína. Inicialmente, a detecção da BZE foi proposta conjuntamente com os outros analitos. Entretanto, com a técnica de LPME desenvolvida não foi possível a extração deste composto. A BZE é um composto anfótero, ou seja, possui dois valores de constante de ionização em sua molécula, tornando-a ionizável tanto em meio básico, como em meio ácido². Devido a esta característica, há certa dificuldade na extração deste analito utilizando extrações líquidas. Por outro

lado, existem na literatura métodos publicados utilizando tanto a LLE como a HF-LPME para a extração de BZE. Pego et al. (2017), utilizaram a técnica de LPME para a extração de BZE e outros analitos de amostras de cabelo. Os autores realizaram a digestão das amostras sólidas, obtendo um extrato seco, o qual foi ressuspendido e derivatizado com butilcloroformato anteriormente à LPME⁹³. Já Takitane et al. (2018), utilizaram a técnica de LLE para a extração de diversos compostos de amostras de sangue *post-mortem* com posterior detecção por UPLC-MS/MS. A extração da BZE foi atingida, entretanto com baixa recuperação (40%)⁹⁸. No presente estudo, tentou-se reproduzir as condições apresentadas por Pego et al. (2017). Como tentativa de obtenção de um extrato seco e derivatização anterior à LPME, foi realizada a precipitação de proteínas do sangue total e o sobrenadante obtido foi evaporado com fluxo de N₂. Foram testadas duas reações de derivatização: com butilcloroformato e com BSTFA. Em ambas, não foi possível a obtenção de sinais cromatográficos referentes à BZE.

A técnica de HF-LPME mostrou-se ineficaz para a extração de canabinoides em configuração similar àquela utilizada nos métodos previamente descritos. Como se trata de uma técnica em que os analitos migram de uma fase para outra através de difusão passiva, um alto coeficiente de partição entre a amostra e a fase aceptora é necessário para o êxito da extração⁸⁸. O THC apresenta um coeficiente de partição octanol/água de 7,6, ou seja, superior aos coeficientes dos principais solventes orgânicos utilizados na técnica de LPME, como diétil éter (logP = 4,7), dodecano (logP = 6,1) e nonanol (logP = 4,3). Estas características físico-químicas podem ter comprometido a migração eficiente do THC através do solvente e finalmente para a fase aceptora. Alguns autores relatam a utilização da HF-LPME de duas fases como satisfatória para a extração de compostos com maior lipofilicidade, como o caso do THC⁸⁸. Uma das vantagens da HF-LPME bifásica é a possibilidade de injeção direta da fase aceptora no equipamento utilizado para detecção (cromatógrafos). Entretanto, para que isso seja possível, a fase aceptora deve ser compatível com a coluna cromatográfica e em caso de cromatografia líquida, solúvel na fase móvel utilizada⁹⁹. Emídio et al. (2010), relataram a extração de THC, CBD e CBN de

amostras de cabelo utilizando a técnica bifásica da LPME com posterior detecção por GC-MS/MS. Os autores utilizaram acetato de butila como membrana líquida suportada nos poros da fibra, e fase aceptora¹⁰⁰. No presente trabalho também foram realizados alguns testes envolvendo a configuração bifásica da LPME, utilizando não somente os solventes clássicos para a LPME (dodecano, diexil éter, nonanol, octanol), mas também o acetato de butila e acetato de etila. Em todos os casos foram testados, tanto a injeção direta da fase aceptora no GC-MS, como optou-se pela evaporação do solvente e ressuspensão como forma de evitar algum dano à coluna cromatográfica. Entretanto, o tempo dispendido para a evaporação tornou a extração inviável, tanto do ponto de vista econômico como para o tempo total da extração. Por outro lado, alguns solventes, como o acetato de etila e acetato de butila, apresentam alta volatilidade, sendo inviável sua utilização na técnica de HF-LPME. A injeção direta no cromatógrafo tanto do diexil éter, como do dodecano apresentaram sinais referentes ao tempo de retenção do THC, como evidenciado na Figura 9. Entretanto, tanto o baixo sinal obtido após a corrida cromatográfica, como a preocupação com a degradação dos consumíveis do cromatógrafo⁹, resultou na exclusão da LPME bifásica como opção para a extração de THC de amostras sanguíneas.

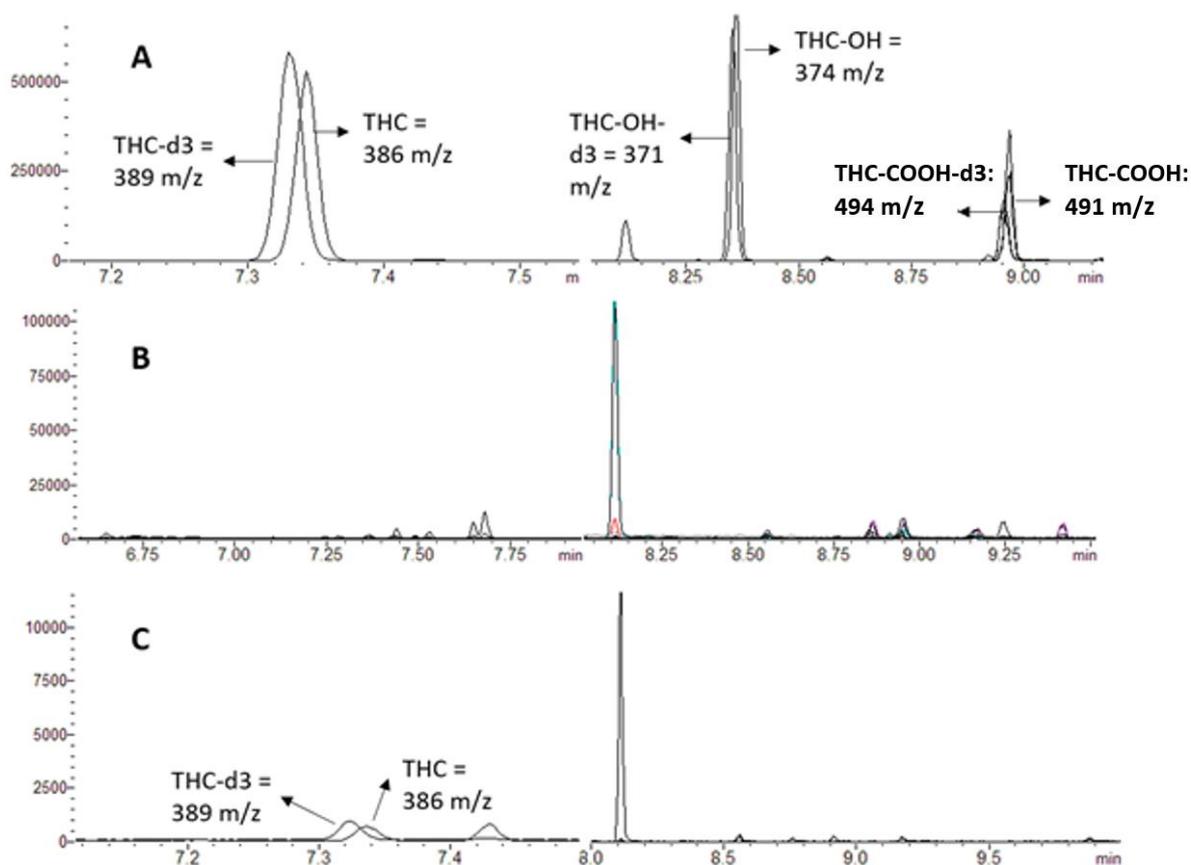


Figura 9. Cromatograma obtido após microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME) e detecção por GC-MS de Δ 9-tetraidrocanabionol (THC), 11-hidroxi- Δ 9-tetraidrocanabionol (THC-OH) e ácido 11-nor-9-carboxil- Δ 9-tetraidrocanabionol (THC-COOH) em amostras de sangue total. **A**: Injeção direta de 50 ng/mL de padrões certificados de THC, THC-OH e THC-COOH após derivatização com BSTFA; **B**: Amostra de sangue total após extração com a técnica de HF-LPME trifásica; **C**: Amostra de sangue total após extração com HF-LPME bifásica. Cada composto está identificado com o fragmento utilizado para sua identificação (m/z).

Visando a manutenção do objetivo original do trabalho: realizar o desenvolvimento de métodos utilizando os princípios da química analítica verde, encontrou-se como alternativa a microextração em fase sólida para a extração de canabinoides. A SPME, tem como vantagem sobre a LPME a possibilidade da completa eliminação de solventes orgânicos durante a extração¹⁰¹. Entretanto, as fibras usualmente utilizadas são frágeis, havendo a possibilidade de ruptura durante a extração¹⁰². A fim de contornar este problema, buscou-se precipitar as proteínas das amostras de sangue previamente à realização da SPME. Com esta técnica foi possível obter um extrato límpido, ausente de

partículas, presentes no sangue total. Para a precipitação das proteínas realizou-se testes com acetonitrila e metanol e com misturas dos dois solventes, para verificação da condição ideal. A acetonitrila gelada apresentou o sobrenadante mais límpido e melhores sinais cromatográficos. A precipitação de proteínas é uma técnica rápida e de baixo custo. O extrato obtido pode, muitas vezes, ser analisado diretamente sem a necessidade de etapas subsequentes¹⁸. Entretanto, o extrato obtido com esta técnica é mais complexo e com maior quantidade de interferentes do que o obtido com a LLE ou SPE, por exemplo¹⁰³. Desta maneira, optou-se pela subsequente realização da SPME a fim de obter melhores resultados cromatográficos.

Assim como a LPME, a SPME também é uma técnica não exaustiva. Durante o procedimento de extração o equilíbrio da concentração dos analitos entre a fase doadora e a fibra também é atingido. Entretanto, o tempo para que essa condição seja atingida é relativamente menor em comparação à microextração líquida, uma vez que não há necessidade de difusão do analito para um solvente orgânico e posteriormente para a fase aceptora. A adsorção dos analitos na fibra ocorre mais facilmente, especialmente se a afinidade entre analitos e o polímero recoberto a fibra for alta. Desta forma, no presente método de extração de THC de amostras de sangue total, o equilíbrio foi atingido após 20 min de agitação do sistema. A influência do aquecimento durante processo de agitação e o efeito *salting-out* também foram analisados para a SPME. Observou-se que a ausência de adição de sal na fase doadora inviabilizaria totalmente a extração, sendo imprescindível sua adição para o sucesso da SPME. Da mesma maneira, o aquecimento do sistema durante a agitação resultou em uma significativa melhora na resposta obtida após decorrido o tempo de agitação. Na Figura 10 está demonstrado o efeito da temperatura e tempo de agitação sobre a extração do THC. Aplicando-se o método desenvolvido e otimizado nas amostras de sangue fortificadas com THC, conforme descrito, foi obtido o cromatograma apresentado na Figura 11.

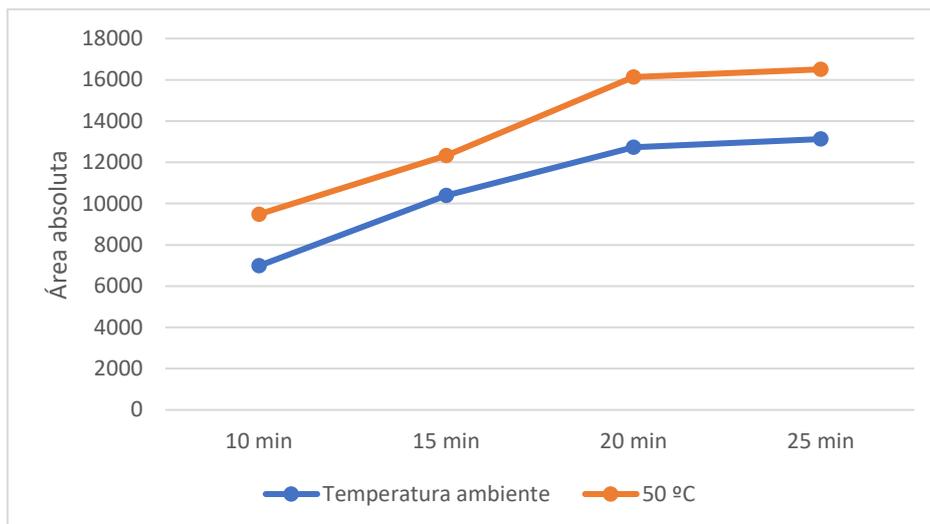


Figura 10. Efeito da temperatura e tempo de agitação do sistema sobre a extração de Δ^9 -tetraidrocannabinol de amostras de sangue total utilizando a técnica de microextração em fase sólida (SPME).

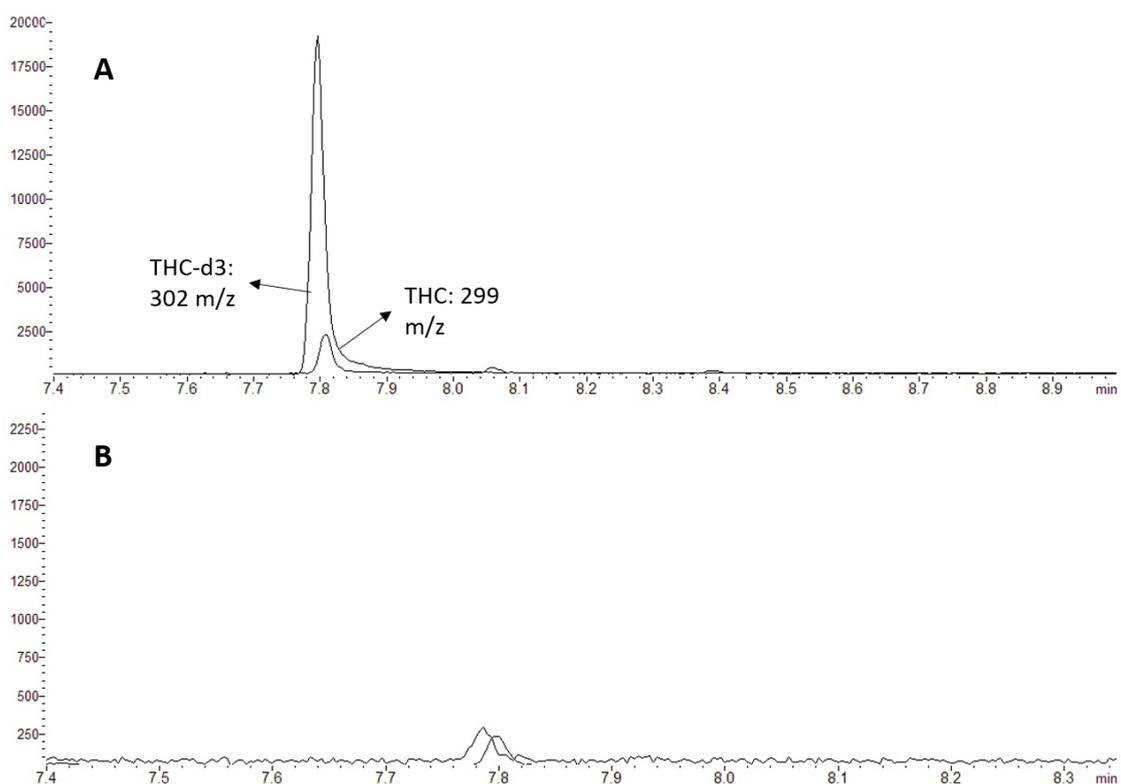


Figura 11. Cromatograma obtido após microextração em fase sólida (SPME) e detecção por GC-MS de Δ^9 -tetraidrocannabinol em amostras de sangue total. **A:** Amostra fortificada com o analito na concentração referente ao Limite de Quantificação. **B:** Amostra branca, sem adição de analitos e padrões internos. Cada composto está identificado com o respectivo íon quantificador (m/z).

5.2 Avaliação da aplicação dos princípios da Química Analítica Verde

A Química Analítica Verde, apresentada por Gałuskas et al. (2013), se baseia em doze princípios para a otimização de métodos analíticos, visando a redução do consumo de energia, tempo, recursos e resíduos²³. Após seu surgimento, diversos métodos analíticos foram desenvolvidos seguindo os ideais preconizados. Entretanto, diversas são as possibilidades de enquadramento de uma metodologia nos parâmetros de segurança ambiental e laboratorial, sendo muitas vezes difícil sua mensuração. Existem atualmente algumas formas de mensuração de quão “verde” é um método, sendo um desses métodos, desenvolvido por Pena-Pereira et al. (2020)⁸⁷. O software AGREE pontua as metodologias de acordo com cada um dos princípios da Química Analítica Verde, onde quanto mais próximo de 1, “mais verde” é a metodologia. O *software* pontua doze características do método, sendo cada característica correspondente a um dos doze princípios da Química Analítica Verde.

Todos os três métodos, desenvolvidos no presente trabalho, foram submetidos ao software para verificação da aplicabilidade dos princípios da química analítica verde. Os resultados estão apresentados na Figura 12.

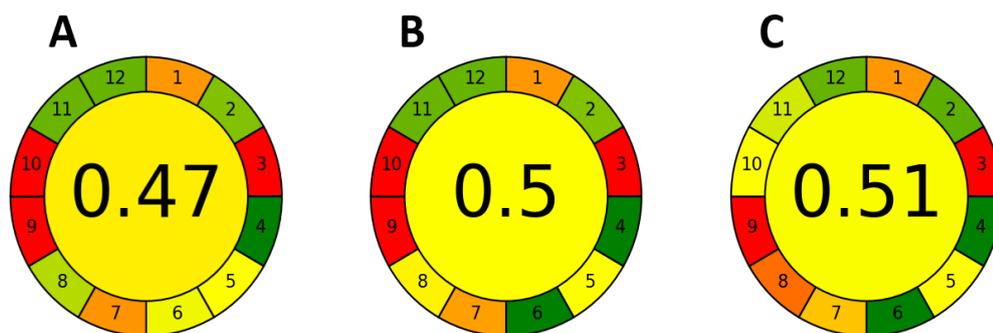


Figura 12. Verificação do enquadramento dos métodos de microextração em fase líquida para a detecção de compostos anfetamínicos (A), cocaína e derivados (B) e microextração em fase sólida para a detecção de THC (C), utilizando o software AGREE (Pena-Pereira et al. 2020).

Todos os três métodos apresentaram-se como medianos em relação aos princípios adotados pela química verde. Este fato pode ter sido muito influenciado por limitações metodológicas e dos equipamentos utilizados. Tanto na LPME quanto na SPME todas as etapas da extração foram realizadas manualmente e sem acoplamento do sistema de extração ao equipamento de detecção. Já foram descritos métodos automatizados tanto de microextrações em fase líquida⁹⁹ como em fase sólida²⁸. Além disso, atualmente existe a possibilidade de realização de SPME *in vivo*¹⁰⁴, sem a necessidade de coleta de amostras biológicas, o que se enquadraria ainda mais nos princípios analíticos verdes pela eliminação da etapa de coleta e armazenamento de amostras.

A HF-LPME para a extração de compostos anfetamínicos recebeu o menor valor dentre os três, muito provavelmente pela necessidade de realização de uma reação de derivatização dos analitos, sem a qual a separação por cromatografia gasosa não seria possível devido à instabilidade térmica dos analitos. Os reagentes utilizados em reações de derivatização são em sua maioria tóxicos, cancerígenos e corrosivos, devendo sua utilização ser evitada sempre que possível^{23,24}.

A técnica de SPME apresentou o maior valor dentre os três métodos devido ao reduzido número de etapas realizadas durante a extração. Entretanto, a extração de apenas um analito e o longo tempo decorrido para análise de uma única amostra diminuiu drasticamente o valor recebido por esta técnica.

Apesar de todas as limitações, tanto a LPME como a SPME ainda se apresentam como técnicas verdes pelo reduzido volume de solventes e reagentes tóxicos utilizados e baixas quantidades de resíduos resultantes para serem descartados. Com a automatização das técnicas e utilização de equipamentos de análise mais modernos, muito provavelmente ambas as técnicas se enquadrariam de maneira mais satisfatória dentro dos princípios da Química Analítica Verde.

5.3 Validação dos métodos de extração por LPME e SPME

5.3.1 Limite de detecção e quantificação

Após a determinação do LOB, as menores concentrações que mantiveram valores aceitáveis de precisão e exatidão foram definidas como LOD e LOQ para cada analito, como ilustrado no Quadro 9 para compostos anfetamínicos e no Quadro 10 para cocaína e derivados

Quadro 9. Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) estabelecidos para o método de microextração em fase líquida (LPME) para determinação de compostos anfetamínicos em amostras de sangue total.

	LOD	LOQ
	(ng/mL)	(ng/mL)
Anfetamina	3	4
Metanfetamina	3	4
MDA^a	3	5
Femproporex	2	3
MDMA^b	1	2
MDEA^c	1	2

^a 3,4-metilenodioxianfetamina;
metilenodioxietilamfetamina

^b 3,4-metilenodioximetanfetamina;

^c 3,4-

Quadro 10. Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) estabelecidos para o método de microextração em fase líquida (LPME) para determinação de anidro ecgonina metil éster, cocaína e cocaetileno em amostras de sangue total.

	LOD	LOQ
	(ng/mL)	(ng/mL)
AEME^a	4	5
Cocaína	3	4
Cocaetileno	3	4

^a: anidro ecgonina metil éster

Para o método de SPME para a detecção de THC, o LOD e LOQ foram determinados, respectivamente, em 3 e 4 ng/mL. Apesar de serem valores baixos, não estão de acordo com os limites de *cutoff* mais utilizados internacionalmente. Este fato se dá pela limitação do equipamento utilizado para análise e não pela técnica de extração em si. Apesar de o GC-MS ser amplamente utilizado em análises toxicológicas, não possui a mesma sensibilidade que equipamentos mais modernos, como é o caso do cromatógrafo líquido acoplado à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) ou o cromatógrafo líquido de ultra eficiência (UHPLC). Entretanto, de maneira similar, Yonamine et al. (2003), aplicando a técnica de SPME a amostras de fluido oral, com posterior detecção por GC-MS, apresentou valores de 5 e 3 ng/mL para LOD e LOQ, respectivamente⁴³.

5.3.2 Seletividade

Após a aplicação do método de HF-LPME para os compostos anfetamínicos e cocaína e derivados e o método de SPME para THC a amostras brancas de sangue, não foram identificados quaisquer picos de interferentes no tempo de retenção relacionado aos analitos específicos. Portanto, a interferência de substâncias endógenas foi descartada. Drogas de abuso e medicamentos

adicionados a amostras de sangue total também não apresentaram quaisquer interferências, caracterizada pela ausência de qualquer sinal nos tempos de referência de cada analito de cada método específico. Desta maneira, garantiu-se a seletividade e especificidade de cada método para cada analito alvo.

5.3.3 Linearidade e heteroscedasticidade

Ambos os métodos de HF-LPME se apresentaram lineares nas faixas de concentrações estudadas. Foram realizados testes de homoscedasticidade e para aqueles analitos que apresentaram heteroscedasticidade foi aplicado um fator de correção para ajuste da linearidade. Os resultados obtidos de inclinação e intercepto das curvas, bem como coeficientes de determinação, com seus respectivos desvios padrões, estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, para o método de determinação de compostos anfetamínicos e cocaína e derivados, respectivamente. Todos os coeficientes de determinação apresentaram-se iguais ou acima de 0,99, com exceção da AEME, fato que pode ter sido ocasionado pela impossibilidade de utilização de padrão interno específico para a AEME.

Tabela 1. Média e desvio padrão (DP) para a inclinação, intercepto e coeficiente de determinação obtidos das curvas de calibração dos analitos durante os testes de linearidade. Fatores de ponderação utilizados para aqueles analitos que apresentaram heteroscedasticidade. Resultados obtidos durante a validação do método de microextração em fase líquida (LPME) para determinação de estimulantes anfetamínicos em amostras de sangue total.

	Inclinação (DP)	Intercepto (DP)	Coeficiente de determinação (r ²) (DP)	Fator de ponderação
Anfetamina	0,0188 (± 0,000817)	0,1232 (± 0,1212)	0,995 (± 0,0036)	$\frac{1}{x^2}$
Metanfetamina	0,0202 (± 0,00041)	0,0289 (± 0,1004)	0,996 (± 0,002)	1/y ²
MDA^a	0,0229 (± 0,00075)	0,1025 (± 0,0588)	0,994 (± 0,0043)	1/x ²
Femproporex	0,0373 (± 0,00048)	3,5422 (± 0,1672)	0,990 (± 0,00142)	Homoscedástico
MDMA^b	0,0309 (± 0,00077)	0,4558 (± 0,1298)	0,997 (± 0,00208)	1/y ²
MDEA^c	0,0208 (± 0,00025)	0,1626 (± 0,0668)	0,995 (± 0,003)	1/y

a: 3,4-metilenodioxianfetamina;
metilenodioxietilamfetamina

b: 3,4-metilenodioximetanfetamina;

c: 3,4-

Tabela 2. Média e desvio padrão (DP) para a inclinação, intercepto e coeficiente de determinação obtidos das curvas de calibração dos analitos durante os testes de linearidade. Fatores de ponderação utilizados para aqueles analitos que apresentaram heteroscedasticidade. Resultados obtidos durante a validação do método de microextração em fase líquida (LPME) para determinação de anidroecgonina metil éster, cocaína e cocaetileno em amostras de sangue total.

	Inclinação (DP)	Intercepto (DP)	Coeficiente	
			de determinação (r ²) (DP)	Fator de ponderação
AEME^a	0,22874 (± 0,0127)	0,27366 (± 0,0225)	0,9518 (± 0,0203)	1/x
Cocaína	0,31256 (± 0,0063)	0,21892 (± 0,0179)	0,9943 (± 0,0013)	1/x ²
Cocaetileno	0,43966 (± 0,0100)	0,3067 (± 0,0293)	0,9933 (± 0,0022)	1/x ²

^a: anidro ecgonina metil éster

O método de SPME para a detecção de THC também se apresentou linear na faixa de concentração estudada. O THC apresentou heteroscedasticidade, sendo utilizado o fator $1/y^2$ para correção da linearidade. A média da inclinação e intercepto da reta obtida, bem como o coeficiente de determinação estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Média e desvio padrão (DP) para a inclinação, intercepto e coeficiente de determinação obtidos das curvas de calibração do analito durante os testes de linearidade. Fator de ponderação utilizado. Resultados obtidos durante a validação do método de microextração em fase sólida (SPME) para determinação de Δ^9 -tetraidrocanabinol (THC) em amostras de sangue total.

Analito	Inclinação (DP)	Intercepto (DP)	Coeficiente	
			de determinação r ² (DP)	Fator de ponderação
THC	0,0136 (0,0004)	0,009725 (0,0322)	0,9952 (0,003)	1/y ²

5.3.4 Precisão intra e interdias e exatidão

Os valores dos coeficientes de variação obtidos após os experimentos de precisão e exatidão estão apresentados nas Tabelas 4 e 5 para os compostos anfetamínicos e nas Tabelas 6 e 7 para cocaína e derivados. Todos os analitos apresentaram resultados de precisão e exatidão acima dos valores preconizados por manuais de validação de métodos para as três concentrações de controles estudadas.

Tabela 4. Resultados de precisão intra e inter-dia (expresso como coeficiente de variação - %) para controles de qualidade baixo, médio e alto, determinados durante validação do método de LPME para determinação de compostos anfetamínicos em amostras de sangue total.

	Precisão (% CV)					
	Intra-dia			Inter-dia		
	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA
Anfetamina	95,8	95,8	97,2	91,6	93,4	94,7
Metanfetamina	96,2	96,2	95,8	92,4	96,4	95,6
MDA^a	95,4	95,4	97,2	90,8	95,5	96,7
Femproporex	95,6	95,6	94,5	93,5	94,1	92,0
MDMA^b	94,4	94,4	97,1	91,3	93,3	96,7
MDEA^c	95,4	95,4	96,9	90,4	94,6	96,3

^a 3,4-metilenodioxianfetamina;
metilenodioxietilamfetamina

^b 3,4-metilenodioximetanfetamina;

^c 3,4-

Tabela 5. Resultados de exatidão (expresso como porcentagem - %) para controles de qualidade baixo, médio e alto, determinados durante validação do método de LPME para determinação de compostos anfetamínicos em amostras de sangue total.

	Exatidão %		
	CQB	CQM	CQA
Anfetamina	90,1	94,8	90,0
Metanfetamina	90,8	101,6	96,3
MDA^a	102,8	106,8	105,2
Femproporex	100,7	105,6	99,5
MDMA^b	100,3	99,7	98,1
MDEA^c	96,5	103,1	105,2

^a 3,4-metilenodioxianfetamina; ^b 3,4-metilenodioximetanfetamina; ^c 3,4-metilenodioxietilamfetamina

Tabela 6. Resultados de precisão intra e inter-dia (expresso como coeficiente de variação - %) para controles de qualidade baixo, médio e alto, determinados durante validação do método de LPME para determinação de anidro ecgonina metil éster (AEME), cocaína e cocaetileno em amostras de sangue total.

	Precisão (% CV)					
	Intra-dia			Inter-dia		
	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA
AEME^a	86,8	92,7	88,4	86,3	93,2	85,2
Cocaína	90,5	95,9	96,7	90,9	95,6	96,3
Cocaetileno	90,6	95,4	97,4	91,4	91,3	96,8

^a: Anidroecgonina metil éster

Tabela 7. Resultados de exatidão (expresso como percentagem - %) para controles de qualidade baixo, médio e alto, determinados durante validação do método de LPME para determinação de anidro ecgonina metil éster (AEME), cocaína e cocaetileno em amostras de sangue total.

	Exatidão %		
	CQB	CQM	CQA
AEME^a	106,7	97,0	103,4
Cocaína	97,1	110	100,6
Cocaetileno	98,9	99,8	99,1

^a: anidro ecgonina metil éster

Em análises toxicológicas a utilização de um padrão interno para cada analito é recomendado para diminuição de erros e aumento da precisão e exatidão dos métodos. Para o método de compostos anfetamínicos foram utilizados cinco padrões deuterados: anfetamina-d5, metanfetamina-d5, MDA-d5, MDMA-d5 e MDEA-d5. Apenas o femproporex não possui padrão deuterado específico disponível comercialmente, desta maneira foi utilizado a MDMA-d5 para o cálculo dos parâmetros.

Da mesma maneira, para o método de detecção de cocaína e derivados foram utilizados os padrões deuterados cocaína-d3 e cocaetileno-d3. Assim como o femproporex, a AEME não possui padrão específico, sendo, portanto, utilizado a cocaína-d3 para os cálculos referentes à AEME.

Ambos os métodos apresentaram valores de precisão e exatidão acima dos valores preconizados pelo manual de validação de métodos analíticos utilizado neste trabalho. Segundo a *Academy Standards Board*, os valores aceitáveis de precisão e exatidão são de $\pm 10\%$ e $\pm 20\%$, respectivamente⁸⁴. Apenas a AEME apresentou precisão inferior a 90%, muito provavelmente devido à não utilização de padrão interno específico para este analito. Da mesma maneira, Pego et al. (2017) também relatou valores inferiores de precisão e exatidão para a AEME em comparação com os outros analitos detectados⁹³.

Apesar de o femproporex também não ter sido analisado com padrão interno específico este não apresentou resultados inferiores em comparação aos

outros analitos. De maneira semelhante, Pantaleão et al. (2012) também reportou ótimos valores para precisão e exatidão para a extração de estimulantes anfetamínicos de amostras de cabelo⁹¹. Já de Oliveira et al. (2016), em método utilizando a mesma técnica de HF-LPME para a extração de anfetamina e metanfetamina de amostras de urina, reportou valores de precisão inferiores aos aqui adquiridos⁹⁰. Os autores do estudo verificaram grandes perdas na determinação de anfetamina principalmente no estudo envolvendo o controle de qualidade baixo.

O método de SPME para a detecção de THC também se mostrou preciso e exato, conforme demonstrado na Tabela 8.

Tabela 8. Resultados de precisão (intra e inter-dia) e exatidão (expressos como porcentagem - %) para controles de qualidade baixo, médio e alto, determinados durante validação do método de SPME para determinação de Δ^9 -tetraidrocanabinol em amostras de sangue.

Controle	Precisão intra-dia	Precisão inter-dia	Exatidão
CQB	96,1	95,7	86,2
CQM	97,3	102,8	92,7
CQA	94,7	105,3	92,2

5.3.5 *Carryover*

A fibra utilizada na técnica de HF-LPME para os métodos para a determinação de compostos anfetamínicos e cocaína e derivados possui um baixo custo. Desta maneira, as fibras são descartadas após um único uso, o que garante que não haja contaminação de uma amostra subsequente pela utilização dos mesmos materiais. Entretanto, alguns materiais são reutilizados, como a barra magnética para agitação das amostras. Além disso, o *carryover* pode ocorrer dentro do aparelho de GC-MS. Desta maneira, foi verificada a presença deste fenômeno com a injeção de amostras brancas logo após a análise de amostras contendo 600 ng/mL e 900 ng/mL de compostos anfetamínicos e cocaína e derivados, respectivamente. No cromatograma obtido das amostras brancas não foi verificado nenhum pico no tempo de retenção característico dos analitos, desta maneira foi comprovado a não existência de *carryover* em ambos os métodos de HF-LPME.

Já no caso das técnicas de SPME, o *carryover* tem maior probabilidade de ocorrência, uma vez que a fibra de PDMS é reutilizada em várias amostras. Devido ao alto custo da fibra, o descarte após um único uso é inviável. Para evitar o arraste de analitos entre as amostras a fibra foi exposta à porta de injeção do GC-MS durante o tempo total da análise de uma amostra (14 min). A temperatura de 220 °C na porta de injeção do GC-MS e o fluxo de hélio garantiram a completa desorção dos analitos impedindo a contaminação da amostra subsequente. Com isso, também não foi verificado a presença de qualquer concentração do analito em amostras brancas após a extração de amostras contendo 500 ng/mL de THC.

5.3.6 Recuperação

O método de LPME para a determinação de compostos anfetamínicos apresentou, de maneira geral, bons níveis de recuperação para todos os analitos, com exceção ao MDA que apresentou resultados abaixo de 80% de recuperação nos três níveis de controles de qualidade avaliados.

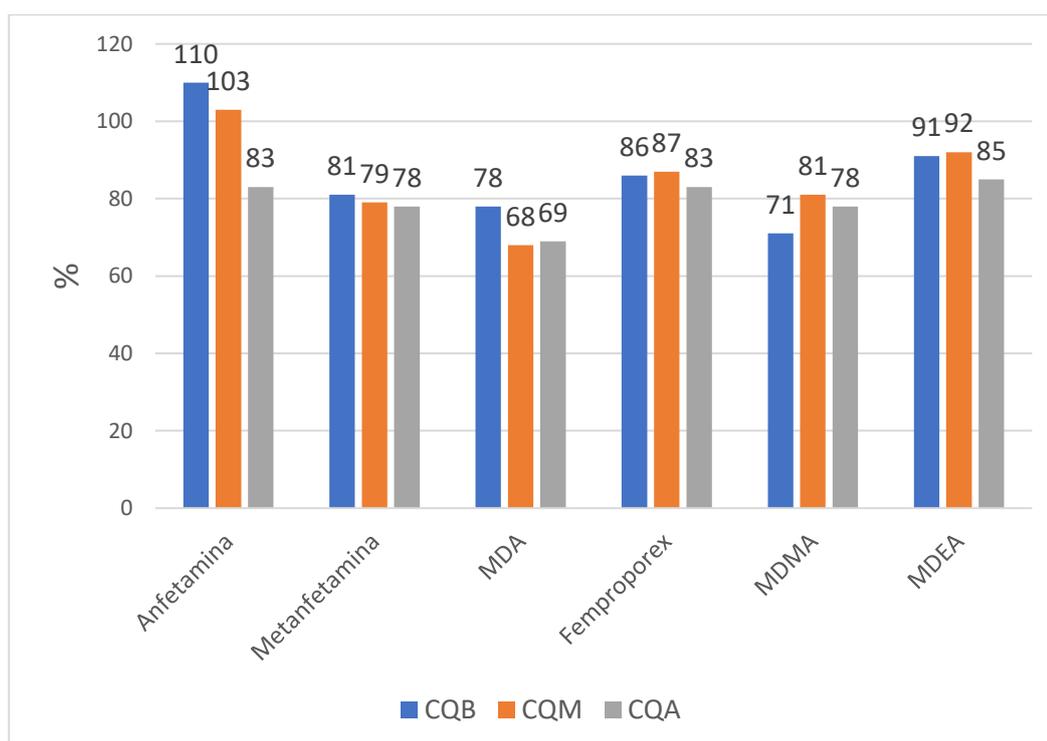


Figura 13. Porcentagem de recuperação para os controles de qualidade baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA), determinado durante a validação do método de microextração em fase líquida (LPME) para determinação de compostos anfetamínicos em amostras de sangue total. MDA: 3,4-metilenodioxianfetamina; MDMA: 3,4-metilenodioximetanfetamina; MDEA: 3,4-metilenodioxietilamfetamina.

O método de LPME para a extração de compostos anfetamínicos, proposto no presente trabalho, apresentou valores satisfatórios de recuperação, sendo superiores a outros estudos utilizando matrizes biológicas diversas. Pantaleão et al. (2012), reportou recuperações de compostos anfetamínicos inferiores a 80%, exceto para a MDMA⁹¹. Ainda, o femproporex foi extraído de amostras de cabelo com uma recuperação inferior a 50%. Da mesma maneira,

de Oliveira et al. (2016), reportou valores de recuperação para anfetamina e metanfetamina variando de 51 a 76% após utilização de HF-LPME em amostras de urina⁹⁰. Gjelstad et al. (2009), reportou que a diluição de amostras de sangue total auxilia no aumento de recuperação dos analitos, portanto a diluição por NaOH pode ter contribuído para os resultados satisfatórios aqui apresentados¹⁰⁵.

De maneira similar, foi possível obter uma ótima recuperação para cocaína e cocaetileno. Entretanto, para a AEME os ensaios de recuperação não apresentaram os mesmos resultados satisfatórios (Figura 14).

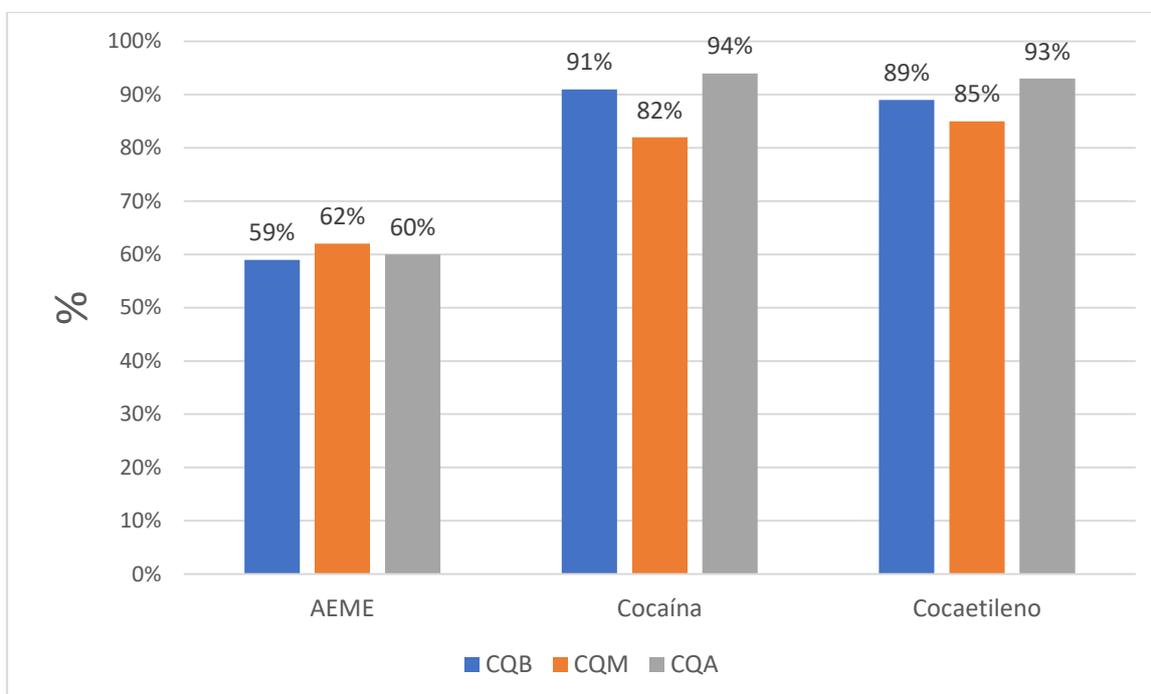


Figura 14. Porcentagem de recuperação para os controles de qualidade baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA), determinado durante a validação do método de microextração em fase líquida (LPME) para determinação de anidro ecgonina metil éster, cocaína e cocaetileno de amostras de sangue total.

A AEME apresenta características físico-químicas que tornam a molécula instável, mesmo na presença de fluoreto de sódio¹⁰⁶. Assim sendo, a baixa recuperação deste analito, em comparação aos demais, pode ter sido causada por sua degradação durante o procedimento de extração.

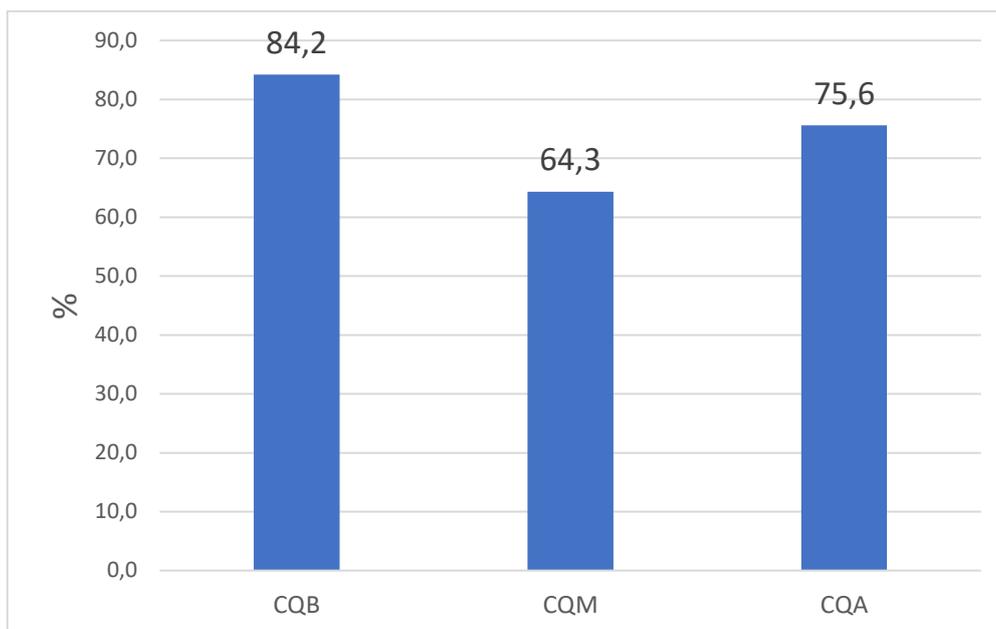


Figura 15. Porcentagem de recuperação (expressos em porcentagem - %) para os controles de qualidade baixo, médio e alto, determinado durante a validação do método de SPME para determinação de Δ^9 -tetraidrocanabinol em amostras de sangue total.

No método de SPME para a determinação de THC, também foi possível a obtenção de resultados acima dos esperados para este parâmetro. A molécula de THC adere-se facilmente a superfícies, principalmente porosas como plástico, ocasionando, muitas vezes baixas recuperações. O método de SPME, diferentemente da LPME, possui menos etapas durante a extração. Este fato pode ter auxiliado nos bons resultados de recuperação do analito, uma vez que, quanto maior o número de etapas, maior a suscetibilidade de erros e perdas do analito.

5.3.7 Integridade da diluição

Os testes de precisão intra e interdia, bem como o de exatidão, foram aplicados a amostras de sangue diluídas. Para os três métodos os valores dos parâmetros se mantiveram dentro dos preconizados pelos manuais de validação de métodos analíticos utilizados. Desta maneira, amostras reais contendo

concentrações que excedam os limites superiores da faixa de trabalho de cada método, podem ser diluídas nos fatores testados, sem que haja comprometimento de precisão e exatidão das análises, obtendo desta forma, resultados confiáveis.

Resultados obtidos para o método para a determinação de compostos anfetamínicos estão apresentados na Tabela 9, para o método para a determinação de cocaína e derivados na Tabela 10 e para o método de determinação de THC na Tabela 11.

Tabela 9. Coeficientes de variação (CV) calculados para precisão intra e inter-dia e exatidão para os analitos analisados pelo método de LPME para determinação de compostos anfetamínicos, após diluição com sangue livre de analitos na proporção de 1:2, 1:5 e 1:10. Dados estão apresentados em porcentagem.

Analitos	Precisão intra-dia			Precisão inter-dia			Exatidão		
	1:2	1:5	1:10	1:2	1:5	1:10	1:2	1:5	1:10
Anfetamina	94,9	96,3	92,8	90,2	89,4	89,5	92,6	93,4	83,7
Metanfetamina	98,7	96,5	95,9	94,4	93,9	90,7	90,6	91,7	94,6
MDA	98,1	99,3	97,6	92,7	91,8	90,0	90,4	87,6	96,1
Femproporex	95,2	97,5	95,9	94,9	94,2	91,1	92,6	88,9	91,6
MDMA	98,3	97,9	96,6	92,8	91,3	90,5	93,3	90,6	93,7
MDEA	98,2	97,9	96,2	94,6	94,8	91,6	91,7	93,0	92,2

Tabela 10. Coeficientes de variação (CV) calculados para precisão intra e inter-dia e exatidão para os analitos analisados pelo método de LPME para determinação de cocaína e derivados, após diluição com sangue livre de analitos na proporção de 1:2, 1:5 e 1:10. Dados estão apresentados em porcentagem.

Analitos	Precisão intra-dia			Precisão inter-dia			Exatidão		
	1:2	1:5	1:10	1:2	1:5	1:10	1:2	1:5	1:10
AEME	90,1	94,1	88,0	85,5	93,9	90,5	88,9	82,9	91,3
Cocaína	95,4	93,5	90,5	94,5	91,9	91,8	90,6	92,0	89,7
Cocaetileno	97,0	94,9	93,2	97,3	94,3	92,1	94,9	97,3	92,6

Tabela 11. Coeficientes de variação (CV) calculados para precisão intra e inter-dia e exatidão para os analitos analisados pelo método de SPME para determinação Δ 9-tetraidrocanabinol, após diluição com sangue livre de analitos na proporção de 1:5, 1:10 e 1:20. Dados estão apresentados em porcentagem.

Diluição	Precisão intra-dia	Precisão inter-dia	Exatidão
1:5	97,7	97,9	101,7
1:10	96,6	96,1	96,4
1:20	95,6	94,1	84,3

Apesar de o parâmetro da integridade da diluição não constar como um parâmetro obrigatório nos manuais de validação de métodos analíticos, é de grande importância durante as análises toxicológicas. A utilização de uma faixa de trabalho com grande variação entre os pontos mínimo e máximo traz alguns problemas como a perda de linearidade e maiores imprecisões do método, mesmo com a utilização de fatores de ponderação para corrigir os erros inerentes. Desta maneira, uma forma para manter-se dentro dos parâmetros é manter uma faixa de trabalho mais limitada, como apresentado no presente trabalho e diluir amostras que excedam os limites superiores.

Nos três métodos observou-se a manutenção dos valores de precisão e exatidão dentro dos valores preconizados nos manuais de validação de método. Desta maneira, é possível manter uma faixa de trabalho mais restrita e ainda

assim proceder a análise de amostras contendo concentrações que excedam os valores superiores da faixa de trabalho.

5.4 Aplicação dos métodos em amostras reais

O método de detecção de compostos anfetamínicos foi aplicado em seis amostras de indivíduos suspeitos de terem consumido ecstasy e/ou outros tipos de estimulantes anfetamínicos. Em quatro amostras foram identificados os seguintes analitos: anfetamina, MDA e MDMA. Na Tabela 12 estão apresentados os resultados dos analitos identificados.

Tabela 12. Aplicação do método de microextração em fase líquida (LPME) para a detecção de compostos anfetamínicos em amostras de sangue total de indivíduos suspeitos de terem feito o uso de ecstasy. Resultados estão apresentados em ng/mL.

Amostra	ANF ^a	MET ^b	MDA ^c	FEM ^d	MDMA ^e	MDEA ^f
1	-	-	50,1	-	3.255,7	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	5,8	-	218,5	-
4	1.439,0	-	-	-	42,6	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	74,0	-

^a: anfetamina, ^b: metanfetamina, ^c: 3,4-metilenodioxianfetamina, ^d: femproporex, ^e: 3,4-metilenodioximetanfetamina, ^f: 3,4-metilenodioxietilanfetamina

Compostos anfetamínicos são utilizados no Brasil principalmente de duas maneiras, através do consumo de *ecstasy* e medicamentos supressores de apetite, principalmente por motoristas de caminhão^{107,108}. Atualmente os comprimidos de *ecstasy* possuem diversas variações e composições. O principal componente ainda é o MDMA, porém frequentemente são encontradas outras substâncias, como anfetamina, metanfetamina, cafeína, fenciclidina entre outras¹⁰⁹. A detecção de anfetamina na amostra 4 poderia estar relacionada com

a presença desta substância em comprimidos de *ecstasy* e não um consumo de outras formas da droga. O mesmo fato ocorre com a MDA. A presença desta substância em comprimidos de *ecstasy* já foi relatada. Além disso, também poderia ter sido detectada através da biotransformação da MDMA.¹¹¹. As diferentes composições podem trazer sérios riscos para os usuários, os quais muitas vezes não possuem conhecimento dos componentes o que poderia causar graves intoxicações nos usuários.

Os métodos de LPME e SPME para a detecção de cocaína e derivados e THC, respectivamente, foram aplicados em amostras de sangue total de pacientes vítimas de acidentes com lesões traumáticas que foram atendidos no Pronto Socorro Central e ficaram internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Foram utilizadas amostras de pacientes que relataram o consumo das drogas durante a aplicação de questionário estruturado. Nas Tabelas 13 e 14 estão apresentados os resultados obtidos.

Tabela 13. Aplicação do método de microextração em fase líquida (LPME) para a detecção de cocaína e derivados em amostras de sangue total de indivíduos suspeitos de terem feito o uso de cocaína e/ou crack. Resultados estão apresentados em ng/mL.

Amostra	AEME*	Cocaína	Cocaetileno
AT 13	-	91,9	42,0
AT 21	-	32,3	40,6
AT 22	-	151,9	67,4
AT 51	-	253,1	6,8
AT 148	-	101,3	-
AT 179	<LOQ	77,4	-
AT 182	5,3	290,6	-
QA 2	-	310,4	-
QA 7	-	76,6	-
QA 37	-	117,2	57,2

*: Anidro ecgonina metil éster

AT: acidente de trânsito

QA: queda de altura

A detecção de cocaína e produtos de biotransformação como cocaetileno e AEME em amostras reais de sangue total demonstra a eficácia do método desenvolvido. A AEME foi detectada em apenas dois casos, sendo em um deles (amostra AT 179) abaixo do LOQ (5 ng/mL), mas acima do LOD (4 ng/mL). Este fato pode ter sido causado pelo tempo decorrido entre a coleta das amostras e aplicação do método. A AEME possui uma baixa meia-vida e alta instabilidade, sendo rapidamente convertida em ecgonidina. Esta conversão acontece não apenas no organismo, mas também *in vitro* e mesmo na presença de conservantes como o fluoreto de sódio^{106,112}. O mesmo fato pode também ter ocorrido no caso da cocaína. Apesar de ter sido detectada, os valores encontrados foram baixos, não condizendo com o consumo recente como relatado pelos pacientes. Assim como a AEME, a cocaína também possui baixa

meia-vida, sofrendo rápida hidrólise para BZE¹¹³. Desta maneira, muito provavelmente os níveis de BZE nas amostras analisadas estariam altos devido a esta conversão sofrida pela cocaína. A detecção de cocaetileno nas amostras dos pacientes internados, reflete o uso concomitante de cocaína e bebidas alcoólicas. Este composto apresenta uma meia-vida mais prolongada em comparação à cocaína e efeitos mais duradouros^{114,115}, podendo contribuir para o envolvimento em acidentes e outros atos de risco.

A impossibilidade de detecção de BZE pela técnica aqui desenvolvida mostra-se como um ponto fraco e desfavorável para a LPME quando aplicada em amostras de sangue total. Apesar de a mesma técnica já ter sido aplicada com sucesso em amostras de cabelo para a determinação de BZE⁹³, o mesmo não foi possível no presente estudo. O prolongado período entre a coleta e a análise das amostras, pela técnica aqui apresentada, poderia resultar em uma subnotificação do consumo de cocaína e resultados falso-negativos. Entretanto, quando a amostra for analisada em um curto período da coleta, a técnica de HF-LPME apresenta boa detecção da substância em questão, podendo ser aplicada apenas para a detecção do consumo, mas não para uma quantificação do consumo em si.

Tabela 14. Aplicação do método de microextração em fase sólida (SPME) para a detecção de Δ^9 -tetraidrocanabinol (THC) em amostras de sangue total de indivíduos que relataram terem feito o uso de maconha. Resultados estão apresentado em ng/mL.

Amostra	THC (ng/mL)
AT 32	7,4
AT 94	6,1
V 47	6,3
QA 73	4,7
QA 82	6,4
QA 87	5,1

Apesar de o LOQ do método de SPME para a determinação de THC não ter se enquadrado dentro dos *cutoffs* utilizados em estudos internacionais, o analito foi detectado com sucesso em amostras de sangue total. O THC por suas características lipofílicas possui uma rápida distribuição pelo organismo e altas taxas de ligação com proteínas plasmáticas¹¹⁶, assim, as concentrações sanguíneas tendem a ser menores do que aquelas encontradas para outras substâncias. Além disso, o THC possui baixa estabilidade em amostras sanguíneas, mesmo com a presença de conservantes. O THC aparenta ter uma maior estabilidade quando as amostras são conservadas em geladeira, a -4°C e não congeladas a -20°C^{117,118}. Por outro lado, concentrações mais baixas de THC tendem a permanecer sem grandes alterações por um maior período em comparação a concentrações mais elevadas. Além disso, o THC-COOH possui maior estabilidade do que THC e THC-OH em amostras sanguíneas¹¹⁷.

6. Considerações finais – Parte I

Ambas as técnicas apresentadas no presente trabalho, a LPME e SPME, apresentaram resultados satisfatórios. Todos os parâmetros avaliados durante a etapa de validação apresentaram resultados dentro dos valores preconizados na literatura. Na avaliação do enquadramento das técnicas aos princípios da Química Analítica Verde, ambas apresentaram resultados medianos. Entretanto, os valores obtidos estão relacionados com limitações inerentes aos equipamentos e procedimentos utilizados e não com as técnicas em si. Com a utilização de equipamentos mais sensíveis e automação das extrações, melhores resultados poderiam ser obtidos.

Tanto a LPME como a SPME poderiam ser implementadas em rotinas laboratoriais, dependendo do fluxo e tipo de amostra analisado. Ambas as técnicas apresentam custos por análise inferiores à LLE e SPE. Entretanto, para uma rotina laboratorial com grande fluxo de amostra, só seriam viáveis com a automação da técnica.

Restrições de equipamentos, falta de automação e longo tempo de separação cromatográfica, foram os principais fatores responsáveis pelos valores medianos obtidos pelas três técnicas quando verificada a aplicabilidade dos princípios da Química Analítica Verde. Por outro lado, todas apresentaram vantagens em relação à LLE e SPE analisando o volume de reagentes utilizados e a quantidade de resíduos resultantes ao final das extrações.

A LPME apesar de já ter sido bastante explorada, ainda apresenta algumas desvantagens importantes, como a impossibilidade de extração de analitos de sangue total. A detecção do consumo de cocaína pela técnica aqui apresentada apenas seria viável com uma análise realizada em curto espaço de tempo do momento da coleta da amostra. A cocaína, por apresentar uma meia-vida curta e instabilidade *in vitro*, hidrolisa-se rapidamente em BZE, o que poderia causar uma subdetecção das concentrações reais de cocaína. Portanto, o método de HF-LPME apresentado neste estudo poderia apresentar resultados falso-negativos, sendo desta maneira, sua aplicação inviável em alguns casos.

A LPME apresenta resultados de concentração de analitos superiores aos apresentados pela LLE¹¹⁹, o que a torna mais atrativa em casos de pequenos volumes de amostras. Além disso, apesar de algumas variações da LPME, como a DLLME ter sido apresentada como uma melhor alternativa, a HF-LPME, esta leva vantagem na repetibilidade e reprodutibilidade sobre a DLLME¹²⁰.

A SPME mostrou-se uma alternativa à LPME para a extração de THC de amostras sanguíneas. Como principais vantagens da SPME estão a simplicidade, alta eficiência de extração, baixos volumes de amostra utilizado e alta sensibilidade¹²¹. Mesmo com a precipitação de proteínas, a SPME, ainda apresentou valores ótimos de recuperação, precisão e exatidão do analito. Mesmo com a injeção manual, é completamente viável a aplicação da técnica em rotinas com baixo volume de amostras, entretanto torna-se ainda mais atrativa com a possibilidade de automação.

Ambas as técnicas aqui apresentadas possuem vantagens e desvantagens, sendo que a escolha de cada uma delas está atrelada aos objetivos da análise, matriz a ser analisada e analitos a serem detectados. Com a modernização de equipamentos de separação de detecção de analitos as técnicas de preparação de amostras, acabam muitas vezes se tornando cada vez mais simples. Entretanto, a grande maioria dos laboratórios de países em desenvolvimento, como o Brasil, ainda conta com equipamentos que requerem mais cuidados com a preparação das amostras e extratos mais límpidos, como GC-MS. Desta forma, ambas as técnicas são viáveis de serem aplicadas nesta realidade, possibilitando a redução de custos inerentes à preparação de amostras, além de promoverem análises mais seguras do ponto de vista da saúde dos trabalhadores.

Parte II

7. Revisão da literatura

7.1 Substâncias psicoativas

7.1.1 Prevalência do uso

Segundo dados do Escritório de Drogas e Crimes da Organização das Nações Unidas (UNODC), o número de usuários de drogas, no mundo, aumentou em 30% desde 2009. Parte deste número se deu pelo aumento populacional, principalmente devido ao aumento da população de adultos jovens em países em desenvolvimento, mas foi principalmente impulsionado pelo aumento na produção e distribuição de drogas⁵. Estima-se que, em 2018, 5,4% da população mundial entre 15 e 64 anos, correspondendo a 269 milhões de pessoas, utilizou alguma substância ilícita pelo menos uma vez no ano anterior. A cannabis é a droga mais utilizada globalmente, com 192 milhões de usuários em 2018, seguida pelos opioides (incluindo opiáceos), estimulantes anfetamínicos e cocaína⁷.

Além das drogas de origem natural como cannabis, cocaína e heroína, a última década presenciou uma expansão das drogas sintéticas e o uso não medicinal de medicamentos prescritos. Essas substâncias sintéticas muitas vezes possuem maior potência de ação e o uso concomitante com outras substâncias pode aumentar os riscos para o usuário, que muitas vezes não tem conhecimento do tipo de substâncias consumida e seus efeitos⁵. Estima-se que atualmente cerca de 500 novas substâncias psicoativas (NSP) estejam em circulação no mercado, sendo principalmente substâncias estimulantes e canabinoides sintéticos⁷.

Existe uma estreita relação com o uso de drogas e problemas decorrentes deste consumo em populações economicamente mais vulneráveis. Este grupo populacional sofre com maior incidência de dependência e desordens ocasionadas pelo uso. Menor escolarização, escassas condições de trabalho, conflitos pessoais e marginalização social geram menor renda e conseqüentemente levam ao consumo de substâncias psicoativas, constituindo um ciclo vicioso⁷.

Em 2017, cerca de 585.000 óbitos foram atribuídos ao uso de substâncias psicoativas, decorrentes de overdose ou doenças decorrentes do uso. Mais da metade dessas mortes foram causadas pelo não tratamento de hepatite C e dois terços causados por desordens decorrentes do uso de opioides. Mais ainda, estima-se que para cada overdose fatal existem pelo menos outras 20 não fatais⁵.

A América do Norte, principalmente os Estados Unidos da América (EUA), sofrem uma crise de saúde pública e social decorrente do uso de opioides, principalmente fentanil, metadona e buprenorfina. Overdoses causadas por substâncias ilícitas são a primeira causa de morte por lesões, a frente de acidentes de trânsito, homicídios e suicídios¹²². Em 2017, aproximadamente 192 pessoas morreram por dia por overdose nos EUA, resultando em mais de 70 mil mortes em todo o país. A principal substância causadora desses óbitos foi o opioide sintético fentanil, sendo responsável por mais de 47 mil mortes em 2017. Além disso, heroína e cocaína também contribuem substancialmente com esses números, atingindo quase 29 mil mortes por overdose nos EUA em 2017¹²². Além disso, a América do Norte também tem a maior prevalência mundial no uso de cocaína, anfetaminas e cannabis. Entretanto, o aumento na prevalência do uso de cannabis está mais relacionado com a legalização do uso não medicinal no Canadá e alguns estados dos EUA⁵.

Na Europa, as mortes relacionadas ao uso de drogas também continuam a aumentar, apresentando números superiores àqueles registrados nos últimos cinco anos¹²³. O consumo de drogas no continente, principalmente opiáceos, continua a contribuir de forma substancial para os custos de saúde e sociais. Essas substâncias estão relacionadas com 85% das overdoses fatais, mesmo sendo o uso delas, apenas o quinto mais prevalente dentre as substâncias ilícitas. Além disso, o consumo de cocaína também tem aumentado nos últimos anos, sendo o uso de crack, identificado em países que anteriormente não apresentavam esta forma da cocaína. Em 2017, 29% da população europeia (96 milhões de pessoas) alegou ter utilizado alguma substância pelo menos uma vez na vida. Dentre a população de 15 a 34 anos, 20 milhões fizeram o uso de alguma substância no último ano¹²³. A substância mais consumida no último ano

foi a cannabis (25,2 milhões), seguida da cocaína (4,3 milhões), MDMA (2,7 milhões), anfetaminas (2 milhões) e opiáceos (1,3 milhão). Dentro da Europa, o consumo de cocaína é mais pronunciado nos países do sul e ocidentais, enquanto o uso de anfetamina é mais prevalente no norte e leste europeus¹²³.

Já no Brasil, o padrão de consumo de substâncias ilícitas se mantém em concordância com o padrão mundial. Segundo dados do III Levantamento Nacional do Uso de Drogas pela População Brasileira (III LNUD), cerca de 4,7% da população brasileira dentro da faixa etária de 15 a 65 anos utilizou algum tipo de substância psicoativa ilícita nos 12 meses anteriores à pesquisa¹²⁴. Ao levar em consideração também o consumo de álcool este número se eleva consideravelmente. Estimativas sugerem que 66,4% dos brasileiros já ingeriram bebidas alcóolicas pelo menos uma vez na vida e que 43,1%, ou seja, 65 milhões de pessoas consumiram no último ano¹²⁴.

Dentre as substâncias ilícitas consumidas, a cannabis apresenta maior prevalência de uso nos últimos 12 meses correspondendo à 2,5% da população, seguida da cocaína/crack e solventes. Com mais de 1,5 milhão de usuários de cocaína e/ou crack, o Brasil é o maior consumidor dessas substâncias na América Latina⁵. O uso de drogas não está restrito a porções mais vulneráveis da população, estando disseminado em diferentes classes sociais e faixas etárias¹²⁵. O uso, principalmente de crack, leva a uma marginalização social acarretando problemas sociais, econômicos e criminais tanto do ponto de vista individual, como comunitário. Na cidade de São Paulo, na região central, encontra-se um dos maiores conglomerados de uso de drogas da América Latina, sendo mais conhecido como “cracolândia”, onde ocorre o uso e comércio disseminado de substâncias ilícitas, principalmente o uso de crack. Estima-se que cerca de duas mil pessoas convivam diariamente, de forma rotativa, neste local, sendo 75% do sexo masculino e majoritariamente na faixa etária até 40 anos*. Muitas ações sociais e políticas já foram realizadas com o objetivo de diminuir e até mesmo erradicar este problema nesse local, entretanto não

* Pereira, ACM (Secretaria de Assistência e Desenvolvimento Social – Prefeitura de São Paulo) Comunicação pessoal, 2021.

surtiram o efeito desejado, inclusive nos últimos foi observado um aumento no número de frequentadores.

O Brasil, devido ao seu posicionamento geográfico, próximo a grandes produtores de cocaína como Colômbia, Bolívia e Peru, também devido às grandes áreas de fronteira, recebe um enorme influxo dessas drogas no interior do país, servindo de meio de passagem de drogas para continentes como África, Europa e Ásia. Segundo dados da UNODC, em 2017, de toda a carga de cocaína apreendida nesses continentes, o país de origem mais citado foi o Brasil⁵.

Além disso, um grande problema nacional e mundial é o uso concomitante de duas ou mais substâncias, o que leva a maiores riscos para a saúde do usuário. No Brasil, segundo dados do LNUD, cerca de 4 milhões de brasileiros consumiram bebidas alcóolicas juntamente com alguma outra droga ilícita e outros 2,3 milhões de pessoas juntamente com medicamentos¹²⁴.

A dependência e transtornos mentais desenvolvidos como consequência do uso de drogas também merecem ser tratados com a importância devida. Mundialmente, estima-se que apenas 1 em cada 7 pessoas recebe tratamento por desordens geradas pelo uso de drogas⁵. No Brasil existem estimativas de que 2,3 milhões de pessoas sofram de dependência do uso de álcool e 1,2 milhão do consumo de drogas ilícitas. Deste montante, apenas 1,6 milhão receberam algum tipo de tratamento, seja para doenças relacionadas ao consumo ou pela dependência¹²⁴.

7.1.2 Riscos de lesões associados ao uso de substâncias psicoativas

O uso de substâncias psicoativas causa prejuízos tanto cognitivos quanto motores, o que pode acarretar maiores riscos para o envolvimento em acidentes ou atos que ponham em risco a integridade física do próprio usuário ou de terceiros. Esses riscos podem ser de maior ou menor grau dependendo da dose consumida ou dos tipos de efeitos (estimulantes, depressores ou alucinógenos).

As drogas estimulantes aumentam a concentração de neurotransmissores nas sinapses podendo levar a comportamentos agressivos¹²⁶.

O uso de drogas ilícitas já foi associado ao aumento da morbidade e mortalidade dos usuários, das taxas de ocorrência de doenças tanto não transmissíveis como as transmissíveis, além de desordens mentais¹²⁷. Além disso, uso de drogas ilícitas pode estar relacionado com violência, tanto em nível individual como comunitário, sendo três os possíveis caminhos para esta associação^{127,128}:

- Fatores psicofarmacológicos: os efeitos físicos e psicológicos do uso de drogas podem desencadear a violência;
- fator econômico: violência como meio de financiar o uso e vício de drogas;
- fatores sistêmicos: violência associada à logística de distribuição de drogas e disputas entre diferentes grupos.

Andreuccetti et al. (2018), identificaram em estudo na cidade de São Paulo, envolvendo análises toxicológicas em vítimas de mortes violentas, uma positividade de 55,3% para algum tipo de substância psicoativa. Álcool foi a substância mais consumida (30%) pelas vítimas, enquanto dentre as drogas ilícitas, a cocaína foi a mais consumida (21,9%), seguida de cannabis (14%). Em vítimas de homicídios, foi encontrada uma taxa elevada para o consumo de substâncias psicoativas, sendo o uso da cocaína detectada em 30,8% das vítimas e cannabis em 19,2% dos casos. Além disso, foi identificada uma associação entre condenações criminais e uso de drogas, sendo que aqueles indivíduos que apresentavam antecedentes criminais eram mais prováveis de terem feito o uso de drogas antes da lesão fatal¹²⁹.

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), o uso de álcool e drogas psicoativas foram responsáveis por quase 230 mil mortes por acidentes de trânsito em todo o mundo em 2013. Desse montante, o álcool foi o principal responsável, mais de 188 mil vítimas haviam consumido bebidas alcóolicas antes do acidente fatal. Entre as drogas psicoativas, as anfetaminas foram os principais responsáveis (51%), seguido da cannabis (22%), cocaína (14%) e opioides (13%)¹³⁰. O risco para a ocorrência de acidentes de trânsito aumenta

consideravelmente com o uso de álcool e outras substâncias psicoativas. O prejuízo causado pelo álcool já está bem estabelecido como uma das maiores causas de acidentes de trânsito. Além disso, o uso de estimulantes também é causa importante para sinistros viários, pois usuários dessa classe de substância desenvolvem comportamentos de risco¹³¹, sendo que estudos já identificaram a associação entre acidentes e uso de estimulantes¹³².

O álcool é a substância psicoativa mais consumida no mundo e a associação entre seu consumo e o aumento no risco de lesões decorrentes de acidentes já está bem estabelecido^{14,16,133}. O uso de álcool aumenta de forma exponencial o risco para ocorrência de acidentes de trânsito, sendo que cada dose aumenta em 13% as chances de lesões. Ainda mais, na América Latina, a cada 5 pacientes atendidos em salas de emergência, uma é vítima de acidente de trânsito. Dentre este grupo, um em cada seis pacientes ingeriu bebidas alcóolicas nas seis horas prévias ao acidente¹⁶. Por outro lado, a associação entre uso de outras substâncias psicoativas e o aumento no risco de lesões e acidentes ainda é controverso, principalmente em relação ao consumo de maconha^{14,17,128,134,135}.

Em um estudo canadense, o risco para a ocorrência de acidentes de trânsito associado ao consumo de maconha foi verificado em indivíduos atendidos em salas de emergência após os acidentes. O consumo de maconha foi quantificado e concentrações de THC menores a 5 ng/mL não apresentaram nenhum aumento no risco. Indivíduos apresentando concentrações de THC no sangue acima de 5 ng/mL apresentaram um leve aumento no risco de ocorrência em acidentes, porém não houve nenhuma associação estatisticamente significativa para este grupo¹³⁶.

Por outro lado, resultados de estudos experimentais mostram que o THC prejudica habilidades psicomotoras essenciais na condução de veículos automotores¹³⁷. Porém, o prejuízo causado pelo consumo de maconha, aparentemente se revela de forma diferente em indivíduos com diferentes padrões de consumo de maconha. Usuários frequentes da droga desenvolvem uma certa tolerância aos efeitos do THC. Ainda mais, em motoristas com alta frequência de uso de maconha, foi observado atitudes para compensar os efeitos

prejudiciais do THC, como por exemplo uma direção com menor velocidade¹³⁸,¹³⁹. Apesar dessas formas de tentativa de compensação ao prejuízo causado pelo THC, os efeitos deletérios foram observados tanto em usuários frequentes, como em usuários ocasionais¹⁴⁰, o que pode levar a maiores riscos de ocorrência de acidentes de trânsito e outros tipos de lesões.

Diferentemente do que ocorre com a maconha, o prejuízo causado pelo uso de estimulantes como anfetaminas e cocaína, já está bem estabelecido, assim como o risco aumentado de ocorrência de acidentes de trânsito¹³². O uso de substâncias estimulantes leva o indivíduo a agir com comportamentos de maior risco e agressividade^{131,141}. O uso de anfetamina ou cocaína podem aumentar em mais de 18 vezes as chances de envolvimento em colisões¹⁴². Dentre as substâncias psicoativas, além do álcool, a anfetamina é aquela que apresenta maiores riscos de ocorrência de acidentes¹⁴³. O consumo de anfetaminas foi associado com um risco 14 vezes maior de se lesionar em acidentes e 34 vezes maior de sofrer lesões fatais em um acidente quando comparado a não usuários¹⁵.

Os padrões de consumo de substâncias psicoativas influenciam de diferentes maneiras os riscos de lesão e acidentes. O consumo de mais de uma substância simultaneamente pode ocasionar aumentos ainda mais expressivos nos riscos para a ocorrência de acidentes de trânsito. O uso de álcool combinado com maconha, leva a um efeito sinérgico, no qual o risco para acidentes é maior quando comparado ao risco individual de cada substância^{135,144}. Ainda mais, o uso de álcool em combinação com duas ou mais substâncias aumenta significativamente os riscos para acidentes de trânsito^{15,132} e outros tipos de trauma¹⁴, comparado ao uso de uma única substância. Somado a isso, um estudo associou o uso concomitante de mais de uma substância como forte fator de risco para o aumento na mortalidade em acidentes; sendo que o uso de maconha e cocaína estava associado com maior risco de morte do que outras combinações¹⁴⁵. Também, a combinação dessas duas substâncias com álcool também já foi relacionada com lesões decorrentes de violência interpessoal¹⁴⁶.

7.1.3 Prevalência de substâncias psicoativas em pacientes atendidos em salas de emergência

O reflexo dos elevados riscos associados ao uso de álcool e outras substâncias psicoativas podem ser observados na alta prevalência dessas drogas em pacientes atendidos em salas de emergência. Pacientes com lesões apresentam maiores chances de reportarem o consumo de álcool, maconha e mais de uma substância simultaneamente nas seis horas anteriores à lesão¹⁴. Uso de substâncias psicoativas, além de ter alta frequência entre acidentados, também resultam em lesões mais severas e com maior gravidade em comparação com não usuários¹⁴⁷.

O álcool é a substância mais frequentemente encontrada em paciente atendidos em salas de emergência¹⁴. Detecção de outras substâncias também é relativamente alto, sendo que o padrão de consumo se altera de acordo com o país estudado.

Nos EUA, resultados de análises toxicológicas em urina mostraram uma positividade de 59,3% para álcool e/ou outras substâncias em pacientes vítimas de acidentes de trânsito. O álcool foi a substância mais identificada (25,8%) seguido de benzodiazepínicos (17,4%). Dentre as drogas ilícitas, o consumo de maconha foi o mais prevalente (16,5%) seguido de cocaína (11,2%)¹⁴⁸.

Em 2009, em estudo realizado na Espanha, com pacientes de diferentes tipos de trauma e utilizando fluido oral e suor como matrizes, foi identificado que 37,1% das vítimas de violência fizeram o uso de alguma droga ilegal antes de sofrerem as lesões, sendo mecanismo de lesão com maior prevalência do uso de substâncias ilegais. Vítimas de acidentes de trânsito corresponderam à segunda causa com maior consumo de drogas ilícitas, sendo identificado o uso em 27% dos pacientes¹⁴⁹.

Em estudo similar, realizado na Noruega, com pacientes apresentando lesões decorrentes de diversas causas de acidentes, 44% das amostras de sangue analisadas apresentaram resultados positivos para pelo menos uma substância. O álcool foi o mais prevalente, tendo sido detectado em 27% das amostras, enquanto drogas ilícitas foram identificadas em apenas 9% dos

pacientes, sendo maconha e anfetaminas as mais prevalentes (6,2% e 3,1%, respectivamente)¹⁵⁰.

Ainda na Europa, estudos envolvendo apenas motoristas de automóveis com lesões graves, foi identificada uma prevalência de 39% e 31% para alguma substância na Bélgica e Dinamarca, respectivamente^{151,152}. Em ambos os estudos o álcool foi a substância mais detectada (26% na Bélgica e 20% na Dinamarca). Dentre as drogas ilícitas, na Bélgica a maconha foi a mais consumida (5,3%)¹⁵¹, enquanto as anfetaminas foram a classe de substância mais detectada na Dinamarca (5,4%)¹⁵².

Já no Canadá, o consumo de substâncias psicoativas foi verificado em motoristas acidentados apresentando lesões leves e com média gravidade. Amostras de sangue foram analisadas e foi detectado que em 38,2% havia pelo menos uma substância. A maior prevalência foi de medicamentos sedativos (19,8%), enquanto o álcool foi a segunda mais prevalente com 14%. Já a maconha foi detectada em 8,3% das amostras de sangue¹³⁶.

No âmbito nacional foram realizados três estudos envolvendo análises toxicológicas em amostras de pacientes atendidos em salas de emergência após lesões traumáticas. Em 2006, na cidade de São Paulo, foi realizado um estudo no Pronto Socorro do Hospital São Paulo da Universidade Federal de São Paulo, com pacientes com lesões de menor complexidade, provenientes de quedas ou violência. O consumo de álcool foi identificado com o uso de etilômetro, enquanto o consumo de maconha e cocaína foi verificado com testes rápidos (imunocromatografia) utilizando amostras de urina, entretanto, não houve análises confirmatórias dos resultados positivos. O consumo de álcool foi identificado em 11% dos pacientes, enquanto 13,6% das amostras de urina apresentaram resultados positivos para maconha e 3,3% para cocaína¹⁵³.

Em 2011, na cidade de Porto Alegre, pacientes com lesões decorrentes de acidentes de trânsito, tiveram amostras de fluido oral coletadas para a análise do consumo de substâncias psicoativas. Álcool também foi detectado através de etilômetro. Foram incluídos apenas pacientes com lesões decorrentes de acidentes de trânsito, sendo divididos entre motoristas, passageiros e pedestres.

A detecção do uso de álcool e maconha apresentaram praticamente resultados similares, sendo ambos detectados em cerca de 7% das amostras. Já a cocaína foi consumida por 5% dos pacientes incluídos no estudo. Entre os motoristas o uso de maconha foi mais frequente (13,3%) em comparação ao uso de álcool (7,8%)¹⁵⁴.

Já na cidade de São Paulo, o consumo de substâncias psicoativas foi investigado entre motociclistas atendidos em salas de emergência de hospitais da Zona Oeste da cidade. Foram coletadas amostras de fluido oral e sangue dos casos mais graves, para a identificação de drogas ilícitas, enquanto o consumo de álcool foi verificado através de etilômetros. Dentre os pacientes incluídos no estudo, 20,3% apresentaram resultados positivos para pelo menos uma substância, sendo que álcool, cocaína e maconha apresentaram frequência de uso similares, cerca de 10%, cada substância. Além disso, motociclistas que consumiram bebidas alcólicas previamente ao acidente possuíam maior probabilidade de serem culpados¹⁵⁵.

8. Pacientes e Métodos

8.1 Coleta de amostras

Trata-se de um estudo do tipo transversal, no qual amostras de sangue foram coletadas entre os meses de julho de 2018 e junho de 2019 no Pronto Socorro Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (PSC – HCFMUSP). Pacientes apresentando lesões traumáticas decorrentes de acidentes de trânsito, quedas e violência interpessoal tiveram as amostras coletadas. Profissionais de enfermagem, treinados, foram responsáveis pelas coletas sanguíneas após os primeiros atendimentos e estabilização dos sinais vitais dos pacientes. Foram incluídos apenas pacientes com lesões graves e que necessitaram posterior internação.

As coletas fizeram parte do projeto intitulado “Fatores relacionados com os acidentes de trânsito com vítimas atendidas no Pronto Socorro Central e que ficaram internadas no Hospital das Clínicas da FMUSP” (aprovação CAPPesq HCFMUSP nº 2.071.227).

O sangue foi coletado em tubos Vacutainer® contendo fluoreto de sódio e EDTA. O fluoreto é fundamental para a estabilização e conservação da amostra, evitando a degradação de alguns analitos. A assepsia do local de coleta foi realizada com solução não alcóolica para evitar contaminação das amostras. Após a coleta, as amostras de sangue eram enviadas para o laboratório central do HCFMUSP e armazenadas à -20°C. No dia posterior à coleta, os tubos eram encaminhados ao Laboratório de Toxicologia do Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e de Trabalho da FMUSP para armazenamento e análises toxicológicas.

Amostras de pacientes que se recusaram a participar do estudo após a coleta das amostras, bem como daqueles que foram à óbito, foram descartadas.

8.2 Dados sociodemográficos

Após a coleta de amostras, os pacientes eram monitorados para verificação da situação de saúde e evolução das lesões. Uma vez que estivessem nas unidades de internação (enfermarias) e conscientes, eram abordados para assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Anexo B) e aplicação de um questionário estruturado para obtenção de informações sociodemográficas bem como relativas aos acidentes. Foi aplicado um questionário para cada tipo de trauma específico (Anexos C, D e E).

Nos casos em que os pacientes se encontravam em coma ou entubados por tempo superior a 10 dias, ou que, por algum outro motivo, não conseguiam responder às perguntas, a assinatura do TCLE e entrevista era realizada com um membro da família ou responsável legal pelo paciente.

8.2.1 Critérios de inclusão

- Pacientes com lesões traumáticas de correntes de acidentes de trânsito, quedas e violência interpessoal, atendidos com seis ou menos horas após à ocorrência, que ficaram internados, concordam em participar do estudo e assinaram o TCLE.

8.2.2 Critérios de exclusão

- Pacientes transferidos para outras unidades hospitalares;
- pacientes que não concordaram em participar após coleta inicial;
- menores de 18 anos;
- pacientes que foram à óbito no PSC-HCFMUSP ou nas unidades de internação.

As amostras de sangue daqueles pacientes que se recusaram a participar, bem como dos pacientes que foram à óbito, foram descartadas e não foram incluídas nas análises toxicológicas.

8.3 Análises toxicológicas

As amostras coletadas dos pacientes incluídos no estudo foram analisadas para álcool e drogas ilícitas. As amostras foram enviadas ao Departamento de Ciências Forenses do Hospital Universitário de Oslo, Noruega para as análises toxicológicas. As amostras foram analisadas pela técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas *in tandem* (UPLC-MS/MS)¹⁵⁶. A dosagem alcóolica foi realizada no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo por cromatografia gasosa-FID após extração via *headspace*, por metodologia já estabelecida no laboratório.

8.4 Análises estatísticas

Porcentagens absolutas e dentro de cada grupo de acidente foram apresentadas para variáveis categóricas. Para variáveis contínuas, foram aplicados testes de normalidade de distribuição. Associações entre variáveis contínuas com distribuição não normal foram analisadas pelos testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. Associações entre variáveis categóricas foram analisadas por tabelas de referência cruzada bivariadas e teste de chi-quadrado de Pearson. Razão de chances (*odds ratio* – OR) foi calculado por regressão linear multivariada. O uso de cocaína foi verificado e associações foram analisadas através da presença de seu principal produto de biotransformação, benzoilecgonina. Todas as análises foram realizadas através do software SPSS 27.0 (IBM Corporation, Armonk, NY.) e o nível de significância foi estabelecido como $p < 0,05$.

9. Resultados

Durante os 12 meses de coleta, foram atendidos 909 pacientes com lesões traumáticas no PSC – HCFMUSP, cujas amostras de sangue foram coletadas. Destes, 342 foram transferidos para outras instituições hospitalares ou tiveram alta, outros 88 não foram incluídos devido à lesões decorrentes de eventos não correspondentes àqueles objetivos do estudo. Sete pacientes se recusaram a participar e 96 foram à óbito. Desta maneira, um montante de 376 pacientes foram incluídos e tiveram suas amostras analisadas, sendo 119 vítimas de quedas, 209 vítimas de acidentes de trânsito e 48 vítimas de violência interpessoal (Figura 16).

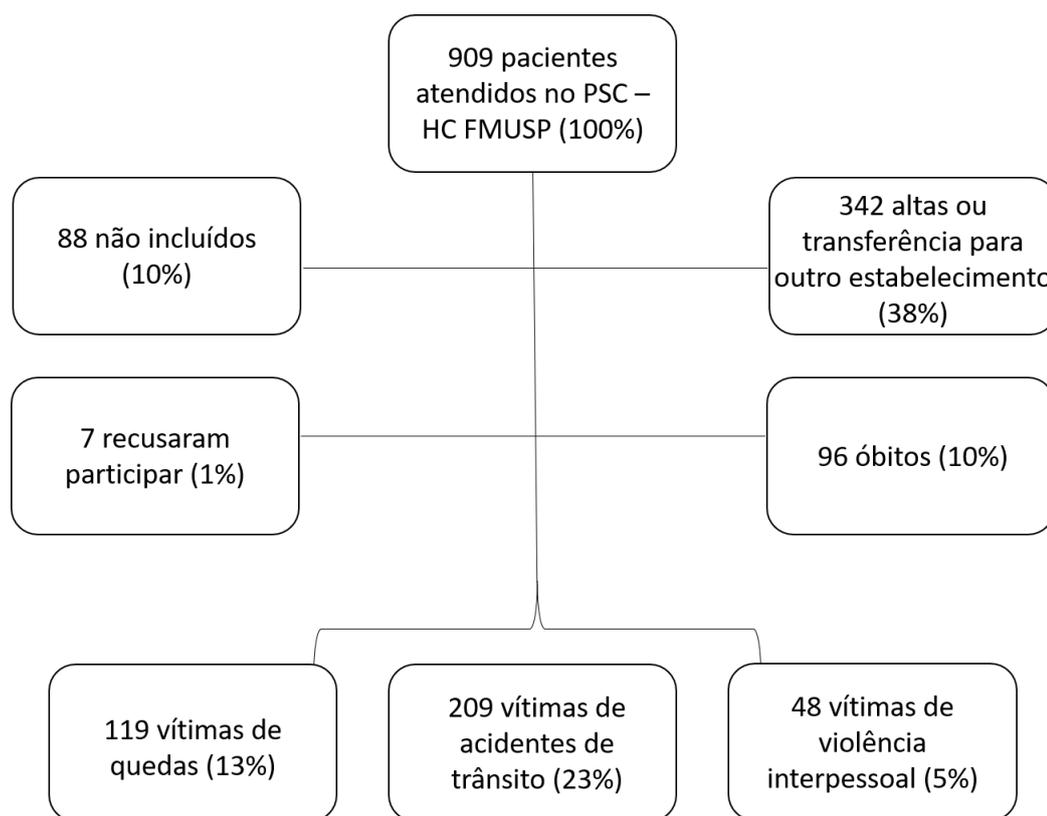


Figura 16. Fluxograma de pacientes atendidos no Pronto Socorro Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (PSC – HCFMUSP) no período de junho de 2018 a junho de 2019 e as respectivas situações de desfecho.

Os pacientes incluídos tinham idade mediana de 36 anos, eram em sua maioria homens (80,3%), casados ou amasiados (51,1%) e possuíam ensino médio completo (39,6%). Na Tabela 15 estão apresentadas as características sociodemográficas dos pacientes incluídos de acordo com o tipo de acidente. Os pacientes de quedas foram divididos em duas categorias: queda de altura (n=90) e queda de própria altura (n=29).

Tabela 15. Dados sociodemográficos referentes aos pacientes incluídos no estudo (n=376), separados de acordo com o tipo de acidente.

	Acidente de trânsito	Queda de altura	Queda de própria altura	Violência interpessoal
Idade*	35,0	39,5	62,0	31,0
Sexo				
Homem	78,9%	85,6%	65,5%	85,4%
Mulher	21,1%	14,4%	34,5%	14,6%
Estado civil				
Solteiro	39,7%	34,4%	20,7%	43,8%
Casado/Amasiado	51,2%	53,3%	41,4%	52,1%
Divorciado	5,3%	11,1%	13,8%	2,1%
Viúvo	3,8%	1,1%	24,1%	2,1%
Escolaridade				
Analfabeto	0,5%	4,4%	3,4%	4,2%
Fundamental incompleto	21,5%	23,3%	37,9%	14,6%
Fundamental completo	8,6%	8,9%	10,3%	8,3%
Médio incompleto	14,8%	14,4%	3,4%	6,3%
Médio completo	37,8%	37,8%	37,9%	52,1%
Superior	16,3%	10,0%	6,9%	14,6%
N/C	0,5%	1,1%	-	-
Horário do acidente				
Diurno (06:01 – 18:00)	68,1%	80,0%	82,8%	42,6%
Noturno (18:01 – 06:00)	31,9%	18,9%	17,2%	57,4%

N/C: não consta

*Mediana

Os acidentes ocorreram em sua maioria durante o período diurno, entre 6 e 18h, (69,1%) e durante dias da semana (56,4%). Lesões decorrentes de violência interpessoal possuíam mais chance de ter ocorrido durante o período noturno, entre 18 e 6h, (OR: 2,85, 95% IC: 1,7 – 4,8, $p < 0,01$), enquanto quedas apresentavam mais chances de ocorrer durante o período diurno (OR: 2,95, 95% IC: 1,4 – 3,3, $p < 0,01$). Pacientes atendidos em finais de semana entre as 18 e 6h eram mais novos (idade mediana: 28 anos, intervalo interquartil: 21,0 – 35,7) quando comparados aos pacientes atendidos em outros dias e horários (idade mediana: 38 anos intervalo interquartil: 29,0 – 50,0), $p < 0,01$.

Dentre as vítimas de acidente de trânsito, as mais prevalentes foram os condutores (54,1%), principalmente motociclistas (83,2%). Passageiros representaram 13,4% da amostra, pedestres 27,7% e ciclistas 4,8% (Figura 17). Motociclistas eram mais jovens comparados à outras vítimas de acidentes de trânsito (idade mediana: 31,0, intervalo interquartil: 24,0 - 37,2 vs 39,0, intervalo interquartil: 27,0 – 52,0, $p < 0,001$), sendo em sua maioria do sexo masculino (97,9%). Entre os casos de lesões relacionadas à violência interpessoal, a maioria dos pacientes apresentou ferimentos por arma de fogo (50%), seguido de agressões (25%). A Figura 18 ilustra todos os mecanismos de lesão relacionados às vítimas de violência interpessoal.

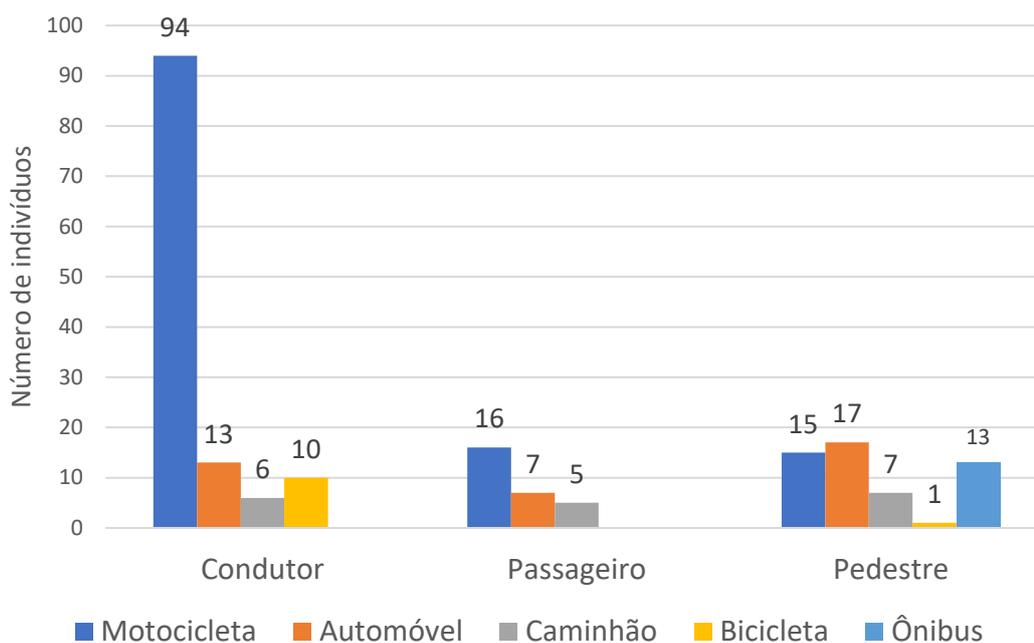


Figura 17. Pacientes vítimas de acidente de trânsito atendidos e internados no Pronto Socorro Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (n=209), estratificados entre condutores, passageiros e pedestres e entre os respectivos veículos envolvidos nos acidentes.

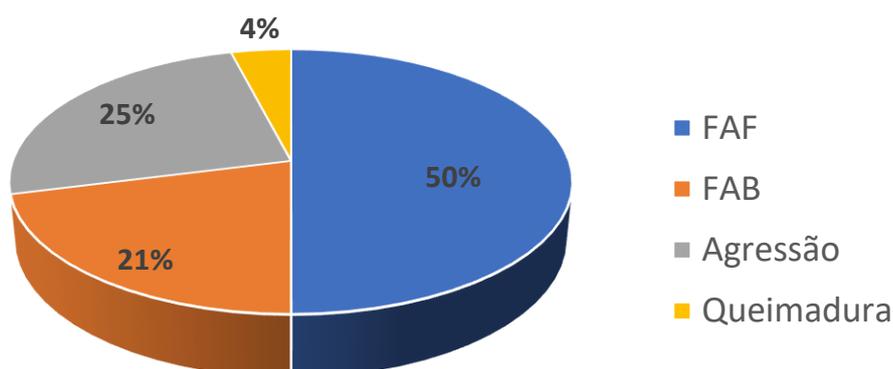


Figura 18. Pacientes vítimas de violência interpessoal atendidos e internados no Pronto Socorro Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (n=48), divididos de acordo com o mecanismo de lesão. FAF: ferimento por arma de fogo; FAB: ferimento por arma branca.

Foram identificadas 118 amostras (31,4%) com resultado positivo para pelo menos uma substância. O consumo de álcool foi o mais prevalente, seguido de cocaína e cannabis. Cocaetilenos, formado pelo consumo concomitante de álcool e cocaína, foi identificado em 12 amostras. Não foi identificado, em nenhuma das amostras, compostos anfetamínicos, bem como a AEME e heroína. A Tabela 16 apresenta os limites de quantificação utilizados como determinação para a presença da substância, bem como a prevalência encontrada para cada substância.

Tabela 16. Substâncias pesquisadas, valores de limite de quantificação (LOQ) utilizados e prevalência das substâncias nas amostras de pacientes incluídos no estudo (n=376).

Substância	LOQ*	%	n
Álcool	0,2 g/L	22,9	86
Anfetamina	27 ng/mL	-	0
Metanfetamina	29,8 ng/mL	-	0
MDMA	38,6 ng/mL	-	0
Δ9-tetraidrocanabinol	0,6 ng/mL	5,1	19
AEME	9,1 ng/mL	-	0
Benzoilecgonina	57,9 ng/mL	12,2	46
Cocaína	15,2 ng/mL	7,4	28
Cocaetilenos	15,9 ng/mL	3,2	12
6-acetilmorfina (heroína)	9,7 ng/mL	-	0
Total		31,4	118

*LOQ: limite de quantificação

Os pacientes cujas amostras apresentaram resultado positivo para alguma substância, eram mais jovens comparado àqueles cujas amostras não indicaram o uso de álcool e/ou drogas ilícitas (idade mediana: 31,5 anos, intervalo interquartil: 26,0 – 39,0, $p < 0,001$), em sua maioria do sexo masculino (88,1%, $p = 0,01$), possuíam o ensino médio completo (41,5%) e eram solteiros (50,8%, $p < 0,01$).

Dentre os tipos de acidentes, as vítimas de violência interpessoal apresentaram a maior porcentagem de consumo de substâncias psicoativas antes da lesão (43,8%), seguido das vítimas de acidente de trânsito (30,1%) e vítimas de quedas (28,6%). A Figura 19 ilustra a prevalência de cada substância dividida entre os tipos de acidentes.

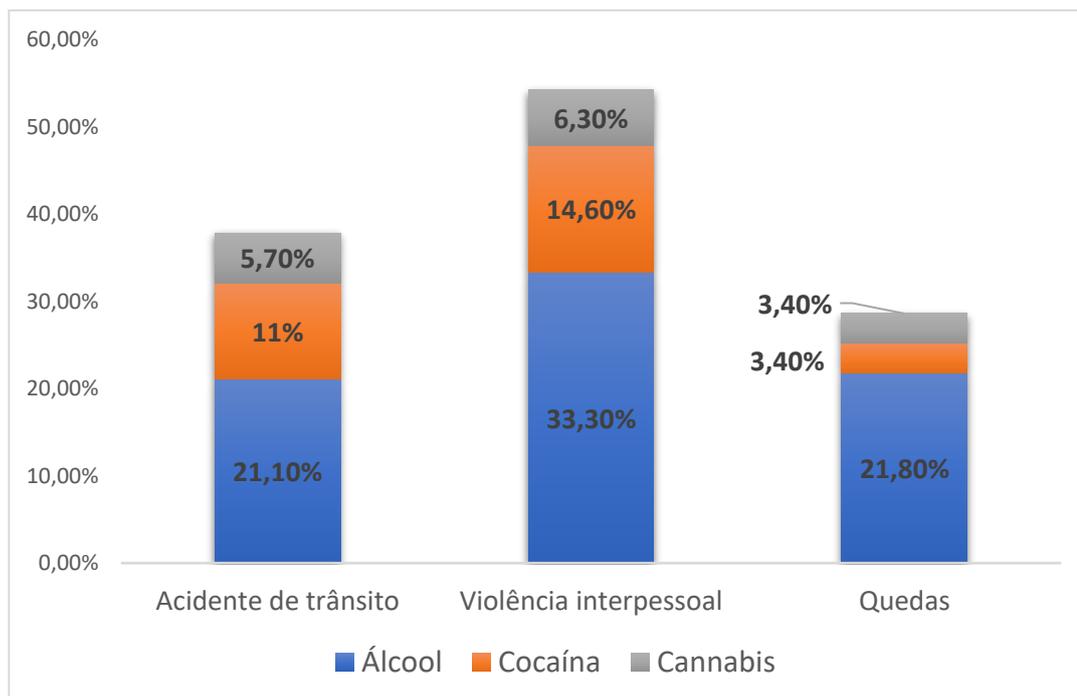


Figura 19. Prevalência de substâncias psicoativas em amostras de sangue de pacientes atendidos no Pronto Socorro Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (n=376), divididas de acordo com o tipo de acidente.

Acidentes ocorridos com indivíduos cujas amostras testaram positivo para algum tipo de substância tinham mais chances de ocorrer no período noturno (OR: 1,6, 95% IC: 1,2 – 2,2, $p < 0,01$). Apesar de haver uma tendência de aumento do consumo de álcool aos finais de semana (Figura 20), apenas foi encontrado uma associação estatisticamente significante entre o uso de alguma substância e ocorrência de acidentes de trânsito ($p = 0,02$) e entre o uso de álcool e ocorrência de violência interpessoal aos finais de semana ($p = 0,03$). Não houve diferença estatisticamente significante entre os meses do ano e o uso de substâncias psicoativas.

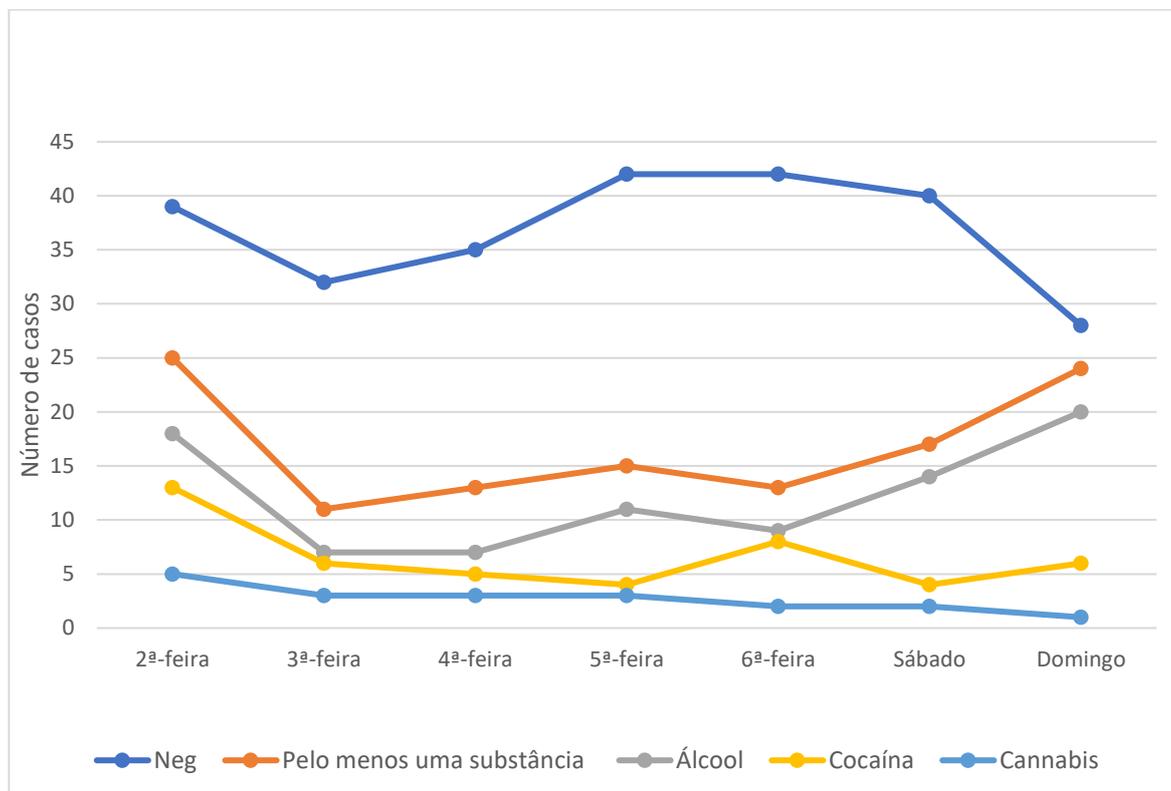


Figura 20. Número de amostras positivas para pelo menos uma substância psicoativa, álcool, cocaína e cannabis entre os pacientes apresentando lesões traumáticas atendidos e internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (n=376). Casos estão divididos entre os dias da semana.

O uso de mais de uma substância concomitantemente foi detectado em 32 pacientes. A combinação mais frequente foi álcool e cocaína, identificada em 25 amostras. Álcool e maconha foram utilizados simultaneamente por quatro pacientes e em apenas um caso, foi detectado o uso das três substâncias.

Dentre as 63 amostras referentes às vítimas de acidentes de trânsito que testaram positivo para pelo uma substância, 54% eram motoristas (n=34) e destes, 82,3% (n=28) eram motociclistas. Apenas considerando os condutores, 30% apresentaram resultados positivos para pelo menos uma substância. Os motociclistas apresentaram a maior prevalência do uso de cannabis entre todos os tipos de vítimas de acidentes de trânsito (9,6%, p=0,03). Um em cada quatro pedestres havia consumido pelo menos uma substância antes do acidente,

sendo as prevalências de álcool e cocaína, nestas amostras, iguais. Na Figura 21 estão apresentadas as prevalências de cada substância entre as vítimas de cada tipo de acidente.

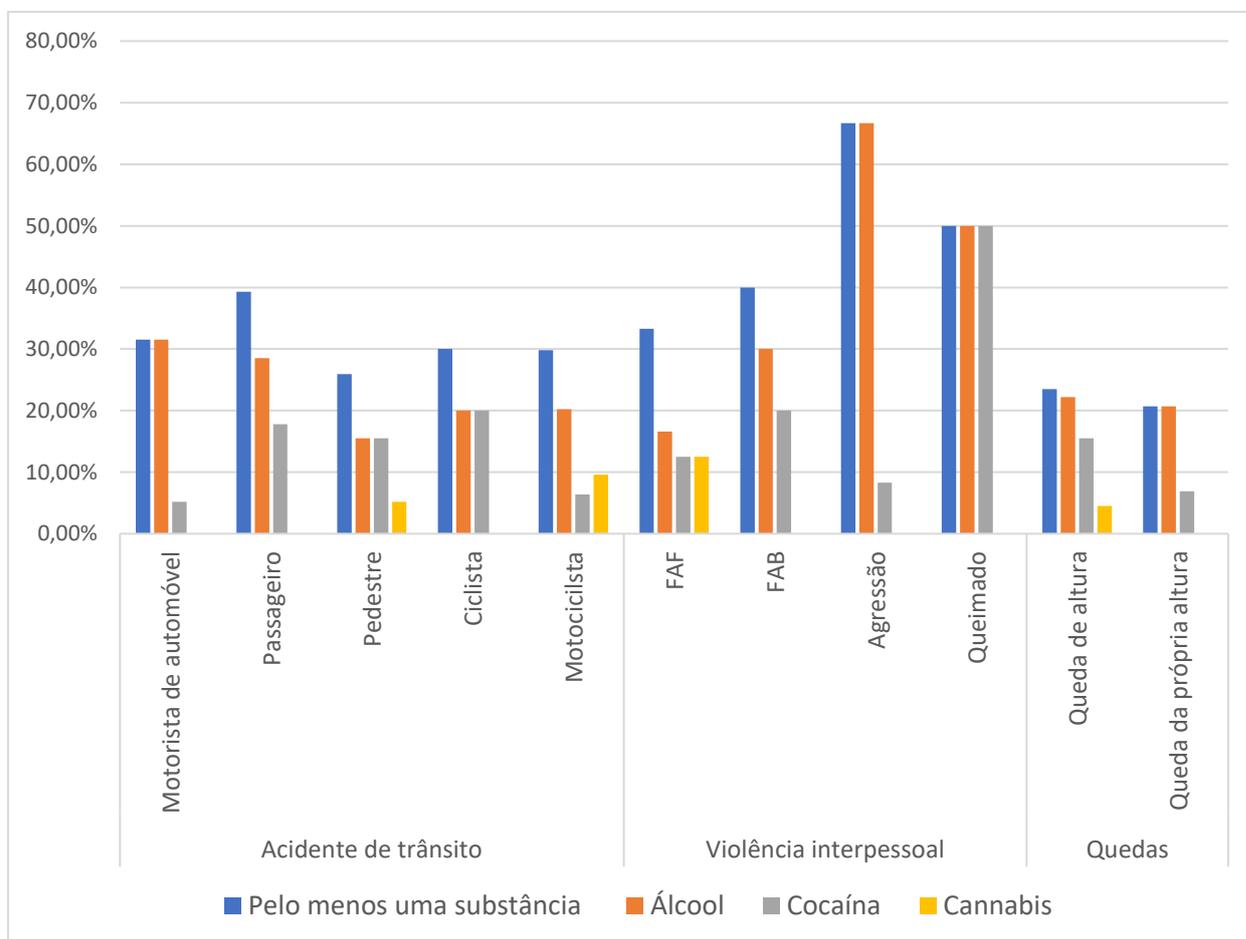


Figura 21. Porcentagem de amostras positivas de vítimas de acidentes com lesões traumáticas atendidas e internadas no Pronto Socorro Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (n=376). Estão divididos entre tipo de vítima e mecanismo de lesão em cada tipo de acidente.

Condutores cujas amostras de sangue testaram positivo para álcool apresentaram uma alcoolemia média de 1,1 g/L (95% IC: 0,85 – 1,37), acima da alcoolemia média das outras vítimas de acidente de trânsito (0,15 g/L, 95% IC: 0,07 – 0,22, $p < 0,01$), sendo que 80% destes pacientes, apresentaram BAC acima de 0,6 g/L.

10. Discussão

Ferimento é definido, pela OMS, como uma lesão corporal decorrente de uma superexposição aguda a qualquer forma de energia. Causas externas são aquelas em que o vetor de transferência de energia é exterior ao corpo ao qual a lesão foi infligida, por exemplo acidentes de trânsito, quedas, agressões e envenenamento, além de ser também considerada a intenção para ocorrência da lesão.

Em 2019, as causas externas foram a quarta principal causa de morte na população brasileira, com mais de 140 mil óbitos, atrás apenas de doenças do aparelho circulatório, neoplasias e do aparelho respiratório. Além das lesões fatais, foram contabilizadas mais de 1,2 milhão de internações devido às lesões decorrentes de causas externas. A grande maioria dos eventos provocados por agentes externos pode ser prevenida, quer seja por atenção do poder público através de políticas públicas apropriadas, ou por fiscalização policial. Dentro das causas externas, as agressões lideram o número de óbitos, com mais de 55 mil mortes em 2018, seguido pelos acidentes de trânsito (cerca de 33 mil), constituindo, respectivamente, a quinta e oitava causa de morte no Brasil em 2019. Entretanto, ao considerar apenas as internações, este perfil é modificado. As quedas apresentam números superiores (436 mil), seguido dos acidentes de trânsito (219 mil), enquanto as internações por agressões não passaram de 48 mil em 2019¹⁵⁷.

Muitas vezes os acidentes e lesões tem causas múltiplas, podendo ser causadas pelo paciente em si ou por causas alheias à pessoa atingida. De qualquer maneira, o uso de álcool e outras substâncias psicoativas aumenta o risco para a ocorrência de lesões¹⁴. O perfil de usuários dessas substâncias consiste em jovens adultos do sexo masculino, sendo que a associação entre sexo e idade e maiores riscos para acidentes já foi previamente descrito, isto é: jovens do sexo masculino tendem a ter maior envolvimento em atividades com maiores riscos¹⁷, corroborando os achados no presente trabalho.

O consumo de substâncias psicoativas pode ser detectado em diversas matrizes biológicas, entretanto a análise sanguínea é uma das únicas em que é

possível realizar a associação entre os achados toxicológicos e os efeitos psicofarmacológicos no SNC no momento em que a amostra foi coletada¹³. Em outras palavras, um resultado toxicológico positivo em amostras de sangue assegura que o indivíduo estava sob efeito no momento da coleta, podendo demonstrar uma relação entre causa e efeito do consumo da droga e a lesão¹⁵⁸. Outros estudos brasileiros envolvendo análises toxicológicas em pacientes atendidos em salas de emergência utilizaram fluido oral^{154,155} e urina¹⁵³ como matrizes biológicas. Apesar de as glândulas salivares serem bastante profundas e a transferência de substâncias da corrente sanguínea para a saliva ocorrer com certa facilidade, a correlação entre a concentração encontrada no fluido oral, muitas vezes não condiz com a concentração no sangue, podendo não refletir o real efeito daquela substância no SNC^{76,77}. Assim sendo, com a utilização do sangue para as análises toxicológicas no presente estudo, foi possível inferir sobre a influência das substâncias consumidas nas lesões apresentadas pelos pacientes.

Álcool e maconha são as duas principais substâncias consumidas por pacientes com lesões traumáticas atendidos em salas de emergência¹⁴. Já o consumo de outras drogas ilícitas altera-se de acordo com o país onde o estudo é realizado. Na Europa, por exemplo, estudos já apontaram o consumo de anfetaminas por pacientes^{150,152}. No Brasil, apesar de a maconha ser a droga ilícita mais consumida pela população de 15 a 64 anos¹²⁴, no presente estudo, o consumo desta droga foi superado pelo consumo de cocaína. Além disso, não foi detectado nenhum resultado positivo para anfetaminas (incluindo anfetamina, metanfetamina e MDMA). Apesar de o consumo de anfetamina já ter sido descrito no cenário brasileiro, por motoristas de caminhão^{107,108} para se manterem em alerta e dirigir horas sem descanso, o mesmo padrão aparentemente não se repete dentro da cidade de São Paulo. O uso de anfetamina e *ecstasy* já foi relatado, na literatura, como disseminado principalmente entre frequentadores de festivais de música, casas noturnas e *raves*¹⁵⁹. No Brasil, o uso de *ecstasy* e outros compostos anfetamínicos também está bastante relacionado com o perfil de frequentadores de casas noturnas e festivais de música eletrônica^{160,161,162}. Entretanto, os estudos realizados em âmbito nacional foram realizados de forma observacional e utilizando relatos dos

sujeitos incluídos sobre uso de drogas, o que poderia ter causado uma subnotificação do consumo. No âmbito do trânsito, estudo identificou a presença de MDMA, MDA e MDEA em amostras provenientes de motoristas vítimas fatais de acidentes de trânsito¹⁶³. Por outro lado, nos outros dois estudos brasileiros realizados com pacientes atendidos em salas de emergência, o consumo de anfetaminas não foi relatado^{154,155}. Desta maneira, outros estudos envolvendo análises toxicológicas são necessários para melhor conhecimento do padrão de uso de compostos anfetamínicos no Brasil.

O consumo de cocaína na forma de crack apresenta alta prevalência na cidade de São Paulo¹⁶⁴. Entretanto, o marcador biológico do consumo desta droga, a AEME, não foi detectada em nenhuma amostra acima dos valores de LOQ adotados. Este fato pode estar relacionado com a baixa meia-vida biológica e instabilidade molecular deste composto, o qual pode sofrer degradação espontânea *in vitro*, mesmo na presença de fluoreto de sódio¹⁰⁶.

O consumo de mais de uma substância simultaneamente pode aumentar ainda mais os riscos para a ocorrência de acidentes e lesões traumáticas, devido a um efeito sinérgico entre as substâncias. Este aumento é maior em comparação ao uso isolado de álcool ou outras substâncias^{14,150}. Já foi descrito na literatura que a combinação de substâncias mais comumente encontrada em pacientes com lesões é álcool e maconha¹⁴. Entretanto, os resultados aqui encontrados demonstraram que o álcool era mais frequentemente associado com a cocaína. O consumo de ambas as substâncias simultaneamente forma o composto cocaetilenó, cuja meia-vida biológica é superior à da cocaína, prolongando os efeitos estimulantes no SNC¹¹⁴, podendo contribuir para maiores chances para o envolvimento em acidentes e acontecimento de lesões. Além disso, pacientes com lesões traumáticas, apresentando resultados positivos para cocaetilenó possuem uma maior probabilidade de necessitar de tratamento intensivo após a lesão¹⁶⁵.

A maioria dos estudos, tanto nacionais quanto internacionais, relacionando o consumo de substâncias psicoativas entre pacientes atendidos em salas de emergência, incluem apenas pacientes provenientes de acidentes de trânsito, muitas vezes apenas motoristas. Entretanto, vítimas de outros tipos

de mecanismos de trauma, como quedas e violência, constituíram praticamente a metade dos pacientes incluídos no presente estudo. Apesar de pacientes com lesões decorrentes de violência interpessoal corresponderem a apenas 12% da população estudada, estes apresentaram a maior prevalência do uso de álcool e outras drogas. Na cidade de São Paulo já foi descrito uma alta prevalência de substâncias em vítimas fatais tanto de quedas, como de violência¹²⁹. Na Noruega, foram identificadas taxas ainda mais elevadas do consumo de álcool e drogas ilícitas por pacientes desses dois tipos de traumas. Álcool esteve presente em 66% dos pacientes vítimas de violência e em 23% das quedas, enquanto drogas ilícitas foram consumidas por 24% daquele grupo e 5% deste¹⁵⁰.

Apesar de a correlação entre violência e o consumo de drogas ser algumas vezes de difícil estudo¹⁶⁶, alguns estudos já apontaram que o aumento no consumo de substâncias psicoativa, principalmente cocaína, já foi relacionado com aumento na criminalidade em algumas cidades¹⁶⁷. Além disso, o consumo de drogas ilícitas por vítimas fatais, necropsiadas na cidade de São Paulo, foi associada com a existência de registros criminais prévios pela vítima¹²⁹. Os pacientes incluídos no presente estudo eram em sua maioria do sexo masculino. Homens que relataram o consumo de álcool em combinação com outras drogas apresentam uma chance sete vezes maior de reportar uma lesão relacionada com a violência¹⁶⁸.

Outro mecanismo de trauma importante para a ocorrência de lesões fatais e não fatais são as quedas. Mais de um terço dos pacientes incluídos no presente estudo sofreram quedas, sendo que praticamente 30% destes, consumiram alguma substância antes do incidente. O uso de substâncias psicoativas já foi fortemente associado com lesões decorrentes de quedas^{150,169}. A prevalência encontrada, no presente estudo, do consumo de cocaína e maconha foi de 3,4%, para cada substância. Dados similares foram encontrados por Bogstrand et al. (2011), onde 5% dos pacientes atendidos com lesões por quedas haviam consumido drogas ilícitas¹⁵⁰. Já em estudo mais recente, foi encontrada uma prevalência três vezes maior para o consumo de drogas ilícitas em pacientes com lesões por quedas, sendo anfetamina a principal droga

consumida. No mesmo estudo, constatou-se que a prevalência do uso de drogas por pacientes com lesões por outros mecanismos era consideravelmente inferior (11% para álcool e 6% drogas ilícitas)¹⁷⁰.

Uma das principais causas de lesões por quedas é a queda de própria altura. As principais vítimas são os idosos, que por dificuldades de deambulação podem acabar sofrendo a queda. Apesar de na população estudada, os casos de queda de própria altura terem sido a minoria dos pacientes atendidos (n = 29), foi possível constatar que esses pacientes eram mais velhos em comparação aos pacientes de outros mecanismos de trauma. Idosos tendem a consumir uma quantidade maior de medicamentos alterando as capacidades cognitivas e psicomotoras acarretando maiores chances de quedas^{150,171}. A detecção de medicamentos psicoativos não foi possível no presente estudo, desta forma, a causa de precipitação por idosos precisa ser melhor estudada.

A principal causa de lesão traumática atendida no HCFMUSP, no período estudado, foram os acidentes de trânsito, correspondendo a mais da metade dos pacientes incluídos. Dentre este grupo, os motociclistas corresponderam pela grande maioria. Diferentemente dos países desenvolvidos, nos países de baixa e média renda, o número de motociclistas representa uma proporção significativa de usuários no trânsito. Este grupo apresenta maior vulnerabilidade e maiores chances de lesões em comparação aos condutores de outros veículos¹⁷², principalmente quando sob influência de álcool e outras drogas.

Na Tailândia, motociclistas corresponderam à grande maioria (89%) dos acidentados atendidos em um departamento de emergência¹⁷³. Em Malawi, na África, 12% dos pacientes admitidos em um hospital eram motociclistas, sendo que 24% destes estavam sob efeito de álcool¹⁷⁴.

A alta proporção de motociclistas lesionados reflete uma crescente tendência no Brasil e na cidade de São Paulo. Nos últimos dois anos o número de motociclistas fatalmente lesionados tem crescido constantemente na capital paulista, sendo que em 2018, foram elevados ao grupo com maior mortalidade no trânsito, ultrapassando os pedestres¹⁷⁵. Sendo essa tendência também observada em uma escala nacional¹⁷⁶.

Nos últimos anos, a crise econômica e o crescimento do desemprego no Brasil forçaram trabalhadores a procurarem novas fontes de renda. O aparecimento de diversos aplicativos de entregas de todo tipo de bem alavancou um crescimento do número de motociclistas em todo o país, principalmente na cidade de São Paulo. Entretanto, tais entregadores por aplicativos não são legalmente contratados por essas empresas, não sendo, desta forma, considerados motociclistas profissionais. Segundo a legislação brasileira, motociclistas profissionais (motoboys) devem completar cursos de direção defensiva e utilizar equipamentos de proteção apropriados¹⁷⁷. Entretanto, motociclistas autônomos, não são amparados por esta lei e nem possuem qualquer suporte das empresas de entregas. Ainda, incentivos financeiros para entregas rápidas podem contribuir para uma direção mais arriscada e com menor segurança, podendo ser a causa para acidentes, visto que motociclistas tendem a não respeitar limites de velocidade em uma proporção maior do que outros veículos¹⁷⁸.

Juntamente com os motociclistas, os pedestres também apresentam grande vulnerabilidade para lesões decorrentes de acidentes no trânsito. Conhece-se muito pouco da influência do álcool e outras drogas no tempo de reação, julgamento e comportamento impulsivo em pedestres e passageiros¹⁶. Na maioria dos estudos em salas de emergência, pedestres não são incluídos. Em outros países, o consumo de álcool por pedestres lesionados foi ainda maior do que o encontrado no presente estudo^{150,174}. Por outro lado, o consumo de drogas ilícitas, principalmente cocaína foi mais prevalente neste estudo. O consumo de cocaína por pedestres foi o dobro do encontrado em outro estudo brasileiro¹⁵⁴. A análise da acidentalidade de pedestre é desafiadora, uma vez que diversos fatores estão envolvidos. Entretanto, altas prevalências do consumo de álcool e drogas em pedestres que foram a óbito e gravemente lesionados demonstram a necessidade de maior atenção na prevenção destes acidentes^{179,180}.

Dentre os condutores de todos os tipos de veículos, praticamente um em cada três havia consumido alguma substância psicoativa antes do acidente. No âmbito internacional, estudos apontaram o consumo de álcool por 14 a 26% dos

pacientes, sendo a maconha consumida por 5 a 8% e cocaína por 1 a 3% dos pacientes incluídos nos estudos^{136,150-152}.

A principal substância psicoativa consumida pelos condutores foi o álcool. O prejuízo causado pelo álcool ocorre progressivamente de acordo com a quantidade ingerida, sendo que a cada dose de álcool o risco para acidentes aumenta em 13%¹⁶. Ainda que outras drogas apresentem grandes prejuízos para o usuário, o álcool ainda é a droga que causa os maiores prejuízos e riscos para a ocorrência de lesões, sendo a mais prevalente substância detectada em pacientes atendidos em hospitais^{14,16,133}.

A legislação brasileira adotou uma tolerância zero em relação a dirigir sob efeito de álcool. De acordo com o Código de Trânsito Brasileiro (CTB) em seu artigo 165, é considerado uma ofensa administrativa dirigir sob a influência de álcool ou qualquer substância que cause dependência, independentemente da concentração de álcool no organismo. Já no artigo 306 do CTB, é considerado crime conduzir veículo automotor com concentração igual ou superior a 0,6 g de álcool por litro de sangue¹⁸¹. No presente estudo, a alcoolemia média dos condutores incluídos, foi de 1,1 g/L, sendo que 80% destes apresentavam alcoolemia superior a 0,6 g/L. De acordo com a legislação vigente, tais condutores deveriam responder legalmente pelo crime de trânsito. Entretanto, não há qualquer determinação legal para que amostras de condutores lesionados e hospitalizados sejam coletadas e conduzidas para análises toxicológicas. Em recente revisão da literatura, Green et al., (2015), investigaram as consequências legais para motoristas lesionados e que estavam sob efeito de álcool. Surpreendentemente, foi encontrado que a maioria dos motoristas não é propriamente acusado ficando imune às sanções que deveriam ser aplicadas. Ainda, apontaram alguns fatores para as baixas taxas de acusação como: acesso limitado de policiais durante procedimento de emergência; dificuldade na identificação da intoxicação; falta de recursos e materiais adequados para fiscalização; dificuldade em se obter uma medida de alcoolemia legalmente aceita; simpatia pelo paciente lesionado; confidencialidade entre médico e paciente, entre outros¹⁸². O ideal seria a existência de um serviço de triagem toxicológica no hospital, a fim de analisar amostras de pacientes atendidos para

a presença de álcool e outras drogas. Desta maneira, os condutores sob efeitos de substâncias responderiam apropriadamente às consequências legais de seus atos. Além disso, a presença dessas substâncias pode interferir nos tratamentos médicos e cirúrgicos dos pacientes¹⁵⁰, sendo o conhecimento de seu consumo de grande importância para os profissionais de saúde envolvidos no tratamento das lesões.

Estudo recente na cidade de São Paulo apontou uma redução na taxa de condutores dirigindo sob influência de álcool¹⁷⁸. Por outro lado, a prevalência do consumo de álcool e outras drogas entre vítimas fatais de acidentes de trânsito continua alta¹²⁹. A fiscalização do uso de álcool foi provavelmente um dos principais fatores para a redução na incidência do uso de álcool por motoristas. Entretanto, algumas lacunas na fiscalização ainda impedem maior eficácia. Atualmente, o motorista abordado tem a possibilidade de se recusar à realização do teste de etilômetro, baseado na Convenção Americana de Direitos Humanos (Pacto de São José da Costa Rica), a qual o Brasil é signatário. Recentemente, a taxa de recusa na cidade de São Paulo atingiu 80% dos motoristas abordados em ações policiais¹⁷⁸. O motorista que se recusar a ser submetido ao teste de verificação de embriaguez sofre as penas estabelecidas no artigo 165-A do CTB, porém, pode ficar livre de sanções mais graves. Além disso, a fiscalização do consumo de outras drogas além do álcool não é realizada de maneira sistemática em nosso país. A falta de instrumentos sensíveis e capazes de detectar a presença de substâncias, além da falta de infraestrutura para confirmação das amostras coletadas, diminuem a capacidade de fiscalização policial neste tópico.

A verificação do consumo de substâncias psicoativas por acidentados é de suma importância, tanto do ponto de vista legal, como do ponto de vista clínico. O consumo de álcool e drogas está fortemente associado com aumento da gravidade das lesões¹⁸³, sendo que esses pacientes permanecem internados por um maior período de tempo, utilizando mais recursos hospitalares e normalmente possuem piores taxas de recuperações em comparação aos pacientes que não fizeram o uso de qualquer substância¹⁸².

Acidentes e lesões traumáticas ocasionadas pelo consumo de álcool e outras drogas são causas passíveis de serem evitadas. O Sistema Único de

Saúde (SUS) encontra-se, na maioria dos locais de atendimento, sobrecarregado e com poucos leitos disponíveis. O SUS é, na maioria das vezes a porta de entrada de vítimas com lesões traumáticas, sendo que a diminuição de lesões decorrentes do uso de substâncias psicoativas, principalmente acidentes de trânsito, poderia acarretar numa diminuição da carga sobre os hospitais públicos brasileiros, liberando leitos de UTI e enfermarias, necessários para outras causas, como por exemplo pandemias como da COVID-19. Além das lesões traumáticas, políticas públicas apropriadas poderiam prevenir outras causas de hospitalização pelo uso de drogas, como doenças transmissíveis e outras desordens causadas pelo abuso dessas substâncias.

O real impacto do consumo de álcool e outras drogas pela população brasileira ainda é incerto e mais estudos precisam ser realizados em uma escala nacional. A abordagem do consumo/abuso de drogas precisa ser realizada de maneira abrangente e multidisciplinar, uma vez que existem interações complexas na relação do abuso de drogas e risco de mortalidade, como questões sociais, econômicas e comunitária¹⁴⁵. A falta de coleta sistemática de dados a nível nacional diminui as possibilidades da aplicação de políticas públicas adequadas para cada tipo de situação e região do país.

Este trabalho foi o primeiro em âmbito nacional a avaliar o consumo de álcool e outras drogas por vítimas não fatais de acidentes de trânsito, violência interpessoal e quedas, utilizando amostras de sangue para análises toxicológicas, com o intuito de correlacionar a causa do acidente com o uso de substâncias psicoativas. Apesar de apenas pacientes severamente lesionados terem sido incluídos, os resultados encontrados poderão servir de subsídio para implementação de políticas públicas baseadas em evidências com o intuito de prevenir o consumo dessas substâncias, além de diminuir os casos de internações decorrentes de lesões, aliviando tanto o SUS como a rede auxiliar de saúde do fardo ocasionado pelo consumo de substâncias psicoativas.

11. Conclusões

No presente estudo foi identificado uma alta prevalência do consumo de substâncias psicoativas por pacientes com lesões traumáticas. De maneira geral, 31,4% dos pacientes atendidos no PSC HCFMUSP haviam consumido álcool e/ou drogas ilícitas antes do acontecimento da lesão. O álcool foi a substância mais consumida (23%), seguida da cocaína (12%) e maconha (5%).

A maioria dos pacientes incluídos no estudo apresentavam lesões decorrentes de sinistros de trânsito, sendo os motociclistas e pedestres os mais prevalentes dentre este grupo. Apesar de as vítimas de violência interpessoal terem sido a minoria (12%), apresentaram a maior prevalência do uso de álcool e/ou drogas (43,8%).

No geral, os pacientes que apresentaram resultados positivos eram em sua maioria do sexo masculino, mais jovens do que aqueles que não consumiram nenhuma substância, solteiros e possuíam ensino médio completo. Além disso, acidentes relacionados com o uso de álcool e/ou drogas, possuíam maior probabilidade de ocorrerem no período noturno.

12. Referências

1. Moffat AC, Osselton MD, Widdop B. *Clarke's analysis of drugs and poisoning*. 4th ed. Londres, UK: Pharmaceutical Press; 2011.
2. Levine B. *Principles of Forensic Toxicology*. 3rd ed. Washington, DC: AACC Press; 2010.
3. Smith MP, Bluth MH. Forensic Toxicology: An Introduction. *Clin Lab Med*. 2016; 36: 753-9.
4. Goldberg BA, Wilkins DG. Analytical and Forensic Toxicology. In: Klassen CD. *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. Mc Graw Hill; 2013. Chap. 32, p. 1357-74.
5. United Nations Office on Drugs and Crime. World Drug Report 2019. Executive Summary. Viena: UNODC; 2019.
6. Chung H, Choe S. Challenges in forensic toxicology. *Aust J Forensic Sci*. 2019. [Epub], DOI: 10.1080/00450618.2019.1567812.
7. United Nations Office on Drugs and Crime. World Drug Report 2020. Executive Summary. Viena: UNODC; 2020
8. Jemal M, Ouyang Z, Xia YQ. Systematic LC-MS/MS bioanalytical method development that incorporates plasma phospholipids risk avoidance, usage of incurred sample and well thought-out chromatography. *Biomed Chromatogr*. 2010; 24:2-19.
9. Stimpfl T. Extraction. In: Moffat AC, Osselton MD, Widdop B. *Clarke's analysis of drugs and poisoning*. Pharmaceutical Press; 2011. Chap 29, p.458-70.
10. Maertens A, Hartung T. Green Toxicology-Know Early About and Avoid Toxic Product Liabilities. *Toxicol Sci*. 2018; 161:285-9.
11. Anastas PT. Green Chemistry and the Role of Analytical Methodology Development. *Crit Rev Anal Chem*. 1999; 29: 167-75.
12. Venson R, Korb AS, Cooper G. A review of the application of hollow-fiber liquid-phase microextraction in bioanalytical method – A systematic approach with focus on forensic toxicology. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2019. [Epub], Doi: 10.1016/j.jchromb.2019.01.006.
13. Gjerde H, Øiestad EL, Christophersen AS. Using biological samples in epidemiological research on drugs of abuse. *Norsk Epidemiologi*. 2011;21:5–14.
14. Cherpitel CJ, Ye Y, Andreucetti G, Stockwell T, Vallance K, Chow C, Brubacher JR. Risk of injury from alcohol, marijuana and other drug use among emergency department patients. *Drug Alcohol Depend*. 2017; 174: 121-7.

15. Hels T, Lyckegaard A, Simonsen KW, Steentoft A, Bernhof IM. Risk of severe driver injury by driving with psychoactive substances. *Accid. Anal. Prev.* 2013; 59: 346-56.
16. Borges G, Monteiro M, Cherpitel CJ, Orozco R, Ye Y, Poznyak V. Alcohol and road traffic injuries in Latin America and the Caribbean: a case-crossover study. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2017; 41: 1731-7.
17. Kelly E, Darke S, Ross J. A review of drug use and driving: epidemiology, impairment risk factors and risk perceptions. *Drug Alcohol Rev.* 2004; 23: 319-44.
18. Flanagan RJ, Taylor A, Watson ID, Whelpton. *Fundamentals of Analytical Toxicology*. 1st ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltda, 2007.
19. Moreau RLM, Siqueira MEPB. *Toxicologia Analítica*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.
20. Sajid M, Nazal MK, Rutkowska M, Szczepańska N, Namieśnik J, Płtka-Wasyłka J. Solid Phase Microextraction: Apparatus, Sorbent Materials, and Application. *Crit Rev Anal Chem.* 2019; 49: 271-88.
21. Burato JSS, Medina DAV, Toffoli AL, Maciel EVSM, Lanças FM. Recent advances and trend in miniaturized sample preparation techniques. *J Sep Sci.* 2020; 43: 202-225.
22. Borden SA, Palaty J, Termopoli V, Famigliani G, Cappiello A, Gill CG, Palma P. Mass Spectrometry Analysis of Drugs of Abuse: Challenges and Emerging Strategies. *Mass Spectrom Rev.* 2020; 39: 703-44.
23. Gałuska A, Migaszewski Z, Namieśnik J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *Trends Analyt Chem.* 2013; 50: 78-84.
24. Tobiszewski M. Metrics for green analytical chemistry. *Anal Methods.* 2016; 8: 2993-9.
25. Fillippou O, Bitas D, Samanidou V. Green approaches in sample preparation of bioanalytical samples prior to chromatographic analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2017; 1043: 44-62.
26. Ghosh C. Green bioanalysis: some innovative ideas towards green analytical techniques. *Bioanalysis.* 2012; 11: 1377-91.
27. Arthur CL, Pawliszyn J. Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Anal Chem.* 1990; 62: 2145-8.
28. Souza-Silva ÉA, Reyes-Garcés N, Gómez-Ríos GA, Boyaci E, Bojko B, Pawliszyn J. A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices III. Bioanalytical and clinical applications. *Trends Analyt Chem.* 2015; 71: 249-64.
29. Pragst F. Application of solid-phase microextraction in analytical toxicology. *Anal Bioanal Chem.* 2007; 388: 1393-414.
30. Goryński K, Goryńska P, Górska A, Harężlak T, Jaroch A, Jaroch K, Lendor S, Skobowiat C, Bojko B. SPME as a promising tool in translational medicine

- and drug discovery: From bench to bedside. *J Pharm Biomed Anal.* 2016; 130: 55-67
31. Pawliszyn J. Theory of solid-phase microextraction. *J Chromatogr Sci.* 2000; 38: 270-8.
 32. Boyaci E, Rodríguez-Lafuente Á, Gorynski K, Mirnaghi F, Souza-Silva ÉA, Hein D, Pawliszyn J. Sample preparation with solid phase microextraction and exhaustive extraction approaches: Comparison for challenging cases. *Anal Chim Acta.* 2015. [Epub], Doi: 10.1016/j.aca.2014.12.051.
 33. Kataoka H, Saito K. Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis. *J Pharm Biomed Anal.* 2011; 54: 926-50.
 34. He Y, Concheiro-Guisan M. Microextraction sample preparation techniques in forensic analytical toxicology. *Biomed Chromatogr.* 2019; 33 [Epub], Doi: 10.1002/bmc.4444.
 35. Camino-Sánchez FJ, Rodríguez-Gómez R, Zafra-Gómez A, Santos-Fandila A, Vílchez JL. Stir bar sorptive extraction: recente applications, limitations and future trends. *Talanta.* 2014. [Epub], Doi: 10.1016/j.talanta.2014.07.022.
 36. Merola G, Gentili S, Tagliaro F, Macchia. Determination of diferente recreational drugs in hair by HS-SPME and GC/MS. *Anal Bioanal Chem.* 2010; 397: 2987-95.
 37. Hijaz F, Gmitter FG, Bai J, Baldwin E, Biotteau A, Leclair C, McCollum TG, Plotto. Effect of fruit maturity on volatiles and sensory descriptors of four mandarin hybrids. *J Food Sci.* 2020; 85: 1548-64.
 38. Belletti N, Ndagijimana M, Sisto C, Guerzoni ME, Lanciotti R, Gardini F. Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem.* 2004. [Epub], Doi: 10.1021/jf049444v.
 39. Peruga A, Beltrán J, López F, Hernández F. Determination of methylisothiocyanate in soil and water by HS-SPME followed by GC-MS-MS with a triple quadrupole. *Anal Bioanal Chem.* 2014; 406: 5271-82.
 40. Toledo FCP, Yonamine M, Moreau RLM, Silva OA. Determination of cocaine, benzoylecgonine and cocaethylene in human hair by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003; 798: 361-5.
 41. Gentili S, Cornetta M, Macchia T. Rapid screening procedure based on headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for the detection of many recreational drugs in hair. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004; 801: 289-96.
 42. Anzillotti L, Marezza F, Calò L, Andreoli R, Agazzi S, Bianchi F, Careri M, Cecchi R. Determination of synthetic and natural cannabinoids in oral fluid by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography/mass spectrometry: A pilot study. *Talanta.* 2019; 201: 335-41.
 43. Yonamine M, Tawil N, Moreau RLM, Silva OA. Solid-phase micro-extraction-gas chromatography-mass spectrometry and headspace-gas chromatography of tetrahydrocannabinol, amphetamine, methamphetamine,

- cocaine and ethanol in saliva samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003; 789: 73-8.
44. Brown SD, Rhodes DJ, Pritchard BJ. A validated SPME-GC-MS method for simultaneous quantification of club drugs in human urine. *Forensic Sci Int.* 2007; 171: 142-50.
 45. Gentili S, Mortali C, Mastrobattista L, Beretta P, Zaami S. Determination of different recreational drugs in sweat by headspace solid-phase microextraction gas chromatography mass spectrometry (HS-SPME GC/MS): Application to drugged drivers. *J Pharm Biomed Anal.* 2016. [Epub], Doi: 10.1016/j.jpba.2016.07.018.
 46. Liu H, Dasgupta PK. Analytical chemistry in a drop. Solvent extraction in a microdrop. *Anal Chem.* 1996; 68: 1817-21.
 47. Sarafraz-Yazdi A, Amiri A. Liquid-phase microextraction. *Trends Analyt Chem.* 2010; 29: 1-14.
 48. Alsharif AMA, Tan GH, Choo YM, Lawal A. Efficiency of hollow-fiber liquid-phase microextraction chromatography methods in separation of organic compounds: a review. *J. Chromatogr Science*, 2016; 1-14.
 49. Burato JSS, Medina DAV, Toffoli AL, Maciel EVS, Lanças FM. Recent advances and trends in miniaturized sample preparation techniques. *J Sep Sci.* 2020; 43: 202-25.
 50. Yousefi SM, Shemirani F, Ghorbanian SA. Enhanced headspace single drop microextraction method using deep eutectic solvent based magnetic bucky gels: Application to the determination of volatile aromatic hydrocarbons in water and urine samples. *J Sep Sci.* 2018; 41: 966-74.
 51. Razaee M, Assadi Y, Hosseini MRM, Aghaee E, Ahmadi F, Berijani S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *J Chromatogr A.* 2006; 1116: 1-9.
 52. Zgoła-Grześkowiak A, Grześkowiak T. Dispersive liquid-liquid microextraction. *Trends Analyt Chem.* 2011; 30: 1382-99.
 53. Mansour FR, Khairy MA. Pharmaceutical and biomedical applications of dispersive liquid-liquid microextraction. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2017; 1061-1062: 382-91.
 54. De Boek M, Dehaen W, Tytgat J, Cuypers E. Ionic Liquid-Based Liquid-Liquid Microextraction for Benzodiazepine Analysis in Postmortem Blood Samples. *J Forensic Sci.* 2018; 63: 1875-79.
 55. Lin Z, Li Jiaolun, Zhang X, Qiu M, Huang Z, Rao Y. Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of seven recreational drugs in human whole blood using gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2017; 1046:177-84.
 56. Odoardi S, Fisichella M, Romolo FS, Strano-Rossi. High-throughput screening for new psychoactive substances (NPS) in whole blood by DLLME

- extraction and UHPLC-MS/MS analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2015; 1000: 57-68.
57. Gardner MA, Sampsel S, Jenkins WW, Owens JE. Analysis of fentanyl in urine by DLLME-GC-MS. *J Anal Toxicol.* 2015; 39: 118-25.
 58. Meng L, Chen S, Zhu B, Zhang J, Mei Y, Cao J, Zheng K. Application of dispersive liquid-liquid microextraction and GC-MS/MS for the determination of GHB in beverages and hair. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2020; 1144:122058 [Epub] Doi: 10.1016/j.jchromb.2020.122058
 59. Vincenti F, Montesano C, Cellucci L, Gregori A, Fanti F, Compagnone D, Curini R, Sergi M. Combination of pressurized liquid extraction with dispersive liquid liquid micro extraction for the determination of sixty drugs of abuse in hair. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2019; 1605: 360348 [Epub] Doi: 10.1016/j.chroma.2019.07.002.
 60. Fernández P, Regenjo M, Ares A, Fernández AM, Lorenzo RA, Carro AM. Simultaneous determination of 20 drugs of abuse in oral fluid using ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction. *Anal Bioanal Chem.* 2018; 411: 193-203.
 61. Havlikova M, Cabala R, Pacakova V, Bosakova Z. Critical evaluation of microextraction pretreatment techniques – Part 2: Membrane supported and homogenous phase based techniques. *J Sep Sci.* 2019; 42: 303–318.
 62. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction. *J Chromatogr A.* 2008; 14: 132-42.
 63. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. *Anal Chem.* 1999; 15: 2650-6.
 64. De Bairros AV, Lanaro R, de Almeida RM, Yonamine M. Determination of ketamine, norketamine and dehydronorketamine in urine by hollow-fiber liquid-phase microextraction using an essential oil as supported liquid membrane. *Forensic Sci Int.* 2014; 243: 47-54.
 65. Gjelstad A, Jensen H, Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S. Kinetic aspects of hollow fiber liquid-phase microextraction and electromembrane extraction. *Anal Chim Acta.* 2012; 12: 10-6.
 66. Pedersen-Bjergaard S. Electromembrane extraction – looking into the future. *Anal Bioanal Chem.* 2018; 411: 1687-1693.
 67. Dolan K, Rouen D, Kimber J. An overview of the use of urine, hair, sweat and saliva to detect drug use. *Drug Alcohol Rev.* 2004; 23: 213-7.
 68. Allen KR. Screening for drugs of abuse: which matrix, oral fluid or urine?. *Ann Clin Biochem.* 2011; 48: 531-41.
 69. Drummer OH. Drug testing in oral fluid. *Clin Biochem Rev.* 2006; 27: 147-59.

70. Drummer OH. Pharmacokinetics and Metabolism. In: Moffat AC, Osselton MD, Widdop B. *Clarke's analysis of drugs and poisoning*. Pharmaceutical Press; 2011. Chap 24, p.388 - 400.
71. Fu S. Adulterants in Urine Drug Testing. *Adv Clin Chem*. 2016; 76: 123-63.
72. Kintz P. Hair Analysis. In: Moffat AC, Osselton MD, Widdop B. *Clarke's analysis of drugs and poisoning*. Pharmaceutical Press; 2011. Chap 19, p.323 - 333.
73. Lendoiro E, de Castro A, Jiménez-Morigosa C, Gomez-Fraguela XA, López-Rivadulla M, Cruz A. Usefulness of hair analysis and psychological test for identification of alcohol and drugs of abuse consumption in driving license regranting. *Forensic Sci Int*. 2018; 286: 239-44.
74. Leyton V, Andreuccetti G, Júnior AESM, dos Santos MF, Bombana HS, Walls HC, Greve JMA, de Carvalho HB, Montal JHC, Adura FE, Yonamine M. Hair testing: na ineffective DUI strategy in Brazil. *Addiction*. 2018; 113: 374-6.
75. Aps JKM, Martens LC. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci Int*. 2005; 150: 119-31.
76. Bakke E, Høiseth G, Arnestad M, Gjerde H. Detection of Drugs in Simultaneously Collected Samples of oral Fluid and Blood. *J Anal Toxicol*. 2019; 43: 228-32.
77. Vindenes V, Lund HME, Andersen W, Gjerde H, Ikdahl SE, Christophersen AS, Øiestad EL. Detection of drugs of abuse in simultaneously collected oral fluid, urine and blood from Norwegian drivers. *Forensic Sci Int*. 2012; 219: 165-71.
78. Langel K, Gjerde H, Favretto D, Lillsunde P, Øiestad EL, Ferrara SD, Verstraete AG. Comparison of drug concentrations between whole blood and oral fluid. *Drug Test Anal*. 2014; 6: 461-71.
79. Dobri SCD, Moslehi AH, Davies TC. Are oral fluid testing devices effective for the roadside detection of recent cannabis use? A systematic review. *Public Health*. 2019; 171: 57-65.
80. Musshoff F, Hokamp EG, Bott U, Madea B. Performance evaluation of on-site oral fluid drug screening devices in normal police procedure in Germany. *Forensic Sci Int*. 2014; 238: 120-4.
81. Jones G. Postmortem Toxicology. In: Moffat AC, Osselton MD, Widdop B. *Clarke's analysis of drugs and poisoning*. Pharmaceutical Press; 2011. Chap 10, p.176 - 189.
82. Gallardo E, Queiroz JA. The role of alternative specimens in toxicological analysis. *Biomed Chromatogr*. 2008; 22: 795-821.
83. Scientific Working Group for Forensic Toxicology. *Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology*. SWGTox, 2013.
84. American Academy of Forensic Sciences Standards Board. *Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology*. Colorado Springs; ASB, 2019.

85. Armbruster DA, Pry T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin Biochem Rev.* 2008; 29: 49-52
86. Almeida AM, Castel-Branco MM, Falcão AC. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2002; 774: 215-222.
87. Pena-Pereira F, Wojnowski W, Tobiszewski M. AGREE – Analytical GREEnness Metric Approach and Software. *Anal Chem.* 2020; 92: 10076-82.
88. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE, Brekke An, Ho TS, Halvorsen TG. Liquid-phase microextraction of basic drugs – selection of extraction moe based on computer calculated solubility data. *J Sep Sci.* 2005; 28: 1195-203.
89. Kokosa JM. Selecting an extraction solvent for a greener liquid phase microextraction (LPME) mode-based analytical method. *Trends Analyt Chem.* 2019; 118: 238-47.
90. De Oliveira SCWSEF, Yonamine M. Measurement uncertainty for the determination of amphetamines in urine by liquid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Forensic Sci Int.* 2016; 265: 81-8.
91. Pantaleão LN, Paranhos BAPB, Yonamine M. Hollow-fiber liquid-phase microextraction of amphetamine-type stimulants in human hair samples. *J Chromatogr A.* 2012; 1254: 1-7.
92. Silveira GO, Belitsky ÍT, Loddi S, de Oliveira CDR, Zucoloto AD, Fruchtengarten LVG, Yonamine M. Development of a method for the determination of cocaine, cocaethylene and norcocaine in human breast milk using liquid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Forensic Sci Int.* 2016; 265: 22-28.
93. Pego AMF, Roveri FL, Kuninari RY, Leyton V, Miziara ID, Yonamine M. Determination of cocaine and its derivatives in hair samples by liquid phase microextraction (LPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *Forensic Sci Int.* 2017; 274: 83-90.
94. Dos Santos MF, Ferri CC, Seulin SC, Leyton V, Pasqualucci CAG, Muñoz DR, Yonamine. Determination of antidepressants in whole blood using hollow-fiber liquid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Forensic Toxicol.* 2014; 32: 214-24.
95. Halvorsen TG, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. Reduction of extraction times in liquid-phase microextraction. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2001; 760: 219-26.
96. Ho TS, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. Liquid-phase microextraction of protein-bound drugs under non-equilibrium conditions. *Analyst.* 2002; 127: 608-13.
97. Bortolotti F, Gottardo R, Pascali J, Tagliaro. Toxicokinetics of cocaine and metabolites: the forensic toxicological approach. *Curr Med Chem.* 2012; 19: 5658-63.

98. Takitane J, Leyton V, Andreuccetti G, Gjerde H, Vindenes V, Berg T. Determination of cocaine, metabolites and a crack cocaine biomarker in whole blood by liquid-liquid extraction and UHPLC-MS/MS. *Forensic Sci Int.* 2018; 289: 165-74.
99. Cabal LFR, Medina DAV, Costa JL, Lanças FM, Santos-Neto. Determination of ring-substituted amphetamines through automated online hollow fiber liquid-phase microextraction- liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem.* 2019; 411: 7889-97.
100. Emídio ES, Prata VM, de Santana FJM, Dórea HS. Hollow-fiber-based liquid phase microextraction with factorial design optimization and gas chromatography-tandem mass spectrometry for determination of cannabinoids in human hair. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2010; 878: 2175-83.
101. Kataoka H, Saito K. Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis. *J Pharm Biomed Anal.* 2011; 54: 926-50.
102. Havlikova M, Cabala R, Pacakova V, Bursova M, Bosakova Z. Critical evaluation of microextraction pretreatment techniques – Part 1: Single drop and sorbet-based techniques. *J Sep Sci.* 2019; 42: 273-84.
103. Telving R, Hasselstrøm JB, Andreassen. Targeted toxicological screening for acidic, neutral and basic substances in postmortem and antemortem whole blood using simple protein precipitation and UPLC-HR-TOF-MS. *Forensic Sci Int.* 2016; 266: 453-61.
104. Huang S, Chen G, Ye N, Kou X, Zhu F, Shen J, Ouyang. Solid-phase microextraction: An appealing alternative for the determination of endogenous substances – A review. *Anal Chim Acta.* 2019; 1077: 67-86.
105. Gjelstad A, Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S. Electromembrane extraction of basic drugs from untreated human plasma and whole blood under physiological pH conditions. *Anal Bioanal Chem.* 2009; 393: 921-8.
106. Dinis-Oliveira RJ. Metabolomics of cocaine: implications in toxicity. *Toxicol Mech Methods.* 2015; 25: 494-500.
107. Leyton V, Bombana HS, Magalhães JG, Panizza HN, Sinagawa DM, Takitane J, de Carvalho HB, Andreuccetti G, Yonamine M, Gjerde H, Muñoz DR. Trend in the use of psychoactive substance by truck drivers in São Paulo State, Brazil: A time-series cross sectional roadside survey (2009-2016). *Traffic Inj Prev.* 2019; 20: 122-127.
108. Bombana HS, Gjerde H, dos Santos MF, Jamt REG, Yonamine M, Rholfs WJC, Muñoz DR, Leyton V. Prevalence of drugs in oral fluid from truck drivers in Brazilian highways. *Forensic Sci Int.* 2017; 273: 140-3.
109. Togni LR, Lanaro R, Resende RR, Costa JL. The variability of ecstasy tablets composition in Brazil. *J Forensic Sci.* 2015; 60: 147-51.
110. Carvalho M, Carmo H, Costa VM, Capela JP, Pontes H, Remião F, Carvalho F, Bastos ML. Toxicity of amphetamines: na uptade. *Arch Toxicol.* 2012; 86: 1167-231.

111. Black DL, Caawthon B, Robert T, Moser F, Caplan YH, Cone EJ. Multiple drug ingestion by ecstasy abusers in the United States. *J Anal Toxicol.* 2009; 33: 143-7.
112. Fandiño AS, Toennes SW, Kauert GF. Studies on in vitro degradation of anhydroecgonine methyl ester (methylecgonidine) in human plasma. *J Anal Toxicol.* 2002; 26: 567-70.
113. Skopp G, Klingmann A, Pötsch L, Mattern R. In vitro stability of cocaine in whole blood and plasma including ecgonine as a target analyte. *Ther Drug Monit.* 2001; 23: 174-81.
114. Jones AW. Forensic Drug Profile: Cocaethylene. *J Anal Toxicol.* 2019; 43: 155-60.
115. Drake LR, Scott PJH. DARK Classic in Chemical Neuroscience: Cocaine. *ACS Chem Neurosci.* 2018; 9: 2358-72.
116. Dinis-Oliveira RJ. Metabolomics of Δ^9 -tetrahydrocannabinol: implications in toxicity. *Drug Metab Rev.* 2016; 48: 80-7.
117. Meneses V, Mata D. Cannabinoid Stability in Antemortem and Postmortem Blood. *J Anal Toxicol.* 2020; 44: 126-32.
118. Sørensen LK, Hasselstrøm JB. The effect of antioxidants on the long-term stability of THC and related cannabinoids in sampled whole blood. *Drug Test Anal.* 2018; 10: 301-09.
119. Ho TS, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. Recovery, enrichment and selectivity in liquid-phase microextraction. Comparison with conventional liquid-liquid extraction. *J Chromatogr A.* 2002; 963: 3-17.
120. Meng L, Zhang W, Meng P, Zhu B, Zheng K. Comparison of hollow-fiber liquid-phase microextraction and ultrasound-assisted low-density solvent dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of drugs of abuse in biological samples by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2015; 989: 46-53.
121. Jain R, Singh R. Microextraction techniques for analysis of cannabinoids. *Trends Analyt Chem.* 2016; 80: 156-66.
122. Drug Enforcement Administration. The 2019 National Drug Threat Assessment. Washington DC: DEA; 2019.
123. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. European Drug Report. Trends and Developments. Lisboa: EMCDDA; 2020.
124. Fundação Oswaldo Cruz. III Levantamento Nacional sobre o Uso de Drogas pela População Brasileira. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2017.
125. Miguel AQC, Madruga CS, Cogo-Moreira H, Yamauchi R, Simões V, da Silva CJ, Abdalla RR, McDonell M, McPherson S, Roll JM, Laranjeira RR. Sociodemographic Characteristics, Patterns of Crack Use, Concomitant Substance Use Disorders, and Psychiatric Symptomatology in Treatment – Seeking Crack-Dependent Individuals in Brazil. *J Psychoactive Drugs.* 2018; 50: 367-72.

126. Anderson PD, Bokor G. Forensic aspects of drug-induced violence. *J Pharm Pract.* 2012; 25: 41-9.
127. Guimarães RA, Mesquita NS, Lopes RS, Lucchese R, Felipe RL, Vera I, Fernandes IL, de Castro PA, Monteiro LHB, Silva GC. Prevalence and Factors Associated With Criminal Behavior Among Illicit Drug Users: A Cross- Sectional Study. *Subst Use Misuse.* 2017; 52; 1393-9.
128. McGinty EE, Chosky S, Wintemute GJ. The Relationship Between Controlled Substances and Violence. *Epidemiol Rev.* 2016; 38: 5-31
129. Andreuccetti G, Cherpitel CJ, Carvalho HB, Leyton V, Miziara ID, Muñoz DR, Reingold AL, Lemos NP. Alcohol in combination with illicit drugs among fatal injuries in Sao Paulo, Brazil: An epidemiological study on the association between acute substance use and injury. *Injury.* 2018; 49: 2186-92.
130. World Health Organization. Drug Use and Road Safety: a Policy Brief. Geneva: WHO; 2016.
131. Hayley AC, Downey LA, Shiferaw B, Stough C. Amphetamine-type stimulant use and the risk of injury or death as a result of a road-traffic accident: A systematic review of observational studies. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2016; 26: 901-22.
132. Gjerde H, Strand M, Mørland J. Driving Under the Influence of Non-Alcohol Drugs – An Update Part I: Epidemiological Studies. *Forensic Sci Rev.* 2015; 27: 89-113.
133. Cherpitel CJ, Ye Y, Watters K, Brubacher JR, Stenstrom R. Risk of injury from alcohol and drug use in the emergency department: a case-crossover study. *Drug Alcohol Rev.* 2012; 31: 431-8.
134. Elvik R. Risk of road accident associated with the use of drugs: a systematic review and meta-analysis of evidence from epidemiological studies. *Accid Anal Prev.* 2013; 60: 254-67.
135. Asbridge M, Hayden JA, Cartwright JL. Acute cannabis consumption and motor vehicle collision risk: systematic review of observational studies and meta-analysis. *BMJ.* 2012. [Epub], Doi: 10.1136/bmj.e536.
136. Brubacher JR, Chan H, Erdelyi S, Macdonald S, Asbridge M, Mann RE, Eppler J, Lund A, MacPherson A, Martz W, Schreiber WE, Brant R, Pursell RA. Cannabis use as risk factor for causing motor vehicle crashes: a prospective study. *Addiction.* 2019; 114: 1616-26.
137. Verstraete AG, Legrand SA. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction Drug use, impaired driving and traffic accidents. EMCDDA; Lisboa, 2014.
138. Desrosiers NA, Ramaekers JG, Chauchard E, Gorelick DA, Huestis MA. Smoked cannabis' psychomotor and neurocognitive effects in occasional and frequent smokers. *J Anal Toxicol.* 2015; 39: 251-61.
139. Lenné MG, Dietze PM, Triggs TJ, Walmsley S, Murphy B, Redman JR. The effects of cannabis and alcohol on simulated arterial driving: Influences of driving experience and task demand. *Accid Anal Prev.* 2010; 42: 859-66.

140. Strand MC, Gjerde H, Mørland J. Driving under the influence of non-alcohol drugs – An update. Part II: Experimental studies. *Forensic Sci Rev.* 2016; 28: 79-101.
141. Jamt REG, Gjerde H, Furuhaugen H, Romeo G, Vindenes V, Ramaekers JG, Bogstrand ST. Associations between psychoactive substance use and sensation seeking behavior among drivers in Norway. *BMC Public Health.* 2020. [Epub], Doi: 10.1186/s12889-019-8087-0.
142. Stoduto G, Mann RE, Ialomiteanu A, Wickens CM, Brands B. Examining the link between collision involvement and cocaine use. *Drug Alcohol Depend.* 2012; 123: 260-3.
143. Marillier M, Verstraete AG. Driving under the influence of drugs. *WIREs Forensic Sci.* 2019. [Epub], Doi: 10.1002/wfs2.1326.
144. Chihuri S, Li G, Chen Q. Interaction of marijuana and alcohol on fatal motor vehicle crash risk: a case-control study. *Inj Epidemiol.* 2017. [Epub], Doi: 10.1186/s40621-017-0105-z.
145. Gilmore D, Zorland J, Akin J, Johnson A, Emscholl JG, Kuperminc GP. Mortality risk in a sample of emergency department patients who use cocaine with alcohol and/or cannabis. *Subst Abus.* 2018; 39: 266-70.
146. Vitale S, Mheen D. Illicit drug use and injuries: A review of emergency room studies. *Drug Alcohol Depend.* 2006; 82: 1-9.
147. Behnood A, Mannering FL. The effects of drugs and alcohol consumption on driver injury severities in single-vehicle crashes. *Traffi Inj Prev.* 2017; 18: 456-62.
148. Walsh JM, Flegel R, Cangianelli L, Atkins R, Soderstrom CA, Kerns TJ. Epidemiology of alcohol and other drug use among motor vehicle crash victims admitted to a trauma center. *Traffic Inj Prev.* 2004; 5: 254-60.
149. Pérez K, Santamariña-Rubio E, Rodríguez-Martos A, Brugal MT, Ricart I, Suelves JM, de la Torre R, Pujadas M, Ariza C, Díez E, Nebot M, Ramos P, Beneyto VM, Plasència A. Substance use among non-fatally injured patients attended at emergency departments in Spain. *Drug Alcohol Depend.* 2009; 105: 194-201.
150. Bogstrand ST, Normann PT, Rossow I, Larsen M, Mørland J, Ekeberg Ø. Prevalence of alcohol and other substances of abuse among injured patients in a Norwegian emergency department. *Drug Alcohol Depend.* 2011; 117: 132-8.
151. Legrand SA, Silvera PNS, Paepe P, Buylaert W, Verstrate AG. Presence of psychoactive substances in injured Belgian drivers. *Traffic Inj. Prev.* 2013; 14: 461-8.
152. Simonsen KW, Steentoft A, Bernhoft IM, Hels T, Rasmussen BS, Linnet K. Psychoactive substances in seriously injured drivers in Denmark. *Forensic Sci. Int.* 2013; 224: 44-50.
153. Reis AD, Figile NB, Laranjeira R. Prevalence of substance use among trauma patients treated in a Brazilian emergency room. *Braz. J. Psychiatry.* 2006; 28: 191-5.

154. De Boni R, Bozzetti MC, Hilgert J, Sousa T, von Diemen L, Benzano D, Menegon G, Holmer B, Duarte PCAV, Pechansky F. Factors associated with alcohol and drug use among traffic crash victims in southern Brazil. *Accid. Anal. Prev.* 2011; 43: 1408-13.
155. De Carvalho HB, Andreuccetti G, Rezende MR, Bernini C, Silva JS, Leyton V, Greve JMA. Alcohol and drug involvement in motorcycle driver injuries in the city of Sao Paulo, Brazil: Analysis of crash culpability and other associated factors. *Drug Alcohol Depend.* 2016; 162: 199-205.
156. Jørgenrud B, Skadberg E, Ponce JC, Furuhaugen H, Berg T. Determination of the alcohol biomarker phosphatidylethanol 16:0/18:1 and 33 compounds from eight different drug classes in whole blood by LC-MS/MS. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2020. [Epub], Doi: 10.1016/j.vascn.2020.106939.
157. Brasil. Ministério da Saúde. DATASUS, 2020. (acessado em: 20/07/2020). Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205&id=6937>
158. Masud M, Chan H, Erdelyi S, Yuan Y, Brubacher JR. Epidemiology of drug driving: protocol from a national Canadian study measuring levels of cannabis, alcohol and other substances in injured drivers. *BMC Public Health.* 2020; 20: 1070.
159. Gjersing L, Bretteville-Jensen AL, Furuhaugen H, Gjerde H. Illegal substance use among 1,309 music festival attendees: An investigation using oral fluid sample drug tests, breathalysers and questionnaires. *Scand J Public Health.* 2019; 47: 400-7.
160. Carlini C, Andreoni S, Sanchez ZM. Environmental Factors Associated with Psychotropic Drug use in Brazilian Nightclubs. *J Urban Health.* 2017; 94: 549-62.
161. Battisti MC, Noto AR, Nappo S, Carlini EA. A profile of Ecstasy (MDMA) use in São Paulo, Brazil: an ethnographic study. *J Psychoactive Drugs.* 2006; 38: 13-8.
162. De Almeida SP, Silva MTA. Ecstasy (MDMA): effects and patterns of use reported by users in São Paulo. *Braz J Psychiatry.* 2003; 25: 11-7.
163. Ishikawa AA, Bordin DM, Campos EG, Blanes L, Doble P, Martinis BS. A gas chromatography-mass spectrometry method for toxicological analysis of MDA, MDEA and MDMA in vitreous humor samples from victims of car accidents. *J Anal Toxicol.* 2018; 42: 661-6.
164. Pego AMF, de Oliveira SCWSEF, de Oliveira T, Leyton V, Miziara I, Yonamine M. Cocaine toxicological findings in cases of violent death in São Paulo city – Brazil. *J. Forensic Leg. Med.* 2018; 60: 3-8.
165. Wiener SE, Sutijono D, Moon CH, Subramanian RA, Calaycay J, Rushbrook JI, Zehtabchi. Patients with detectable cocaethylene are more likely to require intensive care unit admission after trauma. *Am J Emerg Med.* 2010; 28: 1051-5.
166. Hoaken PNS, Stewart SH. Drugs of abuse and the elicitation of human aggressive behavior. *Addict Behav.* 2003; 28: 1533-54.

167. Degenhardt L, Day C, Hall W, Conroy E, Gilmour S. Was an increase in cocaine use among injecting drug users in New South Wales, Australia, accompanied by an increase in violent crime? *BMC Public Health*. 2005; 19: 40.
168. Korcha RA, Cherpitel CJ, Witbrodt J, Borges G, Hejazi-Bazargan S, Bond JC, Ye Y, Gmel G. Violence-related injury and gender: the role of alcohol and alcohol combined with illicit drugs. *Drug Alcohol Rev*. 2013; 33: 43-50.
169. Modén B, Merlo J, Ohlsson H, Rosvall M. Psychotropic drugs and falling accidents among the elderly: a nested case control study in the whole population of Scania, Sweden. *J Epidemiol Community Health*. 2010; 64: 440-6.
170. Acosta S, Andersson L, Bagher A, Wingren CJ. Drugs in fall versus non-fall accidents with major trauma – A population-based clinical and medico-legal autopsy study. *Forensic Sci Int*. 2019; 296: 80-4.
171. Hart LA, Marcum ZA, Gray SL, Walker RL, Crane PK, Larson EB. The association between central nervous system-active medication use and fall-related injury in community-dwelling older adults with dementia. *Pharmacotherapy*. 2019; 39: 530-43.
172. Asgarian FS, Namdan M, Soori H. Worldwide prevalence of alcohol in fatally injured motorcyclists: A meta-analysis. *Traffic Inj. Prev*. 2019; 20: 685-9.
173. Woratanarat P, Ingsathit A, Suriyawongpaisal P, Rattanasiri S, Chatchaipun P, Wattayakorn K, Anukarahanonta T. Alcohol, illicit and non-illicit psychoactive drug use and road traffic injury in Thailand: A case-control study. *Accid Anal Prev*. 2009; 41: 651-7.
174. Sundet M, Kajombo C, Mulima G, Bogstrand ST, Varela C, Young S, christophersen AS, Gjerde H. Prevalence of alcohol use among road traffic crash victims presenting to a Malawian Center Hospital: A cross-sectional study. *Traffic Inj. Prev*. 2020; 21: 527-32.
175. Companhia de Engenharia de Tráfego. Acidentes de Trânsito – Relatório Anual. São Paulo; CET: 2018. Disponível em: <http://www.cetsp.com.br/media/866316/relatorio-anual-2018-versao-28-05.pdf>
176. Chandran A, Sousa TRV, Guo Y, Bishai D, Pechansky F, The Vida no Transito Evaluation Team. Road Traffic Deaths in Brazil: Rising Trend in Pedestrian and Motorcycle Occupant Deaths. *Traffic Inj Prev*. 2012; 13: 11-6.
177. Brasil. Lei. Lei n. 12.009 de 29 de julho de 2009. Regulamenta o exercício das atividades dos profissionais em transporte de passageiros, “mototaxista”, em entrega de mercadorias e em serviço de rua, e “motoboy”, com o uso de motocicleta, Brasília (DF). 2009.
178. Andreuccetti G, Leyton V, Carvalho HB, Sinagawa DM, Bombana HS, Ponce JC, Allen KA, Vecino-Ortiz AI, Hyder AA. Drink driving and speeding in Sao

- Paulo, Brazil: empirical cross-sectional study (2015-2018). *BMJ Open*. 2019; 21:9. [Epub], Doi: 10.1136/bmjopen-2019-030294.
179. Thomas M, Riemann B, Jones J. Epidemiology of alcohol and drug screening among pedestrian fatalities in the United States, 2014-2016. *Traffic Inj Prev*. 2019; 20: 557-62.
 180. Vanlaar W, Hing MM, Brown S, McAteer H, Crain J, McFaull S. Fatal and serious injuries related to vulnerable road users in Canada. *J Safety Res*. 2016; 58: 67-77.
 181. Brasil. Lei. Lei n.13.281 de 4 de maio de 2016. Altera a Lei n. 9.503/1997 (Código de Trânsito Brasileiro) e Lei n. 13.146/2015. Brasília (DF). 2016.
 182. Green RS, Kureshi N, Erdogan M. Legal consequences for alcohol-impaired drivers injured in motor vehicle collisions: A systematic review. *Accid Anal Prev*. 2015; 80: 106-16.
 183. Oliveira KD, Fraga GP, Baracat ECE, Morcillo AM, Lanaro R, Costa JL, Capitani EM, Bucarechi F, Ferreira Filho AI, Gimenes VC, Azevedo RCS. Prevalence of cocaine and derivatives in blood and urine samples of trauma patients and correlation with injury severity: a prospective observational study. *Eur. J. Trauma Emerg. Surg*. 2019; 45: 159-65.

Anexo A

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Drogas ilícitas e medicamentos psicotrópicos em sangue: novas metodologias de análises toxicológicas

Pesquisador: VILMA LEYTON

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 65505417.0.0000.0065

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.967.799

Apresentação do Projeto:

Projeto metodologicamente bem elaborado, viável, relevante para área de pesquisa e sem comprometimento ético.

Objetivo da Pesquisa:

Desenvolver e validar métodos de extração utilizando técnicas de LPME para canabinóides, cocaína e subprodutos, anfetaminas, metilenedioximetanfetamina (MDMA), antidepressivos tricíclicos e benzodiazepínicos, com posterior detecção por GC-MS.

Os métodos serão validados utilizando o sangue como matriz biológica.

Segundo os autores o projeto, Como já realizado em projetos anteriores do Laboratório em questão, bolsas de sangue do Hemocentro que seriam descartadas serão reaproveitadas para validação dos métodos de extração. A essas amostras serão adicionadas concentrações conhecidas e desejadas para avaliação de cada parâmetro durante a validação dos métodos de extração.

Os analitos serão detectados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Risco mínimo.

As metodologias propostas além de serem inéditas no cenário da toxicologia forense, utilizam quantidades ínfimas de solventes orgânicos ou até mesmo nenhum volume, ao contrário das

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

Anexo A (continuação)

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 1.967.799

técnicas convencionais de extração de analitos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto adequado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentados e adequados.

Recomendações:

Aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_862326.pdf	08/03/2017 15:26:13		Aceito
Outros	Cadastro_online.pdf	08/03/2017 14:56:32	Henrique Silva Bombana	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	08/03/2017 14:56:06	Henrique Silva Bombana	Aceito
Outros	Parecer_relator_departamento.pdf	08/03/2017 12:02:00	Henrique Silva Bombana	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_doutorado_Henrique_Bombana.pdf	08/03/2017 10:32:44	Henrique Silva Bombana	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
Bairro: PACAEMBU **CEP:** 01.246-903
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 **E-mail:** cep.fm@usp.br

Anexo A (continuação)

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 1.967.799

SAO PAULO, 16 de Março de 2017

Assinado por:

Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

Anexo B**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa –FATORES RELACIONADOS COM TRAUMAS NAS VÍTIMAS INTERNADAS DE ACORDO COM A GRAVIDADE E FUNCIONALIDADE

Pesquisador principal –JÚLIA MARIA D'ANDRÉA GREVE

Departamento/Instituto –DEPARTAMENTO DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA/
INSTITUTO DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA

Convidamos o(a) Sr(a). para participar desta pesquisa que visa estudar quais são as principais causas dos traumas (acidentes de trânsito, quedas de altura, violência interpessoal e queda da própria altura) que acometem as vítimas internadas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) para depois elaborar e aplicar políticas públicas de prevenção de acidentes.

Para isso, serão realizadas algumas avaliações em três momentos: durante o atendimento no Pronto-Socorro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, durante seu período de internação e 30 dias após a ocorrência do trauma: em caso de alta, será feita uma entrevista por telefone e se ainda estiver internado, será feita nova entrevista presencial.

1. 1º atendimento

No momento do seu primeiro atendimento no Pronto-Socorro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, serão realizados os seguintes procedimentos:

- a) Coleta de sangue por punção venosa (pegar uma veia) para dosar a quantidade de álcool e/ou outras drogas: medicamentos, maconha, cocaína, anfetamínicos (“rebites”) que o senhor possa ter ingerido antes de dirigir. A coleta será de uma pequena quantidade de sangue (10 ml) feita através de uma veia por um profissional da equipe de atendimento, devidamente treinado para execução da tarefa.

Anexo B (continuação)

- b) Ainda dentro da rotina de atendimento, isto é, dentre as condutas que são executadas normalmente durante o atendimento de uma vítima traumatizada, será feita a avaliação da gravidade das lesões sofridas usando a escala RTS, que é um instrumento que mede as alterações clínicas do paciente traumatizado: pressão arterial, respiração e consciência.
- c) Caso, o senhor não seja internado no HCFMUSP, a amostra coletada e as informações serão descartadas.

2. Internação

Durante a sua internação, outras informações serão colhidas para complementar aquelas obtidas na sala de emergência. O senhor precisará responder um questionário, com várias perguntas. Esta entrevista presencial será feita em momento oportuno, durante a sua permanência no hospital.

- a. Identificação pessoal (iniciais do nome, sexo, idade, estado civil, profissão).
- b. Horário e dia da semana e tipo de ocorrência
- c. Acidentes de trânsito
 - i. Condições da habilitação como condutor de veículo: habilitação (sim ou não), há quanto tempo, frequentou autoescola (sim ou não); aprendeu a dirigir veículo com outra pessoa (quem), fez algum tipo de curso de direção defensiva (sim ou não).
 - ii. Veículo atual - modelo, cilindradas, tempo de uso deste veículo atual. Uso do veículo para transporte ou trabalho (frete).
 - iii. Em caso de uso profissional: tempo de profissão, jornada de trabalho, vínculo empregatício (sim ou não), veículo próprio, forma de remuneração.
 - iv. Uso de equipamentos de segurança: (sim ou não) capacete, roupas de couro, botas, cinto de segurança, cadeirinha para transporte de crianças. Tipo de vestimenta utilizada no momento do acidente: com ou sem camisa, bermuda, tipo de calçado utilizado (motociclistas).

Anexo B (continuação)

- v. Acidentes anteriores (sim ou não) e lesões decorrentes destes acidentes.
 - vi. Acidente atual: como ocorreu (descrição do mesmo), havia outros veículos envolvidos, local de ocorrência, horário, condições climáticas e condições da via. Estava trabalhando no momento do acidente? Se for atropelamento fez a travessia na faixa ou foram dela.
- d. Queda de altura :
- i. Local da ocorrência, detalhes da queda, uso de equipamentos de segurança,
 - ii. Trabalho ou lazer
 - iii. Acidental ou provocado (pela própria vítima ou terceiros)
- e. Queda da própria altura
- i. Local da ocorrência: dentro ou fora de casa
 - ii. Descrição do local: alterações do piso da via pública ou doméstica domiciliar, presença de objetos estranhos, piso escorregadio, iluminação, tipo de calçado.
 - iii. Detalhes da queda.
 - iv. Histórico de quedas prévias
- f. Violência interpessoal
- i. Briga, agressão, assalto
 - ii. Tipo de ferimento: arma de fogo ou arma branca.
 - iii. Foi o agressor ou foi agredido?
- g. Os dados clínicos da gravidade da lesão e o cálculo do índice de gravidade serão coletados do seu prontuário e farão parte dos dados da pesquisa.
- h. A entrevista poderá ser feita com familiares, caso o paciente não tenha condições de responder.
3. 30 dias após

Anexo B (continuação)

Será feita uma nova entrevista 30 dias após a ocorrência do acidente que poderá ocorrer no próprio hospital, se o senhor (a) ainda estiver internado ou por telefone, se o senhor (a) já tiver tido alta. É uma avaliação sobre independência nas atividades do dia-a-dia e funções do corpo:

- a) se o senhor (a) está precisando de ajuda para se alimentar, realizar a higiene pessoal, tomar banho, se vestir, usar o vaso sanitário, andar, subir e descer escadas, para compreender, se expressar, interagir socialmente, resolver problemas, usar a memória, se transferir para a cama, cadeira, vaso sanitário, chuveiro e se controla a urina e as fezes.

Informamos que todos os resultados são sigilosos e não serão utilizados de forma individual, apenas compondo o panorama de todo o grupo estudado. Não será possível a identificação individual pelas dosagens de álcool e/ ou drogas. Tais informações não serão usadas ou fornecidas para nenhum tipo de perícia ou investigação posterior.

Não existem benefícios diretos para o participante, mas sua participação está contribuindo para um benefício coletivo. Conhecer as principais causas dos acidentes de trânsito contribui para que as medidas eficientes possam ser tomadas e que realmente diminuam o número de acidentes. Conhecer o problema de forma mais profunda ajuda a encontrar uma solução melhor e por este motivo estamos solicitando sua participação.

Após o encerramento ou interrupção da pesquisa o senhor (a) continuará a ser acompanhado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina para a continuidade do seu tratamento. A pesquisa não atrapalha o andamento do seu tratamento no hospital.

O senhor (a) tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos ou dos resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

O senhor (a) pode se recusar ou retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição e ainda o senhor (a) tem o direito de receber uma via deste termo assinada pelo pesquisador.

Anexo B (continuação)

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Caso ocorra algum dano decorrente da pesquisa, o senhor (a) terá direito de tratamento no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, mas os riscos decorrentes desta pesquisa são mínimos, visto que não envolvem procedimentos invasivos.

O material biológico (sangue coletado do senhor (a) obtido para esta pesquisa serão armazenados de acordo com a resolução 441/2011. O sangue coletado será congelado e enviado em lotes para o Laboratório de Toxicologia do Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para análise das drogas no sangue. Depois da análise, o sangue será descartado no referido laboratório.

Caso seja necessário o uso futuro do seu sangue, o senhor (a) será informado e será pedido ao (a) senhor (a) ler e assinar um novo termo como este e esta nova pesquisa será realizada apenas com a aprovação do sistema CEP-CONEP, que é o sistema responsável pela avaliação e aprovação de pesquisas científicas no Brasil.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas.

O principal investigador é o Dra Júlia Maria D'Andrea Greve que pode ser encontrado no endereço endereço: Instituto de Ortopedia e Traumatologia do HCFMUSP, Rua Dr. Ovídio de Campos, 333, 2º andar, Laboratório de Estudos do Movimento, Telefone(s): 2661-6486, e-mail jgreve@usp.br.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Fui suficientemente informado a respeito do estudo “FATORES RELACIONADOS COM OS ACIDENTES DE TRÂNSITO NAS VÍTIMAS INTERNADAS DE ACORDO COM A GRAVIDADE E FUNCIONALIDADE”.

Anexo B (continuação)

Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável (Dra Júlia Maria D'Andrea Greve) ou pessoa (s) por ela delegada (s) (fisioterapeuta Alexandra Carolina Canonica) sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo um via rubricada pelo pesquisador.

Assinatura do participante /representante legal

Data: __/__/____

Assinatura do responsável pelo estudo

Data: __/__/____

Anexo B (continuação)**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO (OU ETIQUETA INSTITUCIONAL DE IDENTIFICAÇÃO) DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2.RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :..... SEXO: M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

Anexo C

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA
INSTITUTO DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA – IOT

QUESTIONÁRIO SOBRE ACIDENTES DE TRÂNSITO
INFORMAÇÕES GERAIS

Data: ____ / ____ / 2018 Entrevistador: _____ Sujeito Número: _____

DIA SEMANA: DOM SEG TER QUA QUI SEX SAB

Horário da Admissão: ____:____ Clima Horário do Acidente: Bom Chuva Neblina

DADOS DA VÍTIMA

IDADE: _____ anos GÊNERO: MASC FEM PROFISSÃO: _____

COR DE PELE: Branca Parda Negra Amarela

ESCOLARIDADE: Analfabeto Fundamental incompleto Médio incompleto
 Superior Fundamental completo Médio completo

SITUAÇÃO CONJUGAL: Solteiro Casado/União Estável Separado Viúvo

HABILITAÇÃO: SIM NÃO HÁ QUANTO TEMPO: _____ anos OU _____ meses

VÍTIMA: Condutor Pedestre
 Passageiro Ciclista

VEÍCULO: Automóvel Motocicleta Caminhão
 Ônibus Bicicleta

TIPO DE ACIDENTE: Colisão Frontal Capotamento Atropelamento
 Colisão Lateral Queda

SOFREU OUTROS ACIDENTES: SIM NÃO QUANTOS?

QUANTAS VEZES DEU ENTRADA NO HOSPITAL PELOS ACIDENTES:

COMO CONDUTOR? SIM NÃO

DOENÇAS: Hipertensão Cardiopatia
 Diabetes Depressão
 Doença Digestiva Doença musculoesquelética
 Outras: _____

Anexo C (continuação)

DADOS DO ATENDIMENTO

ATENDIMENTO PRÉ-HOSPITALAR: SIM Não Se não, como chegou ao hospital: _____

TIPO DE ATENDIMENTO: SAMU Bombeiro Águia Outro: _____

DIAGNÓSTICO:

<input type="checkbox"/> Amputação Traumática MMII	<input type="checkbox"/> Fratura MMII
<input type="checkbox"/> Amputação Traumática MMSS	<input type="checkbox"/> Fratura MMSS
<input type="checkbox"/> TCE	<input type="checkbox"/> Trauma facial
<input type="checkbox"/> TRM	<input type="checkbox"/> Trauma torácico
<input type="checkbox"/> Lesão pélvica	<input type="checkbox"/> Trauma abdominal
<input type="checkbox"/> Escoriações	<input type="checkbox"/> Lesões de partes moles
<input type="checkbox"/> Contusões	<input type="checkbox"/> Outros: _____

PERDEU A CONSCIÊNCIA NO MOMENTO DO ACIDENTE: SIM NÃO

RTS INICIAL (0 a 8):

$$\text{Cálculo RTS} = (0,9368 \times \text{ECG.v}) + (0,7326 \times \text{PAS.v}) + (0,2908 \times \text{FR.v})$$

(Inserir as variáveis de 0 a 4)

$$(0,9368 \times \underline{\quad}) + (0,7326 \times \underline{\quad}) + (0,2908 \times \underline{\quad})$$

ESCALA COMA GLASGOW	v	Pressão Arterial Sistólica (mm hg)	v	Freq Resp. (min)	v
13-15	4	>89	4	10-29	4
9-12	3	76-89	3	>29	3
6-8	2	50-75	2	6-9	2
4-5	1	1-49	1	1-5	1
3	0	0	0	0	0

Anexo C (continuação)

DADOS DO ACIDENTE

ENDEREÇO DO ACIDENTE: _____

DESCRIÇÃO DO LOCAL ACIDENTE: Cruzamento Via expressa
 Via velocidade média Via velocidade baixa
 Calçada Outros: _____

OBSTÁCULOS DO LOCAL: Buraco Água
 Óleo pista Valeta
 Areia Lombada
 Outros: _____

ESTAVA USANDO CELULAR NO MOMENTO DO ACIDENTE: SIM NÃO

OPINIÃO ACIDENTADO CULPADO? SIM NÃO TALVEZ

CAUSA DO ACIDENTE: Falha pessoal Falha mecânica
 Outro veículo Condição via
 Condição tempo

TIPO DE ACIDENTE: Automóvel x automóvel Moto x moto Moto X caminhão
 Automóvel x pedestre Moto x automóvel Automóvel X caminhão
 Automóvel x ônibus Moto x ônibus Queda de moto
 Automóvel X bicicleta Moto X pedestre Outro: _____
 Automóvel x outros Moto x outros

OBSERVAÇÕES:

Anexo C (continuação)

RELATO BEBIDAS ALCÓOLICAS E MEDICAMENTOS

NOS ÚLTIMOS 12 MESES, COM QUE FREQUÊNCIA VOCÊ CONSUMIU BEBIDAS QUE CONTÉM ÁLCOOL?

- Nunca Uma vez por mês ou menos 2-4 vezes por mês
 2-3 vezes por semana 4 ou mais vezes por semana

QUANDO BEBE, QUANTAS BEBIDAS CONTENDO ÁLCOOL CONSUME EM UM DIA NORMAL?

- 1-2 3-4 5-6 7-9 10 ou mais

COM QUE FREQUÊNCIA CONSUME 4 DOSES (MULHERES) / 5 DOSES (HOMENS) OU MAIS NUMA ÚNICA OCASIÃO?

- Nunca Menos de uma vez por mês Pelo menos uma vez por mês
 Pelo menos uma vez por semana Diariamente ou quase diariamente

NAS 6 HORAS ANTERIORES AO ACIDENTE VOCÊ FEZ USO DE:

1) Álcool

- NÃO NÃO SABE SIM → Quantas horas antes: _____

2) Sedativos ou ansiolíticos

- NÃO NÃO SABE SIM → Nome comercial: _____

3) Analgésicos (analgésicos como paracetamol e ibuprofeno não são considerados)

- NÃO NÃO SABE SIM → Nome comercial: _____

4) Medicamentos para dormir

- NÃO NÃO SABE SIM → Nome comercial: _____

5) Outras drogas

- NÃO NÃO SABE SIM → Quais: _____

6) Fumante

- NÃO EX FUMANTE SIM → Quantos maços: _____

ESCALA SOBRE A SUA DISPOSIÇÃO PARA CORRER RISCOS

Para cada questão escolha a opção de resposta que melhor o descreve (a que mais se aproxima da sua forma de sentir e ser), assinale-a com um (X). Se considerar que nenhuma se adequa a si, assinale aquela que mais lhe agrada.

GOSTO DE EXPLORAR LUGARES ESTRANHOS SOZINHO, MESMO QUE ISSO SIGNIFIQUE QUE EU ME PERCA

- Discordo totalmente Discordo Não discordo nem concordo
 Concordo Concordo totalmente

ÀS VEZES EU GOSTO DE FAZER COISAS QUE PODEM SER UM POUCO ASSUSTADORAS

- Discordo totalmente Discordo Não discordo nem concordo
 Concordo Concordo totalmente

GOSTO DE TER EXPERIÊNCIAS NOVAS E EXCITANTES, AINDA QUE SEJAM ILEGAIS

- Discordo totalmente Discordo Não discordo nem concordo
 Concordo Concordo totalmente

PREFIRO TER COMO AMIGOS PESSOAS EXCITANTES QUE PODEM FAZER COISAS IMPREVISÍVEIS

- Discordo totalmente Discordo Não discordo nem concordo
 Concordo Concordo totalmente

Anexo C (continuação)

ACIDENTE COM MOTOCICLETA

EQUIPAMENTOS SEGURANÇA MOTOCICLISTA

Estava usando no momento do acidente:

CAPACETE: SIM NÃOBOTA: SIM NÃOJAQUETA: SIM NÃOLUVAS: SIM NÃOEQUIPAMENTOS SEGURANÇA MOTOCICLETA

Estava usando no momento do acidente:

ANTENA: SIM NÃOMATA-CACHORRO: SIM NÃOCARREGAVA PASSAGEIRO: SIM NÃOSe sim, quantos? CAPOTAMENTO: SIM NÃOIMPACTO COM EJEÇÃO: SIM NÃOTIPO DE CAPACETE: Capacete Fechado Capacete AbertoMOTOCICLETA - CILINDRADAS: 50 100
 125 126-250
 251-400 >400MOTOFRETISTA: SIM NÃOOUTRO VEÍCULO ENVOLVIDO: SIM NÃOACIDENTE CORREDOR DE MOTOCICLETA: SIM NÃOFOI FECHADO POR OUTRO VEÍCULO: SIM NÃOMOTOCICLETA PRÓPRIA: SIM NÃO ANO DE FABRICAÇÃO: _____COMPROU A MOTO USADA: SIM NÃOFAZ REVISÕES PERIÓDICAS: SIM NÃO DATA ÚLTIMA REVISÃO: _____

QUANTO TEMPO POSSUI MOTO: _____ meses/anos

QUANTAS MOTOS JÁ TEVE: _____

FEZ ALGUM CURSO DE DIREÇÃO DEFENSIVA: SIM NÃO

Anexo C (continuação)**ATROPELAMENTO**

VEÍCULO ATROPELADOR: Moto Carro
 Ônibus Caminhão
 Bicicleta

ATROPELAMENTO CORREDOR DE MOTOCICLETA: SIM NÃO

LOCAL DO ATROPELAMENTO: Cruzamento Semáforo
 Faixa Meio do Quarteirão
 Outro _____

ACIDENTE COM CICLISTAS

LOCAL DE OCORRÊNCIA: Ciclovia Rua/Avenida
 Calçada Rodovia
 Acostamento rodovia

TIPO DE OCORRÊNCIA: Queda Atropelamento
 Colisão Outro: _____

USO DE EQUIPAMENTOS DE SEGURANÇA:

Capacete: SIM NÃO

Luvas: SIM NÃO

HÁ QUANTO TEMPO USA A BICICLETA COMO VEÍCULO: _____ meses/ anos

Anexo C (continuação)**ACIDENTE VEÍCULO DE QUATRO RODAS**

TIPO DE VEÍCULO ENVOLVIDO NO ACIDENTE: Carro Ônibus
 Caminhão Outro: _____

TIPO DE VÍTIMA: Condutor Passageiro veículo coletivo
 Passageiro Outro: _____

CINTO DE SEGURANÇA: SIM NÃO

VEÍCULO PRÓPRIO: SIM NÃO **ANO DE FABRICAÇÃO:** _____

COMPROU O VEÍCULO USADO: SIM NÃO

FAZ REVISÕES PERIÓDICAS: SIM NÃO **DATA ÚLTIMA REVISÃO:** _____

QUANTO TEMPO POSSUI VEÍCULO: _____ meses/anos

QUANTOS VEÍCULOS JÁ TEVE: _____

Anexo D

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA
INSTITUTO DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA – IOT

QUESTIONÁRIO SOBRE VIOLÊNCIA INTERPESSOAL
INFORMAÇÕES GERAIS

Data: ____ / ____ / 2018 Entrevistador: _____ Sujeito Número: _____

DIA SEMANA: DOM SEG TER QUA QUI SEX SAB

Horário da Admissão: ____: ____

DADOS DA VÍTIMA

IDADE: ____ anos GÊNERO: MASC FEM PROFISSÃO: _____

COR DE PELE: Branca Parda Negra Amarela

ESCOLARIDADE: Analfabeto Fundamental incompleto Médio incompleto
 Superior Fundamental completo Médio completo

SITUAÇÃO CONJUGAL: Solteiro Casado/União Estável Separado Viúvo

TIPO DE LESÃO: FAF Agressão FAB

LOCAL: Casa Casa Noturna Rua Trabalho Veículo próprio
 Bar Casa de amigo Espaço público (clube, praça etc)
 Outro: _____

TENTATIVA DE ASSALTO: SIM NÃO

PESSOA QUE OCASIONOU AS LESÕES:

Parceiro íntimo (cônjuge ou namorado (a)) Pais Outros parentes
 Amigo Estranho Desconhecido Outro: _____

NA SUA OPINIÃO, A PESSOA ESTAVA ALCOOLIZADA? SIM NÃO

O QUE ESTAVA FAZENDO NO MOMENTO DA LESÃO? Trabalhando Locomovendo
 Estudando Momento de lazer
 Praticando Esporte Outro _____

Observações:

Anexo D (continuação)

DADOS DO ATENDIMENTO

ATENDIMENTO PRÉ-HOSPITALAR: SIM Não Se não, como chegou ao hospital: _____

TIPO DE ATENDIMENTO: SAMU Bombeiro Águia Outro: _____

DIAGNÓSTICO:

<input type="checkbox"/> Amputação Traumática MMII	<input type="checkbox"/> Fratura MMII
<input type="checkbox"/> Amputação Traumática MMSS	<input type="checkbox"/> Fratura MMSS
<input type="checkbox"/> TCE	<input type="checkbox"/> Trauma facial
<input type="checkbox"/> TRM	<input type="checkbox"/> Trauma torácico
<input type="checkbox"/> Lesão pélvica	<input type="checkbox"/> Trauma abdominal
<input type="checkbox"/> Escoriações	<input type="checkbox"/> Lesões de partes moles
<input type="checkbox"/> Contusões	<input type="checkbox"/> Outros: _____

PERDEU A CONSCIÊNCIA NO MOMENTO DO ACIDENTE: SIM NÃO

RTS INICIAL (0 a 8):

$$\text{Cálculo RTS} = (0,9368 \times \text{ECG.v}) + (0,7326 \times \text{PAS.v}) + (0,2908 \times \text{FR.v})$$

(Inserir as variáveis de 0 a 4)

$$(0,9368 \times \underline{\quad}) + (0,7326 \times \underline{\quad}) + (0,2908 \times \underline{\quad})$$

ESCALA COMA GLASGOW	v	Pressão Arterial Sistólica (mm hg)	v	Freq Resp. (min)	v
13-15	4	>89	4	10-29	4
9-12	3	76-89	3	>29	3
6-8	2	50-75	2	6-9	2
4-5	1	1-49	1	1-5	1
3	0	0	0	0	0

Anexo D (continuação)

RELATO BEBIDAS ALCÓOLICAS E MEDICAMENTOS

NOS ÚLTIMOS 12 MESES, COM QUE FREQUÊNCIA VOCÊ CONSUMIU BEBIDAS QUE CONTÉM ÁLCOOL?

- () Nunca () Uma vez por mês ou menos () 2-4 vezes por mês
 () 2-3 vezes por semana () 4 ou mais vezes por semana

QUANDO BEBE, QUANTAS BEBIDAS CONTENDO ÁLCOOL CONSUME EM UM DIA NORMAL?

- () 1-2 () 3-4 () 5-6 () 7-9 () 10 ou mais

COM QUE FREQUÊNCIA CONSUME 4 DOSES (MULHERES) / 5 DOSES (HOMENS) OU MAIS NUMA ÚNICA OCASIÃO?

- () Nunca () Menos de uma vez por mês () Pelo menos uma vez por mês
 () Pelo menos uma vez por semana () Diariamente ou quase diariamente

NAS 6 HORAS ANTERIORES AO ACIDENTE VOCÊ FEZ USO DE:

1) Álcool

- () NÃO () NÃO SABE () SIM → Quantas horas antes: _____

2) Sedativos ou ansiolíticos

- () NÃO () NÃO SABE () SIM → Nome comercial: _____

3) Analgésicos (analgésicos como paracetamol e ibuprofeno não são considerados)

- () NÃO () NÃO SABE () SIM → Nome comercial: _____

4) Medicamentos para dormir

- () NÃO () NÃO SABE () SIM → Nome comercial: _____

5) Outras drogas

- () NÃO () NÃO SABE () SIM → Quais: _____

6) Fumante

- () NÃO () EX FUMANTE () SIM → Quantos maços: _____

ESCALA SOBRE A SUA DISPOSIÇÃO PARA CORRER RISCOS

Para cada questão escolha a opção de resposta que melhor o descreve (a que mais se aproxima da sua forma de sentir e ser), assinale-a com um (X). Se considerar que nenhuma se adequa a si, assinale aquela que mais lhe agrada.

GOSTO DE EXPLORAR LUGARES ESTRANHOS SOZINHO, MESMO QUE ISSO SIGNIFIQUE QUE EU ME PERCA

- () Discordo totalmente () Discordo () Não discordo nem concordo
 () Concordo () Concordo totalmente

ÀS VEZES EU GOSTO DE FAZER COISAS QUE PODEM SER UM POUCO ASSUSTADORAS

- () Discordo totalmente () Discordo () Não discordo nem concordo
 () Concordo () Concordo totalmente

GOSTO DE TER EXPERIÊNCIAS NOVAS E EXCITANTES, AINDA QUE SEJAM ILEGAIS

- () Discordo totalmente () Discordo () Não discordo nem concordo
 () Concordo () Concordo totalmente

PREFIRO TER COMO AMIGOS PESSOAS EXCITANTES QUE PODEM FAZER COISAS IMPREVISÍVEIS

- () Discordo totalmente () Discordo () Não discordo nem concordo
 () Concordo () Concordo totalmente

Anexo E

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA
INSTITUTO DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA – IOT

**QUESTIONÁRIO SOBRE QUEDA DE ALTURA
INFORMAÇÕES GERAIS**

Data: ____/____/2018 Entrevistador: _____ Sujeito Número: _____

DIA DA SEMANA DA LESÃO: DOM SEG TER QUA QUI SEX SAB

Horário da Admissão: ____:____

DADOS DA VÍTIMA

IDADE: _____ anos GÊNERO: MAS FEM PROFISSÃO: _____

COR DE PELE: Branca Parda Negra Amarela

ESCOLARIDADE: Analfabeto Fundamental incompleto Médio incompleto
 Superior Fundamental completo Médio completo

SITUAÇÃO CONJUGAL: Solteiro Casado/União Estável Separado Viúvo

SOFREU OUTRAS QUEDAS PRÉVIAS? SIM NÃO QUANTAS?

QUANTAS VEZES DEU ENTRADA NO HOSPITAL PELAS LESÕES:

Observações:

Anexo E (continuação)

DADOS DO ATENDIMENTO

ATENDIMENTO PRÉ-HOSPITALAR: SIM Não Se não, como chegou ao hospital: _____

TIPO DE ATENDIMENTO: SAMU Bombeiro Águia Outro: _____

DIAGNÓSTICO:

<input type="checkbox"/> Amputação Traumática MMII	<input type="checkbox"/> Fratura MMII
<input type="checkbox"/> Amputação Traumática MMSS	<input type="checkbox"/> Fratura MMSS
<input type="checkbox"/> TCE	<input type="checkbox"/> Trauma facial
<input type="checkbox"/> TRM	<input type="checkbox"/> Trauma torácico
<input type="checkbox"/> Lesão pélvica	<input type="checkbox"/> Trauma abdominal
<input type="checkbox"/> Escoriações	<input type="checkbox"/> Lesões de partes moles
<input type="checkbox"/> Contusões	<input type="checkbox"/> Outros: _____

PERDEU A CONSCENCIA NO MOMENTO DO ACIDENTE: SIM NÃO

RTS INICIAL(0 a 8):

$$\text{Cálculo RTS} = (0,9368 \times \text{ECG.v}) + (0,7326 \times \text{PAS.v}) + (0,2908 \times \text{FR.v})$$

(Inserir as variáveis de 0 a 4)

$$(0,9368 \times \underline{\quad}) + (0,7326 \times \underline{\quad}) + (0,2908 \times \underline{\quad})$$

ESCALA COMA GLASGOW	v	Pressão Arterial Sistólica (mm hg)	v	Freq Resp. (min)	v
13-15	4	>89	4	10-29	4
9-12	3	76-89	3	>29	3
6-8	2	50-75	2	6-9	2
4-5	1	1-49	1	1-5	1
3	0	0	0	0	0

Anexo E (continuação)

DADOS DA QUEDA DE ALTURA

ALTURA DA QUEDA EM METROS: _____

LOCAL: Casa Trabalho Outro: _____

LOCAL: Céu Aberto Ambiente Fechado

CONDIÇÕES CLIMÁTICAS: Calor Frio Chuva

QUEDA DE QUAL LOCAL? Cobertura/ Telhado Varanda/Janela
 Escada Árvore
 Cama Andaime de Construção
 Mobiliário Doméstico Outro _____

COBERTURA/TELHADO: possuía parapeito (proteção)? SIM NÃO

CAUSA DA QUEDA: Acidente Acidente de Trabalho
 Suicídio Homicídio
 Outro _____

ATIVIDADE NO MOMENTO DA QUEDA: _____

Atividade perigosa no momento da queda? SIM NÃO

Atividade difícil no momento da queda? SIM NÃO

Atividade com equipamento pesado no momento da queda? SIM NÃO

Usava equipamento de proteção: SIM NÃO

Quanto tempo trabalhando antes da queda: _____ horas

Conversava no momento da queda? SIM NÃO

Distraiu-se no momento da queda? SIM NÃO

CHÃO DA QUEDA: Grama/Terra Firme/Duro

TIPO DE SOLO DA QUEDA: Chão Objeto Se sim, qual objeto? _____

POSIÇÃO AO CAIR NO CHÃO: De Frente De costas
 De lado (Direito) De lado (Esquerdo)
 Sentada De Pé
 Desconhecido

Anexo E (continuação)

RELATO BEBIDAS ALCÓOLICAS E MEDICAMENTOS

NOS ÚLTIMOS 12 MESES, COM QUE FREQUÊNCIA VOCÊ CONSUMIU BEBIDAS QUE CONTÉM ÁLCOOL?

- Nunca Uma vez por mês ou menos 2-4 vezes por mês
 2-3 vezes por semana 4 ou mais vezes por semana

QUANDO BEBE, QUANTAS BEBIDAS CONTENDO ÁLCOOL CONSUME EM UM DIA NORMAL?

- 1-2 3-4 5-6 7-9 10 ou mais

COM QUE FREQUÊNCIA CONSUME 4 DOSES (MULHERES) / 5 DOSES (HOMENS) OU MAIS NUMA ÚNICA OCASIÃO?

- Nunca Menos de uma vez por mês Pelo menos uma vez por mês
 Pelo menos uma vez por semana Diariamente ou quase diariamente

NAS 6 HORAS ANTERIORES AO ACIDENTE VOCÊ FEZ USO DE:

1) Álcool

- NÃO NÃO SABE SIM → Quantas horas antes: _____

2) Sedativos ou ansiolíticos

- NÃO NÃO SABE SIM → Nome comercial: _____

3) Analgésicos (analgésicos como paracetamol e ibuprofeno não são considerados)

- NÃO NÃO SABE SIM → Nome comercial: _____

4) Medicamentos para dormir

- NÃO NÃO SABE SIM → Nome comercial: _____

5) Outras drogas

- NÃO NÃO SABE SIM → Quais: _____

6) Fumante

- NÃO EX FUMANTE SIM → Quantos maços: _____

ESCALA SOBRE A SUA DISPOSIÇÃO PARA CORRER RISCOS

Para cada questão escolha a opção de resposta que melhor o descreve (a que mais se aproxima da sua forma de sentir e ser), assinale-a com um (X). Se considerar que nenhuma se adequa a si, assinale aquela que mais lhe agrada.

GOSTO DE EXPLORAR LUGARES ESTRANHOS SOZINHO, MESMO QUE ISSO SIGNIFIQUE QUE EU ME PERCA

- Discordo totalmente Discordo Não discordo nem concordo
 Concordo Concordo totalmente

ÀS VEZES EU GOSTO DE FAZER COISAS QUE PODEM SER UM POUCO ASSUSTADORAS

- Discordo totalmente Discordo Não discordo nem concordo
 Concordo Concordo totalmente

GOSTO DE TER EXPERIÊNCIAS NOVAS E EXCITANTES, AINDA QUE SEJAM ILEGAIS

- Discordo totalmente Discordo Não discordo nem concordo
 Concordo Concordo totalmente

PREFIRO TER COMO AMIGOS PESSOAS EXCITANTES QUE PODEM FAZER COISAS IMPREVISÍVEIS

- Discordo totalmente Discordo Não discordo nem concordo
 Concordo Concordo totalmente

Apêndices

Trabalho publicado



Hollow-fibre liquid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometric determination of amphetamines in whole blood



Henrique Silva Bombana*, Marcelo Filonzi dos Santos, Daniel Romero Muñoz, Vilma Leyton

Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 455 Cerqueira Cesar, Sao Paulo 01246-903, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Amphetamines
Liquid-phase microextraction
Green chemistry

ABSTRACT

Here, we present a fully validated method using a hollow-fibre liquid-phase microextraction technique for the determination by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of amphetamine (AMP), methamphetamine (MET), fenproporex (FEN), 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA), 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) and 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDEA) in whole blood. The validation parameters presented successful values within those recommended by the Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTox) in the Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. The limits of detection ranged from 1 to 3 ng/mL, and the limits of quantification ranged from 2 to 5 ng/mL. The determination coefficients (r^2) ranged from 0.990 to 0.997, and the method presented good intraday and interday accuracy (from 90.4% to 97.2%) and satisfactory recovery (from 68% to 110%). No carryover was observed. The heteroscedasticity was tested, and only AMP presented homoscedasticity. Weighting factors were applied to correct the linearity of MET ($1/x^2$), MDA ($1/x$), FEN ($1/x^{1/2}$), MDMA ($1/x^2$) and MDEA ($1/y$). Dilution integrity was tested at ratios of 1:2, 1:5 and 1:10, and all maintained intraday precision (from 94.9% to 99.3%) and interday precision (from 89.4% to 94.9%). The validated method was applied to six real whole blood samples from individuals suspected of consuming ecstasy, and MDMA, MDA and amphetamine were successfully identified and quantified.

1. Introduction

Amphetamine-type stimulants (ATS) are an important group of substances composed of amphetamine (AMP) and its derivatives, e.g., methamphetamine (MET), 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA – ecstasy), 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), and 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDEA). These substances are structurally similar to dopamine, epinephrine and norepinephrine, acting as false neurotransmitters and releasing catecholamines that results in a stimulatory effect in the central nervous system [1,2].

According to the United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), 5.5% of the world's population (271 million people) from the ages of 15–64 years have consumed some type of drug at least once in 2017. ATS and ecstasy together account for 50 million users worldwide [3].

The use of stimulants, hallucinogens and ATS, mainly ecstasy, are frequent at music festivals and night clubs [4,5,6]. In Brazil, approximately 4% of the population reports to have already used some type of ATS once in their lifetime [7], and studies in this country have also described the use of amphetamine by truck drivers to diminish fatigue and be able to drive for hours without rest [8,9,10]. This kind of

population does not use amphetamine itself; however, appetite suppressant medicines containing fenproporex (FEN) are metabolized into amphetamine. These medicines were sold over the counter in the Brazilian market until 2011, when they were prohibited. Despite the prohibition, these medicines were still consumed, as evidenced by the continuous detection of amphetamine in urine samples [10].

Currently, so-called alternative matrices, such as hair, oral fluid and sweat, are regularly being used to detect and monitor drug use [11]. Compared to blood or urine, this kind of matrix is easier to collect, is less invasive and is more difficult to adulterate. On the other hand, these matrices cannot be analysed in cases that require the determination of whether an individual was under the effect of drugs at the moment the sample was collected (e.g., driving under the influence of drugs – DUID). In cases such as this, blood must be analysed to ensure impairment [12].

There are two main classical methods of extraction: liquid-liquid and solid-phase. In the past few years, concerns about environmental and analyst safety have been highlighted. Consequently, classical methods of extraction are being modified to become “cleaner”. Green analytical chemistry values the reduction in the volume of organic solvents used in the laboratory and the use of non-chlorinated solvents

* Corresponding author.

E-mail address: hbombana@usp.br (H.S. Bombana).

<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.121973>

Received 30 August 2019; Received in revised form 8 January 2020; Accepted 9 January 2020

Available online 13 January 2020

1570-0232/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

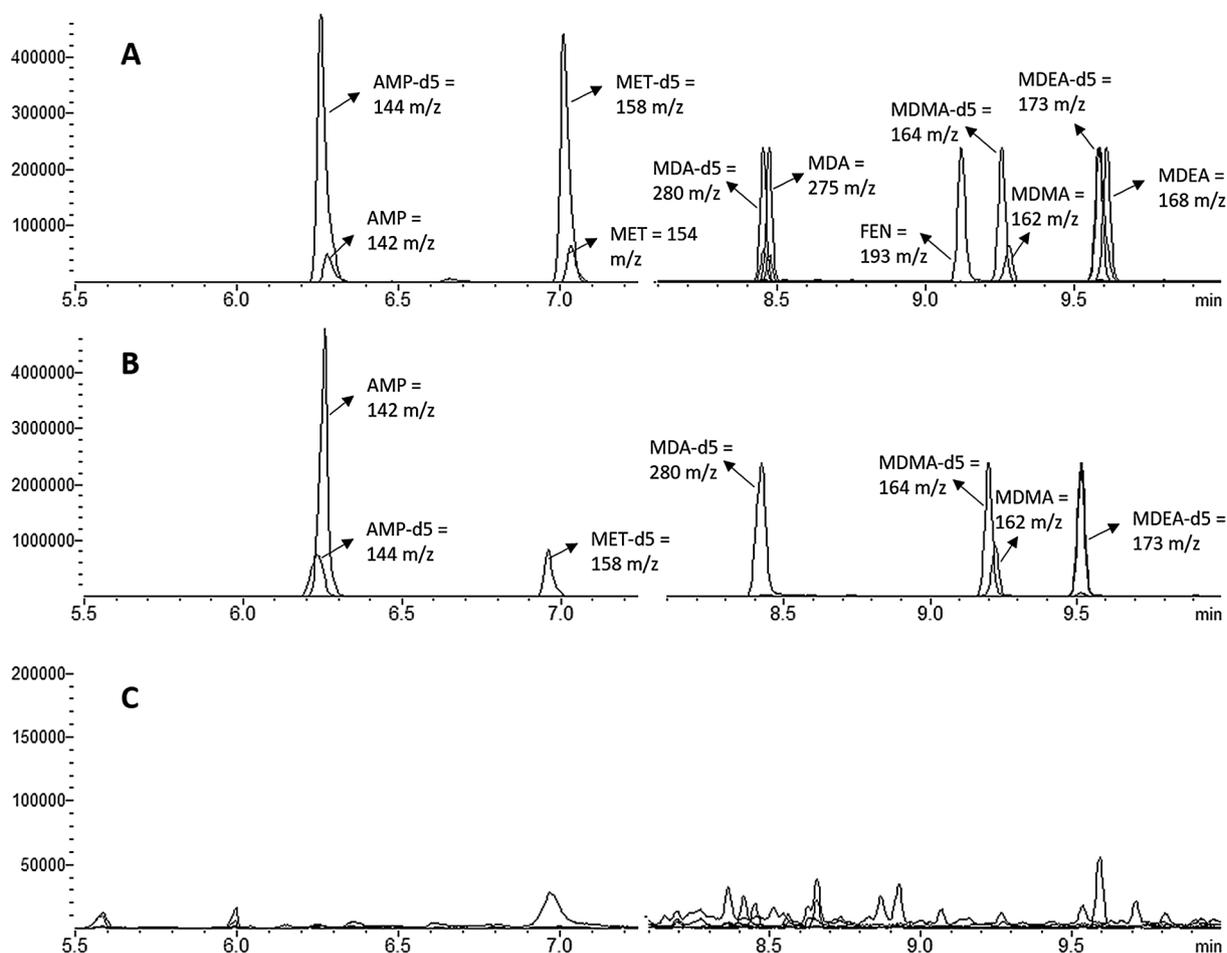


Fig. 1. Chromatograms obtained for the ATS extracted by the described LPME method in whole blood samples. A: fortified with internal standards and analytes at the LOQ concentration, B: real sample collected from individuals suspected of consuming ecstasy C: blank whole blood sample submitted to the LPME procedure. AMP: amphetamine; MET: methamphetamine; MDA: 3,4-methylenedioxyamphetamine; FEN: fenproporex; MDMA: 3,4-methylenedioxymethamphetamine; MDEA: 3,4-methylenedioxyethylamphetamine.

[13,14]. Microextraction is a miniaturization of classic methods using the principles of green chemistry [15]. Liquid-phase microextraction (LPME) and solid-phase microextraction (SPME) and its variations are the two main examples of these modern techniques. LPME was first described in 1996 and has the advantages of low cost, highly reduction of volumes of solvents and the possibility for use in different kinds of matrices and for different classes of substances [16–20].

One of the variations of the LPME technique is the use a porous membrane between phases. This ensure the physical separation of the donor and acceptor phase, making more difficult the phases to mixture, which could compromised extraction. The Hollow-fibre liquid phase microextraction was first described by Pedersen-Bjergaard and Rasmussen in 1999, by the name of liquid-liquid-liquid microextraction [21] and since then was extensively explored. There are two main variations of HF-LPME: two and three phase. In the three phase technique the HF is submerged in an organic solvent, that immobilized in the pores, and inside the fibre lumen another solvent is used as the acceptor phase. The acceptor phase is usually consisted of a solvent with different pH as the donor phase, which traps the analytes inside the lumen, increasing the extraction rates [22].

The extraction of ATS in urine [23], hair [24], oral fluid [25] and vitreous humour [26] has already been described. However, some of these methodologies uses large volumes of samples and solvents and have a higher cost when compared to HF-LPME. The use of HF-LPME in whole blood for these substances, as far as we know, has not been tested before. Therefore, we herein propose a method to extract amphetamine (AMP), methamphetamine (MET), 3,4-methylenedioxymethamphetamine

(MDMA), 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDEA) and fenproporex (FEN) in whole blood by HF-LPME and detection by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

2. Materials and methods

2.1. Reagents and reference standards

AMP, MET, MDA, FEN, MDMA and MDEA solutions (1.0 mg/mL in methanol) and their deuterated internal standards solutions (except for FEN) AMP-d5, MET-d5, MDA-d5, MDMA-d5 and MDEA-d5 (1.0 mg/mL in methanol) were purchased from Cerilliant Analytical Reference Standards (Round Rock, TX, USA). Methanol, dihexyl ether, trifluoroacetic anhydride (TFAA), hydrochloric acid and sodium hydroxide were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, USA). Hollow-fibre Q3/2 Accurel KM polypropylene (600 μm , 200 μm wall thickness and 0.2 μm pore size) was purchased from 3 M (Wuppertal, Germany).

2.2. Preparation of working solutions

Stock solutions of AMP, MET, MDA, FEN, MDMA and MDEA were diluted in methanol into working solutions of 100 $\mu\text{g/mL}$ and 10 $\mu\text{g/mL}$. Likewise, internal standard (IS) working solutions of AMP-d5, MET-d5, MDA-d5, MDMA-d5 and MDEA-d5 were diluted to 10 $\mu\text{g/mL}$. Stock solutions were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ when not in use.

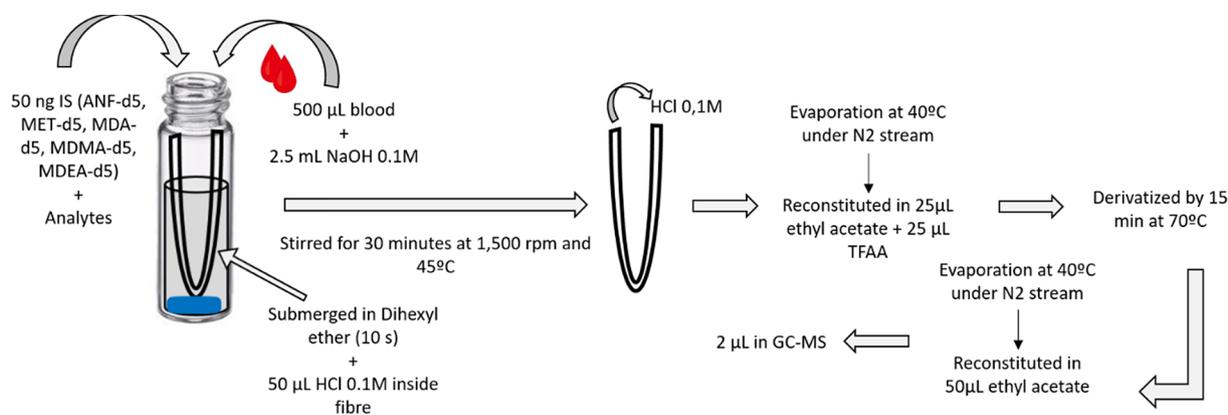


Fig. 2. Scheme of the proposed LPME for determination of amphetamine-type stimulants in whole blood samples.

2.3. Instrumentation

The analyses were performed using a gas chromatograph, model GC-2010, coupled with a mass selective detector (MSD) (GCMS-QP2010; Shimadzu, Kyoto, Japan). Chromatographic separation was achieved with an HP-5MS fused-silica capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.1 µm film thickness) using helium as the carrier gas at 0.6 mL/min in constant flow rate mode. Injections were made in splitless mode. The MSD was operated using electronic ionization at 70 eV by selected ion monitoring (SIM). The temperatures of the injection port, interface and ion source were 220, 250 and 260 °C, respectively. The oven temperature was maintained at 80 °C for 2 min, increased at a rate of 20 °C/min to 200 °C, was held for 5 min and then increased at a rate of 25 °C/min to 275 °C and held for 1 min, resulting in a total run time of 17 min. The following ions (*m/z*) were chosen for quantification (highlighted in bold) and qualification: AMP – **140**, 118, 91; AMP-d5 – **144**, 123, 96; MET – **154**, 118, 110; MET-d5 – **158**, 120, 113; MDA – **275**, 135, 162; MDA-d5 – **280**, 167, 136; FEN – **193**, 140, 118; MDMA – **162**, 154, 110; MDMA-d5 – **164**, 136, 113; MDEA – **168**, 140, 303; and MDEA-d5 – **173**, 141, 308. The chromatograms obtained by the described method are shown in Fig. 1.

2.4. Whole blood samples

Blank whole blood samples were obtained from the blood bank of the Clinics Hospital of the Faculty of Medicine of the University of Sao Paulo and were used as blank samples in the method development and validation.

The method was then applied to real whole blood samples from individuals who were suspected to have had consumed ecstasy and amphetamines. Blood samples were collected in Vacutainer® tubes with EDTA/sodium fluoride in the city of Sao Paulo during 2019.

The Research Ethics Committee of the Faculty of Medicine of USP approved this study (Ethics protocol approval #1967799).

2.5. Sample preparation

In a 4 mL glass vial containing a 10 mm magnetic stirring bar, 50 ng/mL IS solution was added to 500 µL of whole blood, and 2.5 mL of 0.1 mol/L sodium hydroxide (NaOH, pH = 12) was added to constitute the donor phase. A hollow-fibre was manually cut into 8 cm pieces and the pores were filled with dihexyl ether by submersion for 10 s into the organic solvent, and the excess was withdrawn with filter paper. The lumen of the hollow fibres was filled with 50 µL of 0.1 mol/L hydrochloric acid (HCl, pH = 3) as the acceptor phase using electrophoresis pipette tips. The fibre was then inserted in a U shape into the glass vial. We used two hollow-fibre pieces in each vial. The solution was stirred for 30 min at 1500 rpm and 45 °C. After extraction, the acceptor phase was withdrawn and evaporated at 40 °C under a

nitrogen stream. The residue was reconstituted with 25 µL of ethyl acetate and 25 µL of TFAA for derivatization for 15 min at 70 °C. After cooling, the solution was once again dried at 40 °C under a stream of N₂ and reconstituted with 50 µL of ethyl acetate. An aliquot of 2 µL was injected into the GC-MS system (Fig. 2).

2.6. Validation

Validation was carried out according to the international parameters proposed by the Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTox) in the Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology [27]. The following parameters were analysed: Selectivity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), linearity, precision (intra- and inter-day), accuracy, recovery, carryover and dilution integrity.

2.6.1. Limit of detection and limit of quantification

First, we determined the baseline of the equipment and ensured a reliable limit of detection (LOD). It was determined by the analysis of two sources of blank whole blood without the addition of analytes. Each whole blood source was tested in 10 replicates. Next, the LOD was determined by analysing decreasing concentrations of analyte and was established to be the lowest concentration likely to be reliably distinguished from the LOB and the concentration at which detection is feasible. Finally, the limit of quantitation (LOQ) was established as the lowest concentration that could be determined with acceptable precision and accuracy (relative standard deviation – RSD < 15%). For both the LOD and LOQ, variations of retention times were accepted within 2%, and the mass spectra ion proportion should be the same.

2.6.2. Selectivity

We submitted ten blank whole blood samples, from different sources, to the described method in order to ensure the absence of endogenous interfering at the retention time of studied analytes. In addition, we spiked 500 ng/mL of cocaine, THC, THC-OH and amiriptryline in blank whole blood samples and were analysed by the LPME method.

2.6.3. Linearity

A calibration curve was obtained by extraction of the whole blood samples spiked with the following concentrations of all the analytes: 5, 50, 150, 250, 350 and 500 ng/mL. Each concentration was analysed in six replicates. Heteroscedasticity was evaluated by application of the *f*-test for each analyte. When presented, weighting factors were used to adjust linearity.

2.6.4. Intra- and inter-day precision

For the evaluation of these parameters, three quality controls (QCs)

Table 1

Limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) determined during the validation of the LPME method for the determination of amphetamine-type stimulants in whole blood samples.

Analyte	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
AMP	3.0	4.0
MET	3.0	4.0
MDA	3.0	5.0
FEN	2.0	3.0
MDMA	1.0	2.0
MDEA	1.0	2.0

were used: low (LQC – 30 ng/mL), medium (MQC – 180 ng/mL) and high (HQC – 390 ng/mL). All three controls were analysed on three consecutive days in six replicates of each QC per day. Precision was determined based on the calculation of the imprecision of the method, and the results are expressed as the % RSD, calculated through an ANOVA approach. The acceptance criteria were $\pm 10\%$ for all three QCs.

2.6.5. Accuracy

All three QCs were analysed in six replicates to determine the method accuracy. The acceptable criteria were $\pm 20\%$ for all the QCs.

2.6.6. Carryover

Carryover was tested by the analysis of a blank sample immediately after the analysis of a sample spiked with 600 ng/mL of each analyte. We analysed three blank samples and three spiked samples.

2.6.7. Recovery

This parameter was evaluated to quantify the total concentration of analytes extracted by the HF-LPME method. Samples spiked only with IS (A) and spiked with IS and analyte standards (B) were submitted for the extraction procedure. For the A samples, analytes were spiked after the HF-LPME procedure and prior to derivatization. Recovery was evaluated by the measured concentration of B/the measured concentration of A. The acceptable criteria were 80% recovery.

2.6.8. Dilution integrity

Dilution integrity must be evaluated during method validation in cases where there is low sample volume or when sample analyte concentration is above the working range determined during the linearity studies. In these cases, the sample is diluted to bring the concentration within the range of the calibration curve.

This parameter was evaluated by reanalysing the intra- and inter-day precision and accuracy after the sample was diluted in the following ratios: 1:2, 1:5 and 1:10. We started with a whole blood sample spiked with 800 ng/mL analyte that was diluted using blank whole blood.

Table 2

Average and standard deviation (SD) of slope, intercept and determination coefficient and weighting factors determined during validation of the LPME method for the determination of amphetamine-type stimulants in whole blood samples.

	Slope (SD)	Intercept (SD)	Determination coefficient (r^2) (SD)	Weighting factor
AMP	0.0188 (± 0.000817)	0.1232 (± 0.1212)	0.995 (± 0.0036)	$1/x^2$
MET	0.0202 (± 0.00041)	0.0289 (± 0.1004)	0.996 (± 0.002)	$1/y^2$
MDA	0.0229 (± 0.00075)	0.1025 (± 0.0588)	0.994 (± 0.0043)	$1/x^2$
FEN	0.0373 (± 0.00048)	3.5422 (± 0.1672)	0.990 (± 0.00142)	Homoscedastic
MDMA	0.0309 (± 0.00077)	0.4558 (± 0.1298)	0.997 (± 0.00208)	$1/y^2$
MDEA	0.0208 (± 0.00025)	0.1626 (± 0.0668)	0.995 (± 0.003)	$1/y$

3. Results and discussion

3.1. Sample preparation

Samples were prepared using a three-phase HF-LPME. The principle of this technique is to trap target molecules inside the lumen of the fibre [28]. Therefore, an aqueous solution with a pH that is different from that of the analytes is used. In our case, we used an acidic solution as the acceptor phase due to the basic characteristics of the analytes that become ionized in contact with hydrochloric acid inside the fibre lumen. The donor phase consisted of the biological matrix diluted in sodium hydroxide to maintain the pH between 12 and 13. Usually, the pH of the donor phase is maintained 3 times higher than the pKa of the analytes for basic molecules to avoid ionization [29]. Only molecules in their deionized state have the capacity to migrate through the porous membrane filled with organic solvent. For our procedure, we used dihexyl ether to fill the porous membrane. This organic solvent presents an octanol/water partition coefficient of 4.7, which is higher than those of the target molecules (ranging from 1.64 to 2.5), allowing the migration of the analytes through the membrane. The use of a hollow fibre ensures the physical separation of the donor and acceptor phases, preventing the mixture and contamination of the extracts. In contrast to other published methods [23,26], the HF-LPME method proposed consumes very low volumes of organic solvent, and the solutions used as acceptor and donor phases can be easily neutralized before being discarded. In addition, the use of a HF ensures clean extracts even when using complex matrices such as whole blood [30]. Besides that, the volume of sample used in our method was 500 μ L, less than other published methods using humor vitreous (2 mL) [26], urine (1 mL) [31] or blood (1 mL) [32]. In forensic analyses, often the volume of sample is scarce and the extraction methods should be performed with the smallest possible sample volume.

3.2. Validation

The proposed method was validated fully and successfully, presenting all parameters within those values recommended by the validation manuals [27]. The LOD and LOQ of each analyte are presented in Table 1. Concentrations ranging from 1 to 5 ng/mL were determined for the LOD and LOQ.

For the selectivity experiments, no interfering signals were observed at the retention times of the ATS studied.

The working range for all analytes was set from 5 to 500 ng/mL, and the method was linear for all analytes, with determination coefficients > 0.99 . Heteroscedasticity was tested, and this phenomenon was not observed only in the case of fenproporex. Table 2 presents the slope, intercept, determination coefficients and weighting factors utilized.

The method presented satisfactory results after the intra- and inter-day precision and accuracy evaluations. For all QCs and analytes, the precision was above 90% and the accuracy was higher than 89%. Data from the precision and accuracy experiments are shown in Table 3. Accuracy was in accordance and similar to other HF-LPME method

Table 3

Intra- and inter-day precision (expressed as relative standard deviations - %) and accuracy (expressed as a percentage - %) results for low-, medium- and high-quality controls determined during validation of the HF-LPME method for the determination of amphetamine-type stimulants in whole blood samples.

Analytes	Intra-day Precision			Inter-day Precision			Accuracy		
	LQC	MQC	HQC	LQC	MQC	HQC	LQC	MQC	HQC
AMP	95.8	95.8	97.2	91.6	93.4	94.7	90.1	94.8	90.0
MET	96.2	96.2	95.8	92.4	96.4	95.6	90.8	101.6	96.3
MDA	95.4	95.4	97.2	90.8	95.5	96.7	102.8	106.8	105.2
FEN	95.6	95.6	94.5	93.5	94.1	92.0	100.7	105.6	99.5
MDMA	94.4	94.4	97.1	91.3	93.3	96.7	100.3	99.7	98.1
MDEA	95.4	95.4	96.9	90.4	94.6	96.3	96.5	103.1	105.2

Table 4

Recovery results for low-, medium- and high-quality controls, determined during the validation of the LPME method for the determination of amphetamine-type stimulants in whole blood samples. The results are expressed as a percentage (%).

	LQC	MQC	HQC
AMP	110	103	83
MET	81	79	78
MDA	78	68	69
FEN	86	87	83
MDMA	71	81	78
MDEA	91	92	85

Table 5

Amphetamine-type stimulants identified in real whole blood samples using the validated LPME method. The results are shown in ng/mL.

Sample	AMP	MET	MDA	FEN	MDMA	MDEA
1	–	–	50.1	–	3,255.7	–
2	–	–	–	–	–	–
3	–	–	5.8	–	218.5	–
4	1,439.0	–	–	–	42.6	–
5	–	–	–	–	–	–
6	–	–	–	–	74.0	–

described for ATS extraction of amphetamine in urine samples [33].

When analysing a blank whole blood sample immediately after analysis of a sample spiked with 600 ng/mL analyte, we observed no peaks at retention times that were relevant to the analytes. The low cost of the hollow fibre used in this method allowed its discard after use, therefore eliminating the risk of carryover between samples.

Recovery evaluation showed good results except for MDA in the medium- and high-QCs, which presented 68 and 69% recovery, respectively. The MDMA LQC also presented a recovery below the accepted value. With the use of two pieces of hollow fibre for each extraction, it was possible to increase the recovery of the analytes. Table 4 shows all the results from the recovery evaluation.

Recovery results were satisfactory for authors when compared to other published methods. Ishikawa et al. (2018), analysing ATS from humor vitreous reported a recovery ranging from 47.2 to 81.5% using liquid-liquid technique [26]. Similarly, Hartman et al. (2014) also determining amphetamines from blood and plasma published a solid-phase technique with extraction efficiency around 50% [32].

3.3. Application of the method to real samples

We applied the validated method to six samples from individuals suspected to have consumed ATS. MDMA was identified in four samples, MDA in two samples and AMP in one sample. A positive result was considered when concentration was above LOQ for each analyte and relative retention time and ion ratios for each analyte matched those defined during validation process. Table 5 presents all these findings.

Nowadays, detection techniques have a higher sensitivity and efficiency than a few years ago. The use of liquid chromatography or UHPLC-MS/MS requires a less treated sample. In some cases, it is only performed a protein precipitation or sample dilution and injection at the system. However, many laboratories do not own advance equipment and have to analyse all kind of samples using GC-MS that requires a well-done extraction and cleaner extracts. The HF-LPME here presented could fulfil these requirements once the HF act as a filter maintaining interferers outside the donor phase. Besides that, it does not require any expensive and special equipment, which allows the application in several laboratories.

4. Conclusion

The proposed HF-LPME method presented satisfactory parameters within the values recommended in the literature. HF-LPME presented as a cleaner and less expensive alternative to the classical extraction methods since it uses a very low volume of organic solvents. The validated HF-LPME method was successfully applied to real samples, and amphetamine, MDA and MDMA were identified and quantified.

CRedit authorship contribution statement

Henrique Silva Bombana: Conceptualization, Investigation, Methodology, Formal analysis, Validation, Writing - original draft. **Marcelo Filonzi dos Santos:** Methodology, Data curation, Writing - original draft. **Daniel Romero Muñoz:** Writing - review & editing, Funding acquisition. **Vilma Leyton:** : Writing - review & editing, Project administration.

Acknowledgements

The authors wish to thank the support of the Faculty of Medicine, University of Sao Paulo (LIM 40/HC-FMUSP). This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. Henrique Silva Bombana would like to thank scholarship grant #2017/13882-2, São Paulo Research Foundation (FAPESP). The authors also thank FAPESP for grant #2016/20214-3.

Declaration of Competing Interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

- [1] M. Carvalho, H. Carmo, V.M. Costa, J.P. Capela, H. Pontes, F. Remião, F. Cavalho, M.L. Bastos, Toxicity of amphetamines: an update, Arch. Toxicol. 86 (2012) 1167–1231, <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0815-5>.
- [2] N. Rasmussen, Amphetamine-type stimulants: the early history of their medical and nonmedical uses, Int. Rev. Neurobiol. 120 (2015) 9–25, <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2015.02.001>.
- [3] United Nations Office on Drugs and Crime – UNODC. World Drug Report 2019. Stimulants; Vienna, 2019.

- [4] L. Gjersing, A.L. Bretteville-Jensen, H. Furuhaugen, H. Gjerde, Illegal substance use among 1,309 music festival attendees: an investigation using oral fluid sample drug tests, breathalysers and questionnaires, *Scand. J. Public Health* 47 (2019) 400–407, <https://doi.org/10.1177/1403494818821481>.
- [5] A.L.A. Mohr, M. Friscia, J.K. Yeakel, B.K. Logan, Use of synthetic stimulants and hallucinogens in a cohort of electronic dance music festival attendees, *Forens. Sci. Int.* 282 (2018) 168–178, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.11.017>.
- [6] P. Calle, K. Maudens, S. Lemoyde, S. Geerts, D. vansassenbroeck, J. Peter, J. van Overloop, E. Decninck, P. Blanckaert, Lessons to be learned from toxicological analyses in intoxicated patients and seized material at an electronic music dance festival, *Forens. Sci. Int.* 299 (2019) 174–179, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.03.047>.
- [7] L.T.S. Massaro, R.R. Abdalla, R. Laranjeira, R. Caetano, I. Pinsky, C.S. Madruga, Amphetamine-type stimulants use and conditional paths of consumption: data from the Second Brazilian National Alcohol and Drugs Survey, *Braz. J. Psychiatr.* 39 (2017) 201–207, <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2015-1894>.
- [8] D.M. Sinagawa, H.B. de Carvalho, G. Andreuccetti, N.V. do Prado, K.C. de Oliveira, M. Yonamine, D.R. Muñoz, H. Gjerde, V. Leyton, Association between travel length and drug use among Brazilian truck drivers, *Traffic Inj. Prev.* 16 (2015) 5–9, <https://doi.org/10.1080/15389588.2014.906589>.
- [9] H.S. Bombana, H. Gjerde, M.F. dos Santos, R.E. Jamt, M. Yonamine, W.J. Rohlf, D.R. Muñoz, V. Leyton, Prevalence of drugs in oral fluids from truck drivers in Brazilian highways, *Forens. Sci. Int.* 273 (2017) 140–143, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.02.023>.
- [10] V. Leyton, H.S. Bombana, J.G. Magalhães, H.N. Panizza, D.M. Sinagawa, J. Takitane, H.B. Carvalho, G. Andreuccetti, M. Yonamine, H. Gjerde, D.R. Muñoz, Trends in the use of psychoactive substances by truck drivers in São Paulo State Brazil: a time-series cross sectional roadside survey (2009–2016), *Traffic Inj. Prev.* 20 (2019) 122–127, <https://doi.org/10.1080/15389588.2018>.
- [11] K. Dolan, D. Rouen, J. Kimber, An overview of the use of urine, hair, sweat and saliva to detect drug use, *Drug Alcohol. Rev.* 23 (2004) 213–217, <https://doi.org/10.1080/09595230410001704208>.
- [12] H. Gjerde, E.L. Øiestad, A.S. Christophersen, Using biological samples in epidemiological research on drugs of abuse, *Norsk Epidemiol.* 21 (2011) 5–14, <https://doi.org/10.5324/nje.v21i1.1420>.
- [13] P.T. Anastas, Green chemistry and the role of analytical methodology development, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 29 (1999) 167–175, <https://doi.org/10.1080/10408349891199356>.
- [14] C. Ghosh, Green bioanalysis: some innovative ideas towards green analytical techniques, *Bioanalysis* 11 (2012) 1377–1391, <https://doi.org/10.4155/bio.12.31>.
- [15] J.A. Ocaña-González, R. Fernandez-Torres, M.A. Bello-Lopes, M. Ramos-Payán, New developments in microextraction techniques in bioanalysis. A review, *Anal. Chim. Acta* 905 (2016) 8–23, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.10.041>.
- [16] M. Havlikova, R. Cabala, V. Pacakova, M. Bursova, Z. Bosakova, Critical evaluation of microextraction pretreatment techniques – Part 1: Single drop and sorbent-based techniques, *J. Sep. Sci.* 42 (2019) 273–284, <https://doi.org/10.1002/jssc.201800902>.
- [17] M.F. dos Santos, A. Yamada, S.C. Seulin, V. Leyton, C.A. Pasqualucci, D.R. Muñoz, M. Yonamine, Liquid-phase microextraction and gas-chromatographic-mass spectrometric analysis of antidepressants in vitreous humor: study of matrix effect of human and bovine vitreous and saline solution, *J. Anal. Toxicol.* 40 (2016) 187–193, <https://doi.org/10.1093/jat/bkv141>.
- [18] A.M.F. Pego, F.L. Roveri, R.Y. Kuminari, V. Leyton, I.D. Miziara, M. Yonamine, Determination of cocaine and its derivatives in hair samples by liquid phase microextraction (LPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), *Forens. Sci. Int.* 274 (2017) 83–90, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.12.024>.
- [19] G.O. Silveira, Í.T. Belitsky, S. Lodi, C.D. Rodrigues de Oliveira, A.D. Zucoloto, L.V. Fruchtgarten, M. Yonamine, Development of a method for the determination of cocaine, cocaethylene and norcocaine in human breast milk using liquid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *Forens. Sci. Int.* 265 (2016) 22–28, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.01.007>.
- [20] Y. He, M. Concheiro-Guisan, Microextraction sample preparation techniques in forensic analytical toxicology, *Biomed. Chromatogr.* 33 (2019), <https://doi.org/10.1002/bmc.4444>.
- [21] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2650–2656, <https://doi.org/10.1021/ac990055n>.
- [22] M. Havlikova, R. Cabala, V. Pacakova, Z. Bosakova, Critical evaluation of microextraction pretreatment techniques – Part 2: Membrane-supported and homogenous phase based techniques, *J. Sep. Sci.* 42 (2019) 303–318, <https://doi.org/10.1002/jssc.201800903>.
- [23] M.K. Wóznia, M. Wiergowski, J. Aszyk, P. Kibica, J. Namiesnik, M. Biziuk, Application of gas chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of amphetamine type stimulants in blood and urine, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 148 (2018) 58–64, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.09.020>.
- [24] M. Pujadas, S. Pichini, S. Poudevida, E. Menoyo, P. Zuccaro, M. Farré, R. de la Torre, Development and validation of a gas chromatography-mass spectrometry assay for hair analysis of amphetamine, methamphetamine and methylenedioxy derivatives, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 25 (2003) 249–255, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.09.056>.
- [25] K.B. Scheidweiler, M.A. Huestis, A validated gas chromatography-electron impact ionization mass spectrometric method for methylenedioxymethamphetamine (MDMA), methamphetamine and metabolites in oral fluid, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 835 (2006) 90–99, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.03.020>.
- [26] A.A. Ishikawa, D.M. Bordin, E.G. Campos, L. Blanes, P. Doble, B.S. Martinis, A gas chromatography-mass spectrometry method for Toxicological Analysis of MDA, MDEA and MDMA in vitreous humor samples from victims of car accidents, *J. Anal. Toxicol.* 42 (2018) 661–666, <https://doi.org/10.1093/jat/bky044>.
- [27] Scientific Working Group for Forensic Toxicology, Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology, SWGTGX, *J. Anal. Toxicol.* 37 (2013) 452–474, <https://doi.org/10.1093/jat/bkt054>.
- [28] A.M.A. Alsharif, G.H. Tan, Y.M. Choo, A. Lawal, Efficiency of hollow-fiber liquid-phase microextraction chromatography methods in separation of organic compounds: a review, *J. Chromatogr. Sci.* 55 (2016) 1–14, <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw188>.
- [29] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction, *J. Chromatogr. A* 14 (2008) 132–142, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.08.088>.
- [30] R. Venson, A.S. Korbs, G. Cooper, A review of the application of hollow-fiber liquid-phase microextraction in bioanalytical methods – a systematic approach with focus on forensic toxicology, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 15 (2019) 32–53, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.01.006>.
- [31] K.A. Alsenedi, C. Morrison, Determination and long-term stability of twenty-nine cathinones and amphetamine-type stimulants (ATS) in urine using gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 15 (2018) 91–102, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.01.027>.
- [32] R.L. Hartman, N.A. Desrosiers, A.J. Barnes, K. Yun, K.B. Scheidweiler, E.A. Kolbrich-Spargo, D.A. Gorelick, R.S. Goodwin, M.A. Huestis, 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDMA) and metabolites disposition in blood and plasma following controlled oral administration, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 587–599, <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7468-y>.
- [33] S.C.W.S.E. Franco de Oliveira, M. Yonamine, Measurement uncertainty for the determination of amphetamine in urine liquid-phase microextraction and gas-chromatography-mass spectrometry, *Forens. Sci. Int.* 265 (2016) 81–88, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.01.012>.