



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO DOS PRINCIPAIS ADULTERANTES DA
COCAÍNA EM URINA HUMANA**

LAÍS CRISTINA SANTANA SENA

São Cristóvão-SE
Fevereiro/2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DOS PRINCIPAIS ADULTERANTES DA COCAÍNA EM URINA HUMANA

LAÍS CRISTINA SANTANA SENA

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof^o Dr. Fernando José Malagueño de Santana.

São Cristóvão-SE
Fevereiro/2016

SENA, LAÍS CRISTINA SANTANA	DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DOS PRINCIPAIS ADULTERANTES DA COCAÍNA EM URINA HUMANA	2016

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central/UFS

S474d Sena, Laís Cristina Santana
Desenvolvimento de método analítico para determinação dos principais adulterantes da cocaína em urina humana / Laís Cristina Santana Sena ; orientador Fernando José Malagueño de Santana. – São Cristóvão, 2016.
117 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Sergipe, 2016.

1.Cocaína. 2. Cromatografia a líquido de alta eficiência. 3. Intoxicação. 4. Urina - Análise I. Santana, Fernando José Malagueño de, orient. II. Título.

CDU 615.099:543.544.5

LAÍS CRISTINA SANTANA SENA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO DOS PRINCIPAIS ADULTERANTES DA
COCAÍNA EM URINA HUMANA**

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: ____/____/____


Orientador: Prof. Dr. Fernando José Malagueño de Santana

1º Examinador: Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araújo

2º Examinador: Prof. Dr. Sandro Navickiene

PARECER

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha querida tia Nicielma (*in memoriam*), que desde que eu era criança me incentivava e me apoiava em meus estudos. Sei que de alguma forma ainda continua a torcer por mim e, por isso, essa vitória também é sua. Saudades!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado a oportunidade, a força e a coragem de realizar algo que era um sonho pra mim, meu mestrado!

Agradeço imensamente aos meus pais pelo amor, compreensão e suporte nos momentos difíceis. À minha mãe, mais especificamente pela sua sabedoria e cumplicidade e ao meu pai, por ser um exemplo de homem trabalhador e dedicado. Ambos são inspirações para minha vida. Tenho muita sorte em tê-los!

Agradeço ainda ao meu irmão Leonardo e minha cunhada Aline por mesmo que de longe acompanharem meu trajeto.

Ao meu amor Filipe Amado, que esteve sempre tão próximo e participando de cada momento me dando o suporte e amor necessários para seguir adiante e nunca desistir. Obrigada por ser minha companhia nesse mundo.

Aos meus sogros Josinete Vieira e Braulio Vieira por torcerem por mim ao longo dessa caminhada.

Ao meu orientador prof. Dr. Fernando Malagueño, por ter acreditado em mim e no meu trabalho e pela orientação executada de fato desde a bancada até a escrita desta dissertação. Foi uma honra trabalhar com o senhor!

A todos que fazem parte do CEPAT, em especial à prof^a. Dr^a Danielle de Santana, Pavla Lôbo, Lucas Danda, Pedro da Silva e Rafaela Souza pela convivência e aprendizado compartilhado.

À prof^a. Dr^a Fernanda Pimentel que tão pacientemente me conduziu pelo mundo do planejamento fatorial e análise de componentes principais. Muito obrigada mesmo!

Aos professores Adriano Antunes, Cristiani Banderó, Dulce Mascarenhas e Marcelo Cavalcante pelas contribuições ao longo dos Seminários I, II e III.

A todos os demais professores e funcionários que fazem parte do NPGCF pelo agradável convívio ao longo do mestrado.

A todos os colegas do mestrado que ajudaram de forma direta ou indireta na conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos Aline Alves, Andreza Araújo, Brena Larissa, Érica Fabianne, Genival Júnior, Jacqueline Albuquerque, João Luiz e Patrícia Silva por poder sempre contar com vocês.

A todos da Residência das Palmeiras, meu lar enquanto estive em Recife, em especial à Tahyara Barbalho, Shadai Griffith, Carla Perestrelo, Carla Bellot e Margarita Acosta que me acompanharam nos bons e não tão bons momentos em Recife.

À UFPE, mais especificamente ao Departamento de Ciências Farmacêuticas, pela acolhida nos meses em que estive presente.

À CNPq pela concessão da bolsa.

RESUMO

A cocaína é uma droga estimulante que apresenta capacidade de causar dependência. Frequentemente são adicionados a esta droga adulterantes com o intuito de mimetizar sua ação ou minimizar seus efeitos adversos. Quando há nessa droga outros componentes farmacologicamente ativos, agravos à saúde dos usuários podem ocorrer, como quadros de intoxicação. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um método de determinação dos principais adulterantes da cocaína (cafeína, levamisol, lidocaína, fenacetina, diltiazem e hidroxizina) em urina humana. A cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodos foi utilizada como técnica de análise e a microextração líquido-líquido dispersiva com solidificação da gota orgânica flutuante, como técnica de preparo das amostras. A separação cromatográfica dos analitos em fase reversa foi obtida em uma coluna C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m; 80 Å) em modo gradiente e usando acetonitrila-ácido trifluoroacético 0,026% (v/v) a 1 mL.min⁻¹ como fase móvel (25°C e detecção a 235 nm). O tempo de análise foi de 25 min. Para o preparo da amostra, a urina foi alcalinizada com tampão fosfato de sódio 0,5 mol.L⁻¹ (pH 10) e adicionada de cloreto de sódio (20% m/v). Acetonitrila (150 μ L) e 1-dodecanol (30 μ L) foram utilizados como solvente dispersor e extrator, respectivamente. O método apresentou intervalos lineares de concentração de 312,5 – 3125 ng.mL⁻¹ para cafeína e levamisol e de 187,5 – 1875 ng.mL⁻¹ para lidocaína, fenacetina, diltiazem e hidroxizina, com limite de quantificação de 187,5 ng.mL⁻¹ para lidocaína, fenacetina, diltiazem e hidroxizina e 312,5 ng.mL⁻¹ para cafeína e levamisol. Os valores médios de recuperação variaram de 6,0 a 42,6%. O método mostrou boa precisão e exatidão intra e intercorrida com coeficientes de variação e erros relativos menores que 15%. As amostras apresentaram-se estáveis após ciclos de congelamento-descongelamento e após serem mantidas por 24h em temperatura ambiente. Ainda, o método foi aplicado em cinco amostras de urina de usuários de cocaína e pelo menos um adulterante foi identificado em todas as amostras. Espera-se que este método possa contribuir para a precisão no diagnóstico das intoxicações por adulterantes da cocaína e para o adequado planejamento das medidas terapêuticas.

Palavras-chave: Cocaína; Adulterantes; Intoxicação; Urina; DLLME-SFO; Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

ABSTRACT

Cocaine is a stimulant that features a strong ability to cause dependence. Often adulterants are added to this drug in order to mimic its action or minimize its adverse effects. When there are other pharmacologically active components in the drug composition, severe problems can occur to users' health, such as intoxication symptoms. Thus, the aim of this study was to develop a method for the determination of the main adulterants of cocaine (caffeine, levamisole, lidocaine, phenacetin, diltiazem, and hydroxyzine) in human urine. The high-performance liquid chromatography with a photodiode array detector and the dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop were used as analysis technique and as sample preparation technique, respectively. The reversed-phase chromatographic separation was obtained with a C18 column (250 x 4.6 mm; 5 μ m; 80 Å) in gradient elution mode using acetonitrile-trifluoroacetic acid 0.026% (v/v) at 1 mL min⁻¹ as mobile phase, at 25°C, and detection at 235 nm. The analysis time was 25 min. Under optimum conditions, human urine samples were alkalized with 0.5 mol.L⁻¹ sodium phosphate buffer (pH 10) and added sodium chloride (20% m/v). Acetonitrile (150 μ L) and 1-dodecanol (30 μ L) were used as dispersive and extraction solvent, respectively. The method presented linear range of 312.5 – 3125 ng.mL⁻¹ for caffeine and levamisole and 187.5 – 1875 ng.mL⁻¹ for lidocaine, phenacetin, diltiazem, and hydroxyzine, with limit of quantification of 187.5 ng.mL⁻¹ to lidocaine, phenacetin, diltiazem, and hydroxyzine and 312.5 ng.mL⁻¹ for caffeine and levamisole. Recovery mean values were between 6.0 and 42.6%. The method showed good precision and accuracy, with within- and between-run relative standard deviation and relative error less than 15%. The samples were stable after freeze-thaw cycle and short-term room temperature stability tests. Additionally, this method was applied in samples of urine of five cocaine users and at least one adulterant was identified in all samples. It is expected that this method will contribute to the precision in the diagnosis of cocaine adulterants' intoxication and to the proper planning of therapeutic measures.

Keywords: Cocaine, Drug Adulteration, Poisoning, Urine Analysis, DLLME-SFO, High Performance Liquid Chromatography.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>Erythroxylum coca</i>	20
Figura 2: Cocaína.....	21
Figura 3: Representação esquemática do bloqueio da recaptação de dopamina pela cocaína.....	22
Figura 4: Cafeína.....	27
Figura 5: Lidocaína.....	28
Figura 6: Fenacetina.....	30
Figura 7: Paracetamol.....	30
Figura 8: Hidroxizina.....	31
Figura 9: Diltiazem.....	32
Figura 10: Levamisol.....	33
Figura 11: Representação esquemática da microextração líquido-líquido dispersiva.....	37
Figura 12: Representação esquemática da microextração líquido-líquido dispersiva com solidificação da gota orgânica flutuante.....	38
Figura 13: Representação esquemática de um cromatograma com alguns parâmetros cromatográficos importantes identificados.....	39
Figura 14: Cromatograma do levamisol (1) e da cafeína (2) coeluinto parcialmente ao utilizar como fase móvel o metanol: TFA 0,15% com fluxo constante de 1 mL.min ⁻¹ e detecção a 235 nm em modo gradiente (0-21 min- 20:80 - 80:20; 21-23 min- 80:20 – 20:80; 23-25 min- 20:80).....	56
Figura 15: Cromatograma do levamisol (1), cafeína (2) e lidocaína (3) ao utilizar como fase móvel metanol: TFA 0,05% com fluxo constante de 1 mL. min ⁻¹ e detecção a 235 nm em modo gradiente (0-21min- 20:80 - 80:20; 21-23min- 80:20 – 20:80; 23-25min-20:80).....	56
Figura 16: Cromatograma dos adulterantes e do padrão interno ao utilizar acetonitrila: TFA 0,15% como fase móvel com fluxo constante de 1mL.min ⁻¹ e detecção a 235nm em modo gradiente (0-21min- 20:80 - 80:20; 21-23min- 80:20 – 20:80; 23-25min- 20:80). Os picos do propranolol (1), diltiazem (2) e hidroxizina (3) apresentaram assimetria..	58

- Figura 17:** Cromatograma dos adulterantes e do padrão interno ao utilizar acetonitrila: TFA 0,05% como fase móvel em modo gradiente (0-21min- 20:80 - 80:20; 21-23min- 80:20 – 20:80; 23-25min- 20:80). O pico do propranolol (1) e da fenacetina (2) coeluíram..... 58
- Figura 18:** Cromatograma da (1)Cafeína; (2)Levamisol; (3)Lidocaína; (4)Propranolol; (5)Fenacetina; (6)Diltiazem; (7)Hidroxizina obtido através da condição otimizada descrita na Tabela 3. Concentração = 100 µg.mL⁻¹59
- Figura 19:** Efeito dos diferentes tipos de solvente extrator na área do pico cromatográfico da cafeína. Condição de extração: 50 µL de cada solvente extrator; 300 µL de isopropanol; pH do tampão = 9; sem adição de sal. As condições cromatográficas são apresentadas na Tabela 3..... 63
- Figura 20:** Efeito dos diferentes tipos de solvente extrator na área dos picos cromatográficos do levamisol e da lidocaína. Condição de extração: 50 µL de cada solvente extrator; 300 µL de isopropanol; pH do tampão = 9; sem adição de sal. As condições cromatográficas são apresentadas na Tabela 3..... 63
- Figura 21:** Efeito dos diferentes tipos de solvente extrator na área dos picos cromatográficos da fenacetina, do diltiazem, da hidroxizina e do propranolol. Condição de extração: 50 µL de cada solvente extrator; 300 µL de isopropanol; pH do tampão = 9; sem adição de sal. As condições cromatográficas são apresentadas na Tabela 3..... 63
- Figura 22:** Efeito dos diferentes tipos de solvente dispersor na área do pico cromatográfico da cafeína. Condição de extração: 50 µL de 1-dodecanol; 300 µL de cada solvente dispersor; pH do tampão = 9; sem adição de sal. As condições cromatográficas são apresentadas na Tabela 3..... 65
- Figura 23:** Efeito dos diferentes tipos de solvente dispersor na área dos picos cromatográficos do levamisol e da lidocaína. Condição de extração: 50 µL de 1-dodecanol; 300 µL de cada solvente dispersor; pH do tampão = 9; sem adição de sal. As condições cromatográficas são apresentadas na Tabela 3..... 65
- Figura 24:** Efeito dos diferentes tipos de solvente dispersor na área dos picos cromatográficos da fenacetina, do diltiazem, da hidroxizina e do propranolol. Condição de extração: 50 µL de 1-dodecanol; 300 µL de cada

solvente dispersor; pH do tampão = 9; sem adição de sal. As condições cromatográficas são apresentadas na Tabela 3..... 65

Figura 25: Gráfico dos *loadings* das duas componentes principais para os analitos observados..... 70

Figura 26: Dispersão dos 19 tratamentos em função dos escores dos componentes principais.....71

Figura 27: Cromatograma obtido a partir da análise dos adulterantes da cocaína (1875 ng.mL⁻¹) e do padrão interno (625 ng.mL⁻¹) através da microextração por DLLME-SFO sob as condições especificadas na Tabela 9 e da análise cromatográfica sob as condições especificadas na Tabela 3..... 73

Figura 28: Cromatograma obtido a partir da análise de uma amostra do *pool* de urina branca através da microextração por DLLME-SFO sob as condições especificadas na Tabela 9 e da análise cromatográfica sob as condições especificadas na Tabela 3..... 74

Figura 29: Cromatograma obtido a partir da análise de uma amostra do *pool* de urina branca fortificada com os adulterantes da cocaína no limite inferior de quantificação e o padrão interno através da microextração por DLLME-SFO sob as condições especificadas na Tabela 9 e da análise cromatográfica sob as condições especificadas na Tabela 3..... 75

Figura 30: Cromatograma obtido a partir da análise de uma amostra de água pura fortificada com os adulterantes da cocaína (1875 ng.mL⁻¹) e o padrão interno (937,5 ng.mL⁻¹) através da microextração por DLLME-SFO sob as condições especificadas na Tabela 9 e da análise cromatográfica sob as condições especificadas na Tabela 3.....75

Figura 31: Curva analítica da cafeína e do levamisol no intervalo de concentração 312,5 – 3125 ng.mL⁻¹ obtida através da microextração por DLLME-SFO sob as condições especificadas na Tabela 9 e da análise cromatográfica sob as condições especificadas na Tabela 3..... 77

Figura 32: Curva analítica da lidocaína, fenacetina, diltiazem e hidroxizina no intervalo de concentração 187,5 – 1875 ng.mL⁻¹ obtida através da microextração por DLLME-SFO sob as condições especificadas na Tabela 9 e da análise cromatográfica sob as condições especificadas na Tabela 3.....78

Figura 33: Cromatograma de amostra de urina do usuário 4, submetida à extração pelo método proposto utilizando a DLLME-SFO (linha contínua) sobreposto com o cromatograma das soluções-padrão dos adulterantes e do padrão interno a $409,84 \text{ ng.mL}^{-1}$ (linha tracejada)(a). A Figura 34b mostra os três primeiros picos e os dois últimos picos ampliados para melhor visualização.....87

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades físico-químicas dos principais adulterantes da cocaína.....	34
Tabela 2: Planejamento fatorial 2 ⁴ completo com ponto central para otimização dos parâmetros da microextração líquido-líquido dispersiva com solidificação da gota orgânica flutuante.....	50
Tabela 3: Condições cromatográficas otimizadas para a separação dos principais adulterantes da cocaína e do padrão interno propranolol.....	60
Tabela 4: Parâmetros cromatográficos dos analitos obtidos através das condições otimizadas.....	61
Tabela 5: Propriedades físicas dos solventes extratores testados na otimização da microextração líquido-líquido dispersiva com solidificação da gota orgânica flutuante.....	62
Tabela 6: Resultados do teste ANOVA e teste de Tukey para comparação entre os solventes extratores.....	64
Tabela 7: Resultados do teste ANOVA e teste de Tukey para comparação entre os solventes dispersores.....	66
Tabela 8: Efeitos dos parâmetros e suas interações na área dos picos de cada analito.....	69
Tabela 9: Condições otimizadas para a extração dos analitos por DLLME-SFO.....	72
Tabela 10: Precisão e exatidão da análise dos adulterantes da cocaína no limite inferior de quantificação, equação da reta e coeficiente de correlação das respectivas curvas analíticas.....	76
Tabela 11: Recuperação dos adulterantes da cocaína empregando a microextração por DLLME-SFO.....	79
Tabela 12: Precisão e exatidão intra e intercorrida das análises dos adulterantes da cocaína em urina empregando a microextração por DLLME-SFO.....	81
Tabela 13: Estabilidade dos adulterantes da cocaína na urina após ciclos de congelamento e descongelamento e após 24h em temperatura ambiente.....	82
Tabela 14: Aplicação da DLLME-SFO em amostras de urina de usuários de cocaína.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
cAMP	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i>
CAPS-A	Centro de Atenção Psicossocial- Álcool e Drogas
CG	Cromatografia gasosa
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector espectrofotométrico com arranjo de fotodiodos
CV	Coeficiente de Variação
DLLME	<i>Dispersive liquid-liquid Microextraction</i>
DLLME-SFO	<i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction based on Solidification of Floating Organic Drop</i>
DPR	Desvio Padrão Relativo
EC	Eletroforese Capilar
ER	Erro relativo
FD	Fator de Diluição
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HF- LPME	<i>Hollow Fiber - Liquid Phase Microextraction</i>
HSDB	Hazardous Substances Data Base
IARC	International Agency for Research on Cancer
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
INPAD	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas do Álcool e Outras Drogas
LIQ	Limite inferior de quantificação
LLE	<i>Liquid-liquid Extraction</i>
LSQ	Limite Superior de Quantificação
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PC	<i>Principal Component</i>
R	Recuperação
r	Coeficiente de Correlação
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada

RPA	Região Político-Administrativa
SDME	<i>Single Drop Microextraction</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SPE	<i>Solid-Phase Extraction</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TFA	Ácido trifluoroacético
UNODC	<i>United Nation of Drugs and Crime</i>

SUMÁRIO

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
1.1 Coca (<i>Erythroxylum coca</i>)	20
1.2 Cocaína	21
1.3 Efeitos da Cocaína sobre o Usuário	22
1.4 Consumo da cocaína	24
1.5 Adulteração da cocaína	25
1.6 Propriedades físico-químicas e farmacológicas dos principais adulterantes da cocaína	27
1.6.1 Cafeína	27
1.6.2 Lidocaína	28
1.6.3 Fenacetina	29
1.6.4 Hidroxizina	31
1.6.5 Diltiazem	32
1.6.6 Levamisol	33
1.7 Análises Toxicológicas	34
1.8 Preparo das amostras	35
1.9 Análise cromatográfica	38
1.10 Validação de métodos bioanalíticos	40
1.10.1 Seletividade	40
1.10.2 Linearidade	40
1.10.3 Limite Inferior de Quantificação	40
1.10.4 Exatidão	41
1.10.5 Precisão	41
1.10.6 Recuperação	42
1.10.7 Estabilidade	42
2 JUSTIFICATIVA	43
3 OBJETIVOS	45
3.1 Objetivo Geral	45
3.2 Objetivos Específicos	45
4 MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 Padrões, Solventes e Reagentes	46
4.2 Soluções-padrão	46
4.3 Obtenção das amostras de urina humana	47

4.4 Instrumentação.....	47
4.5 Condições cromatográficas de análise	48
4.6 Procedimento de extração por DLLME-SFO	48
4.7 Fator de diluição.....	49
4.8 Planejamento Fatorial Completo e Análise de Componentes Principais.....	50
4.9 Validação do Método.....	51
4.9.1. Seletividade.....	51
4.9.2 Linearidade.....	51
4.9.3 Limite inferior de quantificação.....	52
4.9.4 Recuperação.....	52
4.9.5 Precisão e exatidão.....	52
4.9.5.1 Precisão e exatidão intracorrida	53
4.9.5.2 Precisão e exatidão intercorrida	53
4.9.6 Estabilidade.....	53
4.9.6.1 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento	53
4.9.6.2 Estabilidade de curta duração.....	54
4.10 Aplicação do método validado.....	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 Desenvolvimento do Método Cromatográfico	55
5.2 Otimização dos Parâmetros de Extração por DLLME-SFO.....	61
5.2.1 Seleção do Solvente Extrator.....	61
5.2.2 Seleção do Solvente Dispersor.....	64
5.2.3 Planejamento Fatorial Completo e Análise de Componentes Principais	67
5.3 Validação	73
5.3.1 Seletividade.....	74
5.3.2. Limite Inferior de Quantificação	76
5.3.3 Linearidade.....	76
5.3.4 Recuperação.....	78
5.3.5 Precisão e Exatidão	79
5.3.6 Estabilidade.....	82
5.4 Aplicação.....	83
6 CONCLUSÕES	88
REFERÊNCIAS	89
ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	106

ANEXO B- FORMULÁRIO PARA VERIFICAÇÃO DO PERFIL DE CONSUMO DE COCAÍNA.....	107
ANEXO C- APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO-HU/UFS.....	109
ANEXO D- APROVAÇÃO PELA COORDENAÇÃO DE SAÚDE MENTAL DO MUNICÍPIO DE RECIFE-PE.....	111
ANEXO E- CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE PÔSTER EM CONGRESSO	112
ANEXO F- CARTA CONVITE DA REVISTA TOXICOLOGY.....	113
ANEXO G- COMPROVANTE DE REVISÃO DO ARTIGO	114

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Coca (*Erythroxylum coca*)

O gênero *Erythroxylum* é o mais representativo da família Erythroxylaceae. Das espécies deste gênero são extraídos vários alcaloides, porém apenas uma pequena parcela fornece quantidades consideráveis de cocaína. Das folhas destas plantas, podem ser obtidos teores que variam de 0,5 a 1,5% em alcaloides totais, dos quais cerca de 75% são correspondentes à cocaína (UNODC, 2008).

As regiões de cultivo das variedades de *Erythroxylum* são inerentes, quase que exclusivamente, às regiões andinas da América do Sul, da Austrália, Índia e África (CALDAS NETO, 1998; GOLDSTEIN; DESLAURIERS; BURDA, 2009). Peru, Bolívia e Colômbia são responsáveis por praticamente todo o cultivo mundial de *Erythroxylum coca* (Figura 1), popularmente conhecida como coca (UNODC, 2015). Esta é uma árvore pequena, muitas vezes tratada como arbusto, com casca de coloração vermelho-amarronzada e folhas dispostas em espiral (VARGAS; TALHAVINI, 2000).



Figura 1- *Erythroxylum coca*.

Fonte: Natural Resources Conservation Service (NRCS)

A coca foi utilizada por milênios pelos povos indígenas da região andina em cerimônias religiosas e com propósitos medicinais (SILVERBLATT, 1987; APPELBOOM, 1991; STOLBERG, 2011), porém atualmente a variação Lamarck desta planta e todos os sais, isômeros, ésteres e éteres das substâncias obtidas a partir desta planta são controladas pela Resolução RDC nº 21-ANVISA/MS de 2010 por estarem na Lista E - Lista de plantas que podem originar substâncias entorpecentes e/ou psicotrópicas.

1.2 Cocaína

O mais importante alcaloide extraído das folhas das plantas do gênero *Erythroxylum* é o 3-benzoiloxi-8-metil-8-azabicyclo[3,2,1]octano-4-carboxílico, a cocaína (Figura 2). Esta substância pertence à classe dos alcaloides tropânicos biossintetizados pela via da acetil coenzima A (DOCIMO et al., 2012).

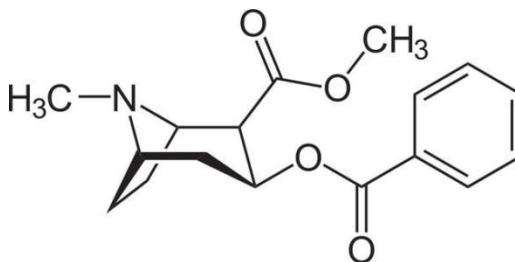


Figura 2: Cocaína

Fonte: The Merck Index Online

Como a quantidade de cocaína presente nas folhas da coca decai ao longo do tempo, o processo de extração e refinamento é realizado o quanto antes (WARNER, 1993). As folhas são submetidas à maceração formando a pasta da coca que pode ser tratada com ácido clorídrico, formando o cloridrato de cocaína (GOLDSTEIN; DESLAURIERS; BURDA, 2009).

Este sal é um pó cristalino, inodoro e com sabor amargo que possui um alto ponto de fusão e que se decompõe com o aumento de temperatura, portanto, pode ser utilizado, por exemplo, por via oral, intravenosa ou nasal. O cloridrato de cocaína pode ainda ser tratado com substância alcalina, se convertendo na sua forma de base livre, denominada *crack*, a qual pode ser fumada, pois possui um ponto de fusão mais baixo (WARNER, 1993; GOLDSTEIN; DESLAURIERS; BURDA, 2009).

A cocaína é um dos mais potentes estimulantes do sistema nervoso central (SNC) por atuar no bloqueio da recaptação dos neurotransmissores norepinefrina, serotonina e dopamina que permanecem mais tempo na fenda sináptica e se ligam aos receptores com maior intensidade. O acúmulo de dopamina na fenda sináptica dos neurônios que inervam a área tegmental ventral, a qual está relacionada ao sistema de recompensa localizada no mesencéfalo resulta numa estimulação crônica dos receptores pós-sinápticos (Figura 3) (DINIS-OLIVEIRA et al., 2012). Isso gera a euforia experimentada pelos usuários, com aumento de energia, libido e autoconfiança, bem como redução da fadiga e do apetite (CICCARONE, 2011).

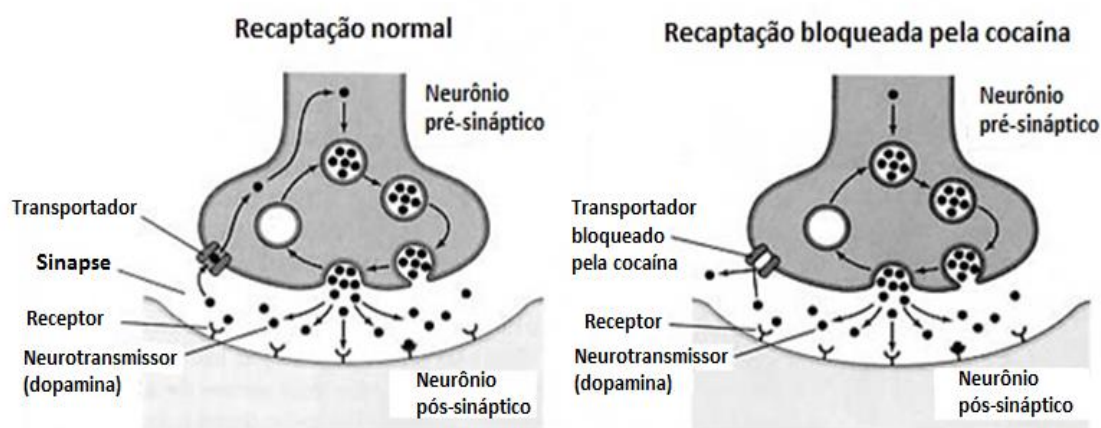


Figura 3: Representação esquemática do bloqueio da recaptação de dopamina pela cocaína.
Fonte: Adaptado de ABADINSKY, 2004.

Com a subsequente queda nos níveis de dopamina, o usuário apresenta disforia e isso está relacionado com o comportamento de busca, já que o usuário crônico utiliza a cocaína a fim de aumentar novamente os níveis de dopamina. A cronicidade do ciclo aumento-diminuição dos níveis deste neurotransmissor leva ao desenvolvimento da farmacodependência à cocaína (DINIS-OLIVEIRA et al., 2012).

1.3 Efeitos da Cocaína sobre o Usuário

O abuso da cocaína está associado a inúmeros problemas de ordem física, psiquiátrica e social no usuário. A perfuração do septo nasal é uma das complicações mais comuns decorrentes do uso dessa droga via nasal. Devido à sua potente ação vasoconstritora, há isquemia dos tecidos na mucosa nasal e a sua progressiva destruição (SILVESTRE et al., 2010). A cocaína também afeta a saúde bucal, pois após sua aplicação na mucosa, o cloridrato de cocaína mistura-se com a saliva e passa a apresentar a capacidade de desmineralizar a dentina e o esmalte. Vários outros problemas como erosão da gengiva, bruxismo e aumento da incidência de doenças periodontais também podem ocorrer (KAYAL et al., 2014; MALONEY, 2010).

A cocaína também pode causar pseudovasculite, vasculite urticariforme, ulcerações de profundidades variáveis, dentre outros problemas, culminando em alguns casos em necrose e gangrena de extremidades. Isto porque os vários efeitos da cocaína atuam sinergicamente na formação de trombos, defeitos focais de

perfusão e uma ampla variedade de vasculopatias, que podem preferencialmente envolver pequenos vasos e manifestar-se como necrose aguda de pele (LUTFY; NOLAND; JARMUSKE, 2013; DINIS-OLIVEIRA et al., 2012; SHAWWA et al., 2013; DHAWAN; WANG, 2007).

Hemorragia intracerebral é outra complicação decorrente do abuso de cocaína. Devido a seus efeitos simpaticomiméticos, a cocaína causa vasoespasmo arterial e formação de trombos, o que pode levar ao infarto cerebral (TREADWELL; ROBINSON, 2007). A cocaína também aumenta a frequência cardíaca, a pressão arterial sistêmica e a contratilidade ventricular esquerda, que são três importantes determinantes da demanda de oxigênio pelo miocárdio. Alguns eventos cardiovasculares relacionados com o consumo de cocaína incluem angina de peito, infarto do miocárdio, miocardiopatia e morte súbita por causas cardíacas (STANKOWSKI; KLONER; REZKALLA, 2015).

Em geral, a cocaína pode causar uma grande variedade de complicações pulmonares, como broncoconstrição, exacerbação da asma, pneumotórax, hemorragia alveolar difusa, barotrauma e “pulmão de *crack*”. Este último consiste no desenvolvimento de falência respiratória com opacidades bilaterais que aparecem logo após o uso do *crack* e clareiam rapidamente após a interrupção do uso (ALMEIDA et al., 2015; BULBENA-CABRE; RAMOS; GORMAN, 2015). Outro problema relacionado ao abuso da cocaína é a rabdomiólise, que consiste na perda de força muscular esquelética com o extravasamento de mioglobina, eletrólitos e proteínas intracelulares na circulação. A insuficiência renal e mioglobinúria podem ocorrer como sequelas (O'CONNOR et al., 2015).

Problemas psiquiátricos como paranoia, depressão e ataques de pânico também podem ocorrer com o uso de cocaína (LANGE; HILLS, 2001; DINIS-OLIVEIRA et al., 2012). Uma síndrome rara associada com o uso crônico dessa substância é o *excited delirium*, que pode ser descrita como um período prolongado de comportamento bizarro do usuário. Os sinais/sintomas incluem comportamento violento, nudez pública, hiperatividade, paranoia, discurso incoerente e hipertermia, frequentemente levando à morte (PLUSH et al., 2015).

O uso de cocaína compromete não só o funcionamento do organismo, como também interfere nas relações sociais do usuário, de forma que seus vínculos estáveis se fragilizam e rompem-se, o que acaba por marginalizá-lo progressivamente (RAUPP; ADORNO, 2010). Portanto, pelo alto potencial que esta

droga apresenta de causar dependência e devido ao seu impacto social e toxicológico, o uso de cocaína pode ser considerado um importante problema de saúde pública em todo o mundo (ROLDAN, 2014; DINIS-OLIVEIRA et al., 2012).

1.4 Consumo da cocaína

O Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (*United Nations Office on Drugs and Crime*, UNODC) publica anualmente o Relatório Mundial sobre Drogas, o qual traz referências ao uso de cocaína no mundo. No relatório de 2015, as estimativas mostraram que 13 a 20 milhões de pessoas usaram cocaína em 2013, o que representa 0,3-0,4% da população mundial com idade entre 15-64 anos.

As regiões nas quais são observados os maiores índices de prevalência de consumo de cocaína são a América do Norte e do Sul e a Europa Ocidental e Central (UNODC, 2013). Contudo, tem se observado uma tendência de declínio na Europa Ocidental e Central e América do Norte, especialmente nos Estados Unidos, ao longo dos últimos anos (UNODC, 2014; UNODC, 2015).

Na América do Sul, a prevalência anual do uso de cocaína aumentou de 0,7% em 2010 (1,84 milhões de usuários) para 1,2% em 2012 (3,34 milhões de usuários) e manteve-se no mesmo nível em 2013. O aumento do uso nessa região muito se deve ao aumento na utilização dessa droga observado no Brasil, que é o maior mercado consumidor de cocaína na América do Sul (UNODC, 2015).

A UNODC ressalta que o Brasil apresenta uma importante função tanto como país de trânsito como país de destino da cocaína, já que possui extensas fronteiras com os três principais países produtores desta droga (Bolívia, Peru e Colômbia), ampla costa litorânea que proporciona fácil acesso ao Oceano Atlântico para o tráfico em direção à África e à Europa, além de significativos níveis de uso tanto de cloridrato de cocaína como de *crack* (UNODC, 2013; UNODC, 2015).

De acordo com o II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (2012) realizado pelo INPAD (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas do Álcool e Outras Drogas), o Brasil é o segundo maior mercado consumidor de cocaína no mundo em relação ao número absoluto de usuários, atrás somente dos Estados Unidos e o primeiro colocado em relação ao mercado consumidor de *crack*. Em 2011, o Brasil apresentou uma estimativa de prevalência do uso de cocaína entre a população adulta de 1,7% (INPAD, 2012).

1.5 Adulteração da cocaína

Assim como no Brasil, em muitos países a “cocaína de rua” é raramente comercializada na sua forma pura, desta forma pode conter várias substâncias como contaminantes, diluentes e adulterantes (COLE et al., 2011; MAGALHÃES et al., 2013). Os contaminantes ou impurezas são substâncias presentes na droga como resultado natural do processo de extração e refinamento, como por exemplo, os alcaloides minoritários que são extraídos conjuntamente com a cocaína. Os diluentes são substâncias inertes utilizadas para aumentar o volume da droga, e consequentemente o lucro. Pode-se citar, como exemplo, a lactose, o bicarbonato de sódio, o leite em pó e as farinhas em geral (EVRARD; LEGLEYE; CADET-TAÏROUA, 2010).

Por outro lado, os adulterantes são substâncias deliberadamente adicionadas com o intuito de mimetizar ou aumentar os efeitos da droga ou minimizar seus efeitos adversos, possuindo assim, atividade farmacológica como, por exemplo, a lidocaína, o levamisol e os estimulantes como cafeína e efedrina. Essas substâncias possibilitam que o material seja confundido com um produto de melhor qualidade, além de alguns serem compostos baratos que também podem ser utilizados para diluir a cocaína e aumentar os lucros (EVRARD; LEGLEYE; CADET-TAÏROUA, 2010; BRUNT et al., 2009).

Em estudos sobre a composição de drogas ilícitas e seu impacto na saúde dos usuários, os adulterantes são mais comumente investigados que os contaminantes e os diluentes. Isso porque essas substâncias podem levar a problemas de saúde adicionais ao usuário, já que podem modificar o perfil farmacológico da droga que está sendo comercializada (BRUNT et al., 2009; UNODC, 2011).

Vários estudos mostram a presença de adulterantes em amostras de cocaína. Em estudo realizado na Suíça, das mais de 6000 amostras apreendidas de 2006 a 2014, 97% delas estavam adulteradas e os adulterantes mais frequentemente encontrados foram: fenacetina (80%), levamisol (65%), lidocaína (47%), cafeína (39%), diltiazem (26%) e hidroxizina (25%) (BROSÉUS et al., 2015). Em estudo realizado no Brasil, o conteúdo de cocaína nas amostras do estado de Minas Gerais variou de 6,4% a 75,3% e os principais adulterantes identificados foram a cafeína e

a lidocaína em 76% e 66,7% das amostras, respectivamente (MAGALHÃES et al., 2013).

No estudo publicado por Botelho e colaboradores (2014), das 210 amostras apreendidas pela Polícia Federal em diferentes estados brasileiros, a pureza média observada foi de 71% e os adulterantes mais comumente encontrados foram a fenacetina (30% das amostras), o levamisol (19%), a cafeína (6%) e a lidocaína (4%). Em outro estudo realizado no Brasil, no qual foram avaliadas 54 amostras de cocaína apreendidas no ano de 2011 e que estavam associadas com o tráfico internacional, a pureza variou de 16,5% a 91,4% e o levamisol foi o adulterante mais frequentemente identificado (55,6% das amostras). Lidocaína, cafeína, fenacetina e 4-dimetilaminoantipirina também foram encontradas, porém em menores concentrações (LAPACHINSKE et al., 2015).

Em estudo realizado na Holanda, verificou-se que em 2007, alguns dos adulterantes mais frequentemente adicionados à cocaína foram: fenacetina (40,6%), cafeína (15,8%), diltiazem (12%), levamisol (11,6%), lidocaína (6,4%) e hidroxizina (4,4%). Neste último estudo, foi observado que a cocaína adulterada foi mais associada a relatos de reações adversas do que a cocaína não adulterada. As reações relatadas foram náuseas, dor de cabeça, reações alérgicas, alucinações e efeitos cardiovasculares e em alguns casos foi necessária a hospitalização (BRUNT et al., 2009).

Na literatura há vários casos de usuários atendidos em caráter emergencial devido aos efeitos da cocaína adulterada. Roldan (2014) descreve o caso de um usuário que sofreu intoxicação aguda devido à fenitoína adicionada à droga. Além deste, alguns trabalhos descrevem casos de intoxicações por cocaína adulterada com anticolinérgicos como a atropina (RIDDER; KLIMEK; RUPREHT, 2005; WEINER et al., 1998) e problemas como vasculopatia cutânea após exposição à cocaína adulterada com levamisol (SOUIED et al., 2014; JAMES et al., 2013; ULLRICH et al., 2011).

Portanto, é importante que a equipe de saúde, ao atender usuários com complicações devido ao uso de drogas ilícitas, perceba que ela não está lidando somente com o abuso de uma única substância, mas sim de uma mistura de princípios ativos. Nesse contexto, os adulterantes conferem maior risco aos usuários, pois podem causar interações medicamentosas sobre as quais ainda há pouco conhecimento (WEINER et al., 1998; BRUNT et al., 2009).

Muitas dessas substâncias são prescritas para ingestão oral, porém quando utilizadas como adulterantes, elas são absorvidas por outras vias, como a nasal. Isso pode afetar parâmetros farmacocinéticos como a taxa de absorção ou a biodisponibilidade (BRUNT et al., 2009). Além disso, a grande variação do conteúdo de cocaína mostra a imprevisibilidade dos efeitos nos usuários, os quais podem variar de nenhum efeito a intoxicação severa ou fatal (BERNARDO et al., 2003).

1.6 Propriedades físico-químicas e farmacológicas dos principais adulterantes da cocaína

1.6.1 Cafeína

A cafeína, 1,3,7-trimetil-1H-purino-2,6(3H,7H)-diona (Figura 4), é uma substância presente em bebidas e também utilizada como agente farmacológico (MITCHELL et al., 2014; PETERSEN, 2013). É um pseudoalcaloide que faz parte do grupo das metilxantinas, apresenta-se na forma de cristais brancos, é inodoro e possui sabor amargo (ILO, 1983; O'NEIL, 2013).

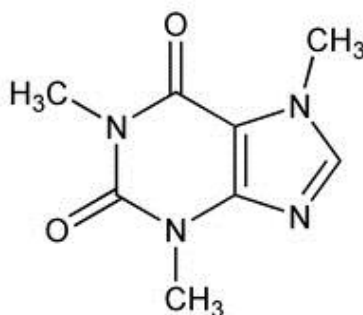


Figura 4: Cafeína
Fonte: The Merck Index Online

Os principais mecanismos de ação da cafeína envolvem o antagonismo aos receptores de adenosina A₁ e A_{2A} e inibição da cAMP fosfodiesterase produzindo leve efeito psicoestimulante, efeitos ansiogênicos e aumento da pressão sanguínea (CHILDS et al., 2008; VANATTOU-SAIFOUDINE; MCNAMARA; HARKIN, 2012). Assim, esta substância pode potencializar os efeitos neuropsiquiátricos e cardiovasculares da cocaína (BERNARDO et al., 2003). É uma substância lícita, de baixo custo e mais prontamente acessível que as drogas ilícitas, o que justifica seu uso para além de mimetizar os efeitos da cocaína, também dilui-la.

O consumo concomitante de cafeína com drogas de abuso psicoestimulantes como a cocaína pode provocar reações adversas agudas e graves, além de consequências em longo prazo. Os mecanismos pelos quais a cafeína aumenta a toxicidade de drogas psicoestimulantes incluem alterações na regulação da temperatura corporal, cardiotoxicidade e redução do limiar convulsivo. A cafeína também influencia os efeitos reforçadores das drogas psicoestimulantes (VANATTOU-SAÏFOUDINE; MCNAMARA; HARKIN, 2012). Além disso, a cafeína pode potencializar o efeito isquêmico da cocaína, o que pode agravar o quadro de perfuração do septo nasal (SASTRY; LEE; HAR-EL, 1997).

Em pequenas quantidades há poucas repercussões para saúde, porém doses moderadas a elevadas podem causar considerável dano. Deve-se atentar para o fato de que a cafeína está presente em fontes alimentares como café, refrigerantes e chás, o que pode aumentar a quantidade total a que o indivíduo está exposto. Dentre os efeitos adversos que esta substância pode causar estão os distúrbios do humor e do sono, ansiedade e dores de cabeça (SWEETMAN, 2009; COLE et al., 2011; FDA, 2010).

A ingestão prolongada de altas doses de cafeína pode produzir tolerância e dependência psicológica. Os sinais físicos de abstinência, como dores de cabeça, irritação, nervosismo, ansiedade e vertigens podem ocorrer mediante descontinuação abrupta do uso (ASHP, 2013).

1.6.2 Lidocaína

A lidocaína, 2-(dietilamino)-N-(2,6-dimetilfenil)acetamida (Figura 5), é um pó cristalino, branco a ligeiramente amarelado, com sabor levemente amargo e odor característico (OSOL, 1980; LEWIS, 1997).

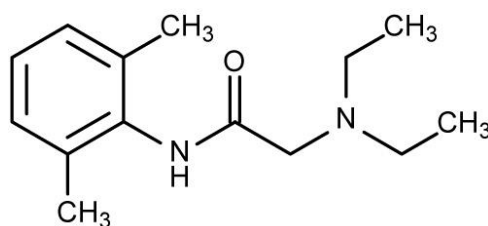


Figura 5: Lidocaína
Fonte: *The Merck Index Online*

Esta substância é utilizada na prevenção e tratamento de dor local. Ao entrar nos canais de sódio dos nervos, é capaz de interromper a atividade neural e de bloquear a condução do impulso nervoso, promovendo anestesia local. Também atua como agente antiarrítmico por deprimir levemente a fase inicial da despolarização e reduzir a duração do potencial de ação (COX; DURIEUX; MARCUS, 2003). A lidocaína intravenosa encontra-se na lista de medicamentos potencialmente perigosos em hospitais (ISMP, 2015).

Esta substância é adicionada à cocaína a fim de mimetizar sua propriedade anestésica local e como possui maior efeito anestésico local que a cocaína, dá a impressão ao usuário de uma droga de melhor qualidade (COLE et al., 2011). Dinis-Oliveira e colaboradores (2012) relatam que é necessária cautela na realização de tratamento dentário que necessite de anestesia local em usuários de cocaína, pois como mencionado anteriormente, tanto esta droga quanto à lidocaína que potencialmente pode estar presente na sua composição, atuam como anestésicos locais.

Os efeitos adversos da lidocaína envolvem principalmente o sistema nervoso central, são normalmente de curta duração e dose dependentes. As reações adversas no SNC podem ser manifestadas por sonolência, tonturas, desorientação, confusão, vertigens, tremores, agitação, distúrbios visuais, náuseas, vômitos, parestesia, entre outros (McEVOY, 2002). Os efeitos cardiovasculares envolvem depressão miocárdial, hipotensão, bradicardia e arritmias (SWEETMAN, 2009).

Embora sejam conhecidos os riscos do uso de cocaína para a saúde humana, as consequências da combinação de lidocaína à cocaína não são totalmente exploradas na literatura. Estudos realizados com animais sugerem que a lidocaína ao ser utilizada concomitantemente com a cocaína promova um aumento na toxicidade desta substância. Isso porque estes compostos interagem sinergicamente aumentando a atividade convulsiva. A natureza desta resposta ocorre em parte por uma depressão da transmissão neuronal inibitória (BARAT; ABDEL-RAHMAN, 1996; DERLET; ALBERTSON; THARRATT, 1991).

1.6.3 *Fenacetina*

A fenacetina, N-(4-etoxifenil)etanamida (Figura 6), é um agente farmacológico que se apresenta na forma de pó branco, é inodoro, ligeiramente amargo e possui

propriedades analgésicas e antipiréticas (O'NEIL, 2013; SWEETMAN, 2009). Suspeita-se que os motivos pelos quais seja adicionada como adulterante à cocaína sejam por apresentar ação analgésica e características físicas semelhantes a essa droga (COLE et al., 2010).

Este fármaco, cujo metabólito ativo é o paracetamol (Figura 7), é proibido em muitos países devido a sua relação com insuficiência renal e ao ser classificado pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) no grupo 2A, ou seja, como provavelmente cancerígeno para os seres humanos (IARC, 1982; COLE et al., 2011). Efeitos hematológicos, como a metemoglobinemia, anemia hemolítica e sulfemoglobinemia também são descritos (SWEETMAN, 2009). Conforme consulta à base de dados de registros em vigilância sanitária, His-Prods através do portal I-HELPS 3.0 (2015), no Brasil, há petição de registro deste fármaco, porém já expirada.

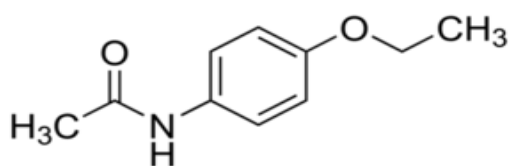


Figura 6: Fenacetina

Fonte: *The Merck Index Online*

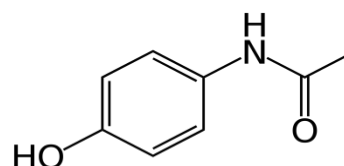


Figura 7: Paracetamol

Fonte: *The Merck Index Online*

A fenacetina, assim como a cafeína, se volatiliza com o aumento da temperatura, dessa forma pode ser absorvida por via pulmonar após utilização da cocaína na forma de *crack* (SABOGAL-CARMONA; URREGO-NOVOA, 2012). Algumas evidências sugerem que a via de administração nasal pode desempenhar um papel importante no aumento da toxicidade da fenacetina. Isto pode ser resultado de determinados metabólitos tóxicos que são formados por enzimas presentes na mucosa nasal. Também pode haver uma possibilidade de interação direta da cocaína ou um de seus metabólitos com a fenacetina ou um dos seus metabólitos, porém mais estudos são necessários para que isso seja confirmado (PETERS et al., 1999; DING; KAMINSKY, 2003; GU et al., 2005).

Embora a venda de fenacetina tenha sido proibida em alguns países, há evidências para acreditar que este fármaco ainda esteja amplamente disponível (McTAVISH, 2004). Devido à sua toxicidade comprovada e presença como adulterante na cocaína, se recomenda que ao realizar exames clínicos de usuários

desta droga de abuso sejam realizados testes hematológicos e de função renal (SABOGAL-CARMONA; URREGO-NOVOA, 2012; BRUNT et al., 2009; FLORIANI et al., 2014).

1.6.4 Hidroxizina

A hidroxizina, 2-[2-[4-[(4-clorofenil)-fenilmetil]piperazin-1-il]etoxi]etanol (Figura 8), é um pó branco, inodoro e com sabor amargo (O'NEIL, 2013). Esta substância é um anti-histamínico de primeira geração derivado da piperazina com propriedade levemente ansiolítica, sedativa e analgésica (SWEETMAN, 2009; SIMONS; SIMONS; FIRTH, 1984). Também tem sido utilizada para o tratamento da agitação causada pela abstinência aguda de álcool, redução da dose de analgésicos opiáceos e para controle de náuseas e vômitos de várias causas (ASHP, 2013).

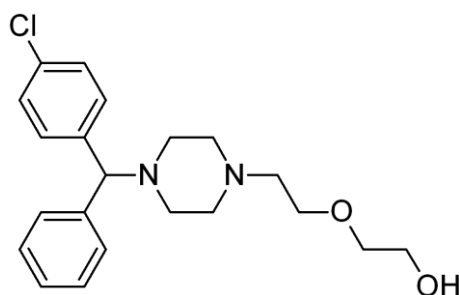


Figura 8: Hidroxizina

Fonte: *The Merck Index Online*

Dentre os efeitos colaterais mais frequentemente observados está a sedação, devido à capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica. Outros efeitos colaterais comuns incluem: sonolência, tontura, irritabilidade, alterações visuais, náuseas e perda de apetite (GELLER et al., 2006). De maneira geral, em uma sobredosagem de hidroxizina podem ser esperados sintomas que são extensões desses efeitos adversos. Sedação excessiva tem sido o principal efeito relatado e hipotensão, apesar de rara, também pode ocorrer (ASHP, 2013).

Brunt e colaboradores (2009) verificaram que a hidroxizina foi um dos adulterantes que mais estava relacionado com relatos de reações adversas por usuários de cocaína. Possivelmente, efeitos imprevisíveis da aplicação nasal poderiam estar relacionados com a ocorrência de efeitos adversos. Não se sabe por que a hidroxizina é usada como adulterante, mas é provavelmente utilizada nas etapas finais do refinamento da cocaína (FUCCI, 2007; COLE et al., 2010). Outra

explicação sugerida por Pawlik e colaboradores (2015) é de que a adição da hidroxizina em preparações com cocaína deve-se ao seu efeito sedativo de longa duração, que permite ao usuário ter a sensação de que pode dormir mesmo se utilizar a cocaína.

1.6.5 Diltiazem

Diltiazem, *cis*- (+) - [2- (2 -dimetilaminoetil) -5- (4- metoxifenil)- 3 –oxo -6 –tia - 2-azabicyclo [5,4,0] undeca-7,9,11-trien-4-il] etanoato (Figura 9), é um agente farmacológico que se apresenta na forma de pó cristalino branco, inodoro e com sabor amargo (O'NEIL, 2013). Este fármaco é um bloqueador dos canais de cálcio e seu uso clínico se baseia nas suas propriedades antiarrítmicas e anti-isquêmicas (APOSTOLAKOS; VARON, 1996).

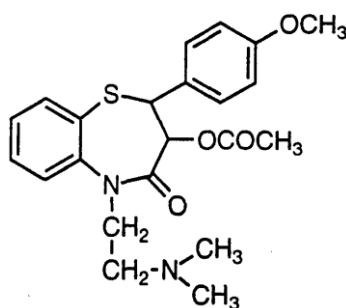


Figura 9: Diltiazem

Fonte: *The Merck Index Online*

A adição desta substância à “cocaína de rua” pode ser uma tentativa de alterar o perfil de risco da droga, procurando atenuar alguns dos efeitos cardíacos negativos da cocaína (SCHINDLER et al., 1995). No entanto, os resultados do estudo de Brunt e colaboradores (2009) não relatam efeitos protetores consistentes sobre a cardiotoxicidade induzida pela cocaína. Na verdade, os dados mostram que a maioria das reações adversas provocadas pela cocaína adulterada com diltiazem foi cardiovascular.

O efeito cardiovascular adverso mais comumente observado com diltiazem intravenoso é a hipotensão sintomática ou assintomática, o que ocorreu em 3,2% e 4,3%, respectivamente, dos pacientes que receberam o medicamento em ensaios clínicos. A hipotensão ou hipotensão postural também foi observada em cerca de 1% ou menos dos pacientes que receberam diltiazem via oral (McEVROY, 2002).

Náusea ocorre em até 3% dos pacientes que receberam diltiazem. Anorexia, vômitos, diarreia, dor abdominal, dispepsia, disgeusia, dentre outros ocorreram em <2% dos pacientes que receberam a droga. A constipação ou boca seca tem sido relatada em <2% dos pacientes que receberam o fármaco por via oral e em <1% dos doentes tratados com a droga via intravenosa (McEVOY, 2002). É necessário investigar se o uso de diltiazem por outras vias (nasal ou pulmonar), como ocorre quando da sua utilização como adulterante da cocaína, pode resultar em doses sistêmicas semelhantes às observadas com a via intravenosa ou oral (BRUNT et al., 2009).

1.6.6 Levamisol

O levamisol, (6S)-6-fenil-2,3,5,6-tetrahidroimidazo[2,1-b][1,3]tiazol (Figura 10), é um fármaco que se apresenta na forma de pó cristalino branco (SIGMA ALDRICH, 2013). É um agente anti-helmíntico desenvolvido nos anos 60, pertencente à classe dos imidazotiazóis. Além desta aplicação, também foi utilizado no tratamento de várias doenças autoimunes e como adjuvante na terapia contra o câncer (AMERY; BRUYNSEELS, 1992). Foi utilizado por muitos anos em humanos, mas atualmente em muitos países, tem somente aplicação veterinária devido à ocorrência de efeitos adversos como agranulocitose, vasculopatia cutânea e leucoencefalopatia (COLE et al., 2010; BUCHANAN; LAVONAS, 2012). Conforme consulta à base de dados de registros em vigilância sanitária, His-Prods através do portal I-HELPS 3.0 (2015), no Brasil, há petição com registro válido do medicamento levamisol com nome comercial de Ascarizole® e Ascaridil®.

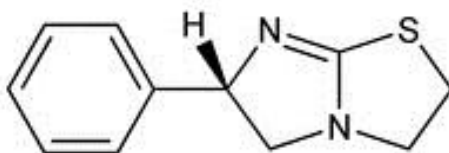


Figura 10: Levamisol
Fonte: The Merck Index Online

O levamisol ganhou o interesse da área forense após o aumento da sua utilização como adulterante da cocaína. De fato, esta substância é encontrada na maioria das amostras apreendidas desta droga (LAPACHINSKE et al., 2015; EVRARD; LEGLEYE; CADET-TAIROU, 2010; SCHNEIDER; MEYS, 2011) e tem

ligação com o acometimento de síndrome autoimune, neutropenia/agranulocitose e púrpura retiforme com possível necrose envolvendo orelhas, face e extremidades nos usuários de cocaína (JAMES et al., 2013; ULLRICH et al., 2011). Também podem ocorrer pauci-imunoglomerulonefrite e hemorragia pulmonar (NOLAN; JEN, 2015).

A razão pela qual o levamisol é utilizado como adulterante é incerta, mas provavelmente deve-se ao fato de que apresenta propriedades químicas e físicas semelhantes à da cocaína como cor e ponto de fusão, o que torna praticamente impossível ao usuário a distinção entre essas duas substâncias (CHANG; OSTERLOH; THOMAS, 2010). Além disso, este adulterante juntamente com seu metabólito aminorex, aumenta a neurotransmissão de norepinefrina ao inibir sua recaptação e aumenta a concentração de compostos opiáceos endógenos (HOFMAIER et al., 2014; HESS et al., 2013).

A Tabela 1 apresenta mais algumas propriedades físico-químicas importantes dos principais adulterantes da cocaína.

Tabela 1: Propriedades físico-químicas dos principais adulterantes da cocaína.

Adulterante	Massa molecular (g/mol)	pKa	Coefficiente de partição (octanol/água)
Cafeína	194,19	10,40	-0,07
Lidocaína	234,34	7,86	2,26 (pH 7,4)
Fenacetina	179,22	2,20	1,58
Hidroxizina	374,90	pKa ₁ = 2,47 (amina); pKa ₂ = 6,95 (amina)	2,36
Diltiazem	414,53	8,06	2,70
Levamisol*	204,29	6,98	1,84

Fonte: HAZARDOUS SUBSTANCES DATA BANK (HSDB). *Dados obtidos através do OPEN CHEMISTRY DATABASE (PubChem).

1.7 Análises Toxicológicas

Diante do risco toxicológico associado à adulteração da “cocaína de rua” (BERNARDO et al., 2003; VROEGOP et al., 2009), surge então o interesse no desenvolvimento de métodos eficazes e rápidos para a determinação dos adulterantes em amostras biológicas dos usuários de cocaína intoxicados que são

hospitalizados. Isso pode contribuir para a adequação do tratamento dos pacientes e com o direcionamento e evolução clínica dos mesmos.

Nas análises toxicológicas são usadas amostras biológicas tradicionais (urina e sangue) (ROLDAN, 2014; BECK; ERICSSON, 2014) e alternativas (cabelo, suor, saliva, entre outras) (JOYA et al., 2012; GARCÍA-SERRA et al., 2012). Como matriz biológica de escolha, a urina se apresenta adequada, pois é de fácil obtenção, apresenta baixa viscosidade, fácil manipulação quando comparada com o sangue, coleta não invasiva, menor custo de análise e não possui risco ocupacional à saúde (TUOMI; JOHNSON; REIJULA, 1999).

A urina é uma das matrizes biológicas com menor número de interferentes endógenos, pois é constituída principalmente por água e apresenta níveis significantes de proteína e lipídios (que poderiam interferir no processo de extração e identificação de fármacos) somente durante estados patológicos. Além disso, quando comparada ao sangue, frequentemente apresenta concentrações mais altas de xenobióticos e/ou de seus produtos de biotransformação (BULCÃO et al., 2012)

Para realizar com sucesso análises de rotina de amostras biológicas contendo inúmeros componentes, laboratórios de toxicologia analítica requerem métodos analíticos simples e rápidos. Neste contexto, as técnicas de separação, tais como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a cromatografia gasosa (CG) e a eletroforese capilar (EC) se mostram bastante adequadas (SIERADZKA; WITT; MILNEROWICZ, 2014; FELIU et al., 2015). Contudo, a análise de drogas em fluidos biológicos normalmente é complicada devido às baixas concentrações do analito e pela complexidade das matrizes biológicas, portanto, antes da análise deve-se seguir uma etapa de enriquecimento e extração (REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010).

1.8 Preparo das amostras

Várias técnicas são utilizadas para realizar a etapa de preparo da amostra. A extração líquido-líquido (*Liquid-liquid extraction*, LLE) é uma técnica tradicional baseada na transferência do analito de uma fase aquosa para uma fase orgânica. A eficiência depende da afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão das fases e do número de extrações. É uma técnica simples que pode utilizar um número grande de solventes puros e disponíveis comercialmente, os quais fornecem uma ampla faixa de solubilidade e seletividade. Este tipo de extração, no entanto,

apresenta uma série de desvantagens como o uso de uma grande quantidade de amostra e de solventes orgânicos tóxicos, várias etapas que estão associadas à perda de analito, contaminação da amostra e geração de uma grande quantidade de poluentes (XU; BASHEER; LEE, 2007; PENA-PEREIRA; LAVILLA; BENDICHO, 2009).

A tendência atual na preparação de amostras para análise de traços está direcionada no desenvolvimento de sistemas de extração miniaturizados que são mais rápidos, mais simples, menos onerosos e mais ambientalmente favoráveis que as técnicas tradicionais, como a LLE ou extração em fase sólida (*Solid-Phase Extraction*, SPE) (VERA-AVILA et al., 2013). Esforços têm sido realizados para a miniaturização da LLE, levando a técnicas como a microextração em gota suspensa (*Single Drop Microextraction*, SDME) e microextração em fase líquida suportada com fibra oca (*Hollow Fiber - Liquid Phase Microextraction*, HF-LPME). Mais recentemente, a microextração líquido-líquido dispersiva (*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*, DLLME) (Figura 11), que foi desenvolvida por Rezaee e colaboradores (2006), tem se mostrado uma técnica muito promissora para o preparo de amostras de matrizes biológicas (SZULTKA et al., 2014).

Nesta técnica, uma mistura de pequenos volumes (microlitros) de dois solventes orgânicos (solvente extrator e dispersor) é injetada em uma amostra aquosa. O solvente extrator é imiscível em água e apresenta densidade maior que a desta e o solvente dispersor é solúvel tanto na amostra quanto no solvente extrator. Quando a mistura de solventes é rapidamente injetada, uma grande turbulência é produzida, o que favorece a formação de microgotas de solvente extrator que são dispersas pelo solvente dispersor na amostra aquosa e os analitos são, então, extraídos. Devido à grande superfície de contato formada entre o solvente extrator e a fase aquosa, o estado de equilíbrio é atingido rapidamente no processo de transferência dos analitos entre as duas fases. A extração é realizada independentemente do tempo e esta é uma das grandes vantagens desta técnica. Em seguida, a mistura é centrifugada e o solvente extrator contendo os analitos de interesse e sedimentado no fundo do tubo é recolhido e analisado (REZAAE; YAMINI; FARAJY, 2010).

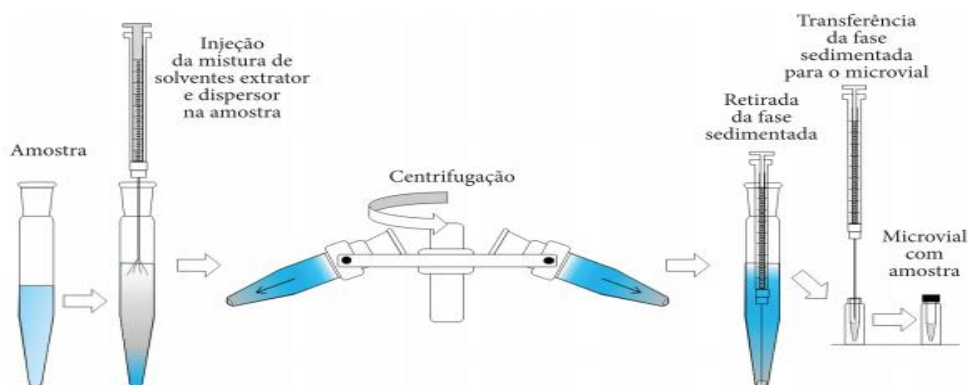


Figura 11: Representação esquemática da microextração líquido-líquido dispersiva.
Fonte: CALDAS et al., 2011

Esta técnica apresenta outras vantagens como operação simples, custo baixo, recuperação alta e grande poder de enriquecimento, porém críticas são direcionadas a esta técnica devido à dificuldade em coletar o extrato no fundo do tubo e pelo uso de solventes tóxicos como clorobenzeno, clorofórmio e tetraclorometano, que apresentam incompatibilidade com alguns sistemas de análise como com a cromatografia líquida em fase reversa (REZAEI et al., 2006; BERIJANI et al., 2006). A fim de aprimorar esta técnica, foi introduzida a microextração líquido-líquido dispersiva com solidificação da gota orgânica flutuante (*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction based on Solidification of Floating Organic Drop*, DLLME-SFO) (Figura 12) (LEONG; HUANG, 2008).

Na DLLME-SFO, o solvente extrator, dispersado na fase aquosa pelo solvente dispersor, apresenta baixa solubilidade em água, ponto de fusão próximo à temperatura ambiente e densidade menor que a da água. Dessa forma, ao invés de o solvente extrator sedimentar no fundo do tubo cônico após a centrifugação, este pode ser facilmente coletado no topo da solução de análise ao ser submetido à solidificação à baixa temperatura. A grande superfície de contato entre o solvente extrator e a fase aquosa produz uma transferência de massa tão rápida quanto a do DLLME, porém com a utilização de solventes extratores com menor toxicidade, ambientalmente mais favoráveis e com compatibilidade com os sistemas de análise utilizados (REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010).

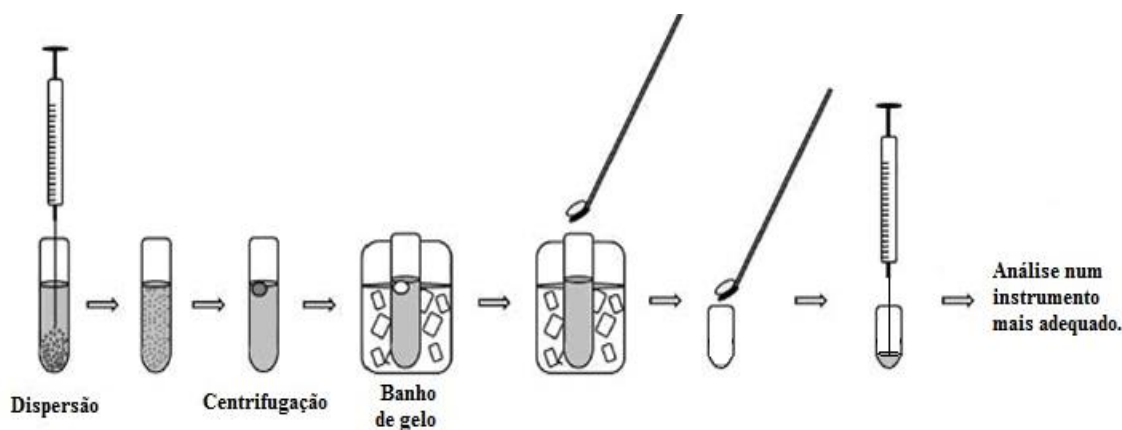


Figura 12: Representação esquemática da microextração líquido-líquido dispersiva com solidificação da gota orgânica flutuante.
Fonte: Adaptado de LEONG et al., 2014.

Esta técnica é amplamente aplicada na extração e enriquecimento de amostra ambientais (PENG et al., 2015; LI et al., 2015; VERA-AVILA et al., 2013) e vem sendo cada vez mais aplicada em preparo de amostras biológicas (JIA et al., 2013; AHMADI-JOUIBARI et al., 2014; TAHERI et al., 2015).

1.9 Análise cromatográfica

Após a etapa de preparo da amostra, segue-se a sua análise, e nesse sentido, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem se mostrado uma técnica adequada, pois apresenta alta sensibilidade, reprodutibilidade e rapidez (BAYNE; CARLIN, 2010; AEHLE; DRAGER, 2010). Esta técnica pode ser utilizada para separar, identificar e quantificar componentes de uma mistura, como por exemplo, de uma amostra biológica (MARKS; SMITH, 2014).

A cromatografia passou a ser uma das técnicas mais utilizadas para fins qualitativos e quantitativos, com destaque em determinações ambientais, médicas e nas indústrias farmacêuticas. A CLAE está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A fase móvel é bombeada à alta pressão através de uma coluna preenchida com a fase estacionária composta por partículas diminutas (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

Os sistemas de detecção utilizados na CLAE são os mais diversos, sendo que os mais usados são o arranjo de fotodiodos (DAD), UV-Visível, fluorescência, índice de refração, infravermelho, polarímetro e dicroísmo circular, eletroquímicos,

espalhamento de luz, ressonância magnética nuclear e espectrômetro de massas (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A eficácia na separação dos compostos por esta técnica é determinada através de vários parâmetros como:

-Fator de retenção (k), que é dado como:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (1)$$

onde, t_R corresponde ao tempo de retenção do composto de interesse e t_M ao tempo morto (tempo que a fase móvel leva para percorrer a coluna).

-Fator de separação (α), que é dado como:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (2)$$

onde, k_1 corresponde ao fator de retenção do composto menos retido e k_2 ao fator de retenção do composto mais retido na coluna.

-Número de pratos (N), que é dado como:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2 \quad (3)$$

onde, t_R corresponde ao tempo de retenção do composto de interesse e W_b à largura da base do pico .

-Resolução (R_s), que é dada como:

$$R_s = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{b1} + W_{b2}} \quad (4)$$

onde, t_{R2} corresponde ao tempo de retenção do composto mais retido e t_{R1} do menos retido. W_{b1} e W_{b2} correspondem às larguras dos picos do composto menos retido e do mais retido, respectivamente. Na Figura 13, pode-se observar alguns destes parâmetros.

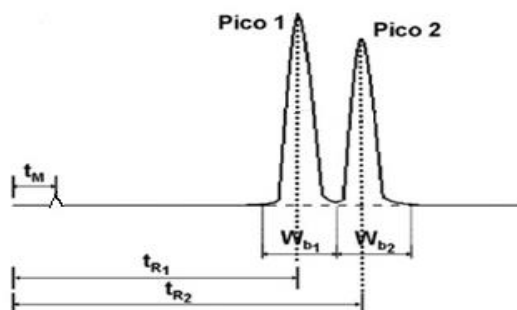


Figura 13: Representação esquemática de um cromatograma com alguns parâmetros cromatográficos importantes identificados.

Fonte: Adaptado de PASCHOAL et al., 2008

1.10 Validação de métodos bioanalíticos

De acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA) (2013), validação de método bioanalítico inclui os procedimentos que demonstram que um determinado método utilizado para a quantificação de analitos em uma dada matriz biológica, como sangue, plasma, soro ou urina, é confiável e reprodutível para o uso pretendido. Os parâmetros fundamentais em uma validação incluem exatidão, precisão, seletividade, sensibilidade, linearidade, recuperação e estabilidade.

1.10.1 Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes (BRASIL, 2003). Algumas substâncias que podem ser interferentes incluem componentes endógenos da matriz biológica, metabólitos, produtos de decomposição, medicamentos utilizados concomitantemente e outros xenobióticos (FDA, 2013).

1.10.2 Linearidade

É a capacidade do método analítico de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Para isso é necessária a realização de uma curva analítica, a qual representa a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito. A curva analítica deve incluir a análise da amostra branco (matriz biológica isenta de padrão do fármaco e do padrão interno), de amostras contendo padrão do analito e padrão interno e a amostra zero (matriz biológica mais o padrão interno) (BRASIL, 2003; FDA, 2013).

1.10.3 Limite Inferior de Quantificação

É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003). A resposta dos analitos no limite inferior de quantificação deve ser

de pelo menos cinco vezes em comparação com a resposta da amostra branco (FDA, 2013).

1.10.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (FDA, 2013; INMETRO, 2003). É importante observar que um valor exato ou verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita e este valor é indeterminado por natureza (ISO, 1993).

A exatidão é normalmente expressa em função da porcentagem do erro relativo (ER) (QUATROCCHI; ANDRIZZI; LABA, 1992) obtido através da equação a seguir:

$$ER(\% \text{ do erro}) = \frac{\text{valor obtido} - \text{valor real}}{\text{valor real}} \cdot 100 \quad (5)$$

1.10.5 Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (INMETRO, 2003). A precisão é subdividida em precisão intracorrida e intercorrida. A primeira é uma avaliação da precisão das análises em um mesmo dia. A segunda é uma avaliação da precisão das análises realizadas em dias diferentes e pode envolver diferentes analistas, equipamentos, reagentes e laboratórios (FDA, 2013).

A precisão é representada através da estimativa do desvio padrão relativo (DPR), também conhecida como coeficiente de variação (CV).

$$RSD (\%) \text{ ou } CV (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (6)$$

onde, s é o desvio padrão absoluto e \bar{x} é a média aritmética de um pequeno número de medições (média das determinações).

1.10.6 Recuperação

A recuperação (ou fator de recuperação), R, representa a eficiência de extração de um determinado método analítico. É definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada e comparada aos resultados analíticos de soluções-padrão não extraídas (BRASIL, 2003; THOMPSON et al., 1999).

A recuperação é calculada através da seguinte equação:

$$R = \frac{C_e \times V_e}{C_o \times V_o} \times 100 \quad (7)$$

onde, C_e e V_e são a concentração e o volume do extrato diluído, respectivamente, e C_o e V_o são a concentração e o volume da amostra de urina, respectivamente.

1.10.7 Estabilidade

Parâmetro que visa determinar se um analito mantém-se quimicamente inalterado em uma dada matriz sob condições específicas em determinados intervalos de tempo (BRASIL, 2003). As condições utilizadas em experimentos de estabilidade devem refletir situações que podem ser encontradas durante o manuseio e análise real da amostra. Estudos de estabilidade incluem estabilidade de curta duração e após ciclos de congelamento e descongelamento (FDA, 2013).

2 JUSTIFICATIVA

A cocaína é um poderoso estimulante do sistema nervoso central que apresenta uma grande capacidade de causar dependência (LASON, 2001). A esta droga frequentemente são adicionados adulterantes (SCHIFANO; CORKERY, 2008). Os adulterantes são substâncias que possuem propriedades similares à droga a qual são adicionados a fim de mimetizar a sua ação ou minimizar efeitos adversos provocados por esta (SHESSER; JOTTE; OLSHAKER, 1991; BRUNT et al, 2009).

De acordo com a UNODC e outros estudos realizados recentemente, alguns dos adulterantes mais comumente adicionados à cocaína são cafeína, fenacetina, levamisol, lidocaína, diltiazem e hidroxizina (UNODC, 2011; BROSEUS et al., 2015; BOTELHO et al., 2014; LAPACHINSKE et al., 2015). Quando há na composição da droga outros componentes farmacologicamente ativos, reações adversas e outros severos agravos à saúde podem ocorrer nos usuários (BRUNT et al., 2009). Nesse sentido, a cocaína é uma das drogas de abuso que mais levam a hospitalização de emergência no mundo ocidental. Em um hospital da Bélgica, a cocaína foi a segunda substância mais consumida entre os pacientes intoxicados por uso de drogas ilícitas, respondendo por 41% dos casos (CALLE et al., 2006) e foi a droga de abuso que mais gerou atendimentos em serviços de emergência na Espanha ao se analisar os anos de 2003 a 2012 (GALICIA; NOGUÉ; BURILLO-PUTZE, 2014).

De acordo com o II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (2012), a prevalência do uso de cocaína pelo menos uma vez na vida pela população adulta brasileira é de 3,8%, representando cerca de cinco milhões de brasileiros. Nos 12 últimos meses anteriores a essa pesquisa, mais de dois milhões de adultos brasileiros (1,7%) relataram o uso desta droga. Em 2013, a UNODC retratou o Brasil como uma das nações emergentes onde o consumo de cocaína está aumentando enquanto na maioria dos países o consumo está diminuindo.

Com o aumento do consumo desta droga provavelmente mais pessoas procurarão os serviços de saúde apresentando quadros de intoxicação e estes estabelecimentos devem estar preparados para atendê-los. Vários destes casos estão relacionados à presença de adulterantes, podendo ser confirmados por meio de métodos laboratoriais (ULLRICH et al., 2011). Nesse sentido, há um crescente interesse no desenvolvimento de métodos laboratoriais simples, eficazes e rápidos

para a determinação dos adulterantes da cocaína em amostras de pacientes com intoxicações agudas que foram hospitalizados.

Dentre as diversas técnicas utilizadas para análise de compostos, a cromatografia líquida de alta eficiência tem sido considerada bastante confiável devido à sua alta sensibilidade, simplicidade e aplicabilidade (BAYNE; CARLIN, 2010). Além disso, a diminuição do seu custo operacional faz com que esta técnica seja amplamente utilizada tanto em laboratórios de pesquisa como de análises clínicas (ARAGÃO et al., 2009).

Como a análise de compostos em matrizes biológicas requer uma etapa prévia de tratamento das amostras e visando acompanhar a tendência de utilização de quantidades reduzidas de solventes orgânicos, novas técnicas de microextração vêm sendo desenvolvidas e utilizadas, como a microextração líquido-líquido dispersiva com solidificação da gota orgânica flutuante (REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010; LEONG; HUANG, 2008).

Esta técnica de microextração apresenta várias vantagens em relação às tradicionalmente empregadas no preparo das amostras, como: operacionalização simples, rapidez, custo baixo, altos valores de recuperação e alto fator de enriquecimento. Além disso, é favorável ao meio ambiente por utilizar solventes menos tóxicos e em menor quantidade (LEONG; HUANG, 2008).

Assim sendo, é esperado que este estudo, que é o primeiro a combinar o uso de DLLME-SFO e CLAE-DAD para a determinação dos principais adulterantes da cocaína (cafeína, levamisol, lidocaína, fenacetina, diltiazem e hidroxizina) em urina humana, contribua para a rapidez e precisão do diagnóstico das intoxicações e para o adequado planejamento das medidas terapêuticas de escolha.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Desenvolver um método analítico para determinação simultânea dos principais adulterantes da cocaína (cafeína, levamisol, lidocaína, fenacetina, diltiazem e hidroxizina) em urina humana.

3.2 Objetivos Específicos

- Otimizar os parâmetros cromatográficos para as análises dos principais adulterantes da cocaína por CLAE-DAD;
- Otimizar a metodologia de extração por DLLME-SFO;
- Validar a metodologia desenvolvida, avaliando os parâmetros de seletividade, linearidade, limite de quantificação, recuperação, precisão, exatidão e estabilidade;
- Aplicar a metodologia desenvolvida e validada em amostras de urina coletadas de usuários de cocaína.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Padrões, Solventes e Reagentes

Os padrões analíticos da cafeína, lidocaína, fenacetina, diltiazem, hidroxizina e do padrão interno propranolol foram gentilmente cedidos pela Pharma Nostra (Anápolis, Brasil). O levamisol foi obtido pela Fort Dodge Saúde Animal LTDA (Campinas, Brasil). O cloreto de sódio (99%) foi adquirido da Dinâmica Química Contemporânea LTDA (Diadema, Brasil) e a acetona (99,5%), da Audaz Brasil (São Paulo, Brasil). O 1-undecanol (99%), 1-dodecanol (98%), 2-dodecanol (99%), n-decanol (99%), bromohexadecano (97%) e o ácido trifluoroacético (TFA) (99%) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, Estados Unidos). O metanol e a acetonitrila (grau cromatográfico) foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). O isopropanol e o etanol (grau cromatográfico) foram obtidos da Mallinckrodt Baker Inc (Phillipsburg, Estados Unidos).

As soluções-tampão foram utilizadas até três dias após o seu preparo a partir da diluição de fosfato de sódio monobásico (99%), dibásico (99%) ambos da Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil) ou tribásico (98%) obtido da Isofar Indústria e Comércio de Produtos Químicos LTDA (Duque de Caxias, Brasil). A água ultrapura foi obtida pelo sistema de purificação Direct-Pure Adept da Rephile Bioscience Ltda (Xangai, China).

4.2 Soluções-padrão

As soluções-estoque de cafeína, levamisol, lidocaína, fenacetina, diltiazem, propranolol e hidroxizina foram preparadas separadamente em metanol na concentração de 1 mg.mL^{-1} . A partir destas soluções, soluções de trabalho foram preparadas pela diluição com metanol. As soluções-estoque foram armazenadas a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e protegidas da incidência de luz, permanecendo estáveis por pelo menos três meses (de acordo com os resultados de experimentos realizados previamente). Na validação do método, a solução do padrão interno, propranolol, foi utilizada na concentração de $50 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.3 Obtenção das amostras de urina humana

As amostras de urina humana para o desenvolvimento do método proposto foram coletadas de voluntários sadios com idade entre 18-60 anos e armazenadas a -20 °C. As amostras de urina fornecidas deveriam ser amostras brancas, ou seja, não deveriam conter cocaína, seus metabólitos nem os adulterantes que estão sendo analisados neste trabalho.

As amostras para a aplicação do método foram obtidas de usuários de cocaína atendidos no Centro de Atenção Psicossocial-Álcool e Drogas (CAPS-AD) Eulâmpio Cordeiro em Recife, Pernambuco ou de indivíduos que espontaneamente declararam ter consumido esta droga e foram submetidas às mesmas condições de armazenamento.

Os participantes foram informados sobre o estudo e registraram seu consentimento através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo A) e por meio de um formulário (Anexo B), foi verificado o perfil de cada usuário quanto à utilização de cocaína. Somente poderiam participar do estudo os indivíduos que fizeram uso da droga até sete dias antes da coleta. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe, sob o CAAE nº 41943415.7.0000.5546 (Anexo C) e também foi aprovado pelo Comitê de Saúde Mental do município de Recife-PE (Anexo D).

4.4 Instrumentação

As soluções-tampão utilizadas tiveram seus valores de pH confirmados empregando um pHmetro digital de bancada ION pHB 500 da IonLab Produtos Laboratoriais (Curitiba, Brasil) e na etapa de extração foram utilizados um agitador de tubos Vortex Mixer XH-C da Shinova Medical Co., Ltda (Xangai, China), uma centrífuga SL-16RAV da Spinlab (Taiwan, República da China), uma balança analítica de precisão, com quatro casas decimais M214A da BEL Engineering (Monza, Itália) e uma microseringa com capacidade para 100 µL da Agilent Technologies (Santa Clara, Estados Unidos).

As análises foram realizadas em um sistema HPLC da Shimadzu Corp. (Quioto, Japão) equipado com desgaseificador modelo DGU-20A3, duas bombas de alta pressão modelo LC-20AD, injetor automático modelo SIL-20ACHT, controlador modelo CBM-20A e um detector de arranjo de fotodiodos modelo SPD-M20A. A coluna cromatográfica utilizada foi a Agilent Zorbax Extended C-18 (250 mm x 4,6 mm; 5 μ m; 80 Å) protegida por uma coluna de guarda (12,5 mm x 4,6 mm; 5 μ m) da Phenomenex (Torrance, Estados Unidos). A aquisição, a integração e o processamento dos dados foram realizados utilizando o programa LabSolutions versão 5.54.

4.5 Condições cromatográficas de análise

Para obter a resolução simultânea dos adulterantes cafeína, levamisol, lidocaína, fenacetina, diltiazem, hidroxizina e do padrão interno, propranolol, a taxa de fluxo foi mantida a 1 mL.min⁻¹ à temperatura 25 \pm 2°C, o volume de injeção foi de 20 μ L e o comprimento de onda selecionado foi de 235 nm. A fase móvel utilizada foi uma mistura de acetonitrila–TFA 0,026% (v/v) (pH=2,5) em modo de eluição gradiente (0-9,3 min, 19:81 para 46:54; 9,3-15 min, 46:54; 15-17min, 46:54 para 19:81; 17-25min: 19:81).

4.6 Procedimento de extração por DLLME-SFO

Amostras de 4 mL de urina foram transferidas para um tubo de ensaio de fundo cônico e alcalinizadas com 2 mL de tampão fosfato de sódio 0,5 mol.L⁻¹ (pH=10). Cloreto de sódio (20 %m/v) e o padrão interno propranolol (50 μ L de solução-padrão a 50 μ g.mL⁻¹) foram adicionados e as soluções resultantes foram homogeneizadas no vórtex e submetidas à extração por DLLME-SFO.

As misturas de solvente dispersor (150 μ L de acetonitrila) e solvente extrator (30 μ L de 1-dodecanol) foram rapidamente injetadas com uma seringa na solução de 6 mL de urina diluída. Em seguida, as amostras foram submetidas à agitação por vórtex por 10 s e centrifugadas a 4000 rpm durante 15 minutos. Os tubos foram transferidos para o banho de gelo por 10 minutos e a fase orgânica flutuante foi retirada com o auxílio da espátula e depositada em um microtubo Eppendorf com capacidade para 1,5 mL.

O material coletado foi submetido à nova centrifugação por 5 minutos a 4000 rpm e, logo após, o solvente extrator descongelado e menos denso que a solução aquosa foi retirado com o auxílio de uma microsseringa no topo da solução de análise. Em sequência, o produto final da extração foi diluído com metanol utilizando o fator de diluição (Seção 4.7) e submetido à análise utilizando as condições cromatográficas otimizadas.

4.7 Fator de diluição

O fator de diluição (FD) corresponde à relação entre o volume da solução depois de diluída e o volume da solução antes de ser diluída e é dada por:

$$FD = \frac{\text{volume total da solução}}{\text{volume da solução antes da diluição}} \quad (8)$$

Considerando que a coleta da fase orgânica flutuante é um processo manual (sujeito a variações) e que a concentração dos compostos de interesse nos produtos finais da extração relaciona a massa (μg) desses compostos e o volume (μL) dessa solução extraída, este cálculo foi efetuado para que houvesse uma adequada harmonização do volume dos produtos finais da extração das amostras contendo os analitos de interesse, garantindo precisão nos resultados. Além disso, o FD foi empregado a fim de obter um volume final apropriado de solução extraída para ser analisado no sistema de auto injeção do CLAE, que exige um volume mínimo de aproximadamente 50 μL para seu adequado funcionamento. A etapa de diluição com metanol também foi introduzida para diminuir a viscosidade dos solventes extratores testados (viscosidade varia de 13,8 a 18,8 mPa.s a 20°C) (HSDB, 2015), a qual poderia interferir significativamente na qualidade das análises cromatográficas. Vale mencionar que na separação cromatográfica por CLAE os compostos migram através do sistema cromatográfico em bandas estreitas em função da sua afinidade entre a fase móvel e a fase estacionária e que quanto maior a viscosidade mais larga será a banda contendo os analitos de interesse e pior será a resolução dos picos cromatográficos (PENG et al., 2015; CHUI; ZUCCHINI; LICHTIG, 2001; CASTELLS; CASTELLS, 1998).

4.8 Planejamento Fatorial Completo e Análise de Componentes Principais

A influência que os fatores volume do solvente extrator e dispersor, pH da solução-tampão e adição de sal desempenham na área dos picos cromatográficos dos analitos de interesse foi verificada por meio do planejamento fatorial 2^4 completo constituído de 16 experimentos mais um ponto intermediário em triplicata, o que confere um total de 19 experimentos. Na Tabela 2, os valores dos níveis de cada fator são apresentados, os quais foram estabelecidos em experimentos prévios e levando em conta as limitações do sistema experimental. Os experimentos foram efetuados de maneira randômica e a análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o programa STATISTICA versão 10.0 (STATSOFT, 2010).

Tabela 2: Planejamento fatorial 2^4 completo com ponto central para otimização dos parâmetros da microextração líquido-líquido dispersiva com solidificação da gota orgânica flutuante.

Variáveis	Níveis		
	Inferior (-1)	Intermediário (0)	Superior (+1)
Volume do solvente extrator (μL)	30	60	100
Volume do solvente dispersor (μL)	150	500*	1000
Adição de sal (NaCl, % m/v)	0	10	20
pH da solução- tampão	8	10	12

* Em unidades codificadas, 60 μL e 500 μL correspondem a -0,14 e -0,17, respectivamente.

Para avaliar simultaneamente o desempenho das condições experimentais, a análise de componentes principais (*Principal Component Analysis*, PCA) foi desenvolvida utilizando como variáveis as áreas dos picos de cada analito. PCA é uma ferramenta bastante conhecida destinada a análise exploratória de dados multivariados, que permite a visualização de conjuntos de dados multidimensionais em representações gráficas de duas ou três dimensões. É o método mais utilizado para compactação de dados em quimiometria, inclusive na análise de dados de otimização de técnicas de microextração como a DLLME-SFO (MOGHADAM; SHABANI; DADFARNIA, 2011; SAEIDI et al., 2015).

A ideia por trás do PCA é encontrar novos eixos, chamados componentes principais (*principal components*, PC) que maximizam a variabilidade contida neles. Estes eixos são combinações lineares das variáveis originais. Os *loadings* são os cossenos dos ângulos entre cada componente e as variáveis originais e reflete o quanto as variáveis originais contribuem para os PCs. A projeção ortogonal sobre um resultado específico de PC consiste em um *score* para cada objeto (BRO; SMILDE, 2014). O conjunto de dados foi centrado na média e redimensionado

através do desvio padrão de cada variável antes do PCA. Para esta análise, foi utilizado o The Unscrambler versão 9.7 (CAMO Software, 2007).

4.9 Validação do Método

O método desenvolvido foi validado de acordo com as recomendações gerais para validação de métodos bioanalíticos indicadas pela *Food and Drug Administration* (FDA, 2013) e pelos critérios descritos na Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

4.9.1. Seletividade

A capacidade de mensurar os analitos na presença de potenciais interferentes foi assegurada por meio da análise de amostras de urina branca provenientes de seis voluntários diferentes, enriquecidas com os analitos no limite inferior de quantificação (LIQ) em triplicata. Da mesma forma, um extrato de urina livre de drogas foi analisado para comprovar a ausência de interferentes.

Outro experimento realizado foi a análise de amostra de água ultrapura fortificada com os adulterantes (1875 ng.mL⁻¹) e extraída (n=2) para verificar a interferência dos reagentes e solventes utilizados no processo de extração.

4.9.2 Linearidade

A fim de estabelecer a linearidade do método, curvas analíticas foram preparadas usando seis pontos em duplicata de amostras de urina branca enriquecidas com concentração final de 312,5; 625; 937,5; 1250; 1875; 3125 ng.mL⁻¹ para cafeína e levamisol e 187,5; 312,5; 625; 937,5; 1250; 1875 ng.mL⁻¹ para lidocaína, fenacetina, diltiazem e hidroxizina.

Os gráficos das curvas analíticas apresentam as áreas dos picos dos adulterantes sobre a área do pico do padrão interno *versus* suas respectivas concentrações. Curvas de calibração com coeficiente de variação menor que 15% foram aceitos. A análise estatística dos dados foi obtida pelo método de regressão linear dos mínimos quadrados e expressa pela seguinte equação de primeira ordem:

$$y = ax + b \quad (9)$$

onde, (a) corresponde ao coeficiente angular, dado pela inclinação da reta e (b) corresponde ao coeficiente linear, dado pelo ponto de interseção da reta com o eixo das ordenadas. A faixa linear foi calculada utilizando o coeficiente de correlação (r). Curvas de calibração com o coeficiente de correlação igual ou maior que 0,99 foram consideradas lineares.

4.9.3 Limite inferior de quantificação

O limite inferior de quantificação foi estabelecido através da análise de amostras de urina branca enriquecidas com concentração final de 312,5 ng.mL⁻¹ para cafeína e levamisol e 187,5 ng.mL⁻¹ para lidocaína, fenacetina, diltiazem e hidroxizina (n=5) em relação às curvas de calibração analisadas nas mesmas condições cromatográficas e de microextração em duplicata para cada concentração. A precisão não deve apresentar coeficiente de variação superior a 20% e a exatidão deve ter erro relativo dentro de 20% (FDA, 2013; BRASIL, 2003).

4.9.4 Recuperação

A recuperação é definida como a porcentagem da quantidade de analito presente na amostra que foi extraída para a gota flutuante (REZAEI et al., 2010; VERA-AVILA et al., 2013). Foi mensurada através da extração de amostras de urina branca enriquecidas com concentração final de 375; 1031 e 2500 ng.mL⁻¹ para cafeína e levamisol e 375; 1031 e 1500 ng.mL⁻¹ para lidocaína, fenacetina, diltiazem e hidroxizina (n=3 para cada concentração) e analisadas frente as curvas analíticas de soluções-padrão não extraídas (n=2). A recuperação foi calculada através da equação descrita na Seção 1.10.6.

4.9.5 Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas em dois níveis: precisão e exatidão intracorrída e precisão e exatidão intercorrída. A precisão foi expressa como coeficiente de variação e desvios menores que 15% indicam que o método é preciso. A exatidão foi expressa em função da porcentagem do erro relativo e resultados menores que 15% indicam que o método é exato (FDA, 2013).

4.9.5.1 Precisão e exatidão intracorrida

A precisão e a exatidão intracorrida foram avaliadas através da análise de amostras de urina branca enriquecidas com concentração final de 375; 1031 e 2500 ng.mL⁻¹ para cafeína e levamisol e 375; 1031 e 1500 ng.mL⁻¹ para lidocaína, fenacetina, diltiazem e hidroxizina (n = 5 para cada concentração) e analisadas frente a curvas analíticas preparadas em duplicata para cada concentração no mesmo dia.

4.9.5.2 Precisão e exatidão intercorrida

A precisão e exatidão intercorrida foi avaliada durante três dias através da análise de amostras de urina enriquecidas com concentração final de 375; 1031 e 2500 ng.mL⁻¹ para cafeína e levamisol e 375; 1031 e 1500 ng.mL⁻¹ para lidocaína, fenacetina, diltiazem e hidroxizina (n = 5 para cada concentração) e analisadas frente a curvas analíticas preparadas em duplicata para cada concentração.

4.9.6 Estabilidade

4.9.6.1 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

Amostras de urina branca enriquecidas com concentração final de 375 e 2500 ng.mL⁻¹ para cafeína e levamisol e 375 e 1500 ng.mL⁻¹ para lidocaína, fenacetina, diltiazem e hidroxizina (n=3 para cada concentração) foram submetidas a três ciclos de 24h de congelamento-descongelamento (-20°C; 25°C). Após esse período as amostras foram extraídas e analisadas. As áreas de pico obtidas foram comparadas com as obtidas por amostras recém-preparadas nas mesmas concentrações (n = 3 para cada concentração). O teste t de Student foi aplicado e os dados com $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

4.9.6.2 Estabilidade de curta duração

Amostras de urina enriquecidas com concentração final de 375 e 2500 ng.mL⁻¹ para cafeína e levamisol e 375 e 1500 ng.mL⁻¹ para lidocaína, fenacetina, diltiazem e hidroxizina foram mantidas à temperatura ambiente (25°C) por 24h. Após esse período, as amostras foram submetidas ao procedimento de extração e análise. As áreas de pico obtidas foram comparadas com as obtidas por amostras recém-preparadas nas mesmas concentrações (n = 3 para cada concentração). O teste t de Student foi aplicado e os dados com $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

4.10 Aplicação do método validado

Amostras de urina de usuários de cocaína (50 mL) foram coletadas e analisadas em duplicata de acordo com o método desenvolvido e validado. A população foi estabelecida por amostragem por conveniência. Os resultados foram comparados a curvas de calibração com seis concentrações em duplicata, preparadas diariamente.

Os picos cromatográficos foram confirmados como sendo dos adulterantes da cocaína após comparação com os picos cromatográficos das soluções-padrões dos respectivos adulterantes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento do Método Cromatográfico

Em trabalho anteriormente realizado pelo nosso grupo de pesquisa, foi estabelecida como condição ótima para a separação dos adulterantes cafeína, lidocaína, fenacetina, diltiazem e hidroxizina, a fase móvel composta por metanol: TFA 0,15% em modo gradiente (0-21 min- 20:80 - 80:20; 21-23 min- 80:20 – 20:80; 23-25 min- 20:80), no fluxo de 1 mL.min⁻¹, a 25 ± 2°C com observação no comprimento de onda de 235 nm e utilizando uma coluna Agilent Zorbax Extended C-18 (250 x 4,6 mm; 5 µm; 80 Å) (CONCEIÇÃO, 2014). No atual trabalho, o levamisol foi incluído na lista de compostos a serem analisados simultaneamente, pois se trata de uma substância que vem sendo bastante encontrada em casos de intoxicação aguda por cocaína adulterada em todo o mundo (ROLDAN, 2014; SOUIED et al., 2014; NOLAN; JEN, 2015).

Os experimentos iniciais na referida condição cromatográfica mostraram uma coeluição parcial entre a cafeína e o levamisol (Figura 14) que inviabilizou sua utilização no presente trabalho. Com a diminuição da concentração do aditivo TFA para 0,05%, foi observada uma melhora na eficiência da separação dos picos cromatográficos, com aumento no fator de separação entre a cafeína e o levamisol sem prejudicar a separação dos outros picos, porém o pico do levamisol e da lidocaína apresentaram assimetrias importantes (Figura 15), que podem estar relacionadas com a estabilidade dos compostos em pH menos ácido (CHIADMI et al., 2005; FLORIANI et al., 2014).

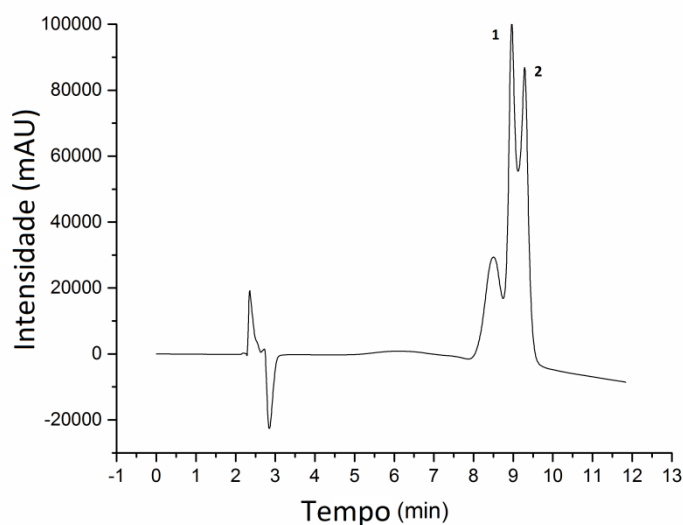


Figura 14: Cromatograma do levamisol (1) e da cafeína (2) coeluido parcialmente ao utilizar como fase móvel o metanol: TFA 0,15% com fluxo constante de 1 mL.min⁻¹ e detecção a 235 nm em modo gradiente (0-21 min- 20:80 - 80:20; 21-23 min- 80:20 – 20:80; 23-25 min- 20:80).

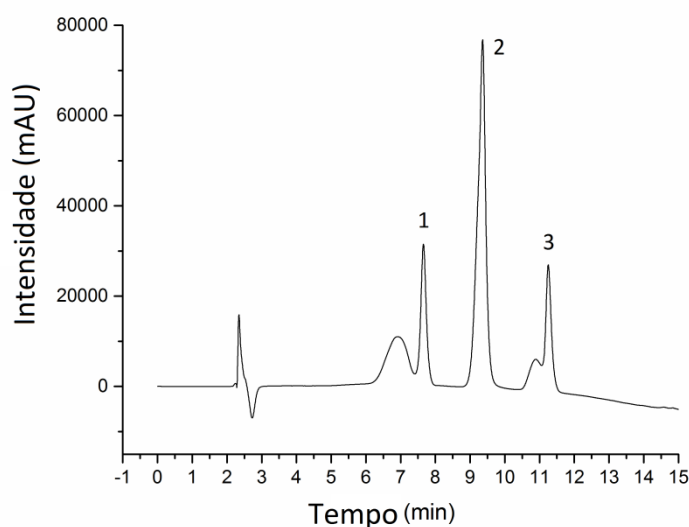


Figura 15: Cromatograma do levamisol (1), cafeína (2) e lidocaína (3) ao utilizar como fase móvel metanol: TFA 0,05% com fluxo constante de 1 mL. min⁻¹ e detecção a 235 nm em modo gradiente (0-21 min- 20:80 - 80:20; 21-23 min- 80:20 – 20:80; 23-25 min- 20:80).

O TFA é um aditivo amplamente utilizado na eluição em modo isocrático e gradiente e atua como agente de pareamento iônico, ou seja, torna moléculas ácidas ou básicas mais hidrofóbicas ao neutralizar suas cargas, melhorando a resolução cromatográfica. Na concentração de 0,15%, o ânion trifluoracetato pode estar interagindo com os grupos amina dos adulterantes cafeína e levamisol carregados positivamente. Ao reduzir a concentração do TFA, o levamisol que possui menos

grupamentos amina provavelmente interage menos com o TFA, tornando-se mais hidrofílico e, conseqüentemente, interage menos com a fase estacionária da coluna do que a cafeína, diminuindo o tempo de retenção e favorecendo a sua separação em relação à cafeína (CAI; LI, 1999).

Uma vez que a modificação na concentração de TFA também resultou na diminuição de número de pratos e assimetria dos picos cromatográficos, foi proposta a substituição do modificador orgânico metanol pela acetonitrila, considerando as diferentes propriedades físico-químicas entre os modificadores (incluindo a polaridade) que poderiam diminuir o tempo de interação da lidocaína e levamisol com a fase estacionária e aumentar a solubilidade na fase móvel e, conseqüentemente, melhorar o perfil cromatográfico desses compostos e separar o levamisol da cafeína. Assim, a acetonitrila foi testada nas mesmas condições utilizadas por Conceição (2014) (incluindo TFA 0,15%) e como resultado, os picos cromatográficos do levamisol e da lidocaína apresentaram-se simétricos e separados da cafeína, porém os picos do propranolol, diltiazem e hidroxizina apresentaram assimetria (Figura 16). Ao diminuir a concentração do TFA para 0,10% e mantendo a acetonitrila como modificador orgânico, o pico cromatográfico do diltiazem manteve-se assimétrico e ao diminuir ainda mais a porcentagem de TFA (0,05%) houve coeluição do propranolol com a fenacetina com melhora do formato do pico do diltiazem, provavelmente devido à sua instabilidade nos meios anteriores, mais ácidos (CHATPALLIWAR; PORWAL; UPMANYU, 2012). É provável que o propranolol tenha interagido menos com a fase estacionária nessa condição cromatográfica ao se tornar mais polar devido à diminuição da sua interação com o TFA, o que reduziu o tempo de retenção do composto em relação à fenacetina, que teve pouca ou nenhuma influência significativa no seu tempo de retenção com a redução da porcentagem do aditivo (Figura 17).

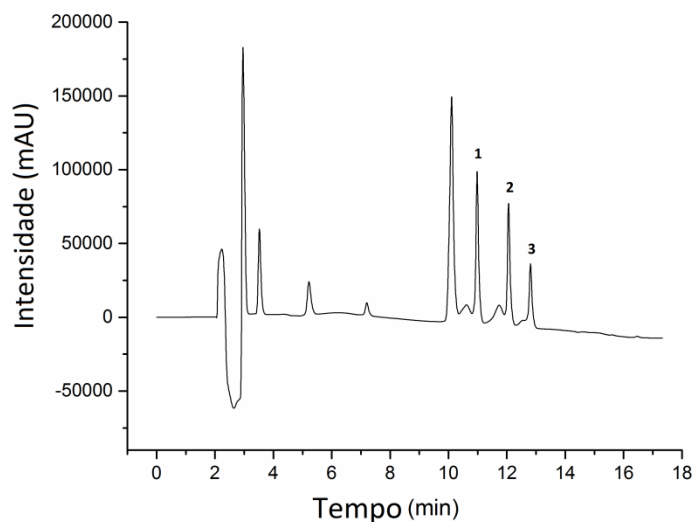


Figura 16: Cromatograma dos adulterantes e do padrão interno ao utilizar acetonitrila: TFA 0,15% como fase móvel com fluxo constante de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e detecção a 235 nm em modo gradiente (0-21 min- 20:80 - 80:20; 21-23 min- 80:20 – 20:80; 23-25 min- 20:80). Os picos do propranolol (1), diltiazem (2) e hidroxizina (3) apresentaram assimetria.

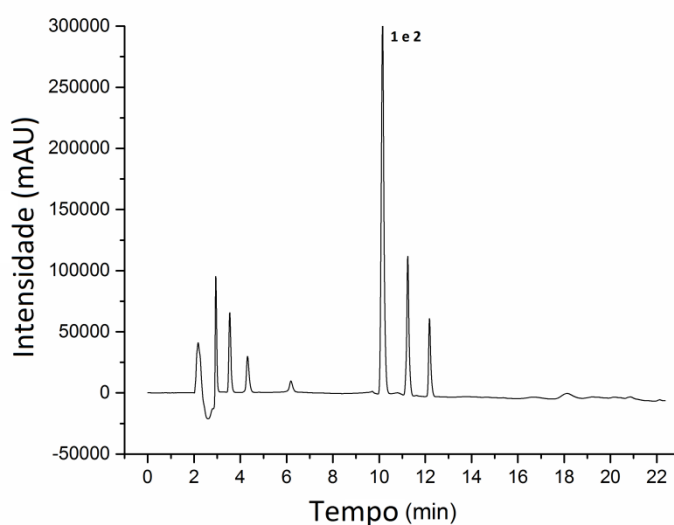


Figura 17: Cromatograma dos adulterantes e do padrão interno ao utilizar acetonitrila: TFA 0,05% como fase móvel em modo gradiente (0-21 min- 20:80 - 80:20; 21-23 min- 80:20 – 20:80; 23-25 min- 20:80). O pico do propranolol (1) e da fenacetina (2) coeluíram.

Na tentativa de melhorar a separação do propranolol e da fenacetina, sem prejudicar a simetria do pico cromatográfico do diltiazem, a concentração de TFA foi diminuída para 0,03%, porém essa mudança não foi suficiente para gerar um fator de separação adequado entre estes compostos. Na concentração de 0,02%, os

picos cromatográficos da cafeína e do levamisol coeluíram novamente. Vários testes foram feitos no intervalo de 0,02 a 0,03% de TFA. Na concentração de TFA de 0,026%, os picos cromatográficos do propranolol e da fenacetina ainda coeluíam, porém após realizar modificações no gradiente da fase móvel, mantendo constante a proporção de acetonitrila: TFA 0,026% no período de tempo em que os quatro últimos picos cromatográficos eluíam, foi possível obter a separação dos compostos de interesse, como observado na Figura 18.

Como o modo de eluição utilizado foi gradiente, ao final da análise foi necessário garantir que a coluna cromatográfica tivesse sido lavada com volume suficiente da fase móvel compatível com a do início da corrida para que não houvesse interferência da composição de fase móvel do final da análise cromatográfica nas análises subsequentes, permitindo o re-equilíbrio da coluna (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010). Como também houve diminuição do tempo de retenção dos picos devido à utilização de um solvente orgânico de maior força eluotrópica (acetonitrila), o gradiente foi alterado para 0-9,3 min- 19:81; 9,3-15 min- 46:54; 15-17 min- 46:54; 17-25 min- 19:81. A Tabela 3 resume a condição cromatográfica otimizada para a separação dos compostos.

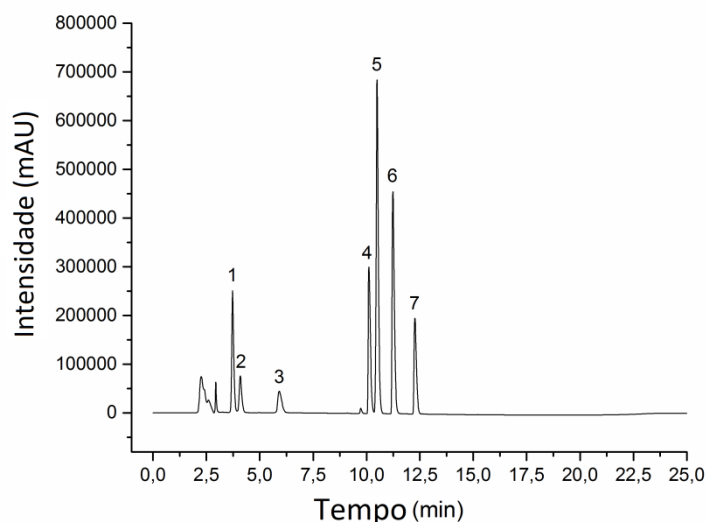


Figura 18: Cromatograma da (1)Cafeína; (2)Levamisol; (3)Lidocaína; (4)Propranolol; (5)Fenacetina; (6)Diltiazem; (7)Hidroxizina obtido através da condição otimizada descrita na Tabela 3. Concentração=100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

Tabela 3: Condições cromatográficas otimizadas para a separação dos principais adulterantes da cocaína e do padrão interno propranolol.

Parâmetros	Condições Otimizadas
Coluna Analítica	Agilent Zorbax Extended C-18 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm; 80 Å)
Fase móvel	Acetonitrila: TFA 0,026 %
Vazão da fase móvel	1 mL.min ⁻¹
Gradiente	0-9,3 min-19:81 a 46:54; 9,3-15 min-46:54; 15-17 min-46:54 a 19:81; 17-25 min-19:81
Volume de injeção	20 µL
Temperatura	25 (±2)°C
Comprimento de onda	235 nm
Tempo de Análise	25 min

A Tabela 4 mostra os parâmetros cromatográficos obtidos a partir da condição otimizada. Uma resolução entre picos cromatográficos de 1,0 significa somente 2,3% de sobreposição, para resolução igual a 1,5, somente 0,1% e nenhuma sobreposição a partir de resolução superior a 1,8 (CASS; DEGANI, 2001; FERRAZ, 2001). Dessa forma, foi possível identificar e quantificar todos os compostos de interesse com mínima ou nenhuma coeluição e adequadas separações de linha de base.

O número de pratos teóricos é uma medida indireta da largura do pico a um dado tempo de retenção. Colunas com um número alto de pratos teóricos são consideradas mais eficientes e apresentarão picos mais estreitos. De acordo com a FDA (1997), o número de pratos teóricos deve ser superior a 2000 e isto foi alcançado na otimização.

O fator de retenção descreve a taxa de migração de um analito em uma coluna. Seu valor deve estar entre 0,5 e 20, pois em valores muito baixos, a eluição é tão rápida que se torna muito difícil determinar com exatidão o tempo de retenção e em valores muito altos, a eluição demora muito tempo (POOLE, 2003) e, de acordo com os resultados, foi possível obter valores adequados. A seletividade reflete a capacidade do método cromatográfico em separar dois compostos entre si. De maneira geral, valores acima de 1,1 demonstram uma separação satisfatória entre os analitos (KROMIDAS, 2008) e os resultados obtidos neste trabalho foram acima ou ficaram próximos desse valor.

Tabela 4: Parâmetros cromatográficos dos analitos obtidos através das condições otimizadas.

Analitos	Tempo de Retenção (t _R)	Fator de retenção (k)	Resolução (Rs)	Fator de separação (α)	Número de pratos (N)
Cafeína	3,770	0,68			2094,86
Levamisol	4,228	0,88	1,37	1,30	2626,41
Lidocaína	6,062	1,70	4,83	1,92	3179,91
Propranolol	10,208	3,55	10,50	2,08	12864,6
Fenacetina	10,642	3,74	1,15	1,05	11913,44
Diltiazem	11,320	4,05	1,86	1,08	17735,97
Hidroxizina	12,297	4,48	3,01	1,11	25176,48

5.2 Otimização dos Parâmetros de Extração por DLLME-SFO

A eficiência do processo de extração por DLLME-SFO é influenciada principalmente pelos fatores: tipo e volume dos solventes extrator e dispersor, adição de sal e pH da solução-tampão (REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010). No presente trabalho, o tipo do solvente extrator e dispersor foi avaliado através do método unifatorial clássico com as análises realizadas em triplicata e com a aplicação do teste estatístico ANOVA com pós-teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os demais parâmetros foram avaliados pelo planejamento fatorial completo.

Para a otimização, foram utilizadas amostras de 4 mL de urina branca enriquecidas com 50 µL das soluções-padrão dos adulterantes a 100 µg.mL⁻¹ e 50 µL de propranolol a 50 µg.mL⁻¹ em um tubo de ensaio de fundo cônico, resultando em concentrações de 1250 e 625 ng.mL⁻¹, respectivamente.

5.2.1 Seleção do Solvente Extrator

A seleção do solvente extrator é de grande importância para a extração dos analitos por DLLME-SFO. Para a escolha do solvente extrator mais apropriado, alguns requisitos devem ser atendidos. Este deve ter baixa solubilidade em água, ponto de fusão próximo à temperatura ambiente e densidade menor que a da água. Além disso, o solvente que tenha baixa toxicidade, alta afinidade pelos analitos em questão, baixo custo e adequado comportamento cromatográfico é preferido (KOCÚROVÁ et al., 2012; LEONG et al., 2008). A Tabela 5 descreve algumas

características físicas dos solventes que foram selecionados para avaliação com base em outros trabalhos da literatura que otimizaram a DLLME-SFO (JIA et al., 2013; SUH et al., 2013).

Tabela 5: Propriedades físicas dos solventes extratores testados na otimização da microextração líquido-líquido dispersiva com solidificação da gota orgânica flutuante.

Solvente Extrator	Ponto de Fusão (°C)	Densidade (g.mL ⁻¹)	Solubilidade em Água (mg L ⁻¹ , 25°C)
1-dodecanol	24	0,83	4
2-dodecanol	17-18 ^a	0,80 ^a	Insolúvel*
1-undecanol	19	0,83	19
1- bromohexadecano	16-18 ^b	0,99 ^b	Insolúvel*
1-decanol	6,4	0,83	37

Fonte: HAZARDOUS SUBSTANCES DATA BANK (HSDB). *Dados experimentais não disponíveis. ^aSTEPHENSON; STUART, 1986. ^bSIGMA-ALDRICH, 2011.

Os analitos presentes nas amostras de urina branca enriquecidas foram extraídos sem adição de sal, utilizando tampão fosfato de sódio 0,5 mol.L⁻¹ pH=9 e uma mistura de 300 µL de isopropanol, como solvente dispersor e 50 µL de cada solvente extrator a ser testado (bromohexadecano, 1-dodecanol, 2-dodecanol, n-decanol e 1-undecanol, separadamente), a fim de selecionar o mais adequado.

Apesar de ter sido citado em outros trabalhos da literatura, o solvente 1-decanol foi descartado deste estudo porque foi necessário um tempo de congelamento muito mais longo no banho de gelo devido ao seu comparativamente baixo ponto de fusão. Além disso, este solvente descongelou rapidamente, o que dificultou a transferência da gota solidificada para o microtubo Eppendorf. Isso também foi observado no estudo realizado por Jia e colaboradores em 2013. O 1-bromohexadecano também foi excluído, pois sua densidade próxima da densidade da água não permitiu uma boa separação de fases no microtubo Eppendorf, o que impossibilitou uma coleta apropriada do extrato.

Dos solventes avaliados, o 1-undecanol apresentou melhor desempenho conforme demonstrado na Tabela 6 e nas Figuras 19, 20 e 21 e o 1-dodecanol e o 2-dodecanol apresentaram comportamento semelhante, sem diferença significativa. O solvente escolhido para os experimentos posteriores foi o 1-dodecanol, pois o custo do 1-undecanol é cerca de sete vezes maior (SIGMA-ALDRICH, 2015a; SIGMA-ALDRICH, 2015b). Além disso, esse solvente favoreceu a extração dos analitos que apresentavam menor sensibilidade (caféina e levamisol). O fator de diluição utilizado neste estudo foi 3,57.

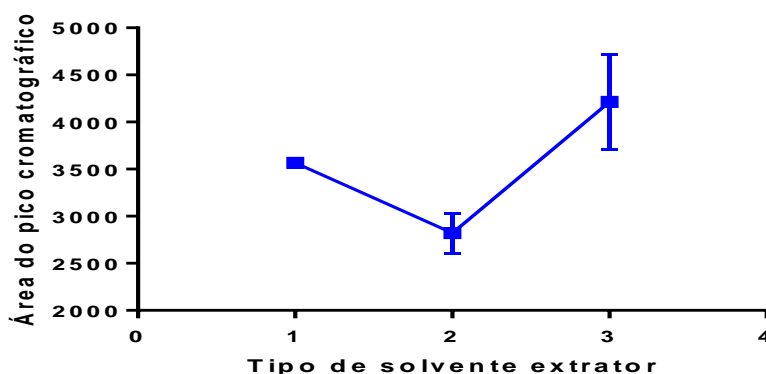


Figura 19: Efeito dos diferentes tipos de solvente extrator na área do pico cromatográfico da cafeína. Condição de extração: 50 μ L de cada solvente extrator; 300 μ L de isopropanol; pH do tampão = 9; sem adição de sal. As condições cromatográficas são apresentadas na Tabela 3. 1: 1-dodecanol; 2: 2-dodecanol; 3: 1-undecanol.

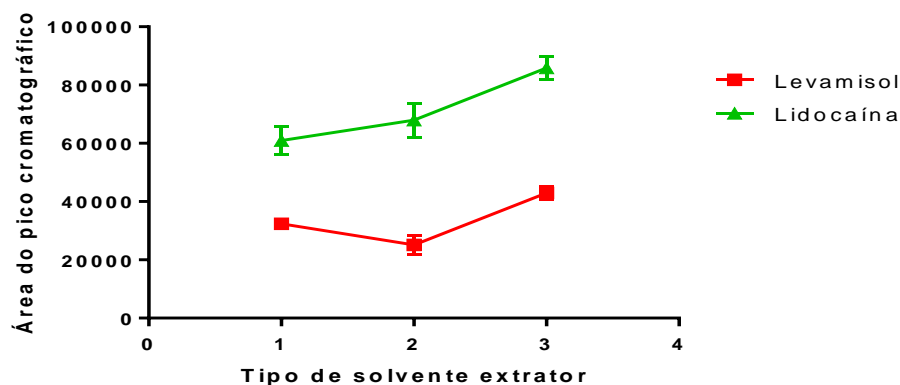


Figura 20: Efeito dos diferentes tipos de solvente extrator na área dos picos cromatográficos do levamisol e da lidocaína. Condição de extração: 50 μ L de cada solvente extrator; 300 μ L de isopropanol; pH do tampão = 9; sem adição de sal. As condições cromatográficas são apresentadas na Tabela 3. 1: 1-dodecanol; 2: 2-dodecanol; 3: 1-undecanol.

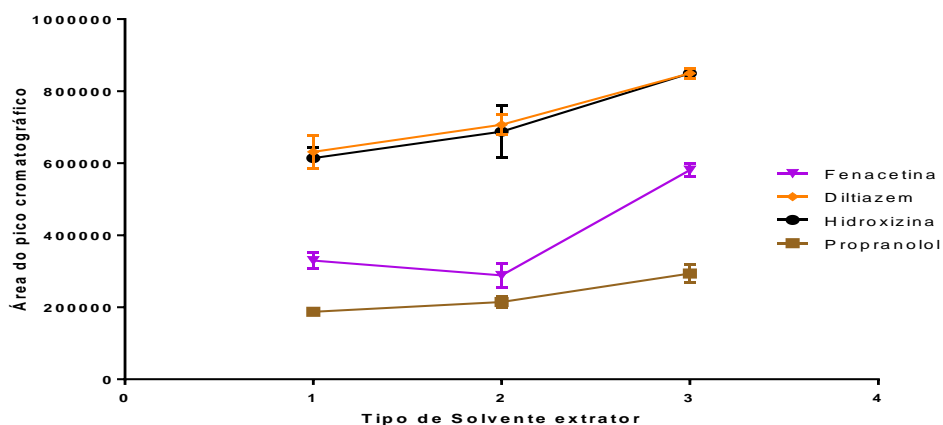


Figura 21: Efeito dos diferentes tipos de solvente extrator na área dos picos cromatográficos da fenacetina, do diltiazem, da hidroxizina e do propranolol. Condição de extração: 50 μ L de cada solvente extrator; 300 μ L de isopropanol; pH do tampão = 9; sem adição de sal. As condições cromatográficas são apresentadas na Tabela 3. 1: 1-dodecanol; 2: 2-dodecanol; 3: 1-undecanol.

Tabela 6: Resultados do teste ANOVA e teste de Tukey para comparação entre os solventes extratores.

Analitos de interesse	ANOVA (p)	Teste de Tukey (p)		
		1*2	1*3	2*3
Cafeína	0,0050	0,0628	0,1015	0,0042
Levamisol	0,0029	0,6679	0,0199	0,0031
Lidocaína	0,0091	0,3522	0,0108	0,0333
Propranolol	0,0082	0,3987	0,0102	0,0280
Fenacetina	1,64. 10⁻⁵	0,2009	0,0002	0,0002
Diltiazem	6,01. 10⁻⁵	0,0675	0,0006	0,0044
Hidroxizina	0,0020	0,1993	0,0019	0,0115

1: 1-dodecanol; 2: 2-dodecanol; 3: 1-undecanol. Em negrito, os resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

5.2.2 Seleção do Solvente Dispersor

Semelhante à DLLME convencional, a escolha do solvente dispersor é um fator considerado muito importante na extração por DLLME-SFO. Para que um solvente orgânico seja considerado um solvente dispersor adequado, ele deve ser miscível tanto em água quanto no solvente extrator e formar uma solução turva ao ser injetado com o solvente extrator na amostra. Este solvente permite o aumento da superfície de contato entre o solvente extrator e a amostra causando uma subsequente intensificação na eficiência do processo de extração (LEONG et al., 2014).

Os analitos presentes nas amostras de urina branca enriquecidas foram extraídos sem adição de sal, utilizando tampão fosfato de sódio $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ pH=9 e uma mistura de 50 μL de 1-dodecanol e 300 μL de cada solvente dispersor a ser testado (etanol, metanol, acetonitrila, acetona e isopropanol, separadamente), a fim de selecionar o mais adequado.

De acordo com os resultados obtidos e demonstrados nas Figuras 22, 23 e 24 e na Tabela 7, para três analitos (levamisol, lidocaína e diltiazem) não houve diferença significativa entre os solventes testados e para o propranolol o metanol foi o solvente que tornou possível a obtenção de maior área do pico cromatográfico. Contudo, para cafeína, fenacetina, e hidroxizina, acetonitrila possibilitou a obtenção de áreas maiores para os picos cromatográficos. Dessa forma, a acetonitrila foi mais adequada para a maioria dos analitos, sendo selecionada como solvente dispersor para os experimentos posteriores. Isto pode ser explicado devido ao efeito sinérgico da compatibilidade da acetonitrila com a solução aquosa e a baixa taxa de

distribuição dos referidos analitos para a solução de acetonitrila e fase aquosa (SANAGI et al., 2013). O fator de diluição utilizado neste experimento foi 2,63.

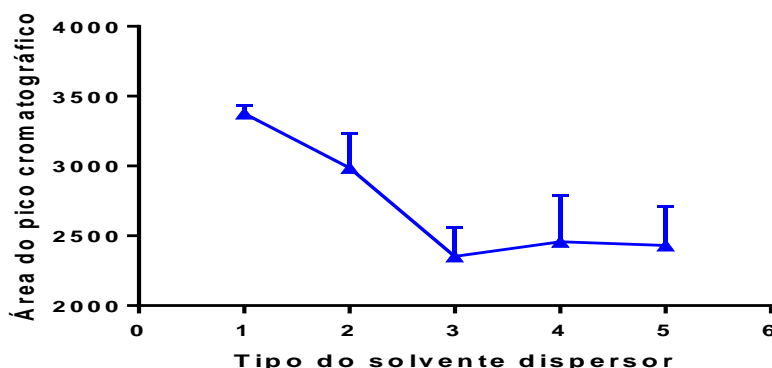


Figura 22: Efeito dos diferentes tipos de solvente dispersor na área do pico cromatográfico da cafeína. Condição de extração: 50 μ L de 1-dodecanol; 300 μ L de cada solvente dispersor; pH do tampão = 9; sem adição de sal. As condições cromatográficas são apresentadas na Tabela 3.1: Acetonitrila; 2: Acetona; 3: Metanol; 4: Etanol; 5: Isopropanol.

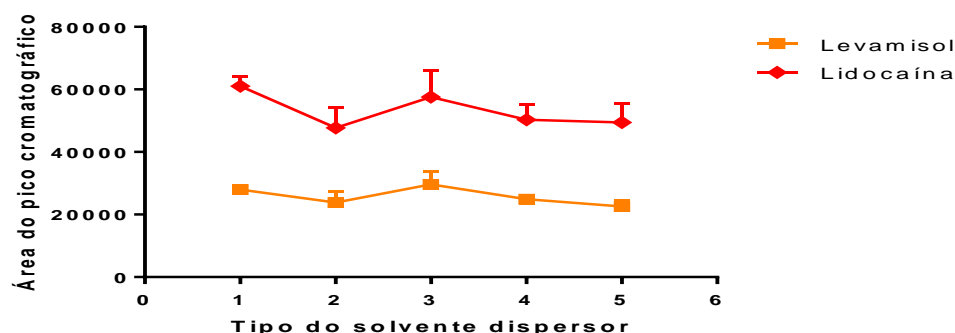


Figura 23: Efeito dos diferentes tipos de solvente dispersor na área dos picos cromatográficos do levamisol e da lidocaína. Condição de extração: 50 μ L de 1-dodecanol; 300 μ L de cada solvente dispersor; pH do tampão = 9; sem adição de sal. As condições cromatográficas são apresentadas na Tabela 3.1: Acetonitrila; 2: Acetona; 3: Metanol; 4: Etanol; 5: Isopropanol.

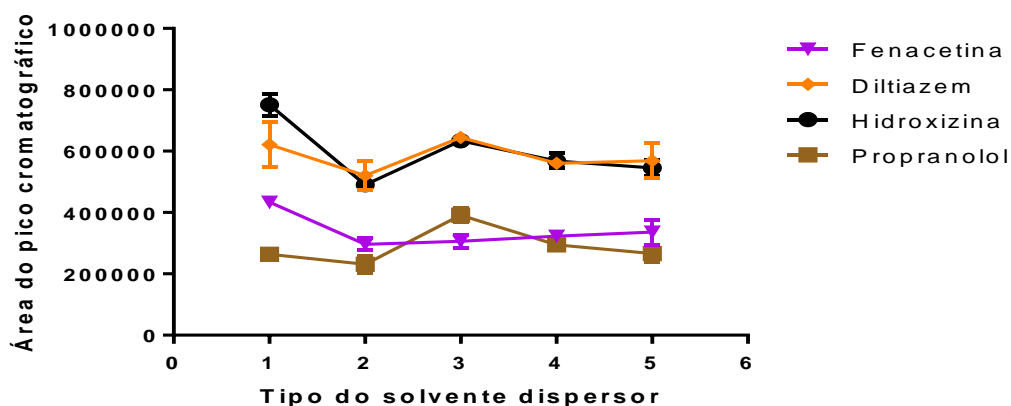


Figura 24: Efeito dos diferentes tipos de solvente dispersor na área dos picos cromatográficos da fenacetina, do diltiazem, da hidroxizina e do propranolol. Condição de extração: 50 μ L de 1-dodecanol; 300 μ L de cada solvente dispersor; pH do tampão = 9; sem adição de sal. As condições cromatográficas são apresentadas na Tabela 3. 1: Acetonitrila; 2: Acetona; 3: Metanol; 4: Etanol; 5: Isopropanol.

Tabela 7: Resultados do teste ANOVA e teste de Tukey para comparação entre os solventes dispersores.

Analitos de interesse	ANOVA (p)	Teste de Tukey (p)									
		1*2	1*3	1*4	1*5	2*3	2*4	2*5	3*4	3*5	4*5
Cafeína	0,0035	0,4175	0,0085	0,0158	0,0135	0,0948	0,1851	0,1568	0,9857	0,9952	0,9999
Levamisol	0,1049	0,5096	0,9603	0,7398	0,2947	0,2442	0,9909	0,9850	0,4052	0,1312	0,8753
Lidocaína	0,2229	0,2555	0,9715	0,4237	0,3621	0,4984	0,9906	0,9979	0,7304	0,6545	0,9999
Propranolol	0,0011	0,5309	0,0024	0,5724	0,9999	0,0007	0,0849	0,4589	0,0112	0,0028	0,6497
Fenacetina	0,0041	0,0042	0,0061	0,0123	0,0229	0,9897	0,7344	0,4177	0,9247	0,6354	0,9632
Diltiazem	0,0938	0,1845	0,9761	0,5974	0,7117	0,0814	0,8591	0,7608	0,3162	0,4060	0,9995
Hidroxizina	1,06 10⁻⁵	0,0002	0,0038	0,0003	0,0002	0,0010	0,0432	0,1879	0,0932	0,0212	0,8408

1: Acetonitrila; 2: Acetona; 3: Metanol; 4: Etanol; 5: Isopropanol. Em negrito, os resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

5.2.3 Planejamento Fatorial Completo e Análise de Componentes Principais

Procedimentos envolvendo a otimização multivariada, como o planejamento fatorial completo, vêm sendo largamente utilizados no desenvolvimento de métodos analíticos (FERNÁNDEZ et al., 2014; TAHERI et al., 2015) por serem mais econômicos e efetivos. Eles permitem a avaliação dos efeitos de interação e a otimização de mais de uma variável simultaneamente. Isso é alcançado com um menor número de ensaios, menor custo operacional e menor tempo gasto para obter as condições ótimas do método de extração (STALIKAS et al., 2009). Neste trabalho, foram necessários 19 experimentos, que foram realizados aleatoriamente em um dia. Caso fosse realizado o planejamento univariado, seriam 60 experimentos distribuídos em quatro dias e com resultados sem informações sobre as interações dos fatores.

O Quadro 1 descreve a matriz com os parâmetros reais e codificados e as respostas para todos os analitos. O fator de diluição utilizado foi 5. A Tabela 8 mostra os efeitos dos parâmetros isoladamente e de suas interações. Valores positivos indicam que a resposta aumentará quando uma variável passa do nível inferior para o nível superior e valores negativos, o inverso. Para as interações, valores positivos indicam que a resposta aumentará se as duas variáveis forem em direção ao mesmo nível e valores negativos indicam um aumento na resposta se as variáveis forem em direções contrárias.

As replicatas no ponto central foram utilizadas para estimar o erro puro, o erro padrão dos efeitos, a variância experimental e a curvatura entre os níveis escolhidos para cada uma das variáveis, os quais podem ser visualizados na Tabela 8. De acordo com os resultados, houve curvatura significativa para todos os analitos, exceto cafeína e fenacetina.

Quadro 1: Matriz com valores reais e codificados e respostas para todos os analitos.

Experimento	Variáveis codificadas				Variáveis reais				Área dos picos cromatográficos						
	Ve	Vd	Ad	pH	Ve	Vd	Ad	pH	CAF	LEVA	LIDO	FENA	DILTI	HIDROX	PROPRA
1	+	+	-	-	100	1000	0	8	2287	13818	29611	196876	212929	255544	45767
2	+	+	+	+	100	1000	20	12	6714	12259	10831	108575	46760	66208	73350
3	+	-	-	+	100	150	0	12	1727	31761	45657	209438	2608	315985	288571
4	+	+	-	+	100	1000	0	12	1586	16359	26299	103134	1158	154999	141455
5	-0,14	-0,17	0	0	60	500	10	10	3492	21862	48721	458981	438882	382342	148022
6	-0,14	-0,17	0	0	60	500	10	10	2883	20958	49643	401240	450270	382363	151908
7	-	+	+	-	30	1000	20	8	4332	5638	32584	649835	333661	503153	124976
8	+	+	+	-	100	1000	20	8	7884	6680	19137	165283	75212	75191	54473
9	-0,14	-0,17	0	0	60	500	10	10	2764	18987	44446	387648	423262	376125	153840
10	+	-	+	-	100	150	20	8	4411	5429	23147	632782	355664	347942	214175
11	-	+	-	-	30	1000	0	8	3424	19833	54777	265582	343437	547588	56814
12	-	-	+	+	30	150	20	12	4329	245917	494545	1137300	32251	1422589	1809464
13	-	+	+	+	30	1000	20	12	4839	83753	132790	544830	29867	730838	637273
14	+	-	-	-	100	150	0	8	3007	16359	34775	352091	308359	408682	68286
15	+	-	+	+	100	150	20	12	4291	57772	62760	616554	16277	322304	295889
16	-	-	-	+	30	150	0	12	2192	43724	74197	265099	550	669671	560450
17	-	-	+	-	30	150	20	8	3598	5135	28126	1072738	446319	670386	297209
18	-	-	-	-	30	150	0	8	2052	11318	30336	311232	401252	671907	140978
19	-	+	-	+	30	1000	0	12	2287	20365	48434	104966	818	447711	382223

Ve: Volume do solvente extrator (μL); Vd: Volume do solvente dispersor (μL); Ad: Adição de sal (%m/v); CAF: Cafeína; LEVA: Levamisol; LIDO: Lidocaína; FENA: Fenacetina; DILTI: Diltiazem; HIDROX: Hidroxizina; PROPRA: Propranolol. Em negrito, as maiores respostas obtidas.

Tabela 8: Efeitos dos parâmetros e suas interações na área dos picos de cada analito.

Fatores	Efeito na área dos analitos						
	Cafeína	Levamisol	Lidocaína	Fenacetina	Diltiazem	Hidroxizina	Propranolol
Média	3685,00	37257,50	71750,38	421019,69	162945,13	475668,63	324460
Curvatura	-1277,33	-33310,33	-48294,08	-10126,71	549052,42	-190783,92	-346406
(1)Ve	606,75	-34405,75	-80446,50	-245856,13	-71148,50	-464623,50	-353428
(2)Vd	968,25	-29838,75	-54885,00	-307269,12	-64929,75	-256029,25	-269836
(3)pH	-378,75	53462,50	80377,50	-69565,37	-293318,00	81239,00	398250
(4)Ad	2729,50	31130,75	57479,25	389934,88	8112,50	83315,50	227783
1* 2	290,50	14287,50	34769,75	-1980,12	-21782,50	45286,50	131867
1* 3	-439,00	-34496,25	-70658,25	-7767,37	71977,75	-138204,75	-294109
1* 4	943,75	-30170,00	-62596,00	-224521,12	-15897,75	-164206,75	-204331
2* 3	-246,50	-31770,75	-59816,25	-34452,37	71659,00	-76669,00	-160182
2* 4	816,75	-21642,00	-48424,00	-190443,62	-26323,00	-90928,50	-161830
3* 4	365,75	40742,25	69105,50	41220,62	21892,75	155077,75	133036
1*2*3	128,75	16864,50	44288,00	36560,12	29569,75	78870,75	113323
1*2*4	872,50	15062,25	40569,75	11953,87	-11949,25	37247,75	108678
1*3*4	-193,00	-30747,50	-63171,25	-355,87	15528,00	-115422,50	-186882
2*3*4	-72,00	-20587,00	-43716,75	-18059,38	33643,25	-50296,75	-105517
Erro padrão dos efeitos	195,26	735,06	1386,46	18937,58	6779,57	1797,73	1481,59

Ve: Volume do solvente extrator (μL); Vd: Volume do solvente dispersor (μL); Ad: Adição de sal (%m/v). Em negrito, os efeitos significativos (no intervalo de confiança de 95%).

Conforme os resultados, para os analitos, exceto a cafeína e o diltiazem, quanto menor o volume dos solventes extrator e dispersor e maior o valor do pH e da adição de sal, maior será a área do pico cromatográfico. Isso pode ser visualizado no Quadro 1, o qual mostra a condição 12 como a melhor para todos os analitos, exceto a cafeína e o diltiazem, para os quais a condição 8 e 5 são melhores, respectivamente.

De acordo com a Tabela 8, efeitos significativos de interações de segunda e até terceira ordem (interações entre dois e três fatores, respectivamente) foram visualizados para a maioria dos analitos, mostrando um comportamento complexo entre as variáveis estudadas e as respectivas respostas. Nesse sentido, esses resultados podem ser melhor observados nas Figuras 25 e 26 que expressam a análise de componentes principais usando como variáveis as respostas analisadas. A primeira PC, que representa 60% da variabilidade dos dados, é uma combinação de todas as respostas, exceto cafeína e diltiazem. Há, portanto, uma correlação positiva entre estas respostas. A segunda PC é praticamente composta pela resposta da cafeína (*loading* positivo) e do diltiazem (*loading* negativo). No gráfico dos escores (Figura 26), observa-se claramente que a melhor condição para todos os analitos (exceto cafeína e diltiazem) é a 12. Para a cafeína, as melhores condições correspondem aos experimentos 8 e 2 (maior volume de solvente extrator e dispersor). O experimento 12, para este analito, é uma condição intermediária. Para o diltiazem, as melhores condições são aquelas em que o pH utilizado corresponde ao nível inferior ou intermediário (condições 5,6,7,9,10,11,14,17 e 18).

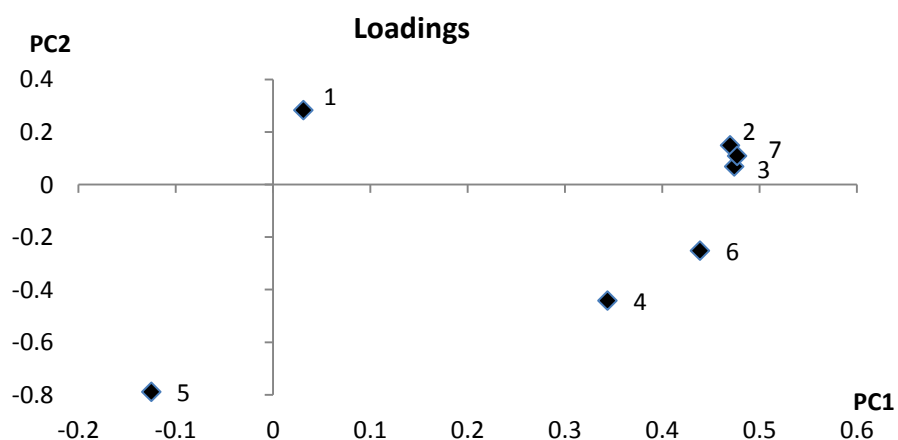


Figura 25: Gráfico dos *loadings* das duas componentes principais para os analitos observados. 1: Cafeína; 2: Levamisol; 3: Lidocaína; 4: Fenacetina; 5: Diltiazem; 6: Hidroxyzina; 7: Propranolol.

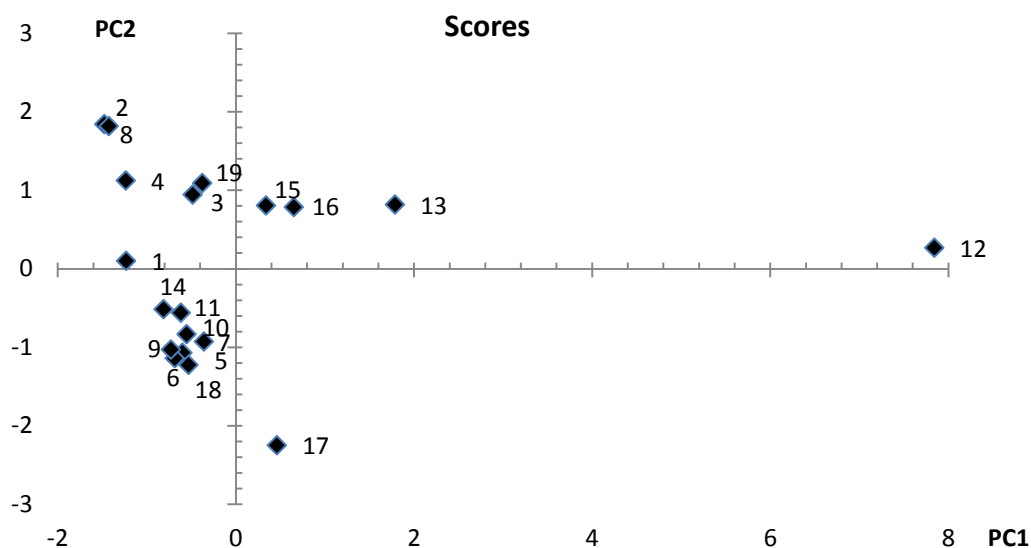


Figura 26: Dispersão dos 19 tratamentos em função dos escores dos componentes principais.

Ao analisar somente os efeitos principais, o volume do solvente dispersor demonstrou ter efeito negativo sobre a área da maioria dos analitos. Isso porque com grandes volumes desse solvente, a solubilidade dos analitos na fase aquosa aumenta e frequentemente a transferência dos analitos para a fase orgânica diminui (LIANG; SANG, 2008), portanto, o menor volume de solvente dispersor testado (150 μL) foi selecionado. O volume do solvente extrator também contribuiu de maneira negativa sobre a área dos picos da maioria dos adulterantes. Isto ocorreu porque, devido ao efeito de diluição, um aumento no seu volume resulta na diminuição da concentração dos analitos no extrato, portanto a área dos picos também será menor (AL-SAIDI; EMARA, 2014). Por este motivo, o menor volume de solvente extrator testado (30 μL) foi escolhido. A utilização de baixos volumes dos solventes extrator e dispersor é benéfica do ponto de vista ambiental, pois há redução do volume de descarte. Esta nova abordagem “verde” é muitas vezes descrita na literatura como os três Rs, que significam: *replace*, *reduce* e *recycle* (substituição de solventes tóxicos por solventes menos prejudiciais ao meio ambiente; redução do consumo de solvente e da produção de resíduos e reciclagem de solvente) (WELCH et al., 2010; SPIETELUN et al., 2014).

A escolha do pH da solução- tampão utilizada é muito importante, pois este parâmetro propicia a manutenção dos analitos nos seus estados não ionizados, o que facilita a partição para as gotas do solvente extrator. Além disso, auxilia na precipitação e eliminação de interferentes da urina, como ácido úrico e ureia,

contudo é necessário ter cautela, já que meios com pH extremos podem causar a degradação dos compostos de interesse (MAHAM et al., 2013; ÇABUK; KÖKTÜRK, 2013). O pH da solução-tampão teve uma influência importante no aumento da resposta da maioria dos analitos, sendo extraídos de forma mais eficiente no nível superior (pH=12), porém para o diltiazem a área do pico teve uma drástica redução, provavelmente devido à sua degradação em meios muito básicos (SADEGHI et al., 2013). Dessa forma, optou-se por ajustar o pH da amostra aquosa utilizando a solução-tampão com pH intermediário (pH=10).

Por sua vez, a força iônica na amostra aquosa, que foi manipulada através da adição de diferentes porcentagens de NaCl, também foi investigada. A adição de sal tem sido largamente utilizada em LLE (TANG; WENG, 2013), mas alguns resultados contraditórios têm sido relatados em microextrações em fase líquida, como a DLLME-SFO (SHAMSIPUR et al., 2014; MIRZAEI et al., 2011; SUH et al., 2013). Por um lado, a adição de sal pode aumentar a extração de analitos, pois devido ao efeito *salting-out*, o sal adicionado facilita a transferência dos analitos para a fase orgânica ao diminuir a solubilidade deles na fase aquosa, pois a força iônica da solução aumenta (MIRZAEI et al., 2011). Por outro lado, a adição de sal também pode aumentar a viscosidade da amostra aquosa, restringindo a transferência do analito para o solvente extrator (SUH et al., 2013). No presente estudo, a adição de sal mostrou ter grande importância na extração dos analitos, sendo observado aumento da área dos picos de todos os analitos, portanto a maior quantidade de sal adicionada (20 % m/v) foi selecionada.

A Tabela 9 mostra as condições otimizadas para a extração dos analitos e a Figura 27 mostra o cromatograma obtido a partir da análise cromatográfica dos adulterantes da cocaína e do padrão interno empregando as condições de microextração otimizadas e as condições cromatográficas descritas na Tabela 3.

Tabela 9: Condições otimizadas para a extração dos analitos por DLLME-SFO.

Parâmetros	Condições Otimizadas
Tipo de solvente extrator	1-dodecanol
Tipo de solvente dispersor	Acetonitrila
Volume do solvente extrator (µL)	30
Volume do solvente dispersor (µL)	150
pH da solução-tampão	10
Adição de sal (NaCl % m/v)	20

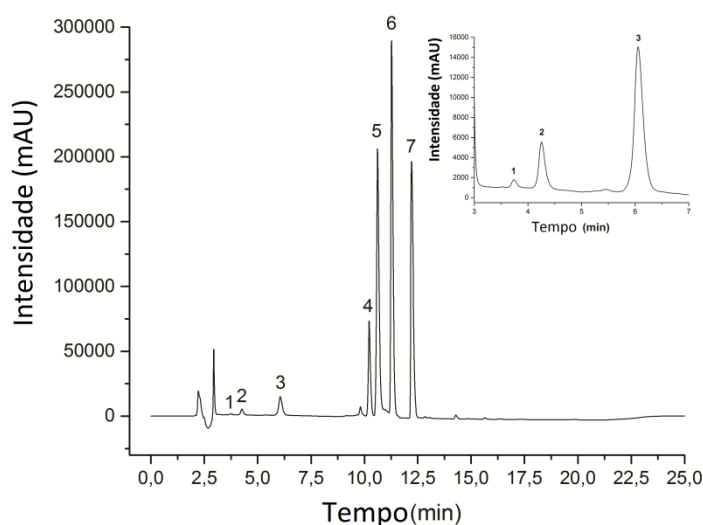


Figura 27: Cromatograma obtido a partir da análise dos adulterantes da cocaína (1875 ng.mL^{-1}) e do padrão interno (625 ng.mL^{-1}) através da microextração por DLLME-SFO sob as condições especificadas na Tabela 9 e da análise cromatográfica sob as condições especificadas na Tabela 3. 1: Cafeína; 2: Levamisol; 3: Lidocaína; 4: Propranolol; 5: Fenacetina; 6: Diltiazem; 7: Hidroxizina.

5.3 Validação

Para assegurar que um novo método analítico forneça informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra e que possui desempenho compatível com o que a aplicação demanda, o processo de validação deve ser executado (RIBANI et al., 2004; FDA, 2013). Existem vários guias para o procedimento de validação de métodos analíticos publicados por órgãos nacionais e internacionais. Neste trabalho, optou-se por utilizar a Resolução da ANVISA RE nº 899, de 29 de maio de 2003 e o *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation* do FDA publicado em 2013. Os parâmetros analíticos normalmente encontrados para validação de métodos de separação são seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e recuperação (BRASIL, 2003; FDA, 2013).

A robustez também é um parâmetro geralmente estudado na etapa de validação e descreve a capacidade do método em resistir a variações das condições analíticas, como pH e composição da fase móvel (BRASIL, 2003). No presente trabalho, como a otimização do método envolve variações de diversas condições, assume-se que a robustez já foi avaliada, pois dados sobre a influência dessas modificações sobre o método são fornecidas.

5.3.1 Seletividade

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método analítico e se esta não for assegurada, outros parâmetros como a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidos. Dentre as várias maneiras em que a seletividade pode ser avaliada, está a comparação da matriz isenta do analito de interesse com a matriz fortificada com o analito. Dessa maneira, nenhum interferente deve eluir no mesmo tempo de retenção do analito de interesse (INMETRO, 2010; FDA, 2013; RIBANI et al., 2004).

As Figuras 28 e 29 mostram que o método desenvolvido obteve boa seletividade ao ser realizada a comparação de uma amostra do *pool* de urina branca com uma amostra fortificada com os analitos no limite inferior de quantificação. Observa-se que não há, no tempo de retenção dos analitos, a presença de interferentes, os quais poderiam prejudicar a adequada identificação e quantificação dos compostos. Da mesma maneira, as Figuras 30 (pág. 75) e 33 a e b (pág. 86) ratificam a boa seletividade observada anteriormente ao não ser constatada interferência dos solventes e reagentes utilizados no processo de extração na análise de amostra de água ultrapura fortificada, nem interferência dos metabólitos dos adulterantes, da cocaína ou de outras substâncias que possam estar presentes em amostras de urina de usuários de cocaína, respectivamente.

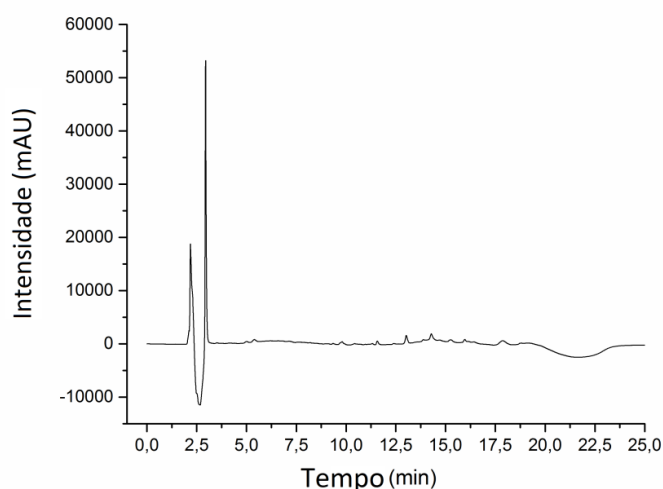


Figura 28: Cromatograma obtido a partir da análise de uma amostra do *pool* de urina branca através da microextração por DLLME-SFO sob as condições especificadas na Tabela 9 e da análise cromatográfica sob as condições especificadas na Tabela 3.

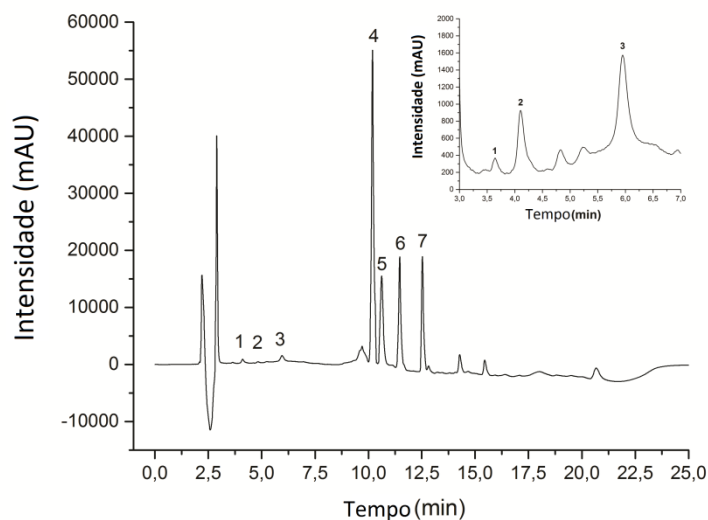


Figura 29: Cromatograma obtido a partir da análise de uma amostra do *pool* de urina branca fortificada com os adulterantes da cocaína no limite inferior de quantificação e o padrão interno através da microextração por DLLME-SFO sob as condições especificadas na Tabela 9 e da análise cromatográfica sob as condições especificadas na Tabela 3. 1: Cafeína; 2: Levamisol; 3: Lidocaína; 4: Propranolol; 5: Fenacetina; 6: Diltiazem; 7: Hidroxizina.

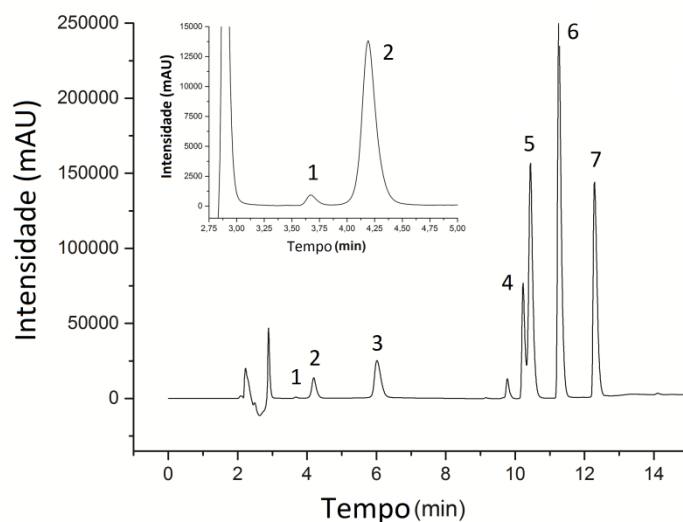


Figura 30: Cromatograma obtido a partir da análise de uma amostra de água pura fortificada com os adulterantes da cocaína (1875 ng.mL^{-1}) e o padrão interno ($937,5 \text{ ng.mL}^{-1}$) através da microextração por DLLME-SFO sob as condições especificadas na Tabela 9 e da análise cromatográfica sob as condições especificadas na Tabela 3. 1: Cafeína; 2: Levamisol; 3: Lidocaína; 4: Propranolol; 5: Fenacetina; 6: Diltiazem; 7: Hidroxizina

5.3.2. Limite Inferior de Quantificação

A determinação do LIQ representa um compromisso entre a concentração, a precisão e a exatidão exigidas. O método mais utilizado é o da relação sinal-ruído para técnicas analíticas em geral, porém em técnicas analíticas de separação, como as cromatográficas, a medição do ruído é muitas vezes subjetiva, já que a curva analítica é construída com a área e não somente o sinal do detector. Além disso, o limite de quantificação pode ser afetado pelas condições cromatográficas devendo ser levado em consideração tanto o tipo quanto o tempo de uso da coluna (RIBANI et al., 2004).

De acordo o FDA (2013), o menor ponto da curva pode ser o limite inferior de quantificação se o pico correspondente ao analito for identificável e reprodutível e se a concentração calculada a partir da resposta tiver precisão (expressa como coeficiente de variação) que não exceda 20% e exatidão (expressa como erro relativo) que não exceda 20%.

A Tabela 10 demonstra que foi possível determinar a lidocaína, fenacetina, diltiazem e hidroxizina na concentração de $187,5 \text{ ng.mL}^{-1}$ e a cafeína e o levamisol na concentração de $312,5 \text{ ng.mL}^{-1}$ com precisão e exatidão aceitáveis.

Tabela 10: Precisão e exatidão da análise dos adulterantes da cocaína no limite inferior de quantificação, equação da reta e coeficiente de correlação das respectivas curvas analíticas.

Adulterantes	Concentração (ng.mL^{-1})	Coeficiente de variação (%)	Erro relativo (%)	Equação da reta	r
Cafeína	346,04	10,74	10,73	$y = 6.10^{-6}x + 0,0008$	0,9931
Levamisol	284,42	9,35	-8,98	$y = 7.10^{-5}x - 0,0073$	0,9925
Lidocaína	158,6	10,49	-15,41	$y = 0,0003x - 0,0251$	0,9912
Fenacetina	201,89	14,69	7,68	$y = 0,0014x + 0,0433$	0,9956
Diltiazem	187,28	6,79	-0,12	$y = 0,0019x + 0,0213$	0,9923
Hidroxizina	212,13	10,65	13,14	$y = 0,0014x + 0,0248$	0,9907

Resultados obtidos através da microextração por DLLME-SFO sob as condições especificadas na Tabela 9 e da análise cromatográfica sob as condições especificadas na Tabela 3.

5.3.3 Linearidade

A linearidade fornece a relação de proporcionalidade entre a resposta do instrumento e a concentração do analito. Esta resposta deve ser reprodutível e

obtida a partir da curva analítica. A curva analítica deve ser preparada na mesma matriz biológica que a amostra através da fortificação da matriz com concentrações conhecidas do analito (FDA, 2013).

A relação matemática entre o sinal e a concentração do analito é expressa como uma equação de reta e, além dos coeficientes de regressão a e b , também é possível calcular o coeficiente de correlação. Este parâmetro descreve uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (FDA, 2013; BRASIL, 2003; INMETRO, 2010).

Como a resposta do detector varia dependendo do analito, dois intervalos de concentração foram utilizados (312,5 – 3125 ng.mL⁻¹ para cafeína e levamisol; 187,5 – 1875 ng.mL⁻¹ para lidocaína, fenacetina, diltiazem e hidroxizina). A partir da análise estatística de regressão linear dos mínimos quadrados verificou-se que o método desenvolvido foi linear no intervalo proposto, apresentando coeficientes de correlação $r > 0,9907$ para todos os analitos. Os resultados estão descritos na Tabela 10 e nas Figuras 31 e 32.

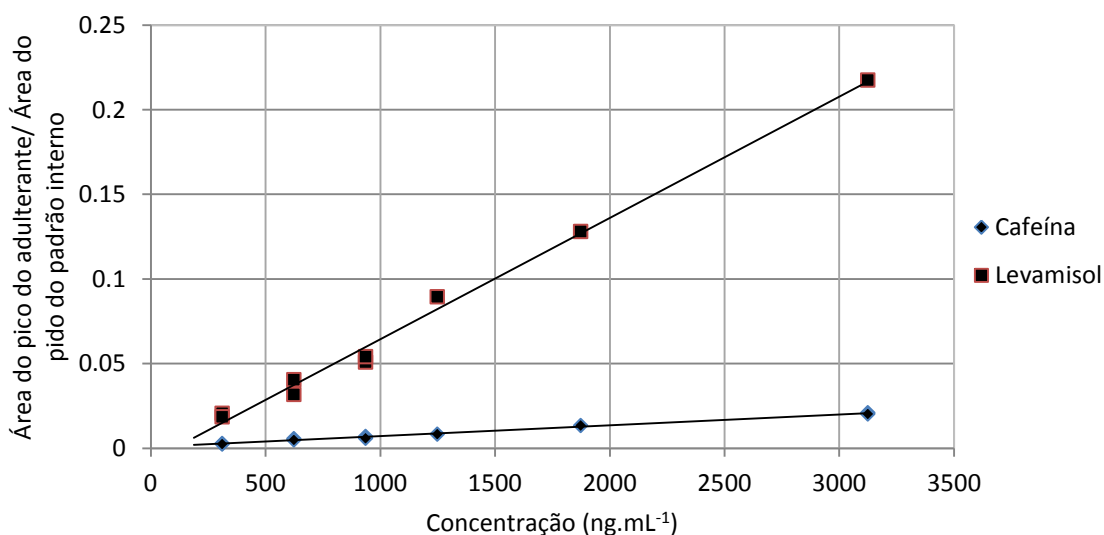


Figura 31: Curva analítica da cafeína e do levamisol no intervalo de concentração 312,5 – 3125 ng.mL⁻¹ obtida através da microextração por DLLME-SFO sob as condições especificadas na Tabela 9 e da análise cromatográfica sob as condições especificadas na Tabela 3.

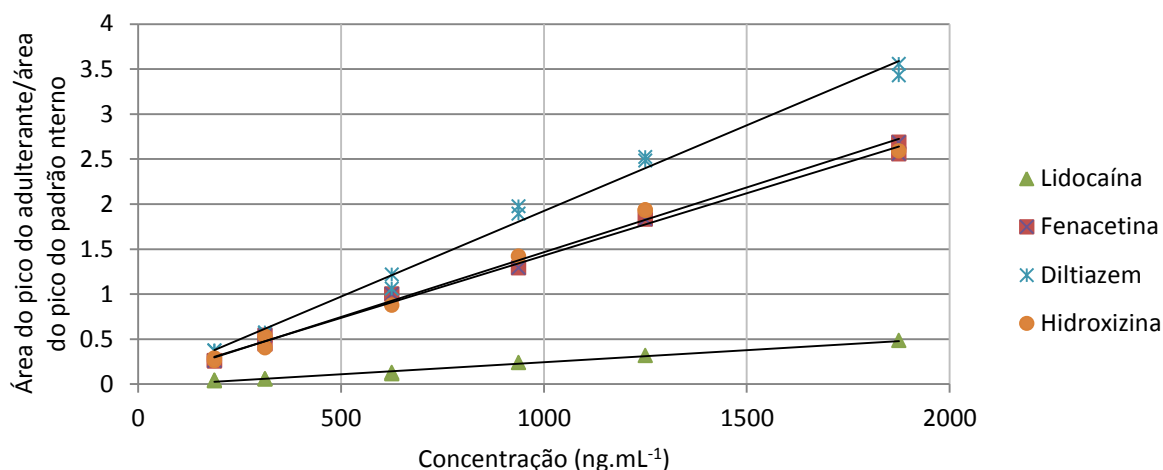


Figura 32: Curva analítica da lidocaína, fenacetina, diltiazem e hidroxizina no intervalo de concentração 187,5 – 1875 ng.mL⁻¹ obtida através da microextração por DLLME-SFO sob as condições especificadas na Tabela 9 e da análise cromatográfica sob as condições especificadas na Tabela 3.

5.3.4 Recuperação

Este parâmetro é primordial para a avaliação da eficiência do método desenvolvido (FDA, 2013). É importante frisar que dificilmente um método recupera 100% dos analitos presentes na matriz biológica, pois são muitas vezes inerentes ao processo de preparo de amostra a coprecipitação, a perda de volume do extrato devido ao processo manual de coleta da gota, entre outras limitações (PENG; CHIOU, 1990).

Os resultados indicam que há perda de analitos durante o processo de extração e estão de acordo com o estudo realizado por Vera-Ávila e colaboradores (2013). Neste estudo, poluentes com coeficientes de partição ($\log P$) bastante variados (0-7) foram extraídos de amostras de água utilizando a DLLME-SFO e o 1-dodecanol como solvente extrator e os resultados mostraram que a recuperação dos analitos está fortemente associada aos seus respectivos $\log P$ (lipofilicidade). Para poluentes com $\log P$ entre 3-7, a recuperação foi $> 70\%$ e para poluentes com $1,4 < \log P < 2,8$ a porcentagem de recuperação esteve compreendida entre 13 e 62%, ambos os resultados com valores de precisão aceitáveis. Contudo, para poluentes com $\log P < 1$ a recuperação foi próxima de zero. Os analitos extraídos no presente estudo possuem $\log P$ entre -0,07 e 2,7 e os valores médios de recuperação variaram de 6,0 a 42,6%, que foram semelhantes aos observados no estudo de

Vera-Ávila e colaboradores (2013) ou até ligeiramente inferiores, pois a urina é uma matriz mais complexa que a água.

Embora os resultados de recuperação não tenham sido elevados, a FDA (2013) informa que a recuperação não precisa necessariamente ser 100%, mas a extensão da recuperação do analito e do padrão interno deve ser consistente, precisa e reprodutível e isso pode ser verificado na Tabela 11.

Tabela 11: Recuperação dos adulterantes da cocaína empregando a microextração por DLLME-SFO.

Analitos	Recuperação (%) (n=3)/ %CV		
	Baixa*	Média*	Alta*
Cafeína	11,95/13,54	4,46/13,56	1,60/12,29
Levamisol	11,40/2,24	7,10/13,46	6,52/10,82
Lidocaína	19,06/11,01	11,96/10,17	20,26/9,62
Fenacetina	22,04/2,38	16,89/12,99	14,27/14,49
Diltiazem	34,40/7,68	25,23/13,58	26,65/12,41
Hidroxizina	48,16/7,56	42,25/10,90	37,36/10,34

* Concentração baixa é equivalente a 375 ng.mL⁻¹; Concentração média é equivalente a 1031 ng.mL⁻¹; Concentração alta é equivalente a 1500 ng.mL⁻¹ para lidocaína, fenacetina, diltiazem e hidroxizina; e 2500 ng.mL⁻¹ para cafeína e levamisol. Resultados obtidos através da microextração por DLLME-SFO sob as condições especificadas na Tabela 9 e da análise cromatográfica sob as condições especificadas na Tabela 3.

5.3.5 Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão são parâmetros muito importantes na avaliação do desempenho de um método analítico, pois determinam a extensão do erro nas análises realizadas (PENG; CHIOU, 1990). Para os testes de precisão e exatidão, foram utilizadas três concentrações: uma concentração baixa, uma intermediária e uma alta em quintuplicata, a fim de avaliar a faixa linear da curva analítica e utilizá-la com confiabilidade para a quantificação das amostras.

A FDA e a ANVISA subdividem o parâmetro precisão em intra e intercorrida. A precisão intracorrida representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição. A precisão intercorrida indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como dias ou analistas diferentes. A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada (FDA, 2013; BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004).

A exatidão consiste na proximidade dos resultados obtidos pelo método em avaliação em relação a um valor considerado verdadeiro. Uma das maneiras em que este parâmetro pode ser avaliado é pelo cálculo do ER (INMETRO, 2010; SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010). Na Tabela 12, são mostrados os valores do CV e do ER calculados nos testes de precisão e exatidão, respectivamente. Os valores estão abaixo do máximo estabelecido (<15%) pela ANVISA e FDA (BRASIL, 2003; FDA, 2013), o que permite concluir que o método foi suficientemente preciso e exato.

Tabela 12: Precisão e exatidão intra e intercorrida das análises dos adulterantes da cocaína em urina empregando a microextração por DLLME-SFO.

Analitos	Exatidão (%ER) (n=5)						Precisão (%CV) (n=5)					
	Intracorrida			Intercorrida			Intracorrida			Intercorrida		
	Baixa*	Média*	Alta*	Baixa*	Média*	Alta*	Baixa*	Média*	Alta*	Baixa*	Média*	Alta*
Cafeína	5,83	-0,59	6,05	4,45	-0,65	4,45	10,18	6,02	6,90	10,55	9,53	8,42
Levamisol	6,82	9,50	14,17	3,96	7,94	5,45	7,53	1,81	11,00	9,45	9,58	8,86
Lidocaína	8,16	2,08	7,21	2,40	-3,94	7,05	5,33	9,56	9,37	8,06	11,51	6,68
Fenacetina	-11,98	-7,62	10,31	-2,11	2,31	7,63	14,40	11,85	6,97	11,30	11,23	6,63
Diltiazem	13,30	8,10	14,62	8,85	10,03	9,84	6,80	7,16	9,08	7,43	5,97	3,50
Hidroxizina	9,86	11,05	12,48	1,18	4,67	7,07	7,66	4,59	7,58	9,66	5,98	6,20

* Concentração baixa é equivalente a 375 ng.mL⁻¹; Concentração média é equivalente a 1031 ng.mL⁻¹; Concentração alta é equivalente a 1500 ng.mL⁻¹ para lidocaína, fenacetina, diltiazem e hidroxizina; e 2500 ng.mL⁻¹ para cafeína e levamisol. Resultados obtidos através da microextração por DLLME-SFO sob as condições especificadas na Tabela 9 e da análise cromatográfica sob as condições especificadas na Tabela 3.

5.3.6 Estabilidade

A estabilidade das amostras foi avaliada para verificar o comportamento dos analitos mediante as condições normais de trabalho, pois para gerar resultados confiáveis e reprodutíveis, as amostras devem estar estáveis até o final da sua análise. A estabilidade dos compostos em líquidos biológicos depende de vários fatores como: tipo de matriz biológica, material e modo de acondicionamento utilizado e as propriedades químicas do analito. Dessa maneira, as condições de realização dos ensaios de estabilidade devem reproduzir as reais condições de manuseio e análise das amostras (FDA, 2013; BRASIL, 2003).

Mediante as condições utilizadas, não houve ocorrência de degradação significativa para todos os compostos, conforme dados da Tabela 13. Mesmo assim, adotou-se a precaução de manter as amostras de urina armazenadas o menor tempo possível, pois tempos longos de estocagem aumentam a probabilidade de degradação dos compostos de interesse, com subsequente formação de metabólitos e outros subprodutos nas análises seguintes (RIBANI et al., 2004). Outras medidas implementadas consistem em descongelar as amostras uma única vez, minutos antes do seu processamento e deixá-las sem refrigeração somente o tempo necessário.

Tabela 13: Estabilidade dos adulterantes da cocaína na urina após ciclos de congelamento e descongelamento e após 24h em temperatura ambiente.

Adulterantes	Concentração (ng.mL ⁻¹)	p	
		Estabilidade de curta duração*	Estabilidade após ciclos de congelamento-descongelamento**
Cafeína	375	0,2037	0,0517
	2500	0,7446	0,3323
Levamisol	375	0,8085	0,3718
	2500	0,5965	0,3082
Lidocaína	375	0,3390	0,5739
	1500	0,1545	0,9059
Fenacetina	375	0,2944	0,3882
	1500	0,8803	0,6329
Diltiazem	375	0,0882	0,0579
	1500	0,0987	0,0551
Hidroxizina	375	0,3172	0,0642
	1500	0,1426	0,4252

* Amostras mantidas à temperatura ambiente (25°C) por 24h; ** Amostras submetidas a três ciclos de 24h de congelamento-descongelamento (-20°C; 25°C). Resultados obtidos através da microextração por DLLME-SFO sob as condições especificadas na Tabela 9 e da análise cromatográfica sob as condições especificadas na Tabela 3.

5.4 Aplicação

Para avaliar a viabilidade do método proposto para a análise simultânea dos principais adulterantes da cocaína em urina humana, o método desenvolvido e validado foi utilizado para a análise de amostras de urina de cinco usuários de “cocaína de rua” (n=2 para cada amostra). Os resultados são mostrados na Tabela 14 e o cromatograma da amostra de urina do usuário 4 é apresentado na Figura 33 a e b.

Os cinco usuários que participaram desta pesquisa apresentavam-se na faixa etária de 20-52 anos, com 2 a 14 anos de consumo de cocaína. Os usuários 1, 2 e 3 eram assistidos pelo CAPS-AD Eulâmpio Cordeiro e eram provenientes de bairros inseridos na Região Político-Administrativa (RPA) IV de Recife (Torrões, Várzea e Cordeiro). O usuário 3 ainda não era abstinente e os usuários 1 e 2 forneceram amostra de urina após relatar recaída no tratamento, estando antes entre 12 a 18 meses em abstinência. Participaram também dois usuários que não eram assistidos pelo CAPS-AD (4 e 5), estes não estavam em abstinência e eram provenientes da RPA V de Recife (Coqueiral) e de Olinda. Os usuários 1, 2 e 5 relataram já ter apresentado em algum momento algum sintoma de intoxicação por cocaína, mas não foram hospitalizados.

Em todas as amostras pelo menos um dos adulterantes foi identificado. Isso revela certo grau de refinamento que é encontrado em drogas apreendidas em estados do Brasil mais distantes das fronteiras com os principais produtores de cocaína (Colômbia, Peru e Bolívia) como, por exemplo, Pernambuco (GOULART-JÚNIOR et al., 2012).

Os adulterantes encontrados em maior concentração foram a cafeína e a fenacetina e os mais frequentemente encontrados foram a cafeína, o diltiazem e a hidroxizina. Apesar de que nas amostras analisadas no presente estudo, a cafeína tenha sido identificada também devido ao consumo de bebidas e medicamentos contendo este fármaco, o consumo por outros meios não invalida sua determinação como adulterante, pois vários trabalhos mostram a cafeína como sendo o adulterante mais frequentemente utilizado e fazendo parte de grande quantidade na amostra (BERNARDO et al., 2003; FLORIANI et al., 2014; MAGALHÃES et al., 2013). No estudo realizado por Magalhães e colaboradores (2013), a cafeína esteve presente em 76% das amostras de cocaína em concentrações variando de 5,5 a

645,3 mg.g⁻¹. No estudo realizado por Floriani e colaboradores (2014), em amostras de cocaína apreendidas no estado do Paraná, 37,4% das amostras continham cafeína cuja composição na droga chegou até 87,8%.

A fenacetina também é um adulterante frequentemente identificado na “cocaína de rua” não só no Brasil como também na Europa (BROSÉUS et al., 2015; SCHNEIDER; MEYS, 2011; MALDANER et al., 2015). Conforme estudo realizado por Maldaner e colaboradores em 2015, a fenacetina foi o adulterante encontrado em maior quantidade na composição da base livre da cocaína (24%) o que corrobora com os dados apresentados na Tabela 14.

O diltiazem e a hidroxizina foram identificados em quatro das cinco amostras, assim como a cafeína. Nos trabalhos sobre a composição das amostras de cocaína apreendidas, observa-se que a hidroxizina e o diltiazem aparecem em menor frequência e a lidocaína e levamisol aparecem sendo identificados em grande número de amostras e em elevadas concentrações, o que não foi observado no presente trabalho. Isso sugere que a cocaína utilizada pelos usuários pode advir de fornecedores da mesma localidade, pois a facilidade de se obter os adulterantes e a sua utilização é característica de cada região (BOTELHO et al., 2014; FLORIANI et al., 2014; MALDANER et al., 2015; GOULAR-JÚNIOR, 2012).

Estudos mostram ainda que o diltiazem e a hidroxizina são encontrados nas amostras apreendidas correspondendo à pequena porcentagem na composição da droga quando comparados aos outros adulterantes (BOTELHO et al., 2014; MALDANER et al., 2015). Isso reflete a dificuldade que foi apresentada na quantificação desses compostos nas amostras de urina dos usuários, as quais apresentaram concentrações abaixo do LIQ. Pode-se supor também que a diluição do extrato no final do procedimento de DLLME-SFO possa ter reduzido a sensibilidade do método dificultando a quantificação dos analitos em níveis baixos de concentração. Contudo, deve-se ainda levar em consideração que as amostras coletadas não foram provenientes de usuários intoxicados com cocaína adulterada, apresentando, portanto menor concentração desses compostos.

A presença dos adulterantes da cocaína no organismo dos usuários é de grande preocupação. No que concerne aos usuários do CAPS-AD em tratamento, estes adulterantes podem interagir com os medicamentos prescritos causando vários outros problemas de saúde que não só os causados pela cocaína. De acordo com o *Drug Interaction Checker* do Medscape, a hidroxizina e o diltiazem interagem

com o diazepam, benzodiazepínico frequentemente prescrito para usuários em tratamento no CAPS-AD, mas também em atendimento de urgência no hospital em caso de intoxicação aguda por cocaína (BODMER et al., 2014). A hidroxizina aumenta o poder sedativo do diazepam devido às suas propriedades farmacológicas e o diltiazem aumenta as concentrações plasmáticas do diazepam por alterar seu metabolismo via CYP 3A4. Estas interações podem requerer ajuste de dosagem do diazepam e são classificadas como importantes (necessário monitoramento) (MEDSCAPE, 2015).

Além disso, os adulterantes podem interagir com outras drogas lícitas e ilícitas utilizadas concomitantemente, como maconha, tabaco e bebidas alcoólicas. A hidroxizina, por exemplo, aumenta o efeito sedativo do álcool e da maconha. A maconha pode afetar o metabolismo do diltiazem via CYP 3A4, dificultando sua eliminação do organismo. Estas interações também são classificadas como importantes (MEDSCAPE, 2015).

Os adulterantes também podem interagir com medicamentos de uso crônico que o usuário pode estar ingerindo, como a sinvastatina consumida pelo usuário 2. De acordo com a base de dados *Micromedex*[®] (2015), o uso concomitante de sinvastatina e diltiazem pode aumentar as concentrações séricas de sinvastatina e aumentar o risco de miopatia, incluindo rabdomiólise. Vale ressaltar que miopatias e rabdomiólise são problemas de saúde que também podem ser causados pela cocaína (SELVARAJ et al., 2013; O'CONNOR et al., 2015).

Exames laboratoriais de rotina também podem ser alterados pelos adulterantes da cocaína. A lidocaína pode interferir nos resultados de exame de creatinina, os quais aparecerão com valores mais altos devido à sua interferência no ensaio com Kodak Ektachem[®]. Dessa maneira, é recomendado o uso do método Jaffe (MICROMEDEX, 2015).

Diante do que foi discutido, a determinação dos adulterantes da cocaína representa uma ferramenta que pode ser utilizada a fim de contribuir com o diagnóstico das intoxicações por estes compostos, assim como contribuir para a adequação do esquema terapêutico utilizado nos pacientes intoxicados.

Tabela 14: Aplicação da DLLME-SFO em amostras de urina de usuários de cocaína.

Usuários	Adulterantes (ng.mL ⁻¹) (CV) n=2						Quantidade consumida	Último uso	Medicamentos e drogas lícitas e ilícitas consumidas
	Cafeína	Levamisol	Lidocaína	Fenacetina	Diltiazem	Hidroxizina			
1- Homem 52 anos ¹ proveniente da Várzea	>LSQ	n.d.	n.d.	n.d.	<LIQ	<LIQ	20 pedras de crack por dia durante 5 dias	7 dias	Bebida alcoólica, Bebida cafeinada, Tabaco, Dipirona, Cafeína, Orfenadrina, Diazepam, Levomepromazina e Paroxetina
2- Homem 35 anos ¹ proveniente do Cordeiro	n.d.	n.d.	n.d.	200,38 (11,94)	<LIQ	<LIQ	10 pedras de crack durante 5 horas	4 dias	Bebida alcoólica, Bebida cafeinada, Tabaco, Maconha, Solventes, Carbamazepina, Diazepam e Sinvastatina
3- Homem 38 anos ¹ proveniente de Torrões	735,25 (1,89)	n.d.	n.d.	<LIQ	n.d.	n.d.	Aproximadamente 8 pedras de crack durante 4 horas	3 dias	Bebida alcoólica, Bebida cafeinada, Carbamazepina, Diazepam e Dipirona
4- Homem 29 anos ² proveniente de Olinda	543,73 (10,45)	<LIQ	<LIQ	499,33 (7,42)	<LIQ	<LIQ	Não soube afirmar quantas pedras de crack	5 h	Bebida alcoólica, Bebida cafeinada, Maconha e Solventes
5- Mulher 20 anos ² proveniente de Coqueiral	415,70 (4,50)	<LIQ	n.d.	n.d.	<LIQ	<LIQ	2 g de cloridrato de cocaína durante aproximadamente 6h	5 dias	Bebida alcoólica, Bebida cafeinada, Maconha, Tabaco Gestodeno e Etinilestradiol

1: Usuário do CAPS-AD Eulámpio Cordeiro; 2: usuário que espontaneamente declarou ter usado cocaína. LIQ: Limite Inferior de Quantificação; LSQ: Limite Superior de Quantificação (acima da concentração mais alta da curva analítica); n.d.: não detectado. Resultados obtidos através da microextração por DLLME-SFO sob as condições especificadas na Tabela 9 e da análise cromatográfica sob as condições especificadas na Tabela 3.

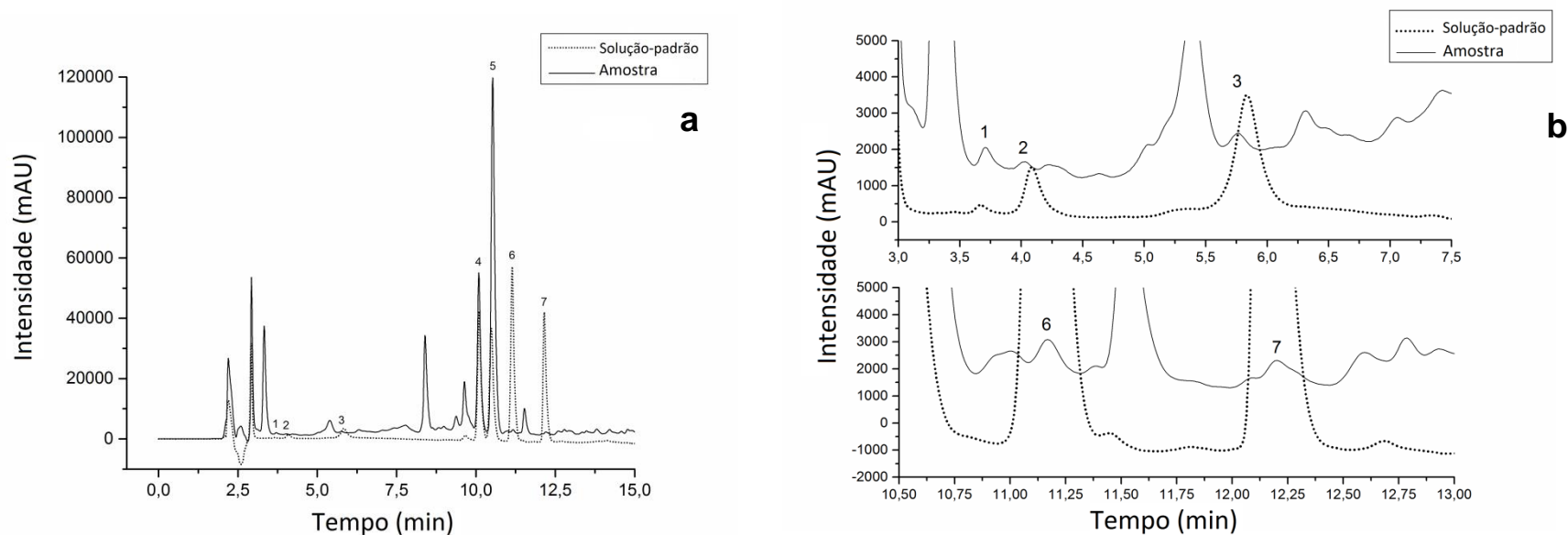


Figura 33: Cromatograma de amostra de urina do usuário 4, submetida à extração pelo método proposto utilizando a DLLME-SFO (linha contínua) sobreposto com o cromatograma das soluções-padrão dos adulterantes e do padrão interno a $409,84 \text{ ng.mL}^{-1}$ (linha tracejada)(a). A Figura 34b mostra os três primeiros picos e os dois últimos picos ampliados para melhor visualização. (1) Cafeína; (2) Levamisol; (3) Lidocaína; (4) Propranolol; (5) Fenacetina; (6) Diltiazem; (7) Hidroxizina.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi apresentado o desenvolvimento, a validação e a aplicação de um novo método analítico para a determinação simultânea dos principais adulterantes da cocaína em urina humana empregando como técnica de preparo de amostra a DLLME-SFO e como técnica de análise a CLAE-DAD.

Este método foi desenvolvido com sucesso e em relação à técnica de separação por CLAE-DAD, o método demonstrou ser adequado para a finalidade proposta, pois apresentou adequados fatores de retenção, de separação, resolução e número de pratos para os adulterantes estudados e o padrão interno. O método otimizado provou ser simples e econômico, além de ser uma alternativa ambientalmente favorável, pois a utilização de solventes orgânicos é reduzida.

A validação foi concluída e os resultados mostraram que este método oferece boa linearidade, precisão e exatidão dentro do intervalo de concentração investigado, além de os analitos apresentarem-se estáveis na matriz biológica, o que é primordial para o sucesso da quantificação dos compostos. Ainda, o método foi aplicado em cinco amostras de urina de usuários de cocaína e pelo menos um adulterante foi identificado em todas as amostras.

Espera-se que este trabalho, que foi o primeiro a combinar o uso da DLLME-SFO e do CLAE-DAD para a determinação dos principais adulterantes da cocaína em urina humana, contribua para a rapidez e precisão do diagnóstico das intoxicações agudas pelos adulterantes da cocaína e que possa ser utilizado para o adequado planejamento das medidas terapêuticas de escolha.

REFERÊNCIAS

ABADINSKY, H. **Drugs: An Introduction**. 5 ed. Belmont: Thomson/Wadsworth, 2004. 437p.

AEHLE, E.; DRAGER B. Tropane alkaloid analysis by chromatographic and electrophoretic techniques: an update. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**. v. 878, n. 17-18, p.1391–1406, 2010.

AHMADI-JOUIBARI, T.; FATTAHI, N.; SHAMSIPUR, M. Rapid extraction and determination of amphetamines in human urine samples using dispersive liquid–liquid microextraction and solidification of floating organic drop followed by high performance liquid chromatography. **J Pharm Biomed Anal**. v.94, p.145–151, 2014.

AL-SAIDI, H.M.; EMARA, A. A.A. The recent developments in dispersive liquid–liquid microextraction for preconcentration and determination of inorganic analytes. **J Saudi Chem Soc**. v.18, n.6, p. 745–761, 2014.

ALMEIDA, R.R.; ZANETTI, G.; SOUZA-JÚNIOR, A.S.; SOUZA, L.S.; SILVA, J.L.; ESCUISSATO, D.L.; IRION, K.L.; MANÇANO, A.D.; NOBRE, L.F.; HOCHHEGGER, B.; MARCHIORI, E. Cocaine-induced pulmonary changes: HRCT findings. **J Bras Pneumol**. v.41, n. 4, p.323-330, 2015.

AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEM PHARMACISTS (ASHP). **Drug Information 2013**. Bethesda: ASHP, 2013. 3822p.

AMERY, W.K.P.; BRUYNSEELS, J.P.J.M. Levamisole, the story and the lessons. **Int J Immunopharmacol**. v.14, n.3, p.481-486, 1992.

APOSTOLAKOS, M. J.; VARON, M. E. Antiarrhythmic and antiischemic properties of calcium-channel antagonists. **New Horiz**. v.4, p. 45–57, 1996.

APPELBOOM, T. Consumption of coca in history. **Verh K Acad Geneeskde Belg**, v.53, n.5, p.497–505, 1991.

ARAGÃO, N.M.; VELOSO, M.C.C.; BISPO, M.S.; ANDRADE, J.B. Efeito da acidez e de modificadores orgânicos na determinação de metilxantinas: um experimento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) empregando otimização uni e multivariada. **Quím Nova**. v.32, n.9, p. 2482- 2486, 2009.

BARAT, S.A.; ABDEL-RAHMAN, M.S. Cocaine and lidocaine in combination are synergistic convulsants. **Brain Res.** v. 742, n. 1–2, p. 157–162, 1996.

BAYNE, S.; CARLIN, M. **Forensic Applications of High Performance Liquid Chromatography**. Boca Raton: CCR Press, 2010. 272p.

BECK, O.; ERICSSON, M. Methods for urine drug testing using one-step dilution and direct injection in combination with LC-MS/MS and LC-HRMS. **Bioanalysis.** v.6, n.17, p.2229-2244, 2014.

BERIJANI, S.; ASSADI, Y.; ANBIA, M.; MILANI HOSSEINI, M.R.; AGHAEE, E. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-flame photometric detection. Very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water. **J Chromatogr A.** v.1123, n.1, p.1-9, 2006.

BERNARDO, N.P.; SIQUEIRA, M.E.P.B.; PAIVA, M.J.N., MAIA, P.P. Caffeine and other adulterants in seizures of street cocaine in Brazil. **Int J Drug Policy.** v.14, n.4, p. 331–334, 2003.

BODMER, M.; ENZLER, F.; LIAKONI, E.; BRUGGISSER, M.; LIECHTI, M.E. Acute cocaine-related health problems in patients presenting to an urban emergency department in Switzerland: a case series. **BMC Res Notes.** v. 7, n.173, p.1-7, 2014.

BOTELHO, E.D.; CUNHA, R.B.; CAMPOS, A.F.C.; MALDANERA, A.O. Chemical Profiling of Cocaine Seized by Brazilian Federal Police in 2009-2012: Major Components. **J Braz Chem Soc.** v. 25, n. 4, p.611-618, 2014.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003.** Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos" e revoga a Resolução RE nº 475, de 19 de março de 2002. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 fev 2003. Seção1, p.18221.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária **Resolução nº 21 de 17 de junho de 2010.** Dispõe sobre a atualização do Anexo I, Listas de Substâncias Entorpecentes, Psicotrópicas, Precursoras e Outras sob Controle Especial, da Portaria SVS/MS nº 344, de 12 de maio de 1998 e dá outras providências. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 jun 2010. Seção 1, p.115.

BRO, R.; SMILDE, A.K.. Principal component analysis. **Anal Methods.**v. 6, p. 2812-2831, 2014.

BROSÉUS, J.; GENTILE, N.; PONT, F.B.; GONGORA, J.M.G.; GASTÉ, L.; ESSEIVA, P. Qualitative, quantitative and temporal study of cutting agents for cocaine and heroin over 9 years. **Forensic Sci Int.** v.257, p. 307–313, 2015.

BRUNT, T.M.; RIGTER, S.; HOEK, J.; VOGELS, N.; VAN DIJK, P; NIESINK, R.J. An analysis of cocaine powder in the Netherlands: content and health hazards due to adulterants. **Addiction.** v.104, n.5, p.798–805, 2009.

BUCHANAN, J.A.; LAVONAS, E.J. Agranulocytosis and other consequences due to use of illicit cocaine contaminated with levamisole. **Curr Opin Hematol.** v.19, n.1, p. 27–31, 2012.

BULBENA-CABRE, A.; RAMOS, D. N.; GORMAN, S. R. "Crack lung": a pulmonary complication of crack cocaine case. **J Addict Med.** v.9, n.2, p.164-5, 2015.

BULCÃO, R.; GARCIA, S.C.; LIMBERGER, R.P.; BAIERLE, M.; ARBO, M.D.; CHASIN, A.A. M.; THIESEN, F.V.; TAVARES, R. *Designer drugs*: aspectos analíticos e biológicos. **Quim Nova.** v.35, n.1, p.149-158, 2012.

ÇABUK, H.; KÖKTÜRK, M. Low Density Solvent-Based Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for the Determination of Synthetic Antioxidants in Beverages by High-Performance Liquid Chromatography. **Sci World J Journal.** v. 2013, p.1-8, 2013.

CAI, B.; LI, J. Evaluation of trifluoroacetic acid as an ion-pair reagent in the separation of small ionizable molecules by reversed-phase liquid chromatography. **Anal Chim Acta.** v. 399, n.3, p.249–258, 1999.

CALDAS NETO, O. B. **Cocaína**. 1998. Monografia de finalização do Curso Superior de Polícia, Departamento de Polícia Federal, Academia Nacional de Polícia, Brasília, 1998.

CALDAS, S.S.; GONÇALVES, F.F.; PRIMEL, E.G.; PRESTES, O.D; MARTINS, M.L.; ZANELLA, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Quim Nova.** v. 34, n. 9, p.1604-1617, 2011.

CALLE, P.A.; DAMEN, J.; DE PAEPE, P.; MONSIEURS, K.G.; BUYLAERT, W.A. A survey on alcohol and illicit drug abuse among emergency department patients. **Acta Clin Belg.** v.61, n.4, p. 188-195, 2006.

CAMO Software. The Unscrambler. Version 9.7. 2007.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC:** Fundamentos, estratégias e validação. Ed. UFSCar. Universidade Federal de São Carlos, Série apontamentos, São Paulo: 2001.

CASTELLS, C.B.; CASTELLS, R.C. Peak distortion in reversed-phase liquid chromatography as a consequence of viscosity differences between sample solvent and mobile phase. **J Chromatogr A**. v.805, n.1-2, p.55–61, 1998.

CHANG, A.; OSTERLOH, J.; THOMAS, J. Levamisole: a dangerous new cocaine adulterant. **Clin Pharmacol Ther**. v. 88, n. 3, p. 408–411, 2010.

CHATPALLIWAR, V.A. PORWAL, P.K; UPMANYU, N. Validated gradient stability indicating HPLC method for determining Diltiazem Hydrochloride and related substances in bulk drug and novel tablet formulation. **J Pharm Anal**. v.2, n.3, p.226–237, 2012.

CHIADMI, F.; IYER, A.; CISTERNINO, S.; TOLEDANO, A.; SCHLATTER, J.; RATINEY, R.; FONTAN, J.E. Stability of levamisole oral solutions prepared from tablets and powder. **J Pharm Pharmaceut Sci**. v.8, n.2, p.322-325, 2005.

CHILDS, E.; HOHOFF, C.; DECKERT, J.; XU, K.; BADNER, J.; DE WIT, H. Association between ADORA2A and DRD2 polymorphisms and caffeine-induced anxiety. **Neuropsychopharmacol**. v. 33, n.12, p.2791-2800, 2008.

CHUI, Q.S.H.; ZUCCHINI, R.R.; LICHTIG, J. Qualidade de medições em química analítica. Estudo de caso: determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica com chama. **Quim Nova**, v. 24, n. 3, p.374-380, 2001.

CICCARONE, D. Stimulant Abuse: Pharmacology, Cocaine, Methamphetamine, Treatment, Attempts at Pharmacotherapy. **Prim Care Clin Office Pract**. v. 38, n.1, p. 41–58, 2011.

COLE, C.; JONES, L.; McVEIGH, J.; KICMAN, A.; SYED, Q.; BELLIS, M.A. **A guide to adulterants, bulking agents and other contaminants found in illicit drugs**. Liverpool: Liverpool John Moores University, 2010. 57p.

COLE, C.; JONES, L.; MCVEIGH, J.; KICMAN, A.; SYED, Q.; BELLIS, M. Adulterants in illicit drugs: a review of empirical evidence. **Drug Test Analysis**. v.3, p.89–96, 2011.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. 1 ed. Campinas: Editora Unicamp, 2006.456p.

CONCEIÇÃO, C.V.C. **Determinação dos principais adulterantes da cocaína em urina empregando a microextração líquido-líquido dispersiva e cromatografia líquida de alta eficiência**. 2014. 84p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2014.

COX, B.; DURIEUX, M.E.; MARCUS, M.A. Toxicity of local anaesthetics. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**. v.17, n.1, p.111-136, 2003.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia: Um breve ensaio. **QNEsc**. v.7, p.21-25, 1998.

DERLET, R.W.; ALBERTSON, T.E.; THARRATT, R.S. Lidocaine potentiation of cocaine toxicity. **Ann Emerg Med**. v.20, n.2, p.135-138, 1991.

DHAWAN, S.S.; WANG, B.W. Four-extremity gangrene associated with crack cocaine abuse. **Ann Emerg Med**. v.49, n. 2, p.186-189, 2007.

DING, X.; KAMINSKY, L. S. Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. v.43, p. 149–173, 2003.

DINIS-OLIVEIRA, R.J.; CARVALHO, F.; DUARTE, J.A.; PROENÇA, J.B.; SANTOS, A.; MAGALHÃES, T. Clinical and Forensic Signs Related to Cocaine Abuse. **Curr Drug Abuse Rev**. v.5, n.1, p.64-83, 2012.

DOCIMO, T.; REICHEL, M.; SCHNEIDER, B.; KAI, M.; KUNERT, G.; GERSHENZON, J.; GERSHENZON, J.; D'AURIA, J.C. The first step in the biosynthesis of cocaine in *Erythroxylum coca*: the characterization of arginine and ornithine decarboxylases. **Plant Mol Biol**. v.78, n.6, p.599-615, 2012.

EVARD, I.; LEGLEYE, S.; CADET-TAÏROU, A. Composition, purity and perceived quality of street cocaine in France. **Int J Drug Policy**, v. 21, n.5, p. 399–406, 2010.

FELIU, C.; FOULEY, A.; MILLART, H.; GOZALO, C.; MARTY, H.; DJERADA, Z. Clinical and analytical toxicology of opiate, cocaine and amphetamine. **Ann Biol Clin (Paris)**. v.73, n.1, p.54-69, 2015.

FERNÁNDEZ, P.; REGENJO, M.; BERMEJO, A. M.; FERNÁNDEZ, A. M.; LORENZO, R. A.; CARRO, A. M. Analysis of drugs of abuse in human plasma by dispersive liquid–liquid microextraction and high-performance liquid chromatography. **J Appl Toxicol**. v.35, n.4, 418-425, 2014.

FERRAZ, V. **Cromatografia líquida de alta eficiência**. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2001. 32p.

FLORIANI, G.; GASPARETTO, J.C.; PONTAROLO, R.; GONCALVES, A.G. Development and validation of an HPLC-DAD method for simultaneous determination of cocaine, benzoic acid, benzoylecgonine and the main adulterants found in products based on cocaine. **Forensic Sci Int**. v.235, p.32–39, 2014.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Reviewer Guidance Validation of Chromatographic Methods**. 1997. 33p.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Caffeine intake by the U.S. population**. Administration, Oakridge Nat Lab, Subcontract Num: 70000073494. 2010.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Guidance for industry: Bioanalytical Method Validation**. 2013. 34p.

FUCCI, N. Unusual adulterants in cocaine seized on Italian clandestine market. **Forensic Sci Int**. v.172, n.2-3, p.e1. 2007.

GALICIA, M.; SANTIAGO NOGUÉ, S.; BURILLO-PUTZE, G. Diez años de assistências urgentes a consumidores de cocaína em Espanha. **Med Clin (Barc)**. v. 143, n.7, p.322-326, 2014.

GARCÍA-SERRA, J.; RAMIS, J.; SIMÓ, S.; JOYA, X.; PICHINI, S.; VALL, O.; GARCÍA-ALGAR, O. Alternative biological materials to detect prenatal exposure to drugs of abuse in the third trimester of pregnancy. **An Pediatr (Barc)**. v.77, n.5, p.323-328, 2012.

GELLER, M.; BONALUMI FILHO, A.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; RIBEIRO, M.G.; DUQUE-ESTRADA, E.O.; NUNES, F.P. Safety and Efficacy of hydroxyzine hydrochloride: a retrospective study. **Rev Bras Med.** v.3, n.5, p. 215-218, 2006.

GOLDSTEIN, R.A.; DESLAURIERS, C.; BURDA, A.M. Cocaine: history, social implications, and toxicity--a review. **Dis Mon;** v.55, n.1, p. 6-38, 2009.

GOULART-JÚNIOR, S.S. **Otimização e Validação de Método Cromatográfico para Quantificação de Componentes Majoritários em Amostras de Cocaína.** 2012. 110p. Dissertação (Mestrado em Química) Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

GU, J.; CUI, H.; BEHR, M.; ZHANG, L.; ZHANG, Q.Y.; YANG, W. et al. *In vivo* mechanisms of tissue-selective drug toxicity: effects of liver-specific knockout of the NADPH-cytochrome P450 reductase gene on acetaminophen toxicity in kidney, lung, and nasal mucosa. **Mol Pharmacol.** v. 67, p. 623–630, 2005.

HAZARDOUS SUBSTANCES DATA BASE (HSDB). Disponível em: <http://toxnet.nlm.nih.gov/newtoxnet/hsdb.htm>. Acessado em 18 de novembro de 2015.

HESS, C.; RITKE, N.; BROECKER, S.; MADEA, B.; MUSSHOFF, F. Metabolism of levamisole and kinetics of levamisole and aminorex in urine by means of LC-QTOF-HRMS and LC-QqQMS, **Anal Bioanal Chem.** v. 405, n. 12, p. 4077–4088, 2013.

HOFMAIER, T.; LUF, A.; SEDDIK, A.; STOCKNER, T.; HOLY, M. et al. Aminorex, a metabolite of the cocaine adulterant levamisole, exerts amphetamine like actions at monoamine transporters. **Neurochem Int.** v. 73, p. 32–41, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA PARA POLÍTICAS PÚBLICAS DO ALCOOL E OUTRAS DROGAS (INPAD). **II Levantamento Nacional de Alcool e Drogas.** São Paulo, 2012. 85p.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (INMETRO). **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos.** DOQ-CGCRE-008, 2003. 20p.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (INMETRO). **Orientações sobre Validação de Métodos Analíticos.** DOQ-CGCRE-008, 2010. 20p.

INSTITUTO PARA PRÁTICAS SEGURAS NO USO DE MEDICAMENTOS (ISMP). Medicamentos Potencialmente Perigosos de Uso Hospitalar e Ambulatorial - Listas Atualizadas 2015. **Boletim ISMP Brasil**. v.4, n.3, p.1-8, 2015.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans: Chemicals, Industrial processes and industries associated with cancer in humans**. v.1-29, suplemento 4, 1982.

INTERNATIONAL LABOUR OFFICE (ILO). **Encyclopedia of Occupational Health and Safety**. v. 1 e 2. Geneva: International Labour Office, 1983.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION (ISO). **Statistics-Vocabulary and Symbols-Part 1: Probability and General Statistical Terms**, ISO 3534-1, 1993.

JAMES, K.T.; DETZ, A.; CORALIC, Z.; KANZARIA, H. Levamisole Contaminated Cocaine Induced Cutaneous Vasculitis Syndrome. **West J Emerg Med**. v.14, n.5, p. 448–449, 2013.

JIA, S.; LI, J.; PARK, S. R.; RYU, Y.; PARK, I. H.; PARK, J. H.; HONG, S. S.; KWONA, S. W.; LEE, J. Combined application of dispersive liquid–liquid microextraction based on the solidification of floating organic droplets and charged aerosol detection for the simple and sensitive quantification of macrolide antibiotics in human urine. **J Pharm Biomed Anal**. v. 86, p. 204–213, 2013.

JOYA, X.; GOMEZ-CULEBRAS, M.; CALLEJÓN, A.; FRIGULS, B.; PUIG, C.; ORTIGOSA, S.; MORINI, L.; GARCIA-ALGAR, O; VALL, O. Cocaine use during pregnancy assessed by hair analysis in a Canary Islands cohort. **BMC Pregnancy Childbirth**. v.12, n.2, p.1-8, 2012.

KAYAL, R.A.; ELIAS, W.Y.; ALHARTHI, K.J.; DEMYATI, A.K.; MANDURAH, J.M. Illicit drug abuse affects periodontal health status. **Saudi Med J**. v.35, n.7, p.724-728, 2014.

KOCÚROVÁ, L.; BALOGH, J.S.; ŠANDREJOVÁ, J.; ANDRUCH, V. Recent advances in dispersive liquid–liquid microextraction using organic solvents lighter than water. A review. **Microchem J** v.102, p.11–17, 2012.

KROMIDAS, S. **HPLC Made to Measure: A Practical Handbook for Optimization**. Darmstad: John Wiley & Sons. 2008. 786p.

LANGE, R.A.; HILLIS, L.D. Cardiovascular complications of cocaine use. **N Engl J Med.** v.345, p. 351-358, 2001.

LAPACHINSKE, S.F.; OKAI, G.G.; SANTOS, A.; BAIRROS, A.V.; YONAMINE, M. Analysis of cocaine and its adulterants in drugs for international trafficking seized by the Brazilian Federal Police. **Forensic Sci Int.** v. 247, p. 48–53, 2015.

LASON, W. Neurochemical and pharmacological aspects of cocaine-induced seizures. **Pol J Pharmacol.** v.53, n.1, p.57-60, 2001.

LEONG, M.I.; HUANG, S.D. Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop combined with gas chromatography with electron-capture or mass spectrometry detection. **J Chromatogr A.** v.1211, n.1-2, p.8-12, 2008.

LEONG, M.I.; FUH, M.R.; HUANG, S.D. Beyond dispersive liquid–liquid microextraction. **J Chromatogr A.** v. 1335, p. 2–14, 2014.

LEWIS, R.J. **Hawley's Condensed Chemical Dictionary.** 13 ed. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1997. 1400p.

LI, Y.; PENG, G.; HE, Q.; ZHU, H.; AL-HAMADANI, S.M. Dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of floating organic drop followed by ICP-MS for the simultaneous determination of heavy metals in wastewaters. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.** v. 140, p.156-161, 2015.

LIANG, P.; SANG, H. Determination of trace lead in biological and water samples with dispersive liquid–liquid microextraction preconcentration. **Anal Biochem.** v. 380, n. 1, p.21–25, 2008.

LUTFY, J.; NOLAND, M.E.; JARMUSKE, M. How to spot cocaine-induced pseudovasculitis. **Ann Plast Surg.** v.70, n.3, p.:375-378, 2013.

MAGALHÃES, E.J.; NASCENTES, C.C.; PEREIRA, L.S.A.; GUEDES, M.L.O.; LORDEIRO, R.A.; AULER, L.M.L.A.; AUGUSTI, R.; QUEIROZ, M.E.L.R. Evaluation of the composition of street cocaine seized in two regions of Brazil. **Sci Justice.** v. 53, n.4, p. 425–432, 2013.

MAHAM, M.; KIAROSTAMI, V.; WAQIF-HUSAIN, S.; ABROOMAND-AZAR, P.; SABER-TEHRANI, M. et al. Extraction and Determination of Cyproheptadine in

Human Urine by DLLME-HPLC Method. **Iran J Pharm Res.** v.12, n. 2, p. 311-318, 2013.

MALDANER, A.O.; BOTELHO, E. D.; ZACCA, J.J.; CAMARGO, M.A., BRAGA, J.W.; GROBÉRIO, T.S. Brazilian Federal District Cocaine Chemical Profiling - Mass Balance Approach and New Adulterant Routinely Quantified (Aminopyrine) **J Braz Chem Soc.** v. 26, n. 6, p.1227-1231, 2015.

MALONEY, W.J. The significance of cocaine use to dental practice. **New York State Dental J**, v.76, p. 36-39, 2010.

MARKS, D.J.B.; SMITH, P.J. High performance liquid chromatography. **Br J Hosp Med**, v. 75, n. 2, p.C18-C21, 2014.

McEVOY, G.K. **American Hospital Formulary Service- Drug Information 2002.** Bethesda: American Society of Health-System Pharmacists, Inc. 2002.

McTAVISH, J. R. **Pain and Profits: The History of the Headache and Its Remedies in America**, 2ed. New Brunswick: Rutgers University Press, 2004. 239p.

MEDSCAPE. Drug Interaction Checker. Disponível em: <http://reference.medscape.com/drug-interactionchecker>. Acessado em 30 de novembro de 2015.

MICROMEDEX[®] 2.0, (electronic version). Truven Health Analytics, Greenwood Village, Colorado, USA. Disponível em: <http://www-micromedexsolutions-com.ez20.periodicos.capes.gov.br/>. Acessado em 30 de novembro de 2015.

MIRZAEI, M.; BEHZADI, M.; ABADI, N.M.; BEIZAEI, A. Simultaneous separation/preconcentration of ultra-trace heavy metals in industrial wastewaters by dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop prior to determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **J Hazard Mater.** v.186, n.3, p.1739-1743, 2011.

MITCHELL, D.C.; KNIGHT, C.A.; HOCKENBERRY, J.; TEPLANSKY, R.; HARTMAN, T.J. Beverage caffeine intakes in the U.S. **Food Chem Toxicol.** v.63, p.136-142, 2014.

MOGHADAM, M. R.; SHABANI, A.M.H.; DADFARNIA, S. Spectrophotometric determination of iron species using a combination of artificial neural networks and

dispersive liquid–liquid microextraction based on solidification of floating organic drop **J Hazard Mater**, v.197, p.176– 182, 2011.

NATURAL RESOURCES CONSERVATION SERVICE (NRCS). *Erythroxylum coca* Lam. Disponível em: http://plants.usda.gov/java/largeImage?imageID=erco41_001_ahp.tif. Acessado em 14 de novembro de 2014.

NOLAN, A.L.; JEN, K.Y. Pathologic manifestations of levamisole-adulterated cocaine exposure. **Diagn Pathol**. v.10, n.48, p. 1-6, 2015.

O'CONNOR, A.D.; PADILLA-JONES, A.; GERKIN, R.D.; LEVINE, M. Prevalence of Rhabdomyolysis in Sympathomimetic Toxicity: a Comparison of Stimulants. **J Med Toxicol**. v.11, n.2, p.195-200, 2015.

O'NEIL, M.J. **The Merck index**: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2013. 2708p.

OSOL, A. **Remington's Pharmaceutical Sciences**. 16ed. Easton: Mack Publishing Co., 1980. 1928p.

PASCHOAL, J.A.R.; RATH, S.; AIROLDI, F.P.S.; REYES, F.G.R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Quím Nova**. v.31, n.5, p. 1190-1198, 2008.

PAWLIK, E.; MAHLER, H.; HARTUNG, B.; PLÄSSER, G.; DALDRUP, T. Drug-related death: Adulterants from cocaine preparations in lung tissue and blood. **Forensic Sci Int**. v. 249 p.294–303, 2015.

PENA-PEREIRA, F.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Miniaturized preconcentration methods based on liquid–liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review. **Spectrochim Acta, Part B**. v.64, n.1, p.1-15, 2009.

PENG, G.W.; CHIOU, W.L. Analysis of drugs and other toxic substances in biological samples for pharmacokinetic studies. **J Chromatogr Amsterdam**. v.531, p.3-50, 1990.

PENG, G.; QIANG HE, Q.; AL-HAMADANI, S.M.Z.F.; ZHOU, G.; LIU, M. et al. Dispersive liquid–liquid microextraction method based on solidification of floating

organic droplet for the determination of thiamphenicol and florfenicol in environmental water samples. **Ecotoxicol Environ Saf.** v.115, p.229–233, 2015.

PETERS, J.M.; MORISHIMA, H.;WARD, J. M.; COAKLEY, C. J.; KIMURA, S.; GONZALEZ, F. J. Role of CYP1A2 in the toxicity of long-term phenacetin feeding in mice. **Toxicol Sci.** v. 50, p. 82–89, 1999.

PETERSEN, K.U. Caffeine in analgesics--myth or medicine? **MMW Fortschr Med.** v.155, n. Suppl 4, p.109-114, 2013.

PLUSH, T.; SHAKESPEARE, W.; JACOBS, D.; LADI, L.; SETHI, S.; GASPERINO, J. Cocaine-induced agitated delirium: a case report and review. **J Intensive Care Med.** v.30, n.1, p.49-57, 2015.

POOLE, C.F.**The essence of chromatography.** Amsterdam: Elsevier. 2003. 925p.

PORTAL I-HELPS 3.0. His-Prods Medicamentos: histórico de registro de medicamentos. [Internet]. São Paulo: Optionline – Health Environment Legal Prevention & Safety. Disponível em: <http://www.i-helps.com>. Acessado em 29 de setembro de 2015.

PUBCHEM. Open Chemistry Database. Levamisole. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/levamisole#section=Top>. Acessado em 30 de junho de 2015.

QUATROCCHI, O.A.; ANDRIZZI, S.I.A.; LABA, R.F. **Introducción a la HPLC – Aplicación y Práctica.** Buenos Aires: Artes Gráficas Farro S.A.1992. 301p.

RAUPP, L.; ADORNO, R.C.F. Uso de crack na cidade de São Paulo/Brasil. **Toxicodependências.** v.16, n. 2, p. 29-37, 2010.

REZAEI, M.; ASSADI, Y.; MILANI HOSSEINI, M.R.; AGHAEI, E.; AHMADI, F.; BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **J Chromatogr A.** v.1116, n.1-2, p.1-9, 2006.

REZAEI, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method. **J Chromatogr A.** v.1217, n.16, p.2342–2357, 2010.

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

RIDDER, W.P.; KLIMEK, M.; RUPREHT, J. Physostigmine for the immediate treatment of a patient with the central anticholinergic syndrome induced by cocaine cut with atropine. **Ned Tijdschr Geneesk**. v.149, n.30, p.1701-1703, 2005.

ROLDAN, C.J. Phenytoin toxicity from cocaine adulteration. **West J Emerg Med**.v.15, n.2, p.127-130, 2014.

SABOGAL-CARMONA, J.S.; URREGO-NOVOA, J.R. Quantifying the chemical composition of crack-cocaine (bazuco) samples seized in Colombia during the first half of 2010. **Rev Salud Publica (Bogota)**. v. 14, n.6, p.1014-1025, 2012.

SADEGHI, F.; NAVIDPOUR, L.; BAYAT, S.; AFSHAR, M. Validation and Uncertainty Estimation of an Ecofriendly and Stability-Indicating HPLC Method for Determination of Diltiazem in Pharmaceutical Preparations. **J Anal Methods Chem**. v.2013, p.1-10, 2013.

SAEIDI, I.; BARFI, B.; ASGHARI, A.; GHARAHBAGH, A.A.; BARFI, A.; PEYROVI, M.; AFSHARZADEH, M.; HOJATINASAB, M. Ionic-liquid-based hollow-fiber liquid-phase microextraction method combined with hybrid artificial neural network-genetic algorithm for speciation and optimized determination of ferro and ferric in environmental water samples. **Environ Monit Assess**, v. 187, n. 631, p. 1-12, 2015.

SANAGI, M.M.; MOKHTAR, S.U.; IBRAHIM, W.A.W.; ABOUL-ENEIN, H.Y. Application of Dispersive Liquid-liquid Microextraction Based on Solidification of Floating Organic Droplet to the Analysis of Antidepressant Drugs in Water Samples. **Sains Malays**. v.42, n.2, p. 149–157, 2013.

SASTRY, R.C.; LEE, D.; HAR-EL, G. Palate perforation from cocaine abuse. **Otolaryngol Head Neck Surg**; v.116, p.565-566, 1997.

SCHIFANO, F.; CORKERY, J. Cocaine/crack cocaine consumption, treatment demand, seizures, related offences, prices, average purity levels and deaths in the UK (1990–2004). **J Psychopharmacol**. v. 22, n.1, p. 71–79, 2008.

SCHINDLER C. W., TELLA S. R., ERZOUKI H. K., GOLDBERG S. R. Pharmacological mechanisms in cocaine's cardiovascular effects. **Drug Alcohol Depend**. v.37, p.183–191, 1995.

SCHNEIDER, S.; MEYS, F. Analysis of illicit cocaine and heroin samples seized in Luxembourg from 2005–2010. **Forensic Sci Int.** v.212, p. 242–246, 2011.

SELVARAJ, V.; GOLLAMUDI, L. R.; SHARMA, A.; MADABUSHI, J. A Case of Cocaine-Induced Myopathy. **Prim Care Companion CNS Disord.** v.15, n.3, p. 1-7, 2013.

SHAMSIPUR, M.; FATTAHI, N.; ASSADI, Y.; SADEGHI, M.; SHARAFI, K. Speciation of As(III) and As(V) in water samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry after solid phase extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of floating organic drop. **Talanta.** v.130, p.26-32, 2014.

SHAWWA, K.; ALRAIYES, A.H.; EISA, N.; ALRAIES, M.C. Cocaine-induced leg ulceration. **BMJ Case Rep.** v. 2013, p.1-2, 2013.

SHESSER, R.; JOTTE, R.; OLSHAKER, J. The contribution of impurities to the acute morbidity of illegal drug use. **Am J Emerg Med.** v.9, n.4, p. 336-342, 1991.

SIERADZKA, E.; WITT, K.; MILNEROWICZ, H. The application of capillary electrophoresis techniques in toxicological analysis. **Biomed Chromatogr.** v.28, n.11, p. 1507-13, 2014.

SIGMA-ALDRICH. 1- Bromohexadecano. Ficha de informações de segurança de produtos químicos. 2011.

SIGMA-ALDRICH. Cloridrato de Levamisol. Ficha de informações de segurança de produtos químicos. 2013.

SIGMA-ALDRICH. 1-undecanol. Disponível em:
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?interface=All&term=1-undecanol&N=0&focus=product&lang=pt®ion=BR>. Acessado em: 30 de junho de 2015a.

SIGMA-ALDRICH. 1-dodecanol. Disponível em:
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/126799?lang=pt®ion=BR>. Acessado em: 30 de junho de 2015b.

SILVERBLATT, I. **Moon, sun, and witches:** Gender ideologies and class in Inca and colonial Peru. Princeton: Princeton University Press, 1987. 3014p.

SILVESTRE, F.J.; PEREZ-HERBERA, A.; PUENTE-SANDOVAL, A.; BAGÁN, J.V. Hard palate perforation in cocaine abusers: a systematic review. **Clin Oral Investig.** v. 6, p. 621-628, 2010.

SIMONS, F.E.; SIMONS, K.J.; FIRTH, E.M. The pharmacokinetics and antihistaminic of the H1 receptor antagonist hydroxyzine. **J Allergy Clin Immunol.** v. 73, p. 69-75, 1984.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; DOLAN, J.W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography.** 3ed. New Jersey: John Wiley & Sons. 2010. 957p.

SOUIED, O.; BAYDOUN, H.; GHANDOUR, Z.; MOBARAKAI, N. Levamisole-contaminated cocaine: an emergent cause of vasculitis and skin necrosis. **Case Rep Med.** v.2014, p.1-3, 2014.

SPIETELUN, A.; MARCINKOWSKI, Ł.; GUARDIA, M.; NAMIEŚNIK, J. Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques **Talanta.** v. 119, p. 34–45, 2014.

STALIKAS, C.; FIAMEGOS, Y.; SAKKAS, V.; ALBANIS, T. Developments on chemometric approaches to optimize and evaluate microextraction. **J Chromatogr A.** v.1216, p.175–189, 2009.

STANKOWSKI, R.V.; KLONER, R.A.; REZKALLA, S.H. Cardiovascular consequences of cocaine use. **Trends Cardiovasc Med.** v.25, n.6, p.517-526, 2015.

STATSOFT. Statistica (data analysis software system). Version 10. 2010.

STEPHENSON, R.; STUART, J. Mutual binary solubilities: water–alcohols and water–esters, **J Chem Eng Data.** v.31, p.56–70, 1986.

STOLBERG, V.B. The Use of Coca: Prehistory, History, and Ethnography. **J Ethn Subst Abuse.** v. 10, n.2, p.126–146, 2011.

SUH, J.H.; LEE, Y.Y.; LEE, H.J.; KANG, M. HUR, Y.; LEE, S.N.; YANG, D.H.; HAN, S.B. Dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplets followed by high performance liquid chromatography for the determination of duloxetine in human plasma. **J Pharm Biomed Anal.** v.5, n.75, p. 214-219, 2013.

SWEETMAN S. **Martindale**: The complete Drug Reference. 36 ed. Londres: Pharmaceutical Press, 2009.

SZULTKA, M.; POMASTOWSKI, P.; RAILEAN-PLUGARU, V.; BUSZEWSKI, B. Microextraction sample preparation techniques in biomedical analysis. **J Sep Sci.** v.37, p.3094–3105, 2014.

TAHERI, S.; JALALI, F.; FATTAHI, N.; JALILI, R.; BAHRAMI, G. Sensitive determination of methadone in human serum and urine by dispersive liquid–liquid microextraction based on the solidification of a floating organic droplet followed by HPLC–UV. **J Sep Sci.** v.38, p.3545–3551, 2015.

TANG, Y.Q.; WENG, N. Salting-out assisted liquid-liquid extraction for bioanalysis. **Bioanalysis.** v.5, n.12, p.1583-1598, 2013.

THE MERCK INDEX ONLINE: Chemicals, Drugs and Biologicals. Disponível em: <https://www.rsc.org/merck-index>. Acessado em: 30 de junho de 2015.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; FAJGELJ, A.; WILLETTS, P.; WOOD, R. Harmonized guidelines for the use of recovery information in analytical measurement, ISO, IUPAC and AOAC International Technical report. **Pure Appl Chem**, v.71, n.2, p.337-348, 1999.

TREADWELL, S.D.; ROBINSON, T.G. Cocaine use and stroke. **Postgrad Med J.** v. 83, n. 980, p.389-394, 2007.

TUOMI, T.; JOHNSON, T.; REIJULA, K. Analysis of Nicotine, 3-Hydroxycotinine, Cotinine, and Caffeine in Urine of Passive Smokers by HPLC-Tandem Mass Spectrometry. **Clin Chem.** v.45, n.12, p. 2164–2172, 1999.

ULLRICH, K.; KOVAL, R.; KOVAL, E.; BAPOJE, S.; HIRSH, J.M. Five Consecutive Cases of a Cutaneous Vasculopathy in Users of Levamisole-Adulterated Cocaine. **J Clin Rheumatol.** v.17, n.4, p.193-196, 2011.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME (UNODC). **Coca Cultivation in the Andean Region**: A Survey of Bolivia, Colombia and Peru. Viena: United Nation publication. 2008. 134p.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME (UNODC). **World Drug Report 2011**. Viena: United Nation Publication, 2011. 272p.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME (UNODC). **World Drug Report 2013**. Viena: United Nation Publication, 2013. 151p.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME (UNODC). **World Drug Report 2014**. Viena: United Nation Publication, 2014. 127p.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME (UNODC). **World Drug Report 2015**. Viena: United Nation Publication, 2015. 162p.

VANATTOU-SAÏFOUDINE, N.; MCNAMARA, R.; HARKIN, A. Caffeine provokes adverse interactions with 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy') and related psychostimulants: mechanisms and mediators. **Br J Pharmacol**. v.167, n.5, p.946-59, 2012.

VARGAS, R. M.; TALHAVINI, M. **Cocaína**. Relatório de atividades do projeto FAPDF no 193.000.360/99, Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal, Brasília, 2000.

VERA-AVILA, L.E.; ROJO-PORTILLO, T.; COVARRUBIAS-HERRERA, R.; PEÑA-ALVAREZ, A. Capabilities and limitations of dispersive liquid-liquid microextraction with solidification of floating organic drop for the extraction of organic pollutants from water samples. **Anal Chim Acta**. v.805, p.60– 69, 2013.

VROEGOP, M.P.; FRANSSEN, E.J.; VAN DER VOORT, P.H.J.; VAN DEN BERG, T.N.A.; LANGEWEG, R.J.; KRAMERS, C. The emergency care of cocaine intoxications. **Neth J Med**. v.67, n.4, p.122-126, 2009.

WARNER, E.A. Cocaine abuse. **Ann Intern Med**. v.119, n.3, p. 226-235, 1993.

WEINER, A. L.; BAYER, M. J.; MACKAY, C. A. J.; DEMEO, M.; STARR, E. Anticholinergic poisoning with adulterated intranasal cocaine. **Am J Emerg Med**. v.16, n.5, p.517–520, 1998.

WELCH, C.J.; WU, N.; BIBA, M.; HARTMAN, R.; BRKOVIC, T.; GONG, X.; HELMY, R.; SCHAFER, W.; CUFF, J.; PIRZADA, Z.; ZHOU, L. Greening analytical chromatography. **Trends Anal Chem**. v.29, p. 667-680, 2010.

XU, L.; BASHEER, C., LEE, H.K. Developments in single-drop microextraction. **J Chromatogr A**. v.1152, n. 1-2, p. 184-192, 2007.

ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: Desenvolvimento de método analítico para determinação dos principais adulterantes da cocaína em urina humana

Eu, _____, fui procurado(a) pela pesquisadora Laís Cristina Santana Sena para colaborar no projeto de pesquisa com título acima citado a ser realizado na Universidade Federal de Sergipe. Nesse estudo uma amostra de 20 mL de urina será coletada para exames laboratoriais. Esses exames não significam qualquer risco para minha saúde, podendo trazer informações que ajudarão no futuro, pacientes em tratamento de intoxicações por cocaína adulterada.

Estou ciente de que os dados obtidos através das análises mencionadas poderão ser a mim comunicados quando solicitados, bem como todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais e minha identidade será mantida em sigilo. Somente os pesquisadores envolvidos no projeto mencionado terão conhecimento dos dados. Também estou ciente de que não haverá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por minha participação.

Fui informado (a) que terei a liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo. Afirmo que entendi tudo o que está escrito acima e concordo em participar do projeto de pesquisa. Confirmo que recebi a cópia deste termo de consentimento.

Recife-PE, ____/____/____ Ficha nº _____

Nome: _____

Assinatura: _____

ou



Impressão digital

Pesquisador Responsável: Laís Cristina Santana Sena.

Telefone: (79) 9116-9486

E-mail: laiscris4@hotmail.com

ANEXO B- FORMULÁRIO PARA VERIFICAÇÃO DO PERFIL DE CONSUMO DE COCAÍNA

Data da coleta: ____/____/____ N° da amostra:_____

1. Idade: _____
2. Sexo: () Masculino() Feminino
3. Bairro/Cidade_____
4. Quando utilizou cocaína/crack pela última vez?
() últimas 2 horas
() entre 2 e 6 horas
() entre 6 e 12 horas
() entre 12 e 24 horas
() mais de 24 horas.
5. Qual a quantidade consumida neste último uso? _____
6. Qual a via de consumo utilizada? () Nasal () Pulmonar () _____
7. Qual é (era) a frequência de consumo? _____
8. Quanto tempo de uso? _____
9. Já teve algum caso de intoxicação e/ou overdose? _____
10. Usa ou já usou recentemente alguma outra droga?() Sim () Não (pular para 14ª)
11. Se sim, qual(is) outra(s) droga(s) utiliza(ou)?
() Bebida alcoólica
() Tabaco
() Maconha
() Heroína
() Anfetamina (“rebite”) ou Metanfetamina (“ice”)
() Ecstasy
() LSD
() Cola de sapateiro
() Outras? Qual? _____
12. Com que frequência usa(ou) essa outra droga? _____
13. Há quanto tempo usa(ou) essa outra droga? _____
14. Usou algum desses medicamentos nas últimas 24h?
() Paracetamol

- ☐ Cafeína
- ☐ Levamisol
- ☐ Hidroxizina
- ☐ Diltiazem
- ☐ Propranolol
- ☐ Lidocaína
- ☐ Outros? Qual? _____

15. Com que frequência consome café? _____

16. Qual a última vez que consumiu café?

- ☐ últimas 2 horas
- ☐ entre 2 e 6 horas
- ☐ entre 6 e 12 horas
- ☐ entre 12 e 24 horas
- ☐ mais de 24 horas.

17. Com que frequência consome refrigerante? _____

18. Qual a última vez que consumiu refrigerante?

- ☐ últimas 2 horas
- ☐ entre 2 e 6 horas
- ☐ entre 6 e 12 horas
- ☐ entre 12 e 24 horas
- ☐ mais de 24 horas.

ANEXO C- APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO-HU/UFS

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE
ARACAJÚ/ UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SERGIPE/ HU-



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise Cromatográfica dos Principais Aduiterantes da Cocaína empregando técnicas modernas de microextração

Pesquisador: Lais Cristina Santana Sena

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 41943415.7.0000.5546

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.106.460

Data da Relatoria: 12/06/2015

Apresentação do Projeto:

A cocaína é um poderoso estimulante do sistema nervoso central que apresenta uma grande capacidade de causar dependência. Frequentemente a esta droga são adicionados aduiterantes com o intuito de mimetizar a sua ação ou minimizar os seus efeitos

adversos. Quando há na composição da droga outros componentes farmacologicamente ativos, reações adversas e outros severos agravos à saúde podem ocorrer nos usuários. Vários destes casos podem ser confirmados por meio de métodos laboratoriais. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho é desenvolver um novo método de determinação dos principais aduiterantes da cocaína (cafeína, lidocaína, fenacetina, difluzem e hidroxizina) em urina humana empregando a cromatografia líquida de alta eficiência como técnica de análise e a microextração líquido-líquido dispersiva com solidificação da gota orgânica flutuante como técnica de pré-paro das amostras. Critério de Inclusão: As amostras de urina humana para o desenvolvimento do método proposto serão coletadas de voluntários

pesando entre 70-90 kg, com 18-45 anos. As amostras para a aplicação do método serão obtidas de usuários de cocaína atendidos no Hospital das Clínicas de Pernambuco. Serão incluídos os voluntários que registrarem seu consentimento através do Termo de consentimento Livre e Esclarecido

Endereço: Rua Cláudio Beldete s/nº

Bairro: Senador

UF: SE

Município: ARACAJU

Telefone: (79)2105-1805

CEP: 49.060-110

E-mail: cephu@ufs.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE
ARACAJÚ/ UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SERGIPE/ HU-



Continuação do Parecer: 1.105.460

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Desenvolver um método analítico empregando a DLLME-SFO e CLAE-DAD para determinação simultânea da cafeína, lidocaína, procaina, diltiazem, hidroxyzina e fenacetina, adulterantes da cocaína, em urina humana.

Objetivo Secundário:

Otimizar os parâmetros cromatográficos para as análises por CLAE-DAD. Otimizar a metodologia de extração por DLLME-SFO. Validar a metodologia desenvolvida, avaliando os parâmetros de seletividade, linearidade, limites de quantificação, recuperação, precisão, exatidão e estabilidade. Aplicar a metodologia desenvolvida e validada em amostras de urina coletadas de usuários de cocaína.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A coleta e a realização das análises não representam riscos para o voluntário, salvo algum tipo de constrangimento.

Benefícios:

Espera-se que o método desenvolvido possa contribuir para a rapidez e precisão do diagnóstico das intoxicações agudas pelos adulterantes da cocaína, assim como, que possa ser utilizado para o adequado planejamento das medidas terapêuticas de escolha e para a monitorização dos pacientes contribuindo então, para um prognóstico favorável dos quadros de intoxicação.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Relevante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram todos adequados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Cláudio Bellete s/nº

Bairro: Senatório

UF: SE


Município: ARACAJU

Telefone: (79)2105-1805

CEP: 49.060-110

E-mail: cephu@ufse.br

**ANEXO D- APROVAÇÃO PELA COORDENAÇÃO DE SAÚDE MENTAL DO
MUNICÍPIO DE RECIFE-PE**


**PREFEITURA DO
RECIFE**
SECRETARIA DE SAÚDE
Secretaria Executiva de Gestão do Trabalho e Educação na Saúde
Divisão de Educação na Saúde

CI nº. 047 / 2015 – DES/GFES/SEGTES/SESAU

Recife, 25 de junho de 2015.

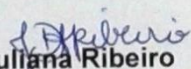
Prezado/a Senhor/a,

Informamos que **Lais Cristina Santana Sena** pesquisadora do Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Sergipe, **está autorizada**, a desenvolver o projeto de pesquisa, nesse serviço, sob o título **“Análise Cromatográfica dos Principais Adulterantes da Cocaína Empregando Técnicas Modernas de Microextração”**.

Solicitamos agendamento com a pesquisadora para definição de cronograma de realização da pesquisa, considerando a disponibilidade do serviço.

Período da coleta de dados: junho a dezembro/ 2015.
Finalização do projeto: fevereiro / 2016.

Cordialmente,


Juliana Ribeiro
Chefe de Divisão de Educação na Saúde

Juliana Ribeiro
Divisão de Educação na Saúde
DES/SEGTES/SESAU/PCR
Matrícula nº 99.986-8

Ilmo. Sr.
Manoel Ferreira
Coordenação de Saúde Mental

ANEXO E- CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE PÔSTER EM CONGRESSO



CERTIFICATE


We hereby certify that the abstract:


DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHOD FOR DETERMINATION OF COCAINE'S MAJOR ADULTERANTS
IN HUMAN URINE

LAÍS CRISTINA SANTANA SENA, CARLOS VINÍCIUS COSTA DA CONCEIÇÃO, RODRIGO BRITO SANTOS, MARIA
FERNANDA PIMENTEL AVELAR, DANIELLE CRISTINE ALMEIDA SILVA DE SANTANA, FERNANDO JOSÉ MALAGUEÑO

DE SANTANA
was presented in a POSTER form at the 9th Congress of Toxicology in
Developing Countries – CTDC9 / XIX Congresso Brasileiro de Toxicologia –
CBTox in Natal/RN - Brazil, held on November 7-10, 2015.

Natal, November 07th, 2015.


Daniel Junqueira Dorta
President of The Brazilian Society of
Toxicology - SBTox


Herman Autrup
President of the International Union
of Toxicology - IUTOX

ANEXO F- CARTA CONVITE DA REVISTA TOXICOLOGY

Dear Laís Cristina Santana Sena

The guest editors of Toxicology are pleased to invite you to submit a complete version of the abstract:

DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHOD FOR DETERMINATION OF COCAINE'S MAJOR ADULTERANTS IN HUMAN URINE" for publication in the special issue designed for the 9th CTDC and XIX CBTox .

It is important to highlight that the peer review process will be absolutely normal and THIS INVITATION DOES NOT MEAN THAT THE MANUSCRIPT IS ALREADY ACCEPTED FOR PUBLICATION. Please, submit the full version of your manuscript assessing the website of TOXICOLOGY (<http://www.journals.elsevier.com/toxicology/>), and log in to the website using your username and password, previously registered.

Click on "submit paper" and in the first page, at the "select article type" you must choose "SI:9th CTDC and XIX CBTox". After that, the submission process will be the same.

Note that the deadline for the submission in November, 20th, 2015.

Please, confirm the receipt of this invitation letter until October, 30th, 2015. If not, your submission will not be accepted.

Sincerely,

Guest Editor - Toxicology

ANEXO G- COMPROVANTE DE REVISÃO DO ARTIGO

Ms. No.: TOX-15-887

Title: DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION BASED ON SOLIDIFICATION OF FLOATING ORGANIC DROP AND HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY TO THE ANALYSIS OF COCAINE'S MAJOR ADULTERANTS IN HUMAN URINE

Corresponding Author: Dr. Fernando José Malagueño Santana

Authors: Laís C Sena; Humberto R Matos; Haroldo S Dórea; Maria F Pimentel; Danielle C Santana;

Dear Dr. Santana,

The review of your manuscript submitted to Toxicology is complete. The reviewers have made suggestions that I feel would improve the quality and significance of your manuscript. I encourage you to consider these comments and make an appropriate revision of your manuscript. The reviewers' comments are below.

Once you have addressed all comments by the reviewers and your revised manuscript is complete please submit your revision online by logging onto the Elsevier Editorial System for Toxicology:

<http://ees.elsevier.com/tox/>

Your username is: fmalagueno

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/TOX/automail_query.asp

You can find the manuscript record listed under "Submissions Needing Revisions." Click "Revise" when you are ready to submit your revision.

When submitting your revised paper, please include a separate document uploaded as "Response to Reviews" that carefully addresses the issues raised in the below comments, point by point. You should also include a suitable rebuttal to any specific request for change that has not been made.

To facilitate the electronic publication of your manuscript (should it be accepted), we request that your manuscript text, tables and figure legend be submitted in an editable format (Word, WordPerfect, or LaTeX only), and all figures uploaded individually as TIF or EPS files.

For guidelines on how to submit your revised manuscript please go the following address: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/p/7923/a_id/115

Thank you, and we look forward to receiving your revised manuscript, hopefully within 30 days of this letter.

With best regards,

Daniel J. Dorta, PhD
Special Issue Managing Guest Editor
Toxicology