

Suellen Pericolo

**COCAÍNA E COCAETILENO EM MORTES VIOLENTAS:  
LEVANTAMENTO DA OCORRÊNCIA E VALIDAÇÃO DE  
METODOLOGIA PARA A IDENTIFICAÇÃO EM HUMOR  
VÍTREO COM SPME POR CG/EM**

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

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Alcíbia Helena de Azevedo Maia

Florianópolis  
2016

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

Pericolo, Suellen

Cocaína e cocaetileno em mortes violentas: levantamento da ocorrência e validação de metodologia para a identificação em humor vítreo com SPME por CG/EM / Suellen Pericolo ; orientadora, Alcíbia Helena de Azevedo Maia - Florianópolis, SC, 2016.

112 p.

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

Inclui referências

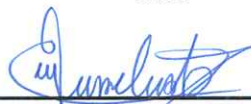
1. Farmacologia. 2. Toxicologia Forense. 3. Microextração em Fase Sólida. 4. Humor Vítreo. 5. Cocaína. I. Maia, Alcíbia Helena de Azevedo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

“Cocaína e cocaetileno em mortes violentas: levantamento da ocorrência e validação de metodologia para a identificação em humor vítreo com SPME por CG/EM”

Por

Suellen Pericolo

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (03/MPFMC/2016) do Mestrado Profissional em Farmacologia - UFSC.



---

Prof(a). Dr(a). José Eduardo da Silva Santos  
Coordenador(a) do Mestrado Profissional em Farmacologia

Banca examinadora:



---

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



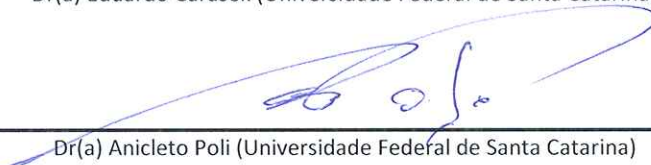
---

Dr(a) Claudia Regina dos Santos (Universidade Federal de Santa Catarina)



---

Dr(a) Eduardo Carasek (Universidade Federal de Santa Catarina)



---

Dr(a) Anicleto Poli (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 04 de Março de 2016.



## AGRADECIMENTOS

*Agradeço aos responsáveis pelo que sou. Meus pais.*

*Ao Instituto Geral de Perícias que tornou-se minha casa, na qual dedico mais que horas trabalhadas, a expressão da vocação e paixão pela atividade que exerço.*

*À minha orientadora de longa data, Biba, pela constante motivação e por compartilhar conhecimento de maneira tão generosa.*

*À Ana que contribuiu com sugestões e colaborações enriquecedoras.*

*Aos meus colegas e companheiros de laboratório Gisele e Jonas pela parceria de todas as horas.*

*Aos colegas de mestrado pelos encontros de aprendizado e conversas agradáveis.*

*Aos docentes pelo conhecimento transmitido.*

*Ao Rafa pela paciência e companhia em tantos finais de semana de estudos.*

*Aos familiares e amigos que compreenderam a ausência e torceram de perto ou longe.*

*E, à todos que de alguma forma contribuíram para esta conquista.*

*Muito Obrigada.*



*“Menor que meu sonho não posso ser.”*

**Lindolf Bell**





## RESUMO

A utilização intencional de substâncias modificadoras do estado de consciência é prática milenar entre as civilizações. O consumo abusivo na sociedade contemporânea cresce vertiginosamente, disseminado por todas as esferas sociais, fomentando um rentável e disputado mercado ilegal. A íntima relação do uso de drogas e mortes violentas é tema amplamente debatido em levantamentos e estudos científicos. O conhecimento do perfil destes óbitos e as substâncias mais recorrentes alicerçam o desenvolvimento técnico-científico para atender às especificidades desta demanda. O Instituto Geral de Perícias de Joinville (IGP/Joinville) conta com *software* institucional que armazena dados relacionados aos atendimentos e os respectivos laudos das ocorrências, viabilizando levantamentos desta natureza. No âmbito forense a realização de exames toxicológicos é importante ferramenta para auxiliar na determinação da causa morte. Todavia, o estado do cadáver pode ser fator limitante para a coleta de espécimes de referência. O humor vítreo (HV) figura como matriz alternativa de grande aplicabilidade por apresentar boa correlação com os níveis sanguíneos. A microextração em fase sólida (SPME) destaca-se pela alta sensibilidade, fácil execução, viabiliza a análise de pequenos volumes e integração automatizada ao cromatógrafo gasoso com espectrômetro de massas (GC/MS). O presente estudo efetuou levantamento do perfil de óbitos atendidos pelo IGP/Joinville no período de 2013 a 2015, ponderando a natureza jurídica das mortes distribuídas em homicídios, suicídios, acidentes de trânsito e outras formas, o gênero e a idade das vítimas, a coleta de amostras biológicas e as substâncias mais detectadas. Os acidentes de trânsito compreenderam o maior número de óbitos, abrangendo 40,9% dos casos, seguidos por homicídios com 29%, enquanto os suicídios contabilizaram 9,1% e outras formas de morte 21%. Entre as amostras não coletadas as justificativas se alternaram entre óbitos em ambiente hospitalar (54,1%), cadáveres putrefeitos (7,7%), carbonizados (0,6%), politraumatizados (1,3%), ossadas (0,9%) e não justificados (35,4%). Os homicídios

abarcaram o maior percentual de toxicológicos detectados (70,5%). Os suicídios apresentaram detecção em 51,6%, acidentes de trânsito em 50% e outras formas de morte em 51,9% dos casos. A cocaína (COC) foi a substância ilícita mais recorrente entre as classificações de morte com exposição concomitante ao álcool. A exposição associada leva a formação do cocaetileno (CE), composto mais tóxico que os precursores. Diante deste cenário, foi validado método para a detecção de COC e CE em HV por SPME e GC/MS. A técnica compreendeu a análise de 0,5 mL de HV, adicionados de 1,0 mL de tampão borato, extração por SPME (fibra DVB/PDMS) sob temperatura (60°C) e agitação constantes durante 20 min., exposição da fibra no injetor a 250°C por 5 min e limpeza a 250°C por 5 min. O método demonstrou precisão sob repetibilidade, apresentando coeficientes de variação (CVs) dos tempos de retenção de 0,4% e 0,3% para COC e CE respectivamente, limite de detecção estipulado em 5 ng/mL com CVs de triplicatas inferiores a 20%, ausência de interferentes na detecção dos analitos de interesse, considerando-se os compostos nicotina, lidocaína e cafeína, e procedimento de limpeza eficaz para a eliminação do efeito *carryover*. A aplicação do método em amostras *post mortem* de HV reproduziu os resultados de detecção obtidos em sangue e urina, assim como confirmou a não detecção dos analitos nos casos negativos testados. Os achados demonstraram a viabilidade de emprego do HV na ausência das matrizes de referência e a importância da coleta de matrizes diversificadas visando ampliar a janela de detecção dos analitos de interesse.

Palavras-Chave: Cocaína. Cocaetileno. Mortes Violentas. Toxicologia Forense. SPME. GC/MS.

## ABSTRACT

The intentional use of substances that modify the state of consciousness has been happening for thousands of years among civilizations. The abusive use in the contemporary society has grown wildly, it has been spread by all social spheres, fostering a profitable and disputed illegal market. The close relation between the use of drugs and violent deaths is an issue widely discussed in surveys and scientific researches. The knowledge about the profile of these deaths and the most recurrent substances, anchors the scientific development to meet the needs of these demands. The Instituto Geral de Perícias de Joinville (IGP/Joinville) has institutional software that store data related to the attendance and respective occurrence reports, making surveys of this kind feasible. In the forensic scope, the procedure of toxic exams is a very important tool to determine the cause of death. Nevertheless, the state of the corpse may be a limiting factor when it comes to collecting reference specimen. The vitreous humor (VH) features as alternative matrix of big applicability for showing good correlation with blood levels. The extraction by solid phase microextraction (SPME) stands out for high sensibility, easiness to use, making feasible the analysis of small volumes and automated integration to gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). The presented study has carried out a survey about the profile of deaths assisted by IGP/Joinville between the years 2013 and 2015, considering the legal status of the deaths among homicide, suicides, traffic accidents and others, gender, victims age, collection of biological samples and the most detected substances. Traffic accidents make the highest number of deaths, comprehending 40,9% of occurrences, followed by homicides with 29%, other forms of deaths with 21% and suicides with 9,1%. Among the cases not collected the reasons are deaths in hospitals (54,1%), putrefied corpses (7,7%), burned corpses (0,6%), multiple-injured bodies (1,3%), bones (0,9%) and non justifies (35,4%). The homicides comprised the biggest percentage of positive toxicological (70,5%) followed by others (51,9%), suicides (51,6%) and traffic accidents (50%). The

cocaine (COC) was the most detected compound in all deaths classification with concomitantly consumption of alcohol. They lead to formation of cocaethylene (CE), compound that is more toxic than the former ones. In this situation, the method for detection of COC and CE was validated in VH by SPME and GC/MS. The technique includes the addition of 0,5 mL of VH and 1,0 mL of borax buffer, exposed to SPME (DVB/PDMS fiber) for 20 min at 60°C and constant agitation. After the fiber was exposed in the inlet (250°C) for 5 min and then cleaned for 5 min at 250°C. The method has shown precision on repeatability with coefficient of variation (CVs) of retention time by 0,4% (COC) and 0,3% (CE), limit of detection estimated in 5 ng/mL with CVs of triplicates lower than 20%, absence of interfering compounds in the detection of analytes of interest, considering the compounds nicotine, lidocaine and caffeine, and procedures of effective cleaning in order to eliminate the carryover effect. The application of this method in post mortem samples of VH has shown correlation with the positive results obtained by COC and CE in blood and urine, as well as it has confirmed the non-detection of analytes in tested negatives. The findings have shown the importance of varied matrix collection in order to enlarge the window of detection and the feasibility of the use of VH in the absence of reference matrixes.

Keywords: Cocaine. Cocaethylene. Violent Deaths. Forensic Toxicology. SPME. GC/MS

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Especificação dos parâmetros adotados para SPME...	50
Tabela 2- Especificação das condições cromatográficas adotadas no método.....	53
Tabela 3- Distribuição das mortes violentas na região de Joinville por natureza jurídica, gênero e idade.....	58
Tabela 4- Valores das áreas dos picos para COC e CE e os respectivos CVs das triplicatas realizadas em 3 dias consecutivos para a concentração de 5 ng/mL (LD).....	67
Tabela 5- Valores de RT para o ensaio de precisão para 10 replicatas fortificadas com 7 ng/mL, e os respectivos CVs para COC e CE.....	68
Tabela 6- Resultados da aplicação da metodologia em 15 casos <i>post mortem</i> , relacionados à dosagem alcoólica e comparação da detecção de COC e CE em sangue, urina e HV.....	71



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Vias de biotransformação da COC.....	34
Figura 2- Em detalhe localização anatômica do HV.....	38
Figura 3- Representação das etapas da extração por DI-SPME..	39
Figura 4- Representação do aparato e fibra de SPME.....	40
Figura 5- Distribuição da coleta de amostras biológicas.....	59
Figura 6- Distribuição das justificativas que causaram limitação na coleta de amostras biológicas.....	60
Figura 7- Distribuição dos resultados de exames toxicológicos por natureza jurídica.....	61
Figura 8- Distribuição dos resultados detectados para exames de varredura toxicológica e álcool.....	62
Figura 9- Distribuição das substâncias mais detectadas na varredura toxicológica nos casos de mortes violentas entre 2013 e 2015 sem detecção de álcool.....	63
Figura 10- Distribuição das substâncias detectadas na varredura toxicológica nos casos de mortes violentas entre 2013 e 2015 com detecção concomitante de álcool.....	63
Figura 11- Distribuição das substâncias detectadas por natureza jurídica nos casos de detecção na varredura toxicológica e álcool.....	64

Figura 12- Distribuição da detecção de COC e CE por natureza jurídica nos casos de detecção na varredura toxicológica e álcool.....	65
Figura 13- Cromatograma representativo contemplando a detecção de COC, CE, nicotina, cafeína e lidocaína no ensaio de seletividade.....	66
Figura 14- Cromatograma representativo da amostra branco analisada posteriormente a 750 ng/mL.....	69
Figura 15- Cromatograma representativo da amostra branco analisada posteriormente a 1000 ng/mL.....	69
Figura 16- Cromatograma representativo da amostra branco analisada posteriormente ao procedimento de descontaminação.....	69
Figura 17- Cromatograma representativo da aplicação do método com detecção de COC e CE.....	72



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADT Antidepressivos Tricíclicos

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCI do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*

BE Benzoilegonina

BDZ Benzodiazepínicos

hCE1 Carboxiesterase Humana do Tipo 1

hCE2 Carboxiesterase Humana do Tipo 2

CEBRID Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas

CE Cocaetileno

COC Cocaína

CV Coeficiente de Variação

CYP Citocromo P450

DI-SPME do inglês *Direct Immersion Solid Phase Micro Extraction*

DP Desvio Padrão

EC Eletroforese Capilar

EI do inglês *Electron Ionization*

EME Éster Metilegonina

EMEA Agência Europeia de Medicamentos

ESI do inglês *Electrospray Ionization*

EEE Éster Etilegonina

FDA do inglês *Food and Drug Administration*

GC do inglês *Gas Chromatography*

GC/MS do inglês *Gas Chromatography/Mass Spectrometry*

h Horas

HS-SPME do inglês *Head Space Solid Phase Micro Extraction*

HV Humor Vítreo

IAF Instituto de Análises Forenses

ICP do inglês *Inductively Coupled Plasma*

IGP Instituto Geral de Perícias

IML Instituto Médico Legal

ISO do inglês *International Organization for Standardization*

LC do inglês *Liquid Chromatography*

LD Limite de Detecção

LLE do inglês *Liquid-Liquid Extraction*

LIQ Limite Inferior de Quantificação

m Metros

min Minuto

MIPs do inglês *Molecularly Imprinted Polymers*

MISPE do inglês *Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction*

mL Mililitro

mm Milímetros

MS/MS do inglês *Tandem Mass Spectrometry*

MS do inglês *Mass Spectrometry*

NCE Norcoacetileno

NCOC Norcoína

PDMS Polidimetilsiloxano

PDMS/DVB Polidimetilsiloxano/Polidivinilbenzeno

PPy do inglês *Polypyrrole*

RAM do inglês *Restricted Access Materials*

RPM Rotações por Minuto

OH-COC m e p-Hidroxicocaína

ONU Organização das Nações Unidas

RT do inglês *Retention Time*

SC Santa Catarina

SIM do inglês *Selective Ion Monitoring*

SPE do inglês *Solid Phase Extraction*

SPME do inglês *Solid Phase Microextraction*

SENAD Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas

SWGTOX do inglês *Scientific Working Group for Forensic Toxicology*

$t_{1/2}$  Tempo de Meia Vida

THC Tetrahydrocabinol

UNODC do inglês *United Nations Office on Drugs and Crime*

Var. Variedade Botânica

°C Graus Celsius

$\mu\text{m}$  Micrômetro



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>25</b>
1.1 Consumo de drogas, tráfico e violência.....	25
1.2 Cocaína .....	28
1.2.1 Histórico .....	28
1.2.2 Formas de apresentação, vias de exposição, adulterantes e diluentes .....	30
1.2.3 Toxicocinética, toxicodinâmica e manifestações clínicas.....	32
1.3 Aspectos Analíticos .....	36
1.3.1 Detecção de COC em amostras biológicas de interesse forense .....	36
1.3.2 Detecção de COC e CE na matriz de HV.....	38
1.3.3 Preparo de amostras.....	39
1.3.4 Ferramenta analítica .....	41
1.3.5 Validação do método.....	42
1.4 Aspectos da Instituição .....	44
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>47</b>
2.1 Objetivo Geral .....	47
2.2 Objetivos Específicos .....	47
<b>3 MATERIAIS E METODOS .....</b>	<b>48</b>
3.1 Materiais .....	48
3.1.1 Equipamentos e Acessórios.....	48
3.1.2 Reagentes.....	48

3.1.3 Soluções.....	48
3.1.3.1 Soluções padrão.....	48
3.1.3.2 Soluções tampão.....	49
3.1.4 Amostras.....	49
3.2 Métodos.....	50
3.2.1 Estudo retrospectivo sobre óbitos e exames toxicológicos.....	50
3.2.1.1 Quanto ao perfil de mortes violentas atendidas no IGP/Joinville.....	50
3.2.1.2 Quanto à coleta de amostras biológicas em relação ao total de óbitos por morte violenta.....	50
3.2.1.3 Quanto aos resultados dos exames toxicológicos.....	50
3.2.2 Etapa pré-analítica.....	51
3.2.2.1 Preparo das amostras.....	51
3.2.2.2 Extração.....	51
3.2.3 Etapa analítica.....	52
3.2.3.1 Condições cromatográficas.....	52
3.2.4 Validação.....	52
3.2.4.1 Especificidade e Seletividade.....	52
3.2.4.2 Limite de Detecção.....	53
3.2.4.3 Precisão.....	54
3.2.4.4 <i>Carryover</i> .....	54
3.2.5 Aplicação do método em casos <i>post mortem</i> .....	54
3.2.6 Análise estatística.....	55

<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>57</b>
4.1 Quanto ao perfil de mortes violentas atendidas no IGP/Joinville .....	57
4.2 Quanto à coleta de amostras biológicas .....	59
4.3 Quanto aos resultados dos exames toxicológicos .....	60
4.4 Validação .....	66
4.4.1 Especificidade e Seletividade .....	66
4.4.2 Limite de Detecção .....	67
4.4.3 Precisão .....	67
4.4.4 <i>Carryover</i> .....	69
4.5 Aplicação do método em casos <i>post mortem</i> .....	70
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>91</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>93</b>







# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Consumo de drogas, tráfico e violência

Os registros de uso de substâncias que produzem efeitos no comportamento remontam aos primórdios da civilização. A história da humanidade está atrelada ao hedonismo e à utilização de certas substâncias psicoativas para facilitar o acesso ao prazer. Na Antiguidade a droga era incentivada por suas múltiplas funções: econômica, religiosa, social e medicinal, atendendo ao contexto cultural da época (COUTINHO; ARAÚJO; GONTIÈS, 2004). Sobre a temática das drogas o escritor inglês Aldous Huxley afirma que:

*Parece improvável que a humanidade, em geral seja algum dia capaz de dispensar os 'paraísos artificiais', isto é,... a busca de autotranscendência através das drogas ou... umas férias químicas de si mesmo... A maioria dos homens e mulheres levam vidas tão dolorosas - ou tão monótonas, pobres e limitadas, que a tentação de transcender a si mesmos, ainda que por alguns momentos, é e sempre foi um dos principais apetites da alma (HUXLEY, 1954, apud GALDURÓZ, 2001 p. 37).*

Assim, é consenso que o consumo de substâncias psicoativas é uma característica comum à maioria das civilizações. O cenário nacional caracteriza-se pelo incremento do consumo de drogas ilícitas a partir da década de 1960, com a expansão do uso de maconha, antes restrito a setores marginalizados das grandes cidades. A partir dos anos 70, o aumento da oferta e a redução do preço favoreceram o crescimento do consumo de cocaína (COC) (CRUZ; FERREIRA, 2001; MISSE, 2003). Para Laranjeiras e colaboradores (1997) o perfil de usuários modificou-se rapidamente a partir da década de 80, devido a fatores facilitadores para a obtenção de drogas,

passando o Brasil a condição de importante rota de tráfico e portador de um substancial mercado interno ilícito.

O maior país do continente sul-americano apresenta números de usuários de drogas em crescimento alarmante. O perfil de consumo no Brasil foi evidenciado em pesquisa realizada pela Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas (SENAD), por meio do Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID). O II levantamento domiciliar sobre o uso de drogas no Brasil, ocorrido no ano de 2005, entrevistou 7.939 pessoas de ambos os sexos, com idade entre 12 a 65 anos, moradores de 108 cidades com mais de 200.000 habitantes. Do total de participantes 22,8% alegaram já terem consumido algum tipo de droga na vida (exceto álcool e tabaco), superando os 19,4% da primeira edição da pesquisa em 2001. Neste contexto, cerca de 8,8% afirmaram já terem fumado maconha e a prevalência sobre o uso de COC, crack e merla (estes dois últimos subprodutos da COC) foi, respectivamente, 2,9%, 0,7% e 0,2% (SENAD, 2006).

Em publicações mais recentes a SENAD reportou 25,5% de incidência de uso de drogas, pelo menos uma vez na vida, entre estudantes dos ensinos fundamental e médio das redes públicas e privadas das 27 capitais brasileiras. Neste levantamento a maconha contribui com 3,7% e a COC com 1,8% (SENAD, 2010a). Entre universitários, pesquisa semelhante demonstrou a prevalência de 26,1% para a maconha e de 7,7% para a COC (SENAD, 2010b). Assim, apesar do último relatório da ONU (Organização das Nações Unidas), *World Drug Report* 2015, ratificar a prevalência do uso de maconha no Brasil, entre as drogas proscritas, ele alerta para um aumento no consumo de COC, estimado em 1,75% da população adulta como usuária da substância no país (UNODC, 2015).

As marcantes diferenças regionais socioeconômicas do país refletem no cenário de consumo das drogas psicotrópicas. O uso abusivo de COC concentra-se nas regiões sul e sudeste, diferentemente de drogas como álcool e tabaco que o consumo se distribui de forma mais uniforme no território nacional. As diferenças também são evidenciadas quanto ao perfil de consumo

prevalecendo entre os homens o uso de maconha e COC e entre mulheres o abuso de antidepressivos e ansiolíticos (NOTO; GALDURÓZ, 1999; GALDURÓZ et al., 2005). Segundo análise da ONU, o Brasil é um país vulnerável ao tráfico tanto por sua localização geográfica, consolidando-se como rota estratégica de COC traficada para a Europa, como também pela elevada população potencialmente consumidora (UNODC, 2014).

Iniciativas para coibir o tráfico e o consumo de substâncias ilícitas têm sido despendidas pelo governo federal, entre elas, merece destaque a Política Nacional sobre Drogas que versa sobre prevenção, tratamento, recuperação e reinserção social, redução dos danos sociais e à saúde, redução da oferta e promoção de estudos, pesquisas e avaliações sobre o assunto (SOUZA; KANTORSKI, 2007).

Através do decreto nº 7179 de 20 de maio de 2010, foi instituído o Plano Integrado de Enfrentamento ao Crack e outras drogas, que prevê ações para o diagnóstico do consumo do crack e suas consequências; mobilização, tratamento e reinserção social; informação e orientação; formação de recursos humanos e desenvolvimento de metodologias e enfrentamento ao tráfico (BRASIL, 2010a). O Ministério da Justiça criou em dezembro de 2009, o Projeto de Policiamento Especializado de Fronteiras (Pefron), formado por grupos de policiais especializados para atuar de forma preventiva e repressiva nas regiões de fronteira em 11 estados brasileiros (Acre, Amapá, Amazonas, Rondônia, Roraima, Pará, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul), visando coibir o tráfico principalmente nas divisas com Paraguai, Peru, Bolívia e Colômbia (BRASIL, 2010b).

A íntima relação das drogas e a violência, na sociedade contemporânea, fica evidente em publicações como o estudo global de homicídios da ONU (UNODC, 2011) e o relatório brasileiro Mapa da Violência (WASELFISZ, 2013a), nos quais o consumo e o tráfico de drogas são apontados como gatilhos para mortes violentas.

Os autores Kessler e Pechansky (2008) correlacionam o uso do crack a um aumento da agressividade, sobretudo nos

períodos de abstinência, sendo este comportamento responsável por índices mais elevados de violência e crimes em regiões com maior concentração de usuários.

A prevalência de crack relacionada a autos de prisão em flagrante foi fundamentada por Sanchez e Nappo (2002) em relato de que muitos usuários acabam aderindo à droga pela elevada oferta, fomentada pelos traficantes considerando o alto potencial aditivo, custo baixo pela unidade (pedra) e fácil manipulação. Em outro estudo realizado por Oliveira e Nappo (2008), usuários entrevistados afirmaram realizar inúmeras atividades ilícitas entre elas tráfico, prostituição, roubos, sequestros, venda de pertences próprios e de familiares, e empreendimento de golpes financeiros de naturezas diversas para suprir a abstinência. A pesquisa ainda aponta a manutenção do perfil de usuários já constatado em levantamentos publicados em 1996 e 2001, com prevalência do sexo masculino, jovens, solteiros, de classe socioeconômica baixa, reduzido nível de escolaridade e sem emprego fixo (NAPPO; GALDURÓZ; NOTO, 1996; NAPPO et al., 2001; OLIVEIRA; NAPPO, 2008).

Sob a égide de ser um dos maiores problemas da sociedade moderna, o uso de drogas tem efeito sistêmico interferindo em questões econômicas, de saúde e de segurança pública, além de estar intimamente ligado ao incremento da violência e criminalidade.

## **1.2 Cocaína**

### **1.2.1 Histórico**

A COC é o principal alcaloide encontrado nas folhas do vegetal do gênero *Erythroxylon* (*E. coca* var. *coca*, *E. novogranatense* var. *novogranatense*, *E. coca* var. *ipadu* e *E. novogranatense* var. *truxillense*) (JHONSON; ZHANG; EMCHE, 2005). Espécie arbustiva, nativa de clima tropical a leste dos Andes e acima da Bacia Amazônica, destacando-se os países Peru, Bolívia e Colômbia como os maiores produtores mundiais (UNODC, 2015). Relatos históricos acerca do uso da COC

remontam há 4500 anos, por civilizações pré-colombianas na América do Sul. Tribos indígenas do norte do Brasil, das regiões fronteiriças à Venezuela e Colômbia, mantêm até os dias atuais o hábito de mascar a folha de coca que denominam de “epadu” ou “ipadu” (BASTOS et al., 2007; FERREIRA; MARTINI, 2001).

Após a chegada dos europeus ao continente, os primeiros relatos sobre a utilização da coca pelos índios datam de 1507. A planta foi introduzida na Espanha no final do século XVI para fins medicinais e afrodisíacos, porém sem grande difusão na época (FERREIRA; MARTINI, 2001, GOLDSTEIN; DESLAURIERS; BURDA, 2009).

Com a industrialização no século XIX, a COC chegou aos países europeus e americanos. O químico alemão Friedrich Gaedeck obteve o primeiro extrato em 1855 e quatro anos depois Albert Niemann isolou quimicamente o alcaloide COC. Na medicina, a substância foi estudada por Freud e outros especialistas, interessados em suas propriedades anestésicas e estimulantes. Carl Koller inovou no emprego como anestésico em cirurgias oftálmicas em 1884, enquanto Freud publicava o famoso livro “Über Coca”, enaltecendo o uso da substância para o tratamento de asma, distúrbios digestivos, problemas nervosos e até sífilis. Com a disseminação da utilização constatou-se o desenvolvimento de dependência química. Em 1863 o químico Angelo Mariani lança o vinho Mariani, contendo até 300 mg de COC por litro. À época desconhecia-se que a combinação de álcool e COC gerava o composto cocaetileno (CE) com efeitos potencializados, possivelmente responsáveis pelo sucesso da bebida. Contemporânea, a coca-cola foi lançada em 1886 como um estimulante e tônico para cérebro e nervos, contendo cerca de 60 mg de COC em sua composição. O alcaloide foi retirado da fórmula em 1903, substituído por cafeína. Em 1885 a indústria farmacêutica Park Davis possuía mais de quinze produtos a base de COC no mercado, e em conjunto com outras empresas como a Merck, fomentava pesquisas na área (FERREIRA; MARTINI, 2001; GOLDSTEIN; DESLAURIERS; BURDA, 2009).

A redução no preço e aumento da oferta no final do século XIX propiciaram o aumento do consumo, tornando mais

evidentes os índices de morbidade e mortalidade relacionados ao abuso da COC. Diante deste cenário surgem os primeiros atos regulatórios ou restritivos sobre o tema como o *Poisons and Pharmacy Act* de 1908 no Reino Unido, o tratado de Haia de 1912 e o *Harrison Tax Act*, de 1914, nos EUA e o Decreto-lei Federal nº 4.292 de 6 de julho de 1921 no Brasil. Em 1930 com o desenvolvimento das anfetaminas, o consumo da COC manteve-se em queda até seu ressurgimento após a década de 50. O uso recreacional intensifica-se nas décadas de 70 e 80. Em 1985 surge o crack em Bahamas, e o primeiro relato no Brasil data de 1989. A nova forma de apresentação pode ser fumada e tem menor custo, conquistando rapidamente número substancial de usuários e atualmente configura-se como grande problema social no Brasil, em expansão epidêmica principalmente nos grandes centros (FERREIRA; MARTINI, 2001; GOLDSTEIN; DESLAURIERS; BURDA, 2009; OLIVEIRA; NAPPO, 2008; WIELENGA; GILCHRIST 2013).

Intimamente relacionada a mortes violentas, principalmente homicídios, apresentando alto custo para reabilitação, aumento de overdoses, óbitos e problemas de saúde associados a adulterantes tóxicos e o uso concomitante de polidrogas, a COC chega ao século XXI como um desafio complexo aos sistemas de saúde e segurança pública em escala global (BEATO FILHO et al., 2001; WIELENGA; GILCHRIST, 2013).

### **1.2.2 Formas de apresentação, vias de exposição, adulterantes e diluentes**

A COC comercializada ilegalmente nas ruas é encontrada nas formas de sal ou base, esta última nas conformações crack, base livre ou merla (MARCELO et al., 2015; ZACCA et al., 2014).

As formas de apresentação, pureza e composição da droga dependem do processo de produção e finalidade a que se destinam. A primeira etapa de extração das folhas secas de *Erythroxylon* consiste na utilização de solução alcalina, solventes

orgânicos (ex. gasolina, querosene), ácido sulfúrico e amônia, tendo como produto a pasta base de COC.

A forma de sal é obtida a partir da reação da pasta base dissolvida em solventes orgânicos como éter de petróleo, acetato de etila e acetato de n-propila, e um segundo solvente como metil-etil-cetona ou metil-isobutil-cetona contendo solução concentrada de ácido clorídrico ou diluída em etanol (MALLETTE; CASALE, 2015). A coloração predominante é branca ou branca-acinzentada. O cloridrato de COC é solúvel em água e apresenta ponto de fusão acima de 195°C. Devido a estas características, o consumo se dá principalmente por meio das vias intranasal, intravenosa, entretanto, as vias oral e retal também podem ser empregadas (VALENTE et al., 2012; WHITE; LAMBE, 2003; ZACCA et al., 2014).

A base livre classificada como *crack* pode ser obtida diretamente da pasta base ou do pó, a partir de processos de aquecimento, adição de carbonatos, seguido de resfriamento e solidificação em material não friável. A coloração varia de marfim, bege amarelado a castanho-claro (COLLEY; CASALE, 2015; ZACCA et al., 2014). O *crack* volatiliza entre 90° e 100°C permitindo que seja consumido em cigarros ou cachimbos, através da via pulmonar e não é solúvel em água impossibilitando a injeção intravenosa (VALENTE et al., 2012; WHITE; LAMBE, 2003).

O processo de produção clandestina acarreta na presença de diversas impurezas orgânicas ou inorgânicas no produto final. Estas podem ser de origem natural, coextraídas da planta ou subprodutos resultantes da manipulação química durante o refino como, por exemplo, cis e trans cinnamoilecgonina, hexanoilecgonina, hidroxicoaína, trimetoxicocaína e truxilina. A identificação destes compostos pode auxiliar na determinação de uma “assinatura química”, estratégica nas ações de inteligência policial sobre a cadeia de produção, pontos de suprimento e tendências do mercado ilícito, além de corroborar para a compreensão de manifestações de toxicidade em usuários (CASALE; BOUDREAU; JONES, 2008; MAGALHAES et al., 2013).



O emprego de adulterantes e diluentes nas amostras de COC de rua é prática comum com a finalidade de potencializar o efeito da droga ou aumentar o volume da preparação, respectivamente. Os compostos empregados podem apresentar efeitos farmacológicos e toxicidade variada (GOLDSTEIN; DESLAURIERS; BURDA, 2009). No Brasil, em análises realizadas pelo projeto PeQui (Perfil Químico), desenvolvido pela Polícia Federal, em 642 amostras apreendidas em cinco estados Brasileiros entre 2011 e 2014, as substâncias fenacetina, cafeína, lidocaína, benzocaína, aminopirina e levamisol foram os adulterantes mais recorrentes (MALDANER et al., 2015). Em estudo realizado na França com 343 amostras de COC de rua, a fenacetina foi o composto mais encontrado (54%), seguido da cafeína (17%), paracetamol (14%), diltiazem e lidocaína (11%) (EVRARD; LEGLEYE; CADET-TAÏROU, 2010). Na Suíça, levantamento semelhante realizado por Broséus e colaboradores (2015) entre os anos de 2006 e 2014, demonstrou a prevalência das substâncias fenacetina, levamisol, lidocaína e cafeína. Entre os diluentes mais utilizados nas práticas ilícitas destacam-se açúcares, talco, carbonatos e amido (COLE et al., 2010).

### **1.2.3 Toxicocinética, toxicodinâmica e manifestações clínicas**

A exposição a COC pode variar de doses entre 10 a 100 mg, mas devido a rápida manifestação de tolerância, usuários recorrentes podem consumir quantidades acima de 1 g diariamente (DRUMMER, 2004).

A via de administração é determinante para estimativa do pico de concentração, biodisponibilidade, e conseqüentemente estabelecimento da relação dose/efeito da COC e seus produtos de biotransformação majoritários (GOLDSTEIN; DESLAURIERS; BURDA, 2009; ZIMMERMAN, 2012). A substância é rapidamente absorvida por membranas mucosas e vasos pulmonares. A exposição intravenosa e pulmonar conformam picos plasmáticos maiores em comparação a via intranasal (BORTOLOTTI et al., 2012). As vias intranasal e oral apresentam taxa de absorção mais lenta e conseqüentemente o

início dos efeitos, porém mais prolongado em relação às duas primeiras (CONE, 1995). No uso concomitante de álcool e COC, o CE, produto de biotransformação resultante, pode potencializar e prolongar a ação da COC, intensificando seus efeitos tóxicos (MACKEY-BOJACK; KLOS; APPLE, 2000).

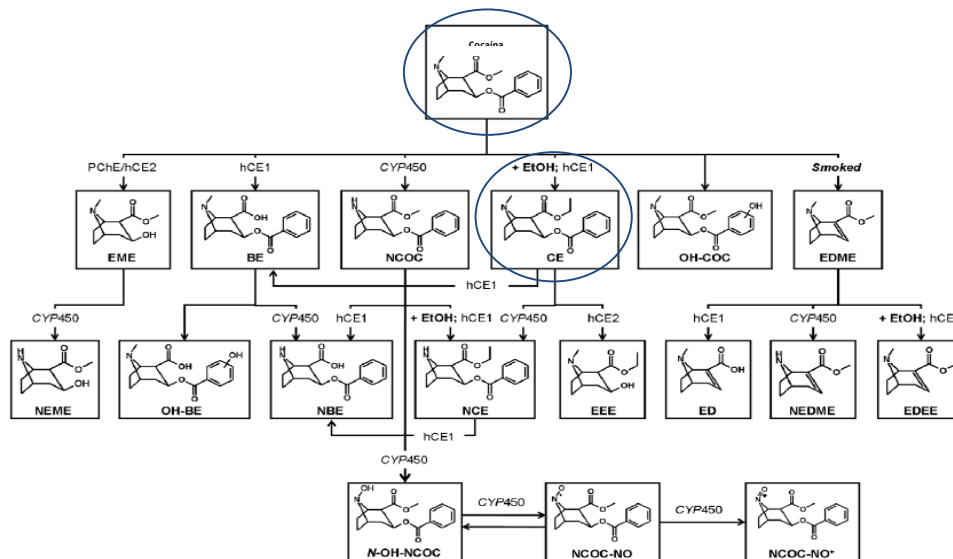
Em pesquisa com 6 voluntários adultos sobre a farmacocinética da COC a partir de vias de administração distintas, foi constatado que após uma dose de 25 mg de cloridrato administrada por via intravenosa, a concentração de COC durante o pico plasmático foi estimada entre 97,7 a 349,4 ng/mL, enquanto para a via pulmonar a partir de uma dose de 42 mg a variação foi de 154,0 a 345,1 ng/mL, ambos atingidos em 5 minutos após a exposição. Para uma dose de 32 mg administrada via intranasal o pico de COC foi atingido entre 0,39 e 0,85 h a uma concentração entre 40,1 a 88,5 ng/mL (Cone, 1995).

A distribuição da COC ocorre rapidamente sendo as maiores concentrações encontradas no cérebro, baço, rim, pulmão, sangue, coração e músculos (JENKINS; CONE, 1998 apud BORTOLOTTI et al., 2012).

Segundo revisão publicada por Valente e colaboradores (2012), subsequente à absorção, a COC é biotransformada principalmente em dois compostos majoritários, benzoilecgonina (BE) e éster metilecgonina (EME) e em dois minoritários, norcocaína (NCOC) e m e p-hidroxicoaína (OH-COC). A BE é produzida no fígado a partir da ação da carboxiesterase humana do tipo 1 (hCE1), enquanto a EME sofre ação da hCE2 e no plasma via enzima pseudocolinesterase, também conhecida por butirilcolinesterase. Juntos, estes produtos de biotransformação compreendem aproximadamente 95% dos produtos de excreção na urina. O consumo concomitante de álcool e COC leva a formação do produto CE, a partir de uma reação de transesterificação dos dois compostos, mediada pela hCE1. O CE sofre n-desmetilação via citocromo P450 (CYP), mais especificamente CYP3A4, ou ainda hidrólise pela ação de hCE2, originando respectivamente os compostos norcoacetileno (NCE) e éster etilecgonina (EEE) (JUFER; WALSH; CONE, 1998;

VALENTE et al., 2012). A Figura 1 retrata as vias de biotransformação da COC e CE.

Figura 1- Vias de biotransformação da COC, adaptada de Valente et al. (2012-p.164)



EME- éster metilecgonina; BE- benzoilecgonina; CE- cocaetileno; NCOC- norcocaína; OH-COC- hidroxicocaína; EDME- éster metilecgonidina; hCE1- carboxiesterase humana do tipo 1, hCE2- carboxiesterase humana do tipo 2; CYP450- citocromo P450; EtOH- etano; NEME- éster metilnorcocaína; OH-BE- hidroxibenzoilecgonina; NBE- norbenzoilecgonina; NCE- norcocaetileno; EEE- éster etilecgonina; ED- ecgonidina; NEDME- éster metilnorecgonidina; EDEE- éster etilecgonidina; N-OH-NCOC- N-hidroxinorcocaína; NO-NCOC- nitróxido de norcocaína; NCOC-NO+- nitrosônio de norcocaína; PChE- pseudocolinesterase.

A COC é eliminada na urina como composto inalterado, 1 a 9% dependendo do pH urinário, e seus produtos de biotransformação majoritários BE (35-54%) e EME (32-49%) em um período médio de 24 h, com tempos de meia vida ( $t_{1/2}$ ) variando em torno de 0,8 h, 4,5 h e 3,1 h respectivamente (BORTOLOTTI et al., 2012). Já para CE experimentos realizados por Farré e pesquisadores (1993), com 9 voluntários, demonstraram que após a administração de dose de 100 mg de COC intranasal e consumo de álcool a 1 g/kg, o  $t_{1/2}$  para CE foi de 99 min. Em pesquisa realizada por Harris e colaboradores (2003) achados evidenciam que na exposição ao álcool prévia à COC, ocorreu redução de 48% na concentração urinária de BE e elevação nos níveis de CE.

Os efeitos farmacológicos produzidos pela COC são similares em todas as vias de exposição, todavia, os obtidos a partir do consumo intranasal se manifestam mais lentamente e são menos robustos. Os efeitos alcançados a partir do consumo fumado ou injetado promovem imediato aumento da pressão sanguínea sistólica e diastólica, elevam a pulsação e promovem a dilatação da pupila, retornando ao estágio inicial após 30 a 45 minutos. Os efeitos euforizantes e psicotomiméticos são evidenciados mais rapidamente por usuários da forma fumada, considerando-se a rápida passagem dos pulmões para o sistema nervoso central e as características de lipossolubilidade da barreira hematoencefálica, favorecendo o acúmulo da COC no cérebro. As outras vias de exposição propiciam uma espécie de entrega gradual da substância ao cérebro, promovendo manifestação dos efeitos mais tardiamente e de intensidade menos pronunciada em relação à forma fumada (CONE, 1995).

A COC provoca ação anestésica local, vasoconstrição e efeitos simpatomiméticos. Os efeitos anestésicos são oriundos do bloqueio de canais de sódio voltagem dependentes na membrana neuronal, resultando em inibição da condução nervosa. A vasoconstrição decorre da estimulação de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos em células da musculatura lisa arterial (ZIMMERMAN, 2012). No sistema nervoso central, o psicotrópico atua inibindo a recaptação pré-sináptica de monoaminas como a noradrenalina, serotonina e dopamina. Concentrações elevadas destas monoaminas aumentam o estado de alerta, causam hiperatividade motora e inquietação. Efeitos como vasoconstrição, hipertensão, disritmia cardíaca, hipertermia e midríase, são decorrentes da elevação dos níveis de noradrenalina (WHITE; LAMBE, 2003). O excesso da atividade dopaminérgica produz profunda euforia, estado de autoconfiança em baixas doses e delírio em doses elevadas

(ZIMMERMAN, 2012). Em usuários crônicos alterações comportamentais como psicose manifestam-se com sintomas de ansiedade e alucinações. Estudos psiquiátricos correlacionam o uso da droga com o aumento da agressividade principalmente nos eventos de abstinência (KESSLER; PECHANASKY, 2008).

### **1.3 Aspectos analíticos**

#### **1.3.1 Detecção de COC em amostras biológicas de interesse forense**

Estudos internacionais relatam aumento expressivo na detecção de substâncias ilícitas em amostras biológicas coletadas em autopsias de mortes violentas como suicídio, homicídio e acidentes graves (DELAVERIS; TEIGE; ROGDE, 2014). O desenvolvimento de ferramentas analíticas altamente sensíveis e específicas viabilizou a realização de análises toxicológicas em matrizes biológicas alternativas como opção ou complemento aos protocolos forenses de sangue e urina (MUSSHOFF; MADEA, 2007).

O setor de Toxicologia Forense do Instituto de Análises Forenses (IAF) do Instituto Geral de Perícias (IGP) de Santa Catarina (SC) realiza exames toxicológicos de vítimas de morte violenta, suspeitas de intoxicação, e a influência ou não de entorpecentes durante a prática de um crime. O protocolo adotado compreende a coleta de amostras de sangue e urina, e a critério do médico-legista o encaminhamento de vísceras. Em casos de lapso temporal entre o óbito e a realização da coleta, ou mesmo o estágio de putrefação do cadáver, a coleta de uma ou ambas as amostras biológicas ficam prejudicadas. As amostras coletadas são analisadas inicialmente utilizando-se técnica de imunoensaio por quimiluminescência e posteriormente confirmadas por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC/MS – do inglês *Gas Chromatography Mass Spectrometry*).

A escolha da matriz biológica deve ponderar o histórico do caso sob investigação e as características químicas dos analitos de interesse. Amostras coletadas *post mortem* são suscetíveis a alterações na concentração das substâncias alvo devido à autólise, ação bacteriana, putrefação e ao fenômeno de redistribuição (HAN et al., 2012; MARGALHO et al., 2011). Grande parte dos centros forenses adota como rotina a análise de sangue, urina e eventualmente vísceras e conteúdo gástrico, entretanto, a diversidade de amostras biológicas passíveis de análise compreende desde fluidos como suor, saliva, líquido

cefalorraquidiano, pericárdico, efusão pleural, bile, líquido amniótico, mecônio, leite materno, humor vítreo (HV) a tecidos muscular, adiposo e ósseo, cérebro, unhas e cabelos (DRUMMER, 2004; MORIYA; HASHIMOTO, 2000; PICHINI et al., 1996).

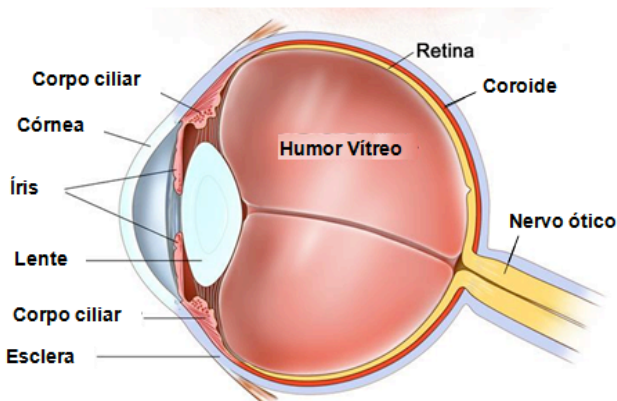
A literatura elenca diversificada aplicabilidade forense para matrizes alternativas e propõe o emprego conjunto de espécimes biológicas para a confirmação dos achados analíticos (ANTONIDES; KIELY; MARINETTI, 2007; MARGALHO et al., 2011; REES et al., 2013; WANG et al., 1994).

O HV figura como uma das matrizes alternativas de eleição por ser de fácil obtenção, mais límpida que sangue e vísceras, não se limita a detecção de drogas lipofílicas como o fígado, além de demandar pré-tratamento mais simplificado que o requerido para a análise de tecidos (PELANDER, 2010).

A primeira publicação relatando o emprego de HV como amostra de interesse analítico, data de 1966 com a comparação entre a detecção de álcool etílico no sangue e no HV (STURNER; COUMBIS, 1966). Este em decorrência de sua posição anatômica protegida por membranas robustas está menos sujeito a contaminação e decomposição (FUCCI et al., 2006). Em casos de queimadura severa, embalsamentos e cadáveres em avançados estágios de putrefação, pode ser a única matriz disponível. Os autores Loggan e Stafford (1989) sugerem que a ausência de atividade metabólica nos olhos permite acurada correlação entre concentração das substâncias no HV com os níveis corpóreos no momento do óbito.

Anatomicamente situado entre o cristalino e a retina no compartimento vítreo (Figura 2), o HV é um tecido altamente hidratado, com aproximadamente 98 a 99,7% de água, essencialmente composto por matriz extracelular, compreendendo principalmente fibras colágenas e carboidratos glicosaminoglicanos que o conferem um aspecto gelatinoso (LE GOFF; BISHOF, 2008).

Figura 2- Localização anatômica do HV (Adaptado de Winslow, 2007)



Em centros forenses europeus e americanos a análise de HV faz parte da rotina laboratorial (ANTONIDES; KIELY; MARINETTI, 2007; MARGALHO et al., 2011; PELANDER, 2010). No Brasil tem aumentado o número de publicações com propostas analíticas para a avaliação de matrizes biológicas alternativas, porém ainda reduzido em comparação ao cenário internacional (COSTA et al., 2014; PERES et al., 2014; SANCHES et al., 2012; TOLEDO et al., 2003).

### 1.3.2 Detecção de COC e CE na matriz de HV

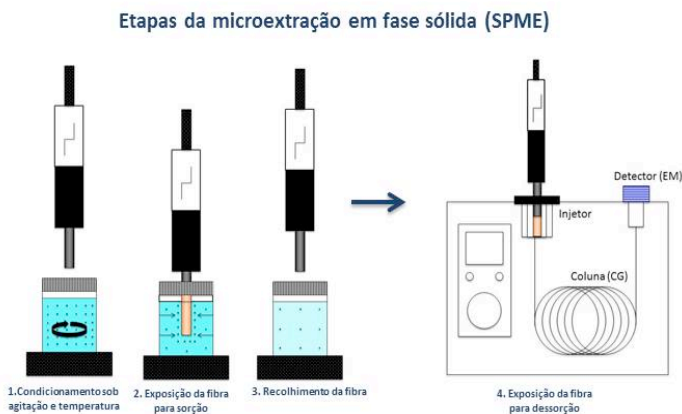
Na literatura diversas técnicas foram propostas utilizando-se as ferramentas analíticas de cromatografia gasosa (GC – do inglês *Gas Chromatography*) (ANTONIDES; KIELY; MARINETTI, 2007; MACKEY-BOJACK et al., 2000) cromatografia líquida (LC – do inglês *Liquid Chromatography*) (DUER; SPITZ; MCFARLAND, 2006), eletroforese capilar (EC) (COSTA et al., 2014), espectrometria de massas de modo sequencial (MS/MS – do inglês *Tandem Mass Spectrometry*), associadas a extrações líquido-líquido (LLE – do inglês *Liquid-Liquid Extraction*) (FUCCI et al., 2006), em fase sólida (SPE – do inglês *Solid Phase Extraction*) (ALVEAR et al., 2014; PERES et al., 2014), uso de polímeros de impressão molecular para SPE (MISPE – do inglês *Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction*) (FERNANDES et al., 2013) ou assistida por micro-ondas (FERNANDEZ et al., 2011) para a detecção de COC e seus produtos de biotransformação em HV.

### 1.3.3 Preparo de amostras

O emprego de metodologias validadas a partir de recursos técnico-científicos que propiciem alta sensibilidade e especificidade é premissa para a identificação dos analitos e a adequada interpretação dos resultados obtidos a partir de matrizes complexas. Os protocolos analíticos compreendem principalmente triagem através do método de imunoensaio e confirmação por GC ou LC acoplados à MS (DRUMMER, 2010; KINTZ, 2004; MUSSHOFF; MADEA, 2007; TOMINAGA et al., 2015).

Na etapa de extração a técnica de microextração em fase sólida (SPME – do inglês *Solid Phase Microextraction*) suplanta a utilização da LLE, e vem se destacando em relação à SPE. A extração por SPME pode ser efetuada por imersão direta (DI-SPME - do inglês *Direct Immersion Solid Phase Micro Extraction*), exposição da fibra na fase vapor (HS-SPME - do inglês *Head Space Solid Phase Micro Extraction*), ou envolvendo membranas de proteção (PAWLISZYN, 2011; SOUZA SILVA; PAWLISZYN, 2012). A Figura 3 retrata um dos tipos de extração por SPME.

Figura 3- Representação das etapas da extração por DI-SPME, inspirada em Kataoka e Saito (2011)

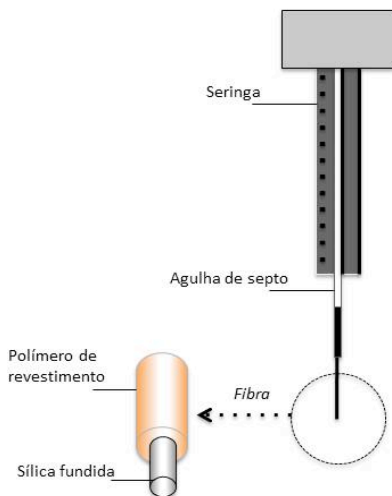


A afinidade da fibra por um analito é o fator mais importante na SPME. A escolha da fibra deve ponderar a polaridade, peso molecular e volatilidade do composto analisado. As versões comerciais de fibras são



compostas por sílica fundida, recoberta por 07 diferentes polímeros isolados ou em combinações conjugadas (Figura 4). As fibras de polidimetilsiloxano (PDMS) e poliacrilato são amplamente empregadas em amostras biológicas para a detecção de compostos não polares e polares, respectivamente (JUNTING et al.,1998, KATAOKA; SAITO, 2011; PRAGST, 2007). Inovações no preparo de sorventes com imunoafinidade, obtidos por processo sol-gel, polímeros de impressão molecular (MIPs – do inglês *Molecularly Imprinted Polymers*), materiais de acesso restrito (RAM - do inglês, *Restricted Access Materials*) e polipirrol (PPy – do inglês *Polypyrrole*), têm sido propostas em busca de maior seletividade na extração por DI-SPME (AUGUSTO et al., 2010; SOUZA-SILVA et al., 2015).

Figura 4- Representação do aparato e fibra de SPME, inspirada em Kataoka e Saito (2011)



A técnica integra as etapas de amostragem, extração, concentração e injeção da amostra em um único processo. A adaptação dos aparatos de SPME com amostradores acoplados ao equipamento GC/MS, viabilizou a automatização das fases de incubação, extração, dessorção, injeção da amostra e limpeza da fibra (RISTICEVIC et al., 2009).

A imersão direta deve ser executada a temperatura e agitação constantes. Incremento na taxa de extração é observado com

temperaturas entre 50°C e 100°C. Quanto à durabilidade da fibra por imersão direta, foi demonstrada reprodutibilidade com mais de 100 injeções consecutivas, dependendo da matriz (PRAGST, 2007).

Inúmeros trabalhos reportam a eficiência da SPME para a detecção de COC e seus produtos de biotransformação em amostras diversificadas como cabelo (BERMEJO et al., 2006), suor (FOLLADOR et al., 2004), saliva (FUCCI et al., 2003), plasma (ALVAREZ et al., 2007) e urina (YONAMINE; SAVIANO, 2006). Em contrapartida, raríssimos trabalhos empregam SPME em HV, merecendo destaque o estudo realizado por De Martinis e Martin (2002), que aplica este tipo de extração na matriz de interesse para a detecção de etanol, no entanto, utilizando a técnica de *headspace* e não a imersão direta da fibra.

### 1.3.4 Ferramenta analítica

A Secretaria Nacional de Segurança Pública (SENASP), órgão vinculado ao Ministério da Justiça tem investido no aparelhamento das instituições periciais como medida de combate à criminalidade. Os laboratórios forenses dos estados da federação receberam nos últimos anos equipamentos GC/MS, viabilizando a realização de pesquisas de drogas psicoativas em amostras brutas e biológicas (SENASP, 2014).

Na técnica de GC a substância é carregada por um gás inerte, como hélio ou hidrogênio, que constitui a fase móvel, através de uma coluna de fase estacionária polimérica. Os componentes da amostra são separados a partir da polaridade e pressão de vapor características e identificados por espectrometria de massas (MS – do inglês *Mass Spectrometry*) (VALENTE et al., 2012).

O MS possui um campo elétrico ou magnético por onde passam as partículas ionizadas da substância. A trajetória do íon depende da sua massa e da carga, conformando a razão  $m/z$ . Como a maioria dos compostos a serem analisados encontram-se na forma neutra, o equipamento possui aparato denominado fonte de íons, cuja função é converter a molécula em partículas ionizadas. As quatro principais variações nos equipamentos compreendem: ionização por elétrons (EI – do inglês *Electron Ionization*), ionização por *eletrospray* (ESI – do inglês *Electrospray Ionization*), ionização química (APCI – do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) e ionização por indução de plasma acoplado (ICP - do inglês *Inductively Coupled Plasma*). A fonte EI é a mais popular, todavia, demanda que a amostra seja volátil ou

semi-volátil (ROCKWOOD; JHONSON-DAVIS, 2011). Após a ionização as partículas passam pelo analisador de massas, em destaque, o tipo quadrupolo como o mais utilizado. Este, composto por quatro barras paralelas, conforma um canal de passagem para os íons até o detector na extremidade oposta, apresentando seletividade relacionada à razão  $m/z$ . O espectrômetro pode ser programado para o modo de monitoramento de íons seletivo (SIM – do inglês *Selective Ion Monitoring*) com valores específicos de  $m/z$  ou para uma faixa de  $m/z$  no modo varredura (SCAN). O modo SIM apresenta maior sensibilidade em relação ao SCAN, sendo notório para análises qualitativas ou quantitativas com substâncias de interesse pré-estabelecidas. O GC/MS quadrupolo é amplamente empregado na identificação e quantificação de substâncias ilícitas em fluidos biológicos e tecidos (SMITH et al., 2007).

### 1.3.5 Validação do método

Reportar dados confiáveis é mister na rotina analítica de laboratórios forenses, pois constituirão evidências determinantes em decisões judiciais. Neste sentido, a expectativa implícita é de resultados validados e reprodutíveis (WILLE et al., 2011). Segundo definição da Organização Internacional para Padronização (ISO – do inglês *International Organization for Standardization*), a validação consiste na “confirmação por exames e fornecimento de evidências objetivas de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos” (ABNT, 2005). Os parâmetros adotados dependem do escopo em que o método será aplicado. No âmbito da toxicologia forense são geralmente classificados em métodos de varredura e confirmação qualitativa ou quantitativa (SWGTOX, 2013).

Os parâmetros preconizados variam conforme o órgão normatizador ou guia de referência. Entre as publicações internacionais voltadas para a área forense destacam-se o *Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology*, proposto pelo *Scientific Working Group for Forensic Toxicology* (SWGTOX, 2013) e o *Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment Used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens*, desenvolvido pelo departamento de drogas e crime da ONU (UNODC, 2009), ambas direcionadas à temática forense. Entre as diretrizes gerais para validação de métodos analíticos em matrizes biológicas, são fontes consolidadas o *Guidance for Industry-*

*Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics* elaborado pela *US Food and Drug Administration* (FDA, 2015), e o *Guideline on Bioanalytical Method Validation* organizado pela *European Medicines Agency* (EMA, 2011). No Brasil mediante a inexistência de normativas específicas para laboratórios forenses, além dos já citados, também podem ser adotados como referência a Resolução 27/2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a qual especifica os ensaios para a validação de técnicas para a análise de produtos farmacêuticos (ANVISA, 2012) e a ISO/IEC 17025:2005, norma técnica que estabelece requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração pelo INMETRO (ABNT, 2005).

Parâmetros como precisão, especificidade, seletividade, linearidade, limites de detecção (LD) e quantificação, recuperação, reprodutibilidade, exatidão, robustez, estabilidade, efeitos matriz e residual (*carryover*), alternam-se entre os elencados para metodologias quantitativas (ABNT, 2005; ANVISA, 2012; EMA, 2011; FDA, 2015; SWGTOX, 2013; UNODC, 2009). Para ensaios qualitativos LD, seletividade, precisão e *carryover* estão entre os mais reportados (PETERS; DRUMMER; MUSSHOF, 2007; SWGTOX, 2013; UNODC, 2009).

O LD pode ser definido como a menor concentração do analito passível de ser detectada, mas não necessariamente quantificada sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2012; ARAUJO, 2009). Em outra abordagem pode ser descrito como a menor concentração do analito que o método consegue diferenciar de maneira confiável de ruídos de fundo (PETERS; DRUMMER; MUSSHOF, 2007).

Conceitualmente a seletividade consiste na habilidade de um método analítico de mensurar inequivocamente e identificar um analito na presença de outros componentes na amostra, como por exemplo, metabólitos, impurezas e interferentes de matriz. Em uma abordagem qualitativa a seletividade pode ser demonstrada a partir da comprovação da ausência de sinais interferentes (ANVISA, 2012; PETERS; DRUMMER; MUSSHOF, 2007).

A precisão é descrita como a proximidade ou grau de concordância entre os resultados obtidos a partir de repetidas aferições de múltiplas alíquotas de uma mesma matriz, sendo expressa através do coeficiente de variação (CV) (ANVISA, 2012; SWGTOX, 2013). O parâmetro pode ser avaliado em três níveis: repetibilidade, também citada como precisão intracorrida, precisão intermediária ou intercorrida

e reprodutibilidade. A primeira compreende a realização de análises em curto intervalo de tempo sob as mesmas condições operacionais, enquanto a precisão intermediária propõe a mensuração em dias distintos utilizando-se recursos variados. Já a reprodutibilidade expressa a precisão entre laboratórios diferentes, demandando estudos colaborativos (ANVISA, 2012; GONZALEZ et al., 2014; PETERS; DRUMMER; MUSSHOFF, 2007).

A presença residual do analito investigado em análises subsequentes pode comprometer os resultados de métodos instrumentais qualitativos e quantitativos (SWGTOX, 2013). Denominado de efeito memória, sendo mais popularmente adotada a terminologia em inglês, *carryover*, geralmente é caracterizado pela permanência na instrumentação analítica de quantidades residuais de analitos decorrentes de amostras com concentrações elevadas, analisadas anteriormente. A interferência pode ocorrer na amostra seguinte ou se estender pela corrida dependendo da concentração residual (ISHIKAWA, 2011; KOLLIPARA et al., 2011).

Segundo revisão publicada por Wille e colaboradores (2011) os guias proveem informação e servem como orientação, todavia, compete ao analista determinar quais parâmetros devem ser adotados na estruturação de protocolo ajustado para a sua demanda analítica. Independentemente da referência adotada é ponto pacífico entre os órgãos técnicos e publicações científicas o entendimento de que a validação visa como produto final ensaios confiáveis, a partir do atendimento a critérios mínimos que comprovem sua aplicabilidade à finalidade pretendida (PETERS; DRUMMER; MUSSHOFF, 2007).

#### **1.4 Aspectos da Instituição**

O IGP/Joinville, responsável pelo atendimento de ocorrências envolvendo mortes violentas na maior cidade do estado de SC e de sua região metropolitana, implantou há cinco anos pioneiro sistema informatizado que possibilita o cadastramento dos casos atendidos pelos Institutos. A ferramenta viabiliza a compilação de dados relevantes com maior confiabilidade e encontra-se em etapa de expansão para outras cidades.

Estima-se que parte dos casos atendidos não possuem laudos de exames toxicológicos em decorrência da inviabilidade de coleta de sangue e urina dos cadáveres, evidenciando gargalo onde o aparato forense não corroborou com a persecução penal. A diversificação de

amostras passíveis de análise pode dirimir parte desta limitação. A matriz HV torna-se recurso atrativo devido a sua posição anatômica preservada e boa correlação com as concentrações de analitos detectadas em outras matrizes biológicas.

Considerando-se o elevado índice de uso da COC no país e sua íntima relação com a violência e óbitos vinculados, estima-se também maior ocorrência da substância nos exames toxicológicos das vítimas atendidas. A utilização de SPME e GC/MS é rotina consolidada no Instituto de Análises Forenses do IGP/SC para a análise de amostras de sangue e urina. A escassez de publicações abrangendo o emprego destes aparatos analíticos para a detecção de COC na matriz HV reforça a motivação para o desenvolvimento da pesquisa.

Neste contexto, o presente estudo pretende levantar a natureza jurídica das mortes violentas, o percentual de exames toxicológicos não realizados por falta de amostra biológica convencional e a ocorrência principalmente de COC e álcool em exames toxicológicos de vítimas de morte violenta atendidas pelo IGP/Joinville. Na sequência, validar método analítico para a detecção de COC e CE na matriz alternativa HV, utilizando SPME e GC/MS, visando implantação da metodologia na rotina do setor de toxicologia forense do IAF/IGP/SC.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Realizar levantamento sobre o perfil de mortes violentas atendidas pelo IGP/Joinville e validar metodologia para a detecção de COC e CE em HV com SPME por GC/MS.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Realizar estudo retrospectivo dos casos atendidos pelo IGP/Joinville, avaliando o perfil de óbitos por morte violenta, a realização da coleta de amostras convencionais para exame toxicológico e o perfil das substâncias detectadas;
- Validar metodologia para a detecção qualitativa de COC e CE em uma amostra alternativa, HV, com SPME e análise por GC/MS;
- Empregar a metodologia validada na análise de amostras de HV de casos *post mortem* que apresentaram resultado toxicológico com detecção para COC e/ou CE em amostras de sangue e/ou urina.





### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

##### 3.1.1 Equipamentos e Acessórios

Para as etapas de desenvolvimento e validação foram utilizados vórtex Quimis<sup>®</sup> (Brasil) Q220, centrífuga Kindly<sup>®</sup> (Brasil) modelo KC4, balança analítica Shimadzu<sup>®</sup> (Japão) modelo AUW 220, deionizador Permutation<sup>®</sup> (Brasil) DE 1800, cromatógrafo gasoso Agilent<sup>®</sup> (EUA) 7890A acoplado a detector de MS 5975C, com amostrador automático CombiPal da CTC Analytics<sup>®</sup> (Suíça), coluna cromatográfica HP-5MS-30 m x 0,25 mm x 0,25 µm filme Agilent<sup>®</sup> (EUA), seringas de injeção cromatográfica CTC Analytics<sup>®</sup> fibra Polidimetilsiloxano/Polidivinilbenzeno (PDMS/DVB) Supelco<sup>®</sup> (EUA) e gás de arraste hélio 6.0 da Linde<sup>®</sup> (Brasil).

##### 3.1.2 Reagentes

Os reagentes ácido bórico, hidróxido de sódio, ácido clorídrico e acetonitrila foram obtidos da Merck<sup>®</sup> (Alemanha), sendo os dois últimos ultrapuros. Os padrões analíticos certificados de COC, CE, nicotina, cafeína e lidocaína foram adquiridos da Cerilliant Corporation<sup>®</sup> (Texas, EUA).

##### 3.1.3 Soluções

###### 3.1.3.1 Soluções padrão

As soluções de trabalho foram preparadas a partir dos padrões de COC e CE na concentração inicial de 1 mg/mL em acetonitrila. Foram transferidos 100 µL de cada ampola para balões volumétricos de 10 mL e o volume completado com acetonitrila conformando concentração de 10 µg/mL. A partir destas, o mesmo procedimento foi adotado para o preparo de soluções de 1 µg/mL. Por fim, as soluções de concentração 0,25 µg/mL foram preparadas a partir de 2,5 mL da solução a 1 µg/mL, completadas para 10 mL com acetonitrila. As alíquotas foram armazenadas em geladeira a 4°C (PERES, 2014).

### 3.1.3.2 Solução tampão

A solução foi preparada adicionando-se 12,37 g de ácido bórico e 100 mL de hidróxido de sódio 1N à 900 mL de água deionizada. Na sequência foram adicionados a 83,5 mL desta solução, 16,5 mL de ácido clorídrico 0,1N e o pH ajustado para 9,0 (ALVAREZ et al., 2007).

### 3.1.4 Amostras

As amostras de HV foram coletadas no Instituto Médico Legal (IML) de Joinville de vítimas de morte violenta no período de abril/15 a novembro/15. As coletas foram realizadas com consentimento dos familiares, formalizado por meio de assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) – UFSC, sob o número 42155115.5.0000.012.

Foram coletadas amostras de HV dos olhos direito e esquerdo individualmente, perfazendo quantidade igual ou superior a 2 mL. A punção foi realizada no quadrante inferior abaixo da íris. Ao final do procedimento foi injetada água deionizada para reconstituição do volume ocular (SWIFT et al., 1974). As amostras foram acondicionadas em tubos de coleta contendo conservante fluoreto de sódio a 2% e armazenadas a -20°C (PERES et al., 2014).

As amostras de HV foram distribuídas em dois grupos denominados teste e negativo, a partir dos respectivos resultados detectado e não detectado para COC e/ou CE em amostras de sangue e/ou urina.

Acrescenta-se que as amostras de sangue e urina são rotineiramente coletadas durante o exame de necropsia, no IML/Joinville, e encaminhadas para análise no setor de toxicologia forense do IAF/IGP em Florianópolis.

Os critérios de inclusão utilizados para este estudo foram vítimas de morte violenta de ambos os sexos, enquanto os critérios de exclusão compreenderam óbitos de causa natural, doadores de córnea e menores de 18 anos.

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Estudo retrospectivo dos casos de óbitos atendidos no IGP/Joinville**

#### **3.2.1.1 Quanto ao perfil de mortes violentas**

O IGP/Joinville conta com sistema informatizado (Sirsaelp<sup>®</sup>) que mantém em sua base de dados o cadastro das vítimas, exames realizados e os respectivos laudos periciais das ocorrências atendidas.

Estudo retrospectivo dos casos atendidos entre janeiro de 2013 e dezembro de 2015 foi realizado abrangendo o número de mortes violentas ocorridas na região de Joinville, abrangendo os seguintes municípios: Joinville, Araquari, São Francisco do Sul, Garuva e Itapoá. Os casos foram analisados com relação a sua distribuição por natureza jurídica (homicídio, suicídio, acidentes de trânsito e outras formas de morte), ao gênero e à idade das vítimas.

#### **3.2.1.2 Quanto à coleta de amostras biológicas**

O protocolo institucional consiste na coleta de sangue e urina de todas as vítimas de morte violenta e em determinados casos, de vísceras. Porém, o estado de conservação do cadáver e óbitos em ambiente hospitalar podem conformar fatores limitantes para a coleta destas amostras.

Foram consultadas, em cada caso de óbito por morte violenta, as guias de encaminhamento de amostras biológicas ao setor de toxicologia do IAF/IGP/SC, e na ausência destas, avaliados os laudos cadavéricos em busca de elementos que justificassem a não realização da coleta.

#### **3.2.1.3 Quanto aos resultados dos exames toxicológicos**

Entre os casos com registro de coleta de amostra biológica foram analisados os resultados dos exames descritos nos laudos periciais. Os resultados foram distribuídos em não detectados e detectados. Entre os casos detectados as substâncias identificadas foram agrupadas por tipo de droga e posteriormente distribuídas em relação à natureza jurídica da morte. Os dados foram expressos em percentual e valores absolutos de ocorrência.

### 3.2.2 Etapa pré-analítica

#### 3.2.2.1 Preparo de amostras

Inicialmente as amostras de HV foram centrifugadas por 5 minutos a 4000 rpm. Destas, alíquotas de 0,5 mL foram acondicionadas em microtubos juntamente com 1,0 mL de solução tampão. Na sequência as amostras foram submetidas à extração por SPME (ÁLVAREZ et al., 2007; YONAMINE; SAVIANO, 2006).

#### 3.2.2.2 Extração

A SPME foi realizada a partir da imersão direta da fibra PDMS/DVB. O processo é automatizado compreendendo as seguintes etapas:

- I. Condicionamento da amostra
- II. Adsorção dos analitos na fibra sob agitação e temperatura constantes
- III. Dessorção dos compostos no injetor do cromatógrafo
- IV. Pós-condicionamento da fibra para limpeza por aquecimento.

A Tabela 1 descreve as condições de tempo, temperatura e agitação de cada etapa acima utilizada (TOLEDO et al., 2003; YONAMINE; SAVIANO, 2006).

Tabela 1. Especificação dos parâmetros adotados para SPME

Parâmetro	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)
<b>Condicionamento da amostra</b>	0,6	60	500
<b>Adsorção</b>	20	60	500
<b>Dessorção</b>	5	250	-
<b>Pós-condicionamento da fibra</b>	5	250	-

min.- minutos; °C- graus Celsius; rpm- rotações por minuto

### 3.2.3 Etapa analítica

#### 3.2.3.1 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas utilizadas foram as mesmas adotadas para a varredura toxicológica em amostras de sangue e urina realizada pelo setor de toxicologia do IAF/IGP, as quais seguem descritas de maneira pormenorizada na Tabela 2.

Tabela 2. Especificação das condições cromatográficas adotadas no método

Parâmetro	Especificações
Coluna	HP-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 $\mu$ m)
Gás de arraste	Hélio- fluxo de 1 mL/min.
Temperatura do injetor	250°C
Modo de injeção	<i>Splitless</i>
Temperatura da coluna	100°C (1min); linear a 18°C/min. até 300°C por 3 min.
Temperatura da fonte de íons	250°C
Temperatura da linha de transferência	280°C
Modo SIM	íons COC 182, 272, 303
	íons CE 196, 272, 317

m- metros; mm- milímetros;  $\mu$ m- micrômetro; min- minutos; °C- graus Celsius

### 3.2.4 Validação

Na etapa de validação foram avaliados os parâmetros especificidade e seletividade, LD, precisão e *carryover*, fundamentados nas orientações do guia SWGTOX (2013) e UNODC (2009).

#### 3.2.4.1 Especificidade e Seletividade

Amostras de HV de cinco fontes distintas foram analisadas para a verificação da ausência de sinais interferentes próprios da matriz,

próximos ao tempo de retenção (RT – do inglês *Retention Time*) dos analitos de interesse, COC e CE (UNODC, 2009). Na sequência amostras de HV em triplicatas foram fortificadas com 100 ng/mL dos padrões de cafeína, lidocaína, nicotina, COC e CE, sendo as duas primeiras, substâncias frequentemente encontradas como adulterantes em amostras de COC apreendidas (MALDANER et al., 2015; UNODC, 2005; SWGDRUG, 2013). A nicotina foi empregada visando descartar possível interferência desta substância no RT dos analitos de interesse no caso de indivíduos fumantes.

A avaliação foi feita a partir da visualização do cromatograma, atentando-se para o surgimento de picos muito próximos ao RT dos analitos de interesse, assim como alterações nas áreas dos picos dos mesmos, o que poderia sugerir uma coeluição.

### 3.2.4.2 Limite de Detecção

Os ensaios para esse parâmetro foram conduzidos conforme uma das abordagens sugeridas pelo guia de toxicologia forense, SWGTOX 2013. A referida abordagem se baseia no estabelecimento de uma concentração para LD a partir de uma tomada de decisão administrativa (*decision point* em inglês), considerando aspectos como a demanda laboratorial, mesmo sendo analiticamente possível obter uma concentração mais baixa para o LD. No presente estudo optou-se pela concentração de 5 ng/mL para LD. Estudos publicados reportam concentrações detectadas em HV de casos *post mortem* a partir de 30 ng/mL para COC e CE (ANTONIDES; KIELY; MARINETTI, 2007; MACKEY-BOJACK et al., 2000; PERES et al., 2014). Neste sentido, a escolha da concentração de 5 ng/mL como LD compreende valor aproximadamente 6 vezes inferior às menores concentrações detectadas em casos forenses reportados na literatura.

Para a avaliação deste parâmetro, a concentração de 5 ng/mL para COC e CE foi adicionada em HV e analisada em triplicata durante três dias consecutivos (SWGTOX, 2013). Para validação deste parâmetro, os resultados, expressos em CV referente às replicatas, devem ser inferiores a 20%. Para o cálculo do CV, utilizou-se a fórmula abaixo.

$$CV (\%) = (DP/CMD) \times 100$$

Onde:

CV= Coeficiente de Variação; DP= Desvio Padrão; CMD= Concentração Média Determinada.

### 3.2.4.3 Precisão

Os ensaios de precisão foram realizados por meio da análise de 10 replicatas de HV fortificadas com 7 ng/mL dos padrões de COC e CE, considerando-se a metodologia proposta pela UNODC (2009) para métodos qualitativos, que preconiza análise de replicatas fortificadas com uma concentração entre 1,25 e 2 vezes a do LD.

Para a avaliação deste parâmetro foram observados os resultados falsos negativos, os quais não devem ultrapassar 20% das amostras analisadas. Além disso, foi avaliado o CV dos RTs dos analitos de interesse que devem ser inferiores a  $\pm 2\%$ , segundo o guia de referência (UNODC, 2009).

### 3.2.4.4 Carryover

Para a análise deste parâmetro uma amostra de HV isenta dos analitos de interesse COC e CE foi processada após a análise de outra fortificada com padrões dos mesmos analitos na concentração de 750 ng/mL, considerada alta, ou seja, 150 vezes maior que o LD estabelecido. Na ausência de efeito residual, amostras em concentrações crescentes a partir de 1000 ng/mL foram empregadas para a avaliação deste parâmetro. O procedimento foi realizado em triplicata (SWGTOX, 2013).

Uma vez constatado o *carryover*, tornou-se necessário implantar procedimentos que eliminem essa contaminação. Os procedimentos adotados com esta finalidade foram o aquecimento da fibra a 250°C por 5 minutos e da coluna a 320°C por 10 minutos. Ao final, processou-se nova amostra isenta dos analitos de interesse para verificar a eficiência do procedimento.

### 3.2.5 Aplicação do método em casos *post mortem*

As amostras de HV com resultados detectados para COC ou CE em sangue ou urina, foram analisadas empregando-se a metodologia validada. Os resultados obtidos foram comparados com as matrizes de referência e compilados em tabela.

Adicionalmente, para avaliação do desempenho do método validado, foram analisadas 3 amostras do grupo negativo.



### 3.2.6 Análise estatística

Os dados obtidos na etapa de levantamento dos exames toxicológicos foram distribuídos em gráficos desenvolvidos no GraphPad Prism<sup>®</sup>, e tabelas no Excel<sup>®</sup>, ilustrando tanto em valores percentuais quanto absolutos das amostras coletadas, a detecção de substâncias nos exames toxicológicos, sua variedade e distribuição quanto à natureza jurídica dos óbitos atendidos no período.

Os resultados obtidos na etapa analítica de validação foram avaliados a partir de cálculos da média, desvio padrão (DP), CV e representados sob a forma de tabelas desenvolvidas no Excel<sup>®</sup>.

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Quanto ao perfil das mortes violentas atendidas no IGP/Joinville**

Os dados relacionados à natureza jurídica dos óbitos, ao gênero e à idade média das vítimas seguem descritos na Tabela 3, distribuídos por ano. Na categoria “outras”, dentro da classificação natureza jurídica, enquadram-se casos de acidentes de trabalho, afogamentos, quedas, eletroplessão e acidentes diversos.

No período avaliado foi verificado um aumento de 20,6 %, no número total de mortes violentas atendidas pelo IGP/Joinville. Quanto à natureza jurídica observou-se elevação nos crimes de homicídios e acidentes de trânsito. Nas outras causas de morte observou-se uma tendência à elevação, por outro lado, nos suicídios foi constatado uma propensão ao decréscimo.

Em relação ao gênero, averiguou-se que o masculino foi notadamente o mais acometido. Ressalta-se que nos homicídios essa diferença foi 14 vezes maior, enquanto nas demais naturezas jurídicas não ultrapassou a 5 vezes. Considerando o gênero feminino observou-se aumento de vítimas principalmente em acidentes de trânsito.

Todas as faixas etárias foram acometidas por mortes violentas, porém a média para cada natureza jurídica foi de 32 a 50 anos.

Tabela 3- Distribuição das mortes violentas ocorridas na região de Joinville, por natureza jurídica, gênero e idade

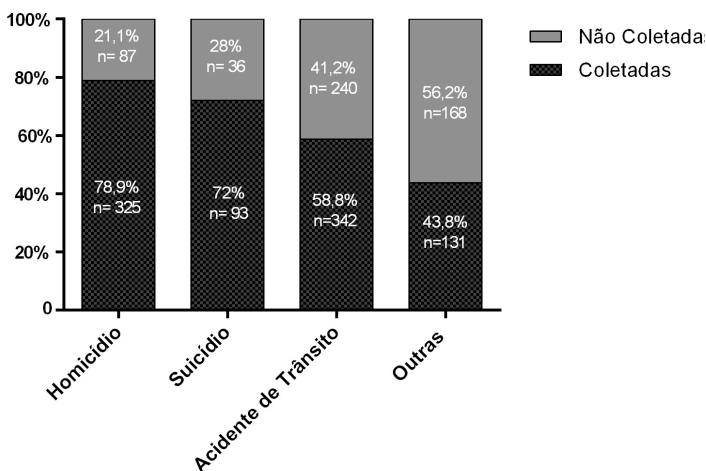
<i>Natureza Jurídica</i>	2013			2014			2015			Total		
	<i>N</i>	<i>Gênero M/F</i>	<i>Idade</i>	<i>N</i>	<i>Gênero M/F</i>	<i>Idade</i>	<i>N</i>	<i>Gênero M/F</i>	<i>Idade</i>	<i>N</i>	<i>Gênero M/F</i>	<i>Idade</i>
<b>Homicídio</b>	116	108/8	31,7±13,1	127	116/11	32,2±12,7	169	161/8	32,0±13,2	412	385/27	32,0±12,9
<b>Suicídio</b>	56	46/10	42,1±17,1	35	27/8	42,0±16,9	38	31/7	43,4±18,1	129	104/25	42,4±17,2
<b>Acidente Trânsito</b>	166	133/33	38,6±17,3	207	163/44	40,0±18,1	209	148/61	37,9±21,1	582	442/138	39,1±18,6
<b>Outras</b>	90	71/19	49,3±21,4	109	93/16	44,0±23,9	100	82/18	50,3±23,2	299	243/53	47,7±23,1
<b>Total Mortes Violentas</b>	428			478			516			1422		

N- número de mortes violentas; M- Masculino; F- Feminino.

## 4.2 Quanto à coleta de amostras biológicas

Entre 2013 e 2015 o maior percentual de amostras coletadas concentrou-se em casos de homicídios (78,9%; n= 325) e suicídios (72%; n= 93), enquanto para acidentes de trânsito foi constatado o percentual de 58,8% (n= 342). Os achados evidenciaram que nos óbitos classificados como outras formas de morte, a coleta de amostras biológicas diminuiu notadamente, compreendendo 43,8% (n= 131) do total de ocorrências desta natureza (Figura 5).

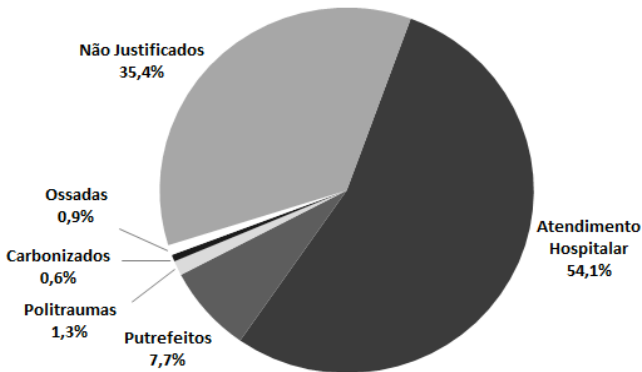
Figura 5- Distribuição da coleta de amostras biológicas



As justificativas para a não realização da coleta foram extraídas dos registros de atendimento e dos laudos cadavéricos. Foram encontradas como justificativas: casos de óbitos ocorridos em ambiente hospitalar (54,1%, n= 287); cadáver em estado de putrefação (7,7%, n= 41); vítimas com politraumas (1,3%, n= 7), ossadas (0,9%, n= 5) e corpos carbonizados (0,6%, n= 3). Os casos sem justificativas representaram 35,4% (n= 188) do total de não coletados (Figura 6). A internação hospitalar foi fator

limitante da maioria dos casos registrados. Constatou-se ainda que a hospitalização está bastante relacionada à óbitos por acidentes de trânsito.

Figura 6- Distribuição das justificativas que causaram limitação na coleta de amostras biológicas

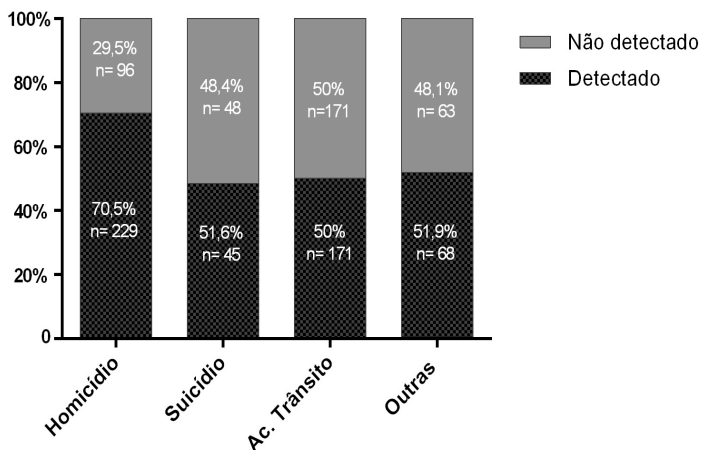


### 4.3 Quanto aos resultados dos exames toxicológicos

Nesta etapa observou-se a detecção e o tipo de substâncias encontradas nas amostras de sangue e urina. As referidas informações foram obtidas a partir dos laudos toxicológicos emitidos pelo IAF/IGP.

Do total de 891 amostras coletadas 513 apresentaram resultado detectado para pelo menos uma das substâncias analisadas e 378 não detectados. A Figura 7 ilustra o percentual de amostras detectadas por natureza jurídica.

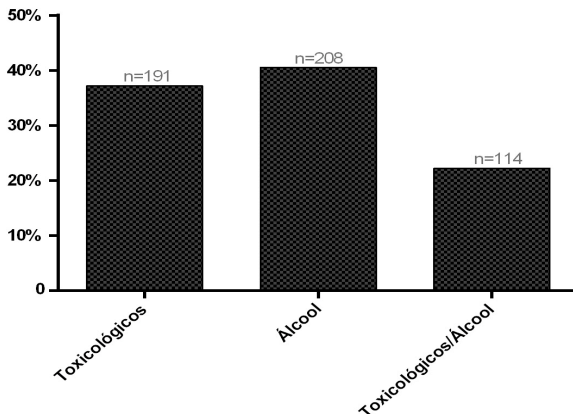
Figura 7- Distribuição dos resultados de exames toxicológicos por natureza jurídica



Nos óbitos atendidos pelo IGP/Joinville o maior percentual de exames detectados concentra-se nos casos de homicídios com 70,5%, seguidos por outras formas de morte com 51,9%, suicídios com 51,6% e acidentes de trânsito com 50%, os quais praticamente não diferenciaram entre si.

As amostras detectadas compreenderam casos com detecção somente na varredura toxicológica (imunoensaios por quimioluminescência), com confirmação por GC/MS (37,23%), detecção somente para o álcool (GC com *headspace* e detector de ionização de chama) (40,54%), e detecção em ambos os exames (22,23%) (Figura 8).

Figura 8- Distribuição dos resultados detectados para exames de varredura toxicológica e álcool



Entre os tipos de substâncias detectadas somente na varredura toxicológica destacam-se a COC (20,4%), COC/Tetrahydrocannabinol (THC) (12,6%), THC (29,8%) e Benzodiazepínicos (BDZ) (12,6%) (Figura 9). Informa-se que o item polidrogas refere-se à exposição concomitante a mais de uma substância proscrita ou de uso controlado, distintas da COC. O item “outras” foi designado a substâncias como analgésicos e princípios ativos não enquadrados nos grupos anteriores.

Figura 9- Distribuição das substâncias mais detectadas na varredura toxicológica nos casos de mortes violentas entre 2013 e 2015 sem detecção de álcool

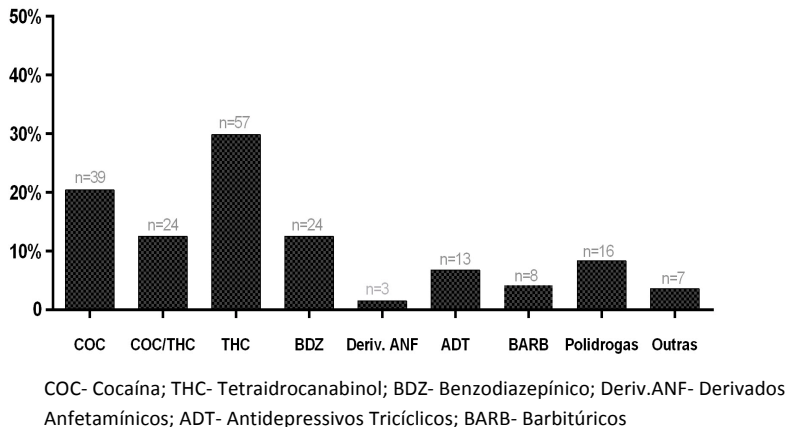
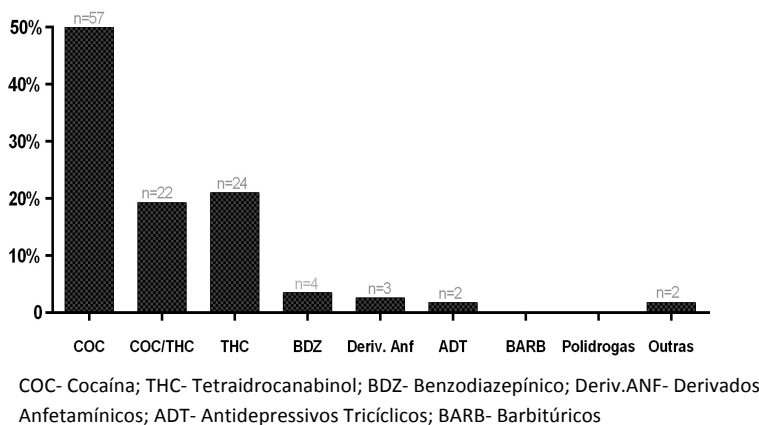


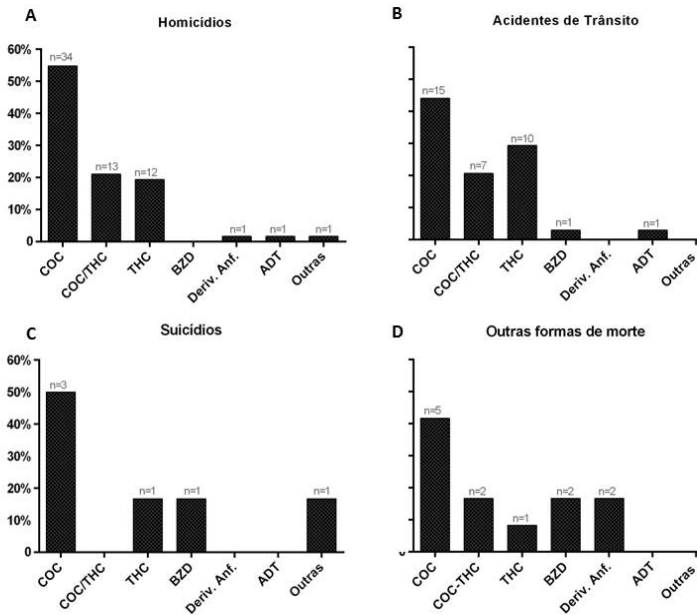
Figura 10- Distribuição das substâncias detectadas na varredura toxicológica nos casos de mortes violentas entre 2013 e 2015 com detecção concomitante de álcool





Considerando-se que a formação do CE, substância de interesse no presente estudo, depende da exposição ao álcool, na sequência optou-se por avaliar a distribuição das substâncias por natureza jurídica nos casos com detecção simultânea das substâncias na varredura toxicológica e do álcool (Figura 11).

Figura 11- Distribuição das substâncias detectadas por natureza jurídica nos casos de detecção na varredura toxicológica e álcool



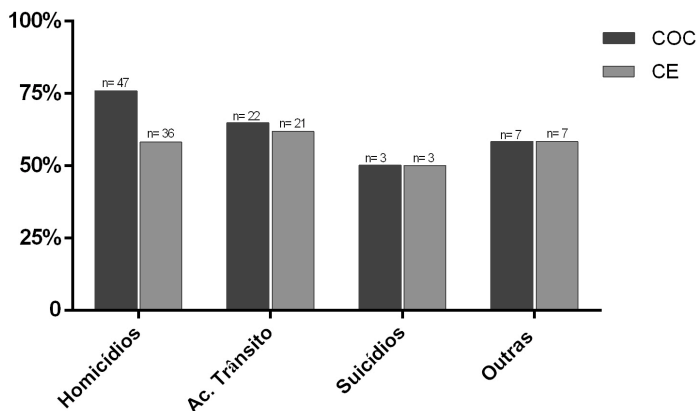
COC- Cocaína; THC- Tetraidrocanabinol; BDZ- Benzodiazepínico; Deriv.ANF- Derivados Anfetamínicos; ADT- Antidepressivos Tricíclicos

Nos homicídios, as substâncias prevalentes foram COC (54,8%, n= 34), a associação COC/THC (21%, n= 13) e THC (23,6%, n= 12) (Figura 11-A). Nas amostras de vítimas de acidentes de trânsito, a substância predominante foi a COC (44,1%, n= 15), seguida por THC (29,4%, n= 10) e a associação

COC/THC (20,6%, n= 7) (Figura 11-B). Nos casos de suicídios e outras formas de morte, o número de casos foram bem mais reduzidos, porém a COC ainda continuou prevalecendo. Nos suicídios (Figura 11-C), a porcentagem de COC (50%, n= 3) foi maior, seguida pelo THC, BDZ e outras drogas, com equivalentes 16,7% (n= 1). Nos óbitos classificados como outras formas de morte, a COC foi proeminente (41,7%, n= 5), e na sequência a associação COC/THC, BDZ e derivados anfetamínicos, com equivalentes 16,7% (n= 2), finalizando com o THC, encontrado em 8,3% (n= 1) (Figura 11-D).

Destarte, a COC foi a substância proscrita predominante entre todas as classificações jurídicas, constatada em 75,8% dos casos de homicídios, 64,7% dos acidentes de trânsito, 50% dos suicídios e 58,4% em outras formas de morte, considerando os casos com detecção concomitante na varredura toxicológica e álcool (Figura 12).

Figura 12- Distribuição da detecção de COC e CE por natureza jurídica nos casos de detecção na varredura toxicológica e álcool



O CE foi detectado em 58,1% dos homicídios, 61,8% dos acidentes de trânsito, 50% dos suicídios e 58,3% dos casos classificados como outras formas de morte, envolvendo a

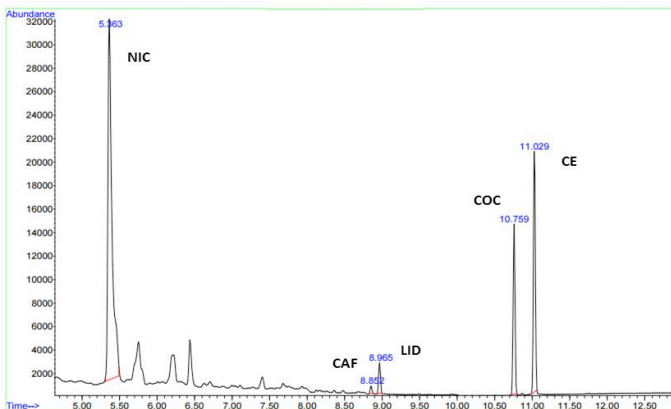
deteção concomitante de álcool (Figura 12). Adicionalmente, cabe relatar 9 casos com detecção de CE, não inseridos no gráfico acima, para os quais não havia resultado da análise de álcool.

## 4.4 Validação

### 4.4.1 Especificidade e Seletividade

Não foram detectados picos interferentes nas cinco amostras de HV de fontes distintas, isentas dos analitos de interesse analisadas. Após a adição dos padrões de COC, CE, nicotina, cafeína e lidocaína (100 ng/mL) não foram constatados picos interferentes, nem alteração nas áreas dos picos referentes aos analitos de interesse, como pode ser observado no cromatograma representado na Figura 13.

Figura 13- Cromatograma representativo contemplando a detecção de COC, CE, nicotina, cafeína e lidocaína no ensaio de seletividade



CAF- Cafeína; CE- Cocaetileno; COC-Cocaína; LID- Lidocaína; NIC- Nicotina

#### 4.4.2 Limite de Detecção

O LD avaliado na concentração de 5 ng/mL, concentração obtida através de uma escolha administrativa, apresentou CVs inferiores a 10%, para COC e inferiores a 15% para o CE em cada dia de análise, estando dessa forma dentro do limite estabelecido pelo guia forense SWGTOX (2013), que é de 20%. Os resultados seguem sumarizados na Tabela 4.

Tabela 4- Valores das áreas dos picos para COC e CE e os respectivos CVs das triplicatas realizadas em 3 dias consecutivos para a concentração de 5 ng/mL (LD)

	<i>COC</i>	<i>CV%</i>	<i>CE</i>	<i>CV%</i>
<i>Dia 1</i>	17024		18073	
	19558	7,3	16745	13,7
	17622		13749	
<i>Dia 2</i>	20194		17624	
	23089	7,2	19525	10,7
	22810		21840	
<i>Dia 3</i>	20213		17194	
	17532	7,1	15320	5,8
	19079		16073	
<i>Geral</i>		11,1		13,6

#### 4.4.3 Precisão

O método demonstrou precisão sob condições de repetibilidade para 10 replicatas de HV, sem a obtenção de falsos-negativos e CVs dos RTs dos analitos de interesse inferiores ao limite preconizado pelo guia forense utilizado como referência (UNODC, 2009). Os valores dos RTs e os respectivos CVs seguem compilados na Tabela 5.

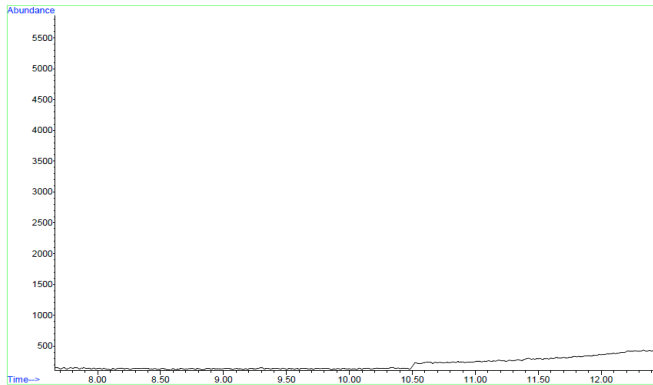
Tabela 5- Valores de RT para o ensaio de precisão para 10 replicatas fortificadas com 7 ng/mL, e os respectivos CVs para COC e CE

<i>Tempo de Retenção (min.)</i>											
<b>HV</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>CV%</b>
<b>COC</b>	10,798	10,799	10,806	10,805	10,802	10,804	10,811	10,801	10,798	10,803	<b>0,4</b>
<b>CE</b>	11,068	11,069	11,076	11,075	11,071	11,075	11,078	11,073	11,069	11,073	<b>0,3</b>

#### 4.4.4 Carryover

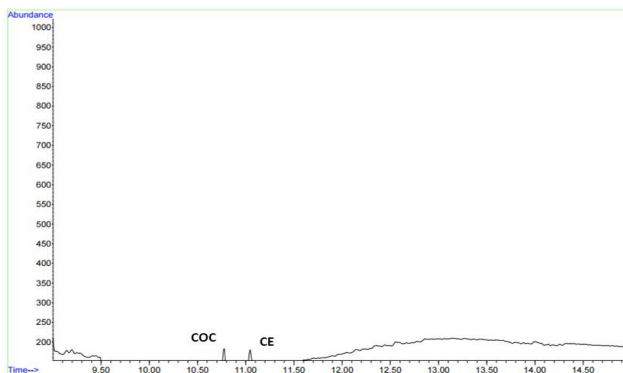
Inicialmente a concentração de 750 ng/mL para ambos os analitos, COC e CE, foi analisada para este parâmetro, não sendo detectado efeito de *carryover* em amostra branco de HV analisada posteriormente. O cromatograma segue ilustrado na Figura 14.

Figura 14- Cromatograma representativo da amostra branco analisada posteriormente a 750 ng/mL



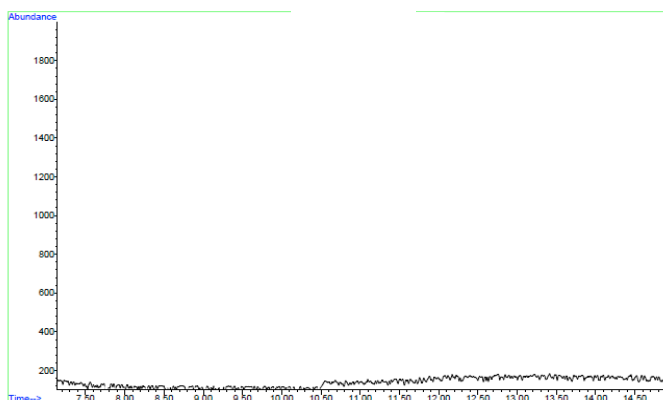
Posteriormente avaliou-se a concentração de 1000 ng/mL, onde foi identificado efeito de *carryover*, conforme pode ser observado na amostra branco de HV, analisada na sequência, representada na Figura 15.

Figura 15- Cromatograma representativo da amostra branco analisada posteriormente a 1000 ng/mL



Após a realização de processo de aquecimento da coluna a 320°C durante 10 minutos e da fibra a 250°C por 5 minutos, objetivando a descontaminação, nova amostra branco foi analisada. Esta demonstrou que nenhum efeito residual permaneceu no aparato, evidenciando que o procedimento adotado foi eficiente na eliminação do efeito residual (Figura 16).

Figura 16- Cromatograma representativo da amostra branco analisada posteriormente ao procedimento de descontaminação



#### 4.5 Aplicação do método em casos *post mortem*

Ao total foram obtidas 15 amostras para o grupo teste e 3 no grupo negativo. Em 13 dos 15 casos avaliados ocorreu detecção de COC e CE nas amostras de sangue ou urina e HV. Em dois casos a COC, exclusivamente, foi detectada somente no HV. Os resultados encontram-se descritos na Tabela 6, abrangendo os dados obtidos na dosagem alcoólica, varredura toxicológica em sangue/urina e da análise de HV.

Tabela 6- Resultados da aplicação da metodologia em 15 casos *post mortem*, relacionados à dosagem alcoólica e comparação da detecção de COC e CE em sangue, urina e HV

<b>Caso</b>	<b>Toxicológico sangue/urina</b>	<b>Dosagem Alcoólica</b>	<b>Resultado HV</b>
1	COC/CE	D	COC/CE
2	COC	ND	COC
3	COC/CE	D	COC/CE
4	CE	D	COC/CE
5	CE/THC	D	COC/CE
6	COC/CE	D	COC/CE
7	COC/CE	D	COC/CE
8	COC	ND	COC
9	COC/THC	ND	COC
10	COC	ND	COC
11	COC/CE	D	COC/CE
12	COC/THC	ND	COC
13	COC/THC	ND	COC
14	COC/THC	ND	COC
15	COC/CE	D	COC/CE

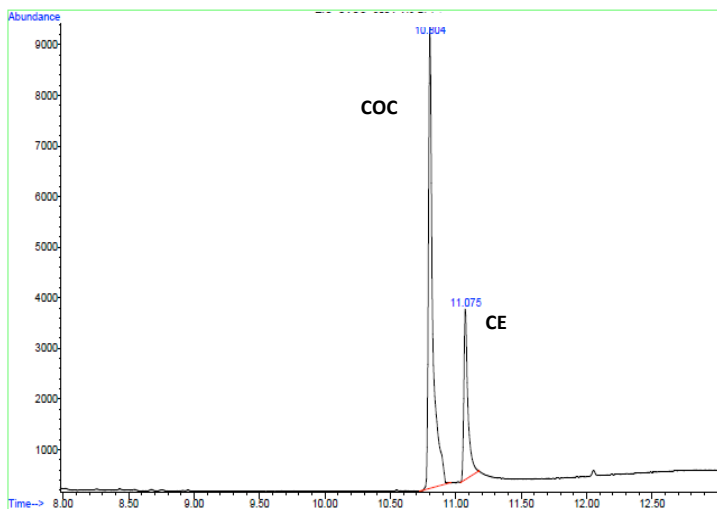
D- Detectado, ND- Não Detectado; COC- Cocaína; CE- Cocaetileno; THC- Tetrahydrocannabinol

Da totalidade de casos avaliados 11 compreenderam amostras de vítimas de homicídio, 3 de acidente de trânsito e 1 de eletrolessão. O gênero masculino foi predominante, abrangendo 13 casos e a idade das 15 vítimas variou entre 17 e 41 anos.

A Figura 17 retrata cromatograma representativo da detecção de COC e CE nos casos *post mortem* avaliados.



Figura 17- Cromatograma representativo da aplicação do método com detecção de COC e CE



Adicionalmente foram avaliados 3 casos com resultado de exame toxicológico com não detecção em sangue e urina, nos quais igualmente não foram detectadas substâncias.

## 5 DISCUSSÃO

“... — *A quem estais carregando, irmãos das almas, embrulhado nessa rede? dizei que eu saiba.*

— *A um defunto de nada, irmão das almas, que há muitas horas viaja à sua morada.*

— *E sabeis quem era ele, irmãos das almas, sabeis como ele se chama ou se chamava?*

— *Severino Lavrador, irmão das almas, Severino Lavrador, mas já não lavra.*

— *E foi morrida essa morte, irmãos das almas, essa foi morte morrida ou foi matada?*

— *Até que não foi morrida, irmão das almas, esta foi morte matada, numa emboscada.”* (trecho adaptado do livro *Morte e Vida Severina* de João Cabral de Melo Neto (1954-1955), p.93-94, 2007.)

Os achados do presente estudo representam a realidade constatada na região de Joinville (Joinville, Araquari, São Francisco do Sul, Garuva e Itapoá) onde dos 1422 casos de óbitos atendidos entre os anos de 2013 e 2015, os acidentes de trânsito abarcaram o maior número de vítimas, compreendendo 40,9% dos casos. Quanto ao gênero, a prevalência foi o masculino com 82,6%. Com relação à idade, observou-se uma média aproximada de 40 anos. O crescimento de 45,7% no número de homicídios em relação ao primeiro ano do levantamento evidencia alarmante incremento da violência na região atendida.

O homicídio foi também a natureza jurídica que compreendeu maior número de casos detectados na triagem toxicológica. Para acidentes de trânsito, suicídios e demais formas de morte, o percentual de detecção foi aproximadamente 20% menor. Entre as substâncias detectadas merecem destaque álcool, COC e THC. Os BDZ, Antidepressivos Tricíclicos (ADT), BARB, derivados anfetamínicos, combinações de polidrogas e demais substâncias agrupadas na classificação outras drogas completam o elenco das

substâncias detectadas em vítimas de mortes violentas no período avaliado.

A partir destes dados é possível conhecer o perfil dos óbitos atendidos e das substâncias detectadas nos exames toxicológicos podendo assim direcionar o planejamento da demanda de atendimento, adequação da infraestrutura e o desenvolvimento de técnicas analíticas compatíveis.

Muito além do âmbito institucional as informações compiladas contribuem, em ampla análise, para compreensão da relação de mortes violentas e uso drogas na região de Joinville e reflexão sobre as políticas públicas nas esferas da segurança e saúde relacionadas a esta temática.

Segundo o Mapa da Violência 2014, em análise das taxas de homicídios no Brasil entre 2001 e 2011, no último ano do levantamento o país atingiu o elevado patamar de 27,1 homicídios para cada 100.000 habitantes. Em SC a estimativa foi de 12,6 para cada 100.000 habitantes, porém não menos preocupante quando se observa o saldo de 797 mortes por homicídios em 2011 (WAISELFIZ, 2014).

Em levantamento realizado por Vermelho e Jorge (1996) sobre a mortalidade de jovens entre 1930 e 1991, constatou-se que até a década de 50 a maioria dos óbitos nas cidades do Rio de Janeiro e São Paulo estava vinculada à doenças infectocontagiosas, especialmente a tuberculose. A partir de 1960 ocorre a transição das mortes de causa violenta como homicídios, acidentes de trânsito e suicídio, para a primeira posição. Passadas duas décadas desta publicação, o número de óbitos por morte violenta segue em tendência ascendente no país e também na região de Joinville. Entre os anos de 2013 e 2015, período avaliado por este estudo, foi constatado um aumento de 20,6% no número de vítimas atendidas pelo IGP/Joinville. O acidente de trânsito é a natureza jurídica com maior percentual de vidas ceifadas, seguida pelo homicídio.

A prevalência de óbitos decorrentes de acidentes de trânsito atendidos pelo IGP/Joinville reflete as realidades nacional e mundial. O Mapa da Violência 2013 aponta dados alarmantes sobre o crescimento de mortes no trânsito no Brasil desde a década de 80. No período de 1980 a 2011 foram contabilizadas 980.838 vítimas (WAISELFIZ, 2013b). A Organização Mundial da Saúde (OMS) ressalta em relatório do mesmo tema, as elevadas taxas de mortes no

trânsito principalmente em países em desenvolvimento (WHO, 2013). O perfil predominante relatado nos dois documentos é do gênero masculino e faixa etária jovem. O levantamento brasileiro reportou média de 39,3 anos para vítimas em automóveis e 32,3 em motocicletas (WAISELFIZ, 2013b; WHO, 2013). Perfil semelhante foi constatado nos acidentes ocorridos na região de Joinville com predominância do gênero masculino (76%) e idade média de 37,9 anos.

A prevalência deste gênero em mortes violentas foi encontrada também em outros estudos como o de Sheehan e colaboradores (2013) que constatou a predominância de 77% de homens entre 5791 óbitos avaliados no período de 2004 a 2009 no Colorado (EUA). Os pesquisadores Darke, Duflou e Torok (2009), reportaram percentuais de 77% e 72,2% de vítimas masculinas para homicídios e suicídios, respectivamente, entre 1723 mortes violentas em Sydney (Austrália).

Para auxiliar na investigação da causa do óbito, os exames toxicológicos no domínio forense são de grande importância. Estes permitem ponderar a relação do uso de substâncias psicoativas às mortes violentas assim como o esclarecimento de mortes suspeitas sem causa aparente (TOMINAGA et al., 2015).

A elucidação destes óbitos a partir dos exames toxicológicos, passa pela etapa inicial de seleção e coleta das amostras apropriadas. A seleção irá depender do tipo de evento investigado e da disponibilidade de amostras. A coleta tem por objetivo a amostragem de parte representativa do todo, que permita a detecção de substâncias e a adequada interpretação dos achados analíticos (SKOPP, 2010). Amostras de sangue, urina, conteúdo gástrico e fígado estão entre as mais empregadas, entretanto, é o estado físico do corpo que irá determinar quais matrizes serão viáveis para coleta (DRUMMER, 2004; SKOPP, 2010).

Em consonância à literatura, o IGP/Joinville possui como protocolo a coleta de amostras de sangue e urina durante a realização da necropsia de mortes violentas. Em determinados casos com *causa mortis* a esclarecer, a coleta de conteúdo gástrico e fragmentos de tecidos é prática complementar. Nas ocorrências atendidas durante o período estudado, o maior percentual de amostras coletadas compreendeu os casos de homicídios e suicídios. Por outro lado, a categoria “outras formas de morte”, conforma a natureza jurídica

com menor percentual de coleta. As principais justificativas apresentadas nos laudos e registros de atendimento para a não realização da coleta foram óbitos ocorridos em ambiente hospitalar e cadáveres em avançado estágio de decomposição.

Nos casos de óbitos em ambiente hospitalar, uma provável causa da não realização da coleta atribui-se ao lapso temporal entre o evento inicial e a admissão no IML, bem como, a administração de medicamentos durante as manobras clínicas, que podem prejudicar a correlação dos achados com a causa do óbito (MADEA; MUSSHOF, 2007).

Foi constatado na rotina de atendimentos do IGP/Joinville que parte significativa das vítimas de morte violenta que vão a óbito em ambiente hospitalar, são oriundas de acidentes de trânsito. Estes, por sua vez, abarcam maior volume de vítimas atendidas pelo IML/Joinville (40,9%), podendo a internação hospitalar contribuir para o percentual de amostras não coletadas.

Em casos de avançado estágio de decomposição e carbonização, a disponibilidade de amostras é uma das limitações. Nos corpos em putrefação os tecidos geralmente estão bastante liquefeitos, sendo a coleta de fluídos biológicos prejudicada (DRUMER, 2004). Os politraumatismos são comuns em acidentes de trânsito, acidentes de trabalho ou quedas de altura (GONZÁLEZ-ROBLEDO et al., 2015). Em casos mais severos, com intensa perda de sangue, a coleta desta matriz pode ser comprometida.

Com relação às ossadas, apesar de relatada na literatura a realização de exames toxicológicos a partir da matriz óssea, fatores limitantes como a diversidade de substâncias que ficam impregnadas na matriz, a degradação de compostos e poucos estudos correlacionando os achados com os níveis sanguíneos, restringem seu emprego na rotina (McINTYRE et al., 2000).

Em 35,4% dos casos de não coleta de amostras biológicas não foram encontradas justificativas relacionadas. Não foi possível detectar a origem da inconsistência, todavia, sugere-se falha no registro de informações no software institucional. Vislumbra-se que os resultados obtidos pelo presente estudo possam fundamentar a necessidade de melhorias no sistema informatizado implantado.

Em estudo realizado em 2004 pela Universidade de São Paulo (USP) em parceria com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPS), foi identificado que a relação entre as drogas ilícitas e

violência urbana é estreita. Esta condição afeta principalmente jovens das periferias de grandes centros, o que determina altas taxas de homicídio, sobretudo entre jovens e adultos do gênero masculino, intimamente ligadas à fácil disponibilidade de armas de fogo e ao tráfico de drogas (PERES, 2004).

Para Beato Filho e colaboradores (2001) as mortes podem estar associadas diretamente aos efeitos das substâncias no comportamento do usuário, relacionadas às ações criminosas do dependente em busca de recursos para a manutenção do vício ou à violência gerada por traficantes nas relações de comércio ilegal destas drogas. Segundo os pesquisadores cerca de 55% dos homicídios ocorridos em Belo Horizonte, Minas Gerais, no ano de 1998, apresentavam relação com o uso ou tráfico de drogas. Em levantamento realizado na cidade de Salvador na Bahia em 1991, sobre índices de mortalidade por causas externas, 21,8 mortes a cada 100.000 habitantes estavam relacionadas ao tráfico de drogas (PAIM et al., 1999).

Estudos internacionais igualmente retratam estatísticas de violência e óbitos relacionados ao consumo e tráfico de drogas (McGINNIS; FOEGE, 1999). Em meta-análise realizada por Khuns e pesquisadores (2009) compilando publicações de cinco países, 11% das vítimas de homicídios apresentaram no exame toxicológico detecção de COC, 6% de THC e 5% de opiáceos. Em comparação, os homicídios atendidos no IGP/Joinville os números foram mais elevados para a COC (54,8%), a associação COC/THC (21%) e THC (23,6%), considerando-se os casos que envolviam uso concomitante de álcool.

Substâncias psicoativas podem comprometer a capacidade motora e cognitiva do usuário, interferindo na aptidão para a condução de veículos automotores (GIROTTO et al., 2014). A relação do álcool e acidentes de trânsito é consolidada, todavia, levantamentos têm demonstrado incidência de diversificadas substâncias em exames toxicológicos de motoristas envolvidos em acidentes graves ou fatais. Em estudo realizado por Gomez-Talegon e coautores (2012) com 3.302 motoristas na Espanha, as substâncias THC, COC e BZD foram detectadas em 7,7%, 3,5%, e 1,6% dos casos, respectivamente. Simonsen e pesquisadores (2013) analisaram amostras de sangue de 840 motoristas envolvidos em acidentes graves na Dinamarca, constatando a incidência de COC em 3,3%,

THC em 3,7%, derivados anfetamínicos em 5,4% e BDZ em 6,4% dos atendimentos. Este panorama se reproduz em trabalhos publicados em diversos países. Segundo revisão sistemática realizada por Giroto e colaboradores (2014), os 36 artigos analisados reportam incidência predominante de álcool, COC, derivados canabinóides e derivados anfetamínicos em amostras biológicas e a prevalência do gênero masculino nas publicações. O presente estudo reforça as estatísticas da literatura, com equivalente predomínio masculino e nos casos com detecção de álcool a prevalência de COC (44,1%), seguida por THC (29,4%), COC/THC (20,6%) e em menor percentual BDZ e ADT (2,9%).

Os suicídios foram responsáveis por 9,1% dos óbitos no período estudado, com predomínio do gênero masculino. Enquadram-se nesta natureza jurídica os casos de morte autoprovocada por meio de arma de fogo, enforcamento, medicamentos, venenos ou outros recursos. Em revisão sobre a relação entre o uso de substâncias psicoativas e suicídio, Wilcox, Conner e Caine (2004) avaliaram artigos americanos e europeus que assinalam maior suscetibilidade para dependentes de álcool, opióides, drogas injetáveis e uso de polidrogas. Pesquisadores do Instituto Nacional de Drogas de Abuso americano alertam sobre o consumo de drogas como fator de risco para o comportamento suicida, principalmente devido ao fato de dependentes químicos frequentemente apresentarem comorbidade de doenças como depressão, distúrbio bipolar e esquizofrenia (ERINOFF, COMPTON; VOLKOW, 2004). Dhossche e colaboradores (2001) avaliaram 333 amostras biológicas de vítimas de suicídio entre 1990 e 1998 no Alabama (EUA). Álcool, COC e THC foram detectados em respectivamente 33%, 8% e 7% dos casos. Na lista de substâncias encontradas, destacam-se ainda os BZD em 13% e antidepressivos em 20% dos casos. A diversidade de substâncias detectadas nas vítimas atendidas pelo IGP/Joinville foi semelhante aos estudos supracitados. Nos casos envolvendo a detecção de álcool destaca-se a exposição concomitante a COC (50%), THC (16,7%), BDZ (16,7%) e psicotrópicos variados qualificados como outras substâncias (16,7%).

Considerando a heterogeneidade dos óbitos classificados como outras formas de morte, não foram realizadas ponderações específicas para cada evento. Em linhas gerais, nos casos de

acidentes, a exemplo os de trabalho, com exame toxicológico positivo, pode-se inferir que o uso de substâncias psicoativas pode prejudicar o estado de alerta e a avaliação de riscos por parte do usuário (LHERMITTE et al., 2012).

A COC, substância de interesse para a validação de uma metodologia analítica no estudo em tela, foi a substância ilícita mais detectada em mortes violentas atendidas pelo IGP/Joinville entre os anos de 2013 e 2015. Este cenário não é diferente de outras regiões do país. Em estudo realizado por Toledo (1999) em vítimas de homicídios, suicídios e acidentes na cidade de São Paulo, 47,2% dos casos analisados apresentaram detecção de COC ou seu produto de biotransformação BE. Nos casos de homicídios a incidência da substância foi ainda maior, 68% (TOLEDO, 1999 apud TOLEDO, 2004). Nos óbitos analisados pelo presente trabalho a COC, isolada e em associação com THC, foi constatada em 33% das amostras sem a detecção de álcool, e, em 69,3% dos casos com exposição concomitante ao álcool. Já nos homicídios representou um percentual ainda maior, abarcando 75,8% considerando-se os casos com exposição conjunta ao álcool. O impacto da COC em mortes violentas fica evidente no estudo realizado por Marzuk e pesquisadores (1995) com 14.843 vítimas de lesões fatais em Nova Iorque entre os anos de 1990 a 1992. Do total de amostras de sangue e urina analisadas, 26,7% apresentaram resultado positivo para exposição à COC. Destes, 1/3 sofreram intoxicações fatais e 2/3 foram vitimados por homicídios, suicídios, acidentes de trânsito ou quedas.

Com relação ao produto de biotransformação da COC, CE, constatou-se maior ocorrência em acidentes de trânsito, outras formas de morte e homicídios. A maior frequência de CE em acidentes de trânsito está intimamente ligada à relação entre o consumo de álcool e a direção (GIROTTO et al., 2014).

Segundo Farré e pesquisadores (1993) a exposição concomitante ao álcool e COC além de dar origem ao CE, contribui para maiores concentrações plasmáticas de COC e NC. O mecanismo pode estar associado à inibição da biotransformação da COC na presença do álcool. Estas alterações nas concentrações da COC e determinados produtos de biotransformação podem contribuir para o aumento da toxicidade da combinação em relação ao uso de ambas as drogas isoladamente. O uso conjugado de álcool e COC é



prática comum entre os dependentes. Em uma amostra de 6.059 participantes da pesquisa americana sobre uso de drogas e saúde, entre os dependentes de álcool que fazem uso concomitante de substâncias ilícitas, foi relatada a prevalência de COC em 19% dos casos (HEDDEN et al., 2010). O aumento nos efeitos subjetivos relacionados ao uso da COC e álcool reforça a popularidade da associação dos dois compostos (HERBST et al., 2011). Entre as mortes violentas atendidas pelo IGP/Joinville o álcool e a COC abrangeram respectivos 62,8% e 27,7% dos casos com detecção de alguma substância.

Considerando a prevalência de COC e o significativo percentual de álcool constatados nas amostras biológicas de vítimas de mortes violentas atendidas pelo IGP/Joinville, somados à ausência de coleta em decorrência de limitadores como avançado estado de decomposição, carbonização e politraumatismos, abrangendo aproximadamente 10% dos casos atendidos, a implantação de metodologia para a detecção desta substância e seu produto de biotransformação, CE, em matriz alternativa confirma-se como demanda relevante para o setor de toxicologia forense. No presente estudo o método validado para a detecção de COC e CE em HV demonstrou precisão, seletividade para os compostos testados, boa detectabilidade e ausência de *carryover* considerando as concentrações médias dos analitos reportadas na literatura para esta matriz, na maioria dos casos na faixa de 100 a 300 ng/mL (ANTONIDES; KIELY; MARINETTI, 2007; MACKKEY-BOJACK et al., 2000; PERES et al., 2014).

Após a administração e absorção, a COC se distribui rapidamente para diferentes compartimentos mais irrigados como cérebro, pulmão, rins, e baço, seguido de coração, músculos e posteriormente para os menos permeados como a gordura (BORTOLOTTI et al., 2012; WHITE; LAMBE, 2003). A análise de diferentes matrizes pode corroborar para a estimativa do intercurso de exposição à substância, validação das concentrações sanguíneas encontradas e ampliação da janela de detecção. Enquanto os resultados de sangue e urina permitem avaliar a exposição no período de horas a dias, amostras de unha e cabelo podem fornecer dados de semanas a meses (JANICKA; KOT-WASIK; NAMIESNIK, 2010). Segundo Antonides, Kiely e Marinetti (2007) o HV por apresentar aparente demora na distribuição e ser mais

límpido em relação a matrizes como fígado e urina, pode ser adotado em laboratórios forenses como uma segunda matriz para a confirmação de exposição a COC e opióides.

Em estudo realizado com amostras biológicas de 18 vítimas fatais, usuárias de COC, Carvalho e pesquisadores (2013) demonstraram a equivalência de distribuição da substância entre amostras de cérebro (0,10-24,44 µg/g), sangue total (0,11-24,43 µg/mL) e HV (0,12-10,97 µg/mL), entretanto, ressaltam a importância da avaliação da concentração em diferentes compartimentos corpóreos para determinação da *causa mortis*.

O HV teve ampla aplicação na toxicologia forense para a determinação de álcool em casos onde a formação endógena do composto, devido ao processo de putrefação, era questionada. Com o passar dos anos, novas propostas como, por exemplo, a detecção de drogas de abuso, compostos bioquímicos e determinados eletrólitos, a consolidaram como relevante matriz alternativa (DRUMMER, 2004).

Sua composição predominantemente aquosa, cerca de 90-98%, permite a troca de substâncias com o sangue, e conseqüente boa correlação das concentrações de determinados xenobióticos entre os dois fluídos (COSTA et al., 2014). A menor suscetibilidade de contaminação e decomposição da amostra devido a sua posição anatômica e a coleta de fácil obtenção somam-se como pontos favoráveis para a utilização da matriz (COSTA et al., 2014, FUCCI, 2003). Em casos de corpos em avançado estado de decomposição e queimaduras extensas, o HV pode ser uma das poucas amostras disponíveis para coleta (DRUMMER, 2004). Entre os óbitos atendidos pelo IGP/Joinville, estas duas condições foram responsáveis por aproximadamente 10% dos casos sem a realização de exames toxicológicos por indisponibilidade de sangue e urina.

As ferramentas para a detecção de drogas em matrizes biológicas alternativas devem ser adaptadas para atenderem a particularidades como pouco volume e composição diferenciada destas amostras (CONE, 2001). Segundo Kataoka e Saito (2011) os analitos podem estar presentes em pequenas concentrações demandando além de instrumentação analítica compatível, o pré-tratamento adequado para extrair, isolar e concentrar os compostos de interesse. Os autores sugerem que a técnica ideal de preparação de amostra deve ser simples, rápida, seletiva, eficiente, livre de

solventes, reprodutível e com boa recuperação. Reforçam ainda sobre a capacidade de automatização e a separação e concentração simultânea de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos em meio aquoso.

Apesar de amplamente empregadas como técnicas de pré-concentração em amostras líquidas, a LLE e SPE apresentam fatores limitadores em sua execução. A LLE apresenta eficiência limitada quando se trata de analitos de polaridades diversificadas. A utilização de volumes de solventes potencialmente tóxicos e a possível formação de emulsão, figuram como desvantagens da técnica. Já a SPE apresenta como contraponto, maior número de etapas de processamento como o condicionamento do sorvente, tempo de eluição das amostras e ciclos de lavagem, e demanda adequada otimização do tipo e volume de solventes, ajustes de pH, tipo de sorvente e fluxo empregado (JANICKA; KOT-WASIK; NAMIESNIK, 2010).

A SPME contempla vantagens como simplicidade na execução, menor manipulação da amostra, boa sensibilidade, dispensa o emprego de solventes e de fácil automação permitindo a amostragem diretamente da matriz líquida para o analisador GC/MS (ALVAREZ et al., 2007; KATAOKA; SAITO, 2011; PRAGST, 2007). Os LDs e linearidade publicados são compatíveis ou superiores a outras técnicas consolidadas como SPE e LLE, por exemplo (SNOW, 2000). Algumas dificuldades são citadas com relação a interferentes da matriz e na extração de compostos muito polares (BERMEJO et al., 2006; PRAGST, 2007). Desde o seu desenvolvimento em 1990 (ARTHUR; PAWLISZYN, 1990), a técnica tem se expandido rapidamente em aplicações diversas como análise de fármacos (LORD; PAWLISZYN, 2000a), alimentos (BIANCHIN et al., 2014), pesticidas (MERIB et al., 2013), drogas de abuso (DENG et al., 2014; KATAOKA; SAITO, 2011) e contaminantes ambientais (MARTENDAL; CARASEK, 2011). Entre as inovações mais recentes destacam-se a análise *in vivo* e de alto rendimento (*high-throughput* em inglês) (KATAOKA; SAITO, 2011; SOUZA-SILVA et al., 2015).

Versátil, a SPME agrega as etapas de amostragem, extração e concentração dos analitos em um único processo (DENG et al., 2014). Segundo Kataoka e Saito (2011) a redução na manipulação da amostra nesta técnica minimiza potenciais fontes de erro e melhora a

acurácia e precisão do método. O mecanismo de extração é fundamentado no coeficiente de partição quando o equilíbrio entre a amostra e a fase extratora é estabelecido (BOYACI et al., 2014). A sensibilidade máxima é atingida no equilíbrio de partição, sendo diretamente proporcional a relação entre a concentração na amostra e a quantidade de analito extraída (KATAOKA; SAITO, 2011; LORD; PAWLISZYN, 2000b).

Para o desenvolvimento de método com emprego de SPME a escolha da fibra, tipo de exposição, ajustes de pH da matriz e condições de dessorção devem ser compatíveis com os analitos de interesse (PRAGST, 2007). A concentração do analito em cada fase no equilíbrio dependerá da afinidade do composto por ambas. Desta forma, quanto maior a afinidade do analito pela fase extratora em relação à matriz, maior será a quantidade de composto extraído (LORD; PAWLISZYN, 2000a). A escolha da fibra PDMS/DVB foi condicionada ao recurso disponível no laboratório. Classificada como fibra de revestimento misto, a fase extratora primária é um sólido poroso onde os analitos são extraídos por adsorção. Em geral revestimentos de polímeros porosos apresentam bons resultados para extração em matrizes lípidas ou de composição constante e com baixas concentrações de analitos (GORÉCKI; YU; PAWLISZYN, 1999).

O controle do pH através de tampão propicia melhor extração do analito pelo favorecimento de formas não ionizadas na solução (LORD; PAWLISZYN, 2000a). A recuperação de substâncias alcalinas como a COC é aprimorada em condições alcalinas (JUNTING; PENG; SUZUKI, 1998; SNOW, 2000). O tampão borato de pH 9,0 utilizado neste estudo foi equivalente ao empregado por Álvarez e colaboradores (2007) para a extração de COC e CE em plasma. Segundo os autores o tampão adotado apresentou bons resultados de recuperação e maior preservação da fibra.

Analitos de baixa volatilidade apresentam menor afinidade pela fase vapor (LORD; PAWLISZYN, 2000a), sendo compostos como a COC e CE melhor extraídos por DI-SPME, ponderando-se também o tipo de matriz (PRAGST, 2007). Na imersão direta da fibra, os analitos são extraídos da matriz líquida por sorção na fibra extratora, e posteriormente dessorvidos por evaporação em alta temperatura no injetor do GC/MS (PAWLISZYN, 2011; PRAGST, 2007). A fibra é exposta diretamente na solução a temperatura e

agitação constantes. Em matrizes aquosas, como o HV, a agitação reduz a zona de depleção formada entre a fibra e matriz à medida que os analitos vão sendo adsorvidos pela fibra, promovendo incremento na velocidade da extração (JUNTING; PENG; SUZUKI, 1998; LORD; PAWLISZYN, 2000b). Em sistemas automatizados a agitação ocorre por vibração do frasco e movimentação da fibra, promovendo redução substancial no tempo para se atingir o equilíbrio em relação à sistemas estáticos (PAWLISZYN, 1997).

Após a extração e concentração dos analitos a fibra é transferida para um instrumento analítico para a dessorção e posterior separação e detecção dos compostos (RISTICEVIC et al., 2009). A ferramenta mais comumente empregada é a cromatografia, sendo a GC/MS com SPME automatizado, de ampla aplicação na área forense (DENG et al., 2014; LORD; PAWLISZYN, 2000b; PRAGST, 2007).

A dessorção no injetor pode ser realizada no modo *split*, onde uma fração da amostra é injetada na coluna, ou *splitless*, com injeção da totalidade de amostra dessorvida. Este último é o mais adotado para análise de COC e CE em amostras biológicas (LORD; PAWLISZYN, 2000b; TOLEDO et al., 2003; YONAMINE; SAVIANO, 2006). A elevada temperatura do injetor, 250°C no estudo em tela, promove a rápida dessorção dos analitos por reduzir significativamente a constante de distribuição gás/revestimento e aumentar o coeficiente de difusão. Entre as análises é recomendado o pós-condicionamento da fibra a elevadas temperaturas para a limpeza de analitos residuais (LORD; PAWLISZYN, 2000b). O fabricante da fibra empregada adverte sobre a temperatura máxima de 270°C, para evitar comprometimento do material (SUPELCO®). A temperatura de 250°C durante 5 minutos de pós-condicionamento adotada no método proposto, apresentou boa resposta no que concerne a não conformação de *carryover* entre as análises na validação.

O laboratório de toxicologia do IGP/SC adota como rotina a varredura toxicológica em sangue e urina por imunoenaios e confirmação por GC/MS, métodos internacionalmente recomendados pela UNODC para análise de drogas ilícitas em amostras biológicas (UNODC, 1995).

Métodos para a detecção de COC e CE em HV empregando GC/MS e extração por SPE foram sugeridos por diversos autores

(ALVEAR et al., 2014; ANTONIDES; KIELY; MARINETTI, 2007; MACKEY-BOJACK et al., 2000; PERES et al., 2014). Já para a detecção de COC e CE por GC/MS e extração por SPME, destacam-se metodologias para plasma (ALVAREZ et al., 2007), cabelo (TOLEDO et al., 2003), urina (YONAMINE; SAVIANO, 2006), suor (FOLLADOR et al., 2004) e saliva (FUCCI; GIOVANNI; CHIAROTTI, 2003). Destarte, a carência de referências para detecção dos analitos de interesse empregando SPME e GC/MS na matriz estudada, e o objetivo de minimizar alterações na rotina já adotada no setor de toxicologia para a análise das matrizes de referência, fomentaram a avaliação da aplicação do método vigente para a matriz HV.

Etapa obrigatória para a avaliação da capacidade do método desenvolvido de fornecer resultados precisos e compatíveis para a aplicação pretendida, a validação na esfera forense deve ser ainda mais criteriosa, considerando que os dados fornecidos serão empregados em casos com imputação jurídica (TIWARI; TIWARI, 2010; WILLE et al., 2011).

Segundo o guia SWGTOX (2013), a validação deve ser empregada para novos métodos ou quando são promovidas alterações na aplicação das metodologias praticadas. O UNODC (2009) é mais específico recomendando a revalidação ou verificação do método caso seja empregado em novas situações como, por exemplo, uma matriz diferenciada. Os parâmetros avaliados dependem das circunstâncias e finalidade de utilização. Para ensaios qualitativos seletividade, limite de detecção, precisão e *carryover* estão entre os sugeridos em guias forenses internacionais e na legislação nacional (ANVISA, 2012; SWGTOX, 2013; UNODC, 2009). Em revisão sobre validação com base nos guias e normativas mundiais, González e colaboradores (2014) ressaltam que em grande parte estes documentos são mais conceituais e pouco precisos acerca da execução e avaliação dos parâmetros. Diante da carência de normativa nacional específica para laboratórios forenses, o presente trabalho teve como base as referências supracitadas e publicações científicas relacionadas ao tema.

Em ensaios analíticos é imprescindível estabelecer que a propriedade mensurada seja inerente ao analito de interesse e não a composto quimicamente ou fisicamente semelhante (EURACHEM, 2014). Para exames qualitativos em toxicologia forense a seletividade pode

ser interpretada como a ausência de sinais interferentes na detecção dos analitos de interesse (PETERS; DRUMMER; MUSSHOF, 2007). O guia UNODC (2009) reforça que o método proposto deve apresentar especificidade e seletividade, objetivando apresentar mínima ocorrência de falsos positivos na matriz analisada e preferencialmente nenhuma interferência de outros compostos no tempo de retenção dos analitos de interesse. Condição esta atingida nas replicatas analisadas, nas quais nenhum pico interferente foi detectado nos cromatogramas, assim como não houve alteração nas áreas do pico, o que poderia indicar uma possível coeluição, demonstrando que o método proposto é seletivo para os dois analitos estudados.

No contexto forense, o LD fornece limites de corte (*cut-off* em inglês) para as análises qualitativas importantes para a interpretação dos achados (WILLE et al., 2011). Segundo o guia Eurachem (2014), normalmente é suficiente para a validação estabelecer valores aproximados para LD em que a detecção do analito se torne dificultosa. O SWGTOX (2013) elenca diversificadas abordagens para a determinação do LD, entre elas, a utilização do *decision point*, compreendendo a determinação de uma concentração, por parte do analista, que atenda à demanda e a exequibilidade do método com precisão (SWGTOX, 2013). Considerando que trabalhos publicados reportam concentrações detectadas em HV de casos *post mortem* a partir de 30 ng/mL para COC e CE (ANTONIDES; KIELY; MARINETTI, 2007; MACKEY-BOJACK et al., 2000; PERES et al., 2014), a escolha da concentração de 5 ng/mL como *decision point*, torna-se adequada por compreender valor aproximadamente 6 vezes inferior às concentrações supracitadas. Neste sentido, a partir das análises da concentração de 5 ng/mL, observou-se que os valores de CVs das triplicatas das áreas obtidas nos testes foram inferiores a 20%, o que qualifica a concentração determinada pelo analista como analiticamente adequada para LD do método.

A precisão, outro parâmetro testado na validação, mensura o erro aleatório relacionado a um procedimento analítico, podendo ser expressa como DP, DP relativo ou CV (GONZÁLEZ et al., 2014; ROZET et al., 2011). Conceitualmente também pode ser descrita como o grau de concordância entre uma série de medições sob condições pré-estabelecidas (GONZÁLEZ et al., 2014; WILLE et al., 2011). Segundo Rozet e coautores (2011) para a avaliação da

repetibilidade todas as condições analíticas devem ser mantidas constantes. Desta forma, a variação obtida durante as análises de uma corrida pode ser considerada como natural ou intrínseca ao procedimento analítico. A metodologia adotada para a avaliação da precisão foi a descrita pela UNODC (2009), cujos CVs dos RTs das replicatas avaliadas foram significativamente inferiores aos  $\pm 2\%$  recomendados pela referência.

A conformação de efeito residual ou *carryover* pode prejudicar a precisão e exatidão do método (GONZÁLEZ et al., 2014; KOLIPARA et al., 2011). A origem da contaminação pode ser de aparatos instrumentais como injetor, detector, *liner*, coluna, seringa ou na fibra SPME (PERES, 2014; PRAGST, 2007). A ANVISA estabelece que o branco processado após a amostra do limite superior de quantificação não pode apresentar picos interferentes próximos ao RT do analito de interesse com resposta superior a 20% da resposta do analito no limite inferior de quantificação (LIQ). Segundo comparação realizada por González e coautores (2014) o guia EMEA apresenta abordagem semelhante a ANVISA, enquanto o FDA (2015) não menciona metodologia para a avaliação do parâmetro. O SWGTOX (2013) admite que seja avaliado o último ponto da curva de calibração, entretanto, concentrações mais elevadas são preferíveis.

No presente estudo as amostras branco analisadas posteriormente à triplicada de 750 ng/mL, não apresentaram picos nos RTs correspondentes a COC e CE. Por outro lado, quando avaliada a concentração de 1000 ng/mL foi observado *carryover* na amostra branco analisada posteriormente.

A fibra pode ser submetida à limpeza e recondicionamento térmico na unidade de condicionamento do autoamostrador. É recomendado o emprego de temperaturas de até 250°C para que a fase estacionária da fibra não seja danificada. A descontaminação do GC pode ser realizada a partir do aquecimento da coluna e injetor a elevadas temperaturas, procedimento denominado como *bake out* (PRAGST, 2007; WERCINSKI, 1999). Após a realização de aquecimento da coluna a 320°C durante 10 minutos e condicionamento da fibra a 250°C por 5 minutos, nenhum efeito residual foi observado na amostra branco analisada, mostrando-se eficientes os procedimentos empregados para descontaminação da fibra e do cromatógrafo.



Em amostras *post mortem* avaliadas por Peres e coautores (2014), as concentrações de COC e CE em HV variaram entre 30,81-267,64 ng/mL e 33,97-115,32 ng/mL, respectivamente. Antonides e pesquisadores (2007) compararam os resultados de 40 amostras de sangue e HV constatando a predominância de concentrações entre 50 e 500 ng/mL na matriz alternativa. Estes achados reforçam a viabilidade do método sem a manifestação de efeito residual na faixa de concentração testada.

A discrepância de detecção de COC em sangue e HV, em 2 dos 15 casos avaliados, pode ser explicada em parte pelos achados de estudo realizado por Moriya e Hashimoto (1996) sobre a estabilidade *post mortem* de COC e CE. Foi demonstrado que os dois compostos permanecem em maior concentração na respectiva sequência cérebro, fígado, tecido muscular e sangue, com significativa variação interindividual no momento do óbito. A COC degradou rapidamente no sangue e fígado, entretanto, aproximadamente 12,0-8,5% e 26,2% - 19,4% da concentração inicial permaneceram detectáveis no cérebro e tecido muscular, respectivamente, enquanto o CE degradou mais lentamente que a COC. Os pesquisadores demonstraram ainda que não há formação de CE *post mortem*. Em trabalho desenvolvido por Antonides, Kiely e Marinetti (2007) com 40 casos envolvendo a análise em sangue e HV, em 4 deles, ou seja 10%, a COC foi detectada somente na matriz alternativa. Para os autores o HV apresenta janela de detecção mais ampla para substâncias com  $t_{1/2}$  plasmática curta como a COC.

Entre as amostras avaliadas no presente estudo, o CE foi detectado em ambas as matrizes, sangue e HV, nos casos em que o composto estava presente. O achado foi reforçado pela constatação de álcool no sangue em todos os casos envolvendo a detecção do produto de biotransformação.

A não detecção dos analitos de interesse em amostras do grupo negativo, considerando o LD estipulado, reforça a confiabilidade do método proposto.

A aplicabilidade da matriz alternativa HV e a semelhança com as substâncias detectadas em amostras convencionais, constatada no presente estudo, está em consonância aos achados de Mackey-Bojack, Kloss e Apple (2000) que compararam a detecção de COC, BE, CE e etanol em HV e sangue de 62 casos forenses. Os autores não constataram diferença significativa entre as concentrações

médias obtidas para COC, CE e etanol nas matrizes, entretanto, relatam que CE apresentou menor correlação com os níveis sanguíneos. Já Duer, Spitz e McFarland (2006) demonstraram experimentalmente a rápida distribuição de COC entre o sangue e o HV e a forte correlação das concentrações do analito entre as duas matrizes.

Em avaliação da distribuição de COC no cérebro, HV e sangue, Carvalho e pesquisadores (2013) sugerem que a análise das concentrações de COC em diferentes compartimentos é essencial para a correta interpretação da correlação da substância com a causa morte. No presente estudo a detecção de COC em HV em dois casos sem a detecção em sangue, reforça a importância da diversificação das amostras analisadas, além da sua aplicabilidade na ausência das matrizes de referência.



## 6 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitiram concluir que:

- O levantamento acerca do perfil de óbitos violentos na região de maior concentração populacional do estado apontou prevalência de mortes violentas por acidente de trânsito e homicídios, com predominância para o sexo masculino e faixa etária adulta.

- A diversidade de substâncias encontradas nos exames toxicológicos foi equivalente a estudos publicados na literatura envolvendo óbitos por homicídios, acidentes de trânsito, suicídios e acidentes em geral. A COC lidera entre as substâncias proscritas mais detectadas, merecendo destaque também o THC e o álcool.

- Os achados aclaram a relação da COC, seja em casos com mais proximidade à violência como os homicídios, ou no uso recreacional ou dependência severa, presente nos casos de acidentes de trânsito e suicídio, ratificando a importância da consolidação de metodologias para a sua detecção.

- A necessidade da diversificação de amostras biológicas passíveis de análise ficou evidente, considerando-se a parcela de casos sem coleta de amostras biológicas em decorrência do avançado estado de decomposição, carbonização ou politraumatismos.

- O método validado para detecção dos analitos COC e CE em HV demonstrou precisão, seletividade, boa detectabilidade e ausência de *carryover* nas concentrações normalmente encontradas nesta matriz em casos forenses reportados na literatura.

- O método aplicado em casos *post mortem* mostrou-se como ferramenta alternativa útil para a detecção de COC e CE em casos de morte violenta, sendo de fácil execução, reprodutível, portanto passível de ser implantado no laboratório de toxicologia do IGP/SC.

- Os resultados demonstraram a relevância da diversificação de amostras para melhor correlação dos achados analíticos com o órbita e a aplicabilidade de HV na ausência das matrizes convencionais.

## REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR ISO/IEC 17025:2005**: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2005.

ALVEAR, E.; VON BAER, D.; MARDONES, C.; HITSCHFELD, A. Determination of cocaine and its major metabolite benzoylecgonine in several matrices obtained from deceased individuals with presumed drug consumption prior to death. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, v.23, p. 37-43, 2014.

ALVAREZ, I.; BERMEJO, A.M.; TABERNERO, M.J.; FERNANDEZ, P.; LOPEZ, P. Determination of cocaine and cocaethylene in plasma by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.845, p. 90-94, 2007.

ANTONIDES, H.M.; KIELY, E. R.; MARINETTI, L. J. Vitreous fluid quantification of opiates, cocaine, and benzoylecgonine: comparison of calibration curves in both blood and vitreous matrices with corresponding concentrations in blood. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 31, p. 469-476, 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC n.º 27, de 17 de maio de 2012. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/564310004b60537e891f9baf8fded4db/RDC+27+12+-Valida%C3%A7%C3%A3o+de+M%C3%A9todos+Bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 08 jan. 2016.

ARAUJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 2224-2234, 2009.

ARTHUR, C.L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Anal. Chem.**, v.62, p. 2145-2148, 1990.

AUGUSTO, F.; CARASEK, E.; SILVA, R.G.C.; RIVELLINO, S.R.; BATISTA, A.D.; MARTENDAL, E. New sorbents for extraction and microextraction techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2533-2542, 2010.

BASTOS, F. I.; CAIAFFA, W.; ROSSI, D.; VILA, M.; MALTA, M. The children of mama coca: Coca, cocaine and the fate of harm reduction in South America. **International Journal of Drug Policy**, v.18, p. 99-106, 2007.

BEATO FILHO, C.C; ASSUNÇÃO, R.M; SILVA, B.F.A.; MARINHO, F.C.; REIS, I.A; ALMEIDA, M.C.M. Conglomerados de homicídios e o tráfico de drogas em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, de 1995 a 1999. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 5, p.1163-1171, 2001.

BERMEJO, A.; LOPEZ, P.; ALVAREZ, I.; TABERNERO, M.J.; FERNANDEZ, P. Solid-phase microextraction for the determination of cocaine and cocaethylene in human hair by gas chromatography–mass spectrometry. **Forensic Science International**, v. 156, p. 2-8, 2006.

BIANCHIN, J.N.; NARDINI, G.; MERIB, J.; MARTENDAL, E.; CARASEK, E. Screening of volatile compounds in honey using a new sampling strategy combining multiple extraction temperatures in a single assay by HS-SPME-GC-MS. **Food Chem.**, v.145, p.1061-1065, 2014.

BORTOLOTTI, F.; GOTTARDO, R.; PASCALI, J.; TAGLIARO, F. Toxicokinetics of cocaine and metabolites: The forensic toxicological approach. **Current Medicinal Chemistry**, v, 19, p. 5658-5663, 2012.

BOYACI, E.; GORYNSKI, K.; RODRIGUEZ-LAFUENTE, A.; BOJKO, B.; PAWLISZYN, J. Introduction of solid-phase microextraction as a high-throughput sample preparation tool in laboratory analysis of prohibited substances. **Analytica Chimica Acta**, v. 809, p. 69-81, 2014.

BRASIL. Decreto-Lei nº 7179: Institui o Plano Integrado de Enfrentamento ao Crack e outras Drogas, cria o seu Comitê Gestor, e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, n. 96, p. 43, 2010a.

\_\_\_\_\_. Enfrentamento ao crack só é possível com união de esforços, 2010b. Disponível em: <http://portal.mj.gov.br/data/Pages/MJ4E0605EDITEMID4FD03CF59D98448284D5101475F1AF11PTBRIE.htm>. Acesso em: 10 dez 2014.

BROSÉUS, J.; GENTILE, N.; PONT, F.D.; GONGORA, J.M.G.; GASTE, L.T.; ESSEIVA, P. Qualitative, quantitative and temporal study of cutting agents for cocaine and heroin over 9 years. **Forensic Science International**, v. 257, p. 307-313, 2015.

CARVALHO, V. M.; FUKUSHIMA, A.R.; FONTES, L. R.; FUZINATO, D.V.; FLORIO, J.C.; CHASIN, A. A.M. Cocaine postmortem distribution in three brain structures: A comparison with whole blood and vitreous humour. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, v. 20, p.143-145, 2013.

CASALE, J. F; BOUDREAU, D.K.; JONES, L.M. Tropane ethyl esters in illicit cocaine: isolation, detection, and determination of new manufacturing by-products from the clandestine purification of crude cocaine base with ethanol. **J Forensic Sci**, v. 53, n. 3, p. 661-667, 2008.

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.

COLLEY, V.L.; CASALE, J.F. Differentiation of South American crack and domestic (US) crack cocaine via headspace-gas chromatography/mass spectrometry. **Drug Test. Analysis**, v. 7, p. 241-246, 2015.



CONE, E.J. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cocaine. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 19, p. 459-478, 1995.

\_\_\_\_\_. Legal, workplace, and treatment drug testing with alternate biological matrices on a global scale. **Forensic Sci Int.**, v. 15, n.121, p. 7-15, 2001.

COSTA, J.L.; MORRONE, A.R.; RESENDE, R.R.; CHASIN, A.A.; TAVARES, M.F. Development of a method for the analysis of drugs of abuse in vitreous humor by capillary electrophoresis with diode array detection (CE-DAD). **J Chromatogr B**, v. 945-946, p. 84-91, 2014.

COUTINHO, M. P. L.; ARAÚJO, L. F.; GONTIÈS, B. Uso da maconha e suas representações sociais: estudo comparativo entre universitários. **Psicologia em Estudo**, Maringá, v. 9, n. 3, p. 469-477, 2004.

CRUZ, M. S.; FERREIRA, S. M. B. Determinantes sócio-culturais do uso abusivo de álcool e outras drogas. In: **Álcool e drogas: usos, dependências e tratamentos**. Rio de Janeiro: Ed. Ipub-Cuca, p.95-113, 2001.

DARKE, S.; DUFLOU, J.; TOROK, M. Drugs and violent death: comparative toxicology of homicide and non-substance toxicity suicide victims. **Addiction**, v.104, p. 1000-1005, 2009.

DELAVERIS, G.J.M.; TEIGE, B.; ROGDE, S. Non-natural manners of death among users of illicit drugs: Substance findings. **Forensic Science International**, v. 238, p.16-21, 2014.

DE MARTINIS, B.S.; MARTIN, C.C.S. Automated headspace solid-phase microextraction and capillary gas chromatography analysis of ethanol in postmortem specimens. **Forensic Science International**, v.128, p.115-119, 2002.

DENG, J.; YANG, Y.; WANG, X.; LUAN, T. Strategies for coupling solid-phase microextraction with mass spectrometry. **Trends in Analytical Chemistry**, v.55, p. 55-67, 2014.

DHOSSCHE, D.M.; RICH, C.L.; ISACSSON, G. Psychoactive substances in suicides comparison of toxicologic findings in two samples. **The American Journal of Forensic Medicine and Pathology**, v. 22, n. 3, p. 239-243, 2001.

DRUMMER, O.H. Postmortem toxicology of drugs of abuse. **Forensic Science International**, v. 142, p. 101-113, 2004.

DRUMMER OH. Forensic toxicology. *EXS.* v.100, p.579-603, 2010.

DUER, E.C.; SPITZ, D.J.; MCFARLAND, S. Relationships between concentrations of cocaine and its hydrolysates in peripheral blood, heart blood, vitreous humor and urine. **J Forensic Sci.**, v. 51, n. 2, p. 421-425, 2006.

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.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). **Guideline on validation of bioanalytical methods Committee for medicinal products for human use (CHMP)**, 2011. Disponível em: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf). Acesso em: 08 jan. 2016.

ERINOFF, L.; COMPTON, W.M.; VOLKOW, N.D. Editorial: Drug abuse and suicidal behavior. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 76S p. S1-S2, 2004.

EURACHEM. **Guide: The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics**, 2014. Disponível em: [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org). Acesso em: 13 jan. 2016.

FARRE, M.; DE LA TORRE, R.; LLORENTE, M.; LAMAS, X.; UGENA, B.; SEGURA, J.; CAMI, J. Alcohol and cocaine

interactions in humans. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 266, n. 3, p. 1364-1373, 1993.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION U.S. Department of Health and Human Services. **Guidance for industry- Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics, 2015**. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm386366.pdf>. Acesso em: 08 jan. 2016.

FERNÁNDEZ, P.; SEOANE, S.; VASQUEZ, C.; BERMEJO, A.M.; CARRO, A.M.; LORENZO, R.A. A rapid analytical method based on microwave-assisted extraction for the determination of drugs of abuse in vitreous humor. **Anal Bioanal Chem**, v. 401 p. 2177-2186, 2011.

FERNANDES, R.M.T.; SANTOS JÚNIOR, J.C.; LOSS, C.G.; HÖEHR, N.F.; MOLLO FILHO, P.C.; GUIDUGLI, R.B.F.; EBERLIN, M.N. Development of MISPE-MS/MS method for cocaine and its metabolites in vitreous humor. In: **Abstracts / Toxicology Letters**, v. 221S, p. S59-S256, 2013.

FERREIRA, P. E.; MARTINI, R. K. Cocaína: lendas, história e abuso. **Rev Bras Psiquiatr.**, v. 23, n. 2, p. 96-99, 2001.

FOLLADOR, M.J.D; YONAMINE, M.; MOREAU, R.L.M., SILVA, O.A. Detection of cocaine and cocaethylene in sweat by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 811, p.37-40, 2004.

FUCCI, N.; GIOVANNI, N.; CHIAROTTI, M. Simultaneous detection of some drugs of abuse in saliva samples by SPME technique. **Forensic Science International**, v. 134, p. 40-45, 2003.

FUCCI, N.; DE GIOVANNI, N.; DE GIORGIO, F.; LIDDI, R.; CHIAROTTI, M. An evaluation of the Cozart1RapiScan system as an on-site screening tool for drugs of abuse in a non-conventional

biological matrix: vitreous humor. **Forensic Science International**, v. 156, p. 102-105, 2006.

FUKUSHIMA, A.R. CARVALHO, V.M.; CARVALHO, D.G; DIAZ, E.; BUSTILLOS, J.O.W.V; SPINOSA, H.S.; CHASIN, A.A.M. Purity and adulterant analysis of crack seizures in Brazil. **Forensic Science International**, v. 243, p. 95-98, 2014.

GALDURÓZ, J. C. F. Uso e Abuso de Drogas Psicotrópicas no Brasil, **Revista IMESC**, n. 3, p. 37-42, 2001.

GALDURÓZ, J. C. F.; NOTO, A. R.; NAPPO, S. A.; CARLINI, E. A. Uso de drogas psicotrópicas no Brasil: pesquisa domiciliar envolvendo as 107 maiores cidades do país - 2001. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, Ribeirão Preto, v. 13, p. 888-895, 2005.

GIROTTO, E.; MESAS, A.E.; ANDRADE, S.M.; BIROLIM, M.M. Psychoactive substance use by truck drivers: a systematic review. **Occup Environ Med.**, v. 71, p.71-76, 2014.

GOLDSTEIN, R.A.; DESLAURIERS, C.; BURDA, A.M. Cocaine: history, social implications, and toxicity--a review. **Dis Mon.**, v 55, n1, p. 6-38, 2009.

GOMEZ-TALEGON, T.; FIERRO, I.; GONZALEZ-LUQUE, J.C.; COLAS, M.; LOPEZ-RIVADULLA, M.; ALVAREZ, J. Prevalence of psychoactive substances, alcohol, illicit drugs, and medicines in Spanish drivers: A roadside study. **Forensic Science International**, v. 223, p.106-113, 2012.

GONZÁLEZ, O.; BLANCOA, M.E.; IRIARTE,G.; BARTOLOMÉD, L.; MAGUREGUIA, M.I; ALONSO, R.M. Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect. **Journal of Chromatography A**, v.1353, p.10-27, 2014.

GONZÁLEZ-ROBLEDO, J.; MARTÍN-GONZÁLEZ, F.; MORENO-GARCÍA, M.; SÁNCHEZ-BARBA, M.; SÁNCHEZ-

HERNÁNDEZ, F. Prognostic factors associated with mortality in patients with severe trauma: from prehospital care to the Intensive Care Unit. **Med Intensiva**, v. 39, n. 7, p. 412-421, 2015.

GÓRECKI, L.; YU, X.; PAWLISZYN, J. Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibres. **Analyst**, v. 124, p. 643-649, 1999.

HAN, E.G.; KIM, E.; HONG, H.; JEONG, S.; KIM, J.; IN, S.; CHUNG, H.; LEE, S. Evaluation of postmortem redistribution phenomena for commonly encountered drugs. **Forensic Science International**, v. 219, p. 265-271, 2012.

HARRIS, D.S.; EVERHART, E.T.; MENDELSON, J.; JONES, R.T. Drug and the pharmacology of cocaethylene in humans following cocaine and ethanol administration. **Alcohol Dependence**, v. 72, p. 169-182, 2003.

HEDDEN, S.L.; MARTINS, S.S.; MALCOLM, R.J.; FLOYD, L.; CAVANAUGH, C.E.; LATIMER, W.W. Patterns of illegal drug use among an adult alcohol dependent population: Results from the National Survey on Drug Use and Health. **Drug Alcohol Depend.**, v. 15, n. 106, p. 119-25, 2010.

HERBST, E.D.; HARRIS, D.S.; EVERHART, E.T.; MENDELSON, J.; JACOB, P.; JONES, R.T. Cocaethylene formation following ethanol and cocaine administration by different routes. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**, v. 19, n. 2, p. 95-104, 2011.

ISHIKAWA, A.A. **Desenvolvimento de metodologia analítica para a investigação de metileno-dióxi derivados em amostras de humor vítreo em vítimas fatais de acidente de trânsito**. Dissertação de mestrado, USP- Ribeirão Preto, 2011.

JANICKA, M.; KOT-WASIK, A.; NAMIESNIK, J. Analytical procedures for determination of cocaine and its metabolites in biological samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 209-224, 2010.

JOHNSON, E.L.; ZHANG, D.; EMCHE, S.D. Inter- and Intra specific Variation among Five Erythroxyllum Taxa Assessed by AFLP. **Annals of Botany**, v. 95, p. 601-608, 2005.

JUFER, R.A.; WALSH, S.T.; CONE, E.J. Cocaine and metabolite concentrations in plasma during repeated oral administration: development of a human laboratory model of chronic cocaine use. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 22, p. 435-444, 1998.

JUNTING, L.; PENG, C.; SUZUKI, O. Solid-phase microextraction (SPME) of drugs and poisons from biological samples. **Forensic Science International**, v. 97, p. 93-100, 1998.

KATAOKA, H.; SAITO, K. Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.54, p. 926-950, 2011.

KESSLER, F., PECHANSKY, F. Uma visão psiquiátrica sobre o fenômeno do crack na atualidade. **Rev Psiquiatr RS**, v. 30, n.2, p. 96-98, 2008.

KINTZ, P. Value of hair analysis in postmortem toxicology. **Forensic Science International**, v.142, p.127-134, 2004.

KOLLIPARA, S.; BENDE, G.; AGARWAL, N.; VARSHNEY, B.; PALIWAL, J. International guidelines for bioanalytical method validation: a comparison and discussion on current scenario. **Chromatographia**, v.73, p. 201-217, 2011.

KUHNS, J.B., WILSON, D.B., MAGUIRE, E.R., AINSWORTH, S.A., CLODFELTER, T.A. A meta-analysis of marijuana, cocaine and opiate toxicology study findings among homicide victims. **Addiction**, v.104, n.7, p.1122-1131, 2009.

LARANJEIRAS, R.; RATTO, L.; DUNN, J. Heroína: A próxima epidemia de drogas no Brasil? **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 46, p. 5-7, 1997.

LE GOFF, M.M.; BISHOP, P.N. Adult vitreous structure and postnatal changes. **Eye/Nature**, v.22, p.1214-1222, 2008.

LHERMITTE M.; FRIMAT, P.; LABAT L.; HAGUENOER, J.M. Use of illicit substances in the workplace. **Ann Pharm Fr.**, v. 70, n. 1, p. 3-14, 2012.

LOGAN, B.K.; STAFFORD, D.T. Direct analysis of anticonvulsant drugs in vitreous humour by hplc using a column switching technique. **Forensic Science International J.** v. 41, p.125-134, 1989.

LORD, H.; PAWLISZYN, J. Microextraction of drugs. **Journal of Chromatography A**, v. 902, p.17-63, 2000a.

\_\_\_\_\_. Evolution of solid-phase microextraction technology. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p.153-193, 2000b.

MACKAY-BOJACK, S.M.; KLOSS, J.; APPLE, F. Cocaine, Cocaine Metabolite, and Ethanol Concentrations in Postmortem Blood and Vitreous Humor. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 24, p. 59-65, 2000.

MADEA, B.; MUSSHOF, F. Postmortem biochemistry. **Forensic Science International**, v.165, p.165-171, 2007.

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. **Science and Justice**, v, 53, p. 425-432, 2013.

MALDANER, A.D.; BOTELHO, E.D.; ZACCA, J.J.; MELO, R.C.A.; COSTA, J.L.; ZANCANARO, I.; OLIVEIRA, C.S.L.; KASAKOFF, L.B.; PAIXÃO, T.R.L.C. Chemical Profiling of Street Cocaine from Different Brazilian Regions. **J. Braz. Chem. Soc.**, v,0, n, 0, p.1-8, 2015.

MALLETTE, J.R.; CASALE, J.F. Headspace-gas chromatographic-mass spectrometric analysis of South American commercial solvents and their use in the illicit conversion of cocaine base to cocaine hydrochloride. **J Forensic Sci**, v. 60, n. 1, p. 45-53, 2015.

MARCELO M.C.A.; MARIOTTI K.C.; FERRÃO, M.F.; ORTIZ R.S. Profiling cocaine by ATR-FTIR. **Forensic Science International**, v. 246, p. 65-71, 2015.

MARGALHO, C.; FRANCO, J.; CORTE-REAL, F., DUARTE, N. V. Illicit drugs in alternative biological specimens: A case report. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, v. 18, p.132-135, 2011.

MARTENDAL, E.; CARASEK, E. A new approach based on a combination of direct and headspace cold-fiber solid-phase microextraction modes in the same procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and phthalate esters in soil samples. **Journal of Chromatography A**, v.1218, n.13, p. 1707-1714, 2011.

MARZUK, P.M.; TARDIFF, K.; LEON, A.C.; HIRSCH, C.S.; STAJIC, M.; PORTERA, L.; HARTWELL, N.; IQBAL, M.I. Fatal injuries after cocaine use as a leading cause of death among young adults in New York city. **The New England Journal of Medicine**, v. 332, n.26, p. 1753-1757, 1995.

McENTYRE, L.M.; KING, C.V.; BORATTO, M.; DRUMMER, O.H. Post-mortem drug analyses in bone and bone marrow. **Ther Drug Monit.**, v. 22, n. 1, p. 79-83, 2000.

McGINNIS, J.M., FOEGE W.H. Mortality and morbidity attributable to use of addictive substances in the United States. **Proc Assoc Am Physicians.**, v.111, n. 2, p. 109-118, 1999.

MELO NETO, J.C. **Morte e vida Serverina (1955-1956) e outros poemas**. Rio de Janeiro: Objetiva, p. 93-94, 2007.



MERIB, J.; SIMÃO, V.; DIAS, A.N.; CARASEK, E. Simultaneous determination of trihalomethanes and organochlorinepesticides in water samples by direct immersion-headspace-solidphase microextraction. **Journal of Chromatography A**, v.1321, p. 30-37, 2013.

MISSE, M. O movimento: a constituição e reprodução das redes do mercado informal ilegal de drogas a varejo no Rio de Janeiro e seus efeitos de violência. In: **Drogas e pós-modernidade: faces de um tema proscrito**. Rio de Janeiro: Ed. UERJ, p. 147-156, 2003.

MORIYA, F.; HASHIMOTO, Y. Postmortem stability of cocaine and cocaethylene in blood and tissues of humans and rabbits. **J Forensic Sci.**, v.41, n. 4, p. 612-616, 1996.

\_\_\_\_\_. Criteria for judging whether postmortem blood drug concentrations can be used for toxicologic evaluation. **Legal Medicine**, v. 2, p. 143-151, 2000.

MUSSHOFF, F.; MADEA, B. New trends in hair analysis and scientific demands on validation and technical notes. **Forensic Science International**, v. 165, p. 204-215, 2007.

NAPPO, S. A.; GALDURÓZ, J. C.; NOTO, A.R. Crack use in São Paulo. **Subst Use Misuse**, v.31, n. 5, p. 565-79, 1996.

NAPPO, S.A.; GALDURÓZ, J.C.; RAYMUNDO, M.; CARLINI E.A. Changes in cocaine use as viewed by key informants: a qualitative study carried out in 1994 and 1999 in São Paulo, Brazil. **J Psychoactive Drugs**, v.33, n.3, p. 241-53, 2001.

NOTO, A. R.; GALDUROZ, J. C. O uso de drogas psicotrópicas e a prevenção no Brasil. **Ciênc. Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 1, p. 145-151, 1999.

OLIVEIRA, L. G.; NAPPO, S. A. Caracterização da cultura de crack na cidade de São Paulo: padrão de uso controlado. **Rev Saúde Pública**, v. 42, p. 664-71, 2008.

PAIM, J.S.; COSTA, M. C.; MASCARENHAS, J.C.; DA SILVA L.M. Regional distribution of violence: mortality from external causes in Salvador (Bahia). **Rev Panam Salud Publica**. v. 6, n. 5, p.321-32, 1999.

PAWLISZYN, J. **Solid phase microextraction: theory and practice**. New York: Wiley-VCH, 1997.

\_\_\_\_\_. **Handbook of solid phase microextraction**, Waterloo: Elsevier, 2011.

PELANDER, A.; RISTIMAA, J.; OJANPERÄ, A.. Vitreous humor as an alternative matrix for comprehensive drug screening in postmortem toxicology by liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 34, p. 312-318, 2010.

PERES, M.D. **Humor vítreo: uma matriz alternativa para a investigação de drogas post-mortem**. Tese de doutorado, USP-Ribeirão Preto, 2014.

PERES, M. D.; PELIÇÃO, F.S.; CALEFFI, B.; DE MARTINIS, B. S.. Simultaneous Quantification of Cocaine, Amphetamines, Opiates and Cannabinoids in Vitreous Humor. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 38, p. 39-45, 2014.

PERES, M.F.T. **Violência por armas de fogo no Brasil - Relatório Nacional**. São Paulo, Brasil: Núcleo de Estudos da Violência, Universidade de São Paulo, 2004.

PETERS, F.T.; DRUMMER, O.H.; MUSSHOFF, F. Validation of new methods. **Forensic Science International**, v.165, p. 216-224, 2007.

PICHINI S, ALTIERI I, ZUCCARO P, PACIFICI R. Drug monitoring in nonconventional biological fluids and matrices. **Clin Pharmacokinet.**, v. 30, n.3, p. 211-228, 1996.

PRAGST, F. Application of solid-phase microextraction in analytical toxicology. **Anal Bioanal Chem.**, v. 388, p.1393-1414, 2007.

REES, K. A.; POUNDER, D.J.; OSSELTON, D.M. Distribution of opiates in femoral blood and vitreous humour in heroin/morphine-related deaths. **Forensic Science International**, v. 226, p. 152-159, 2013.

RISTICEVIC, S.; NIRI, V.H.; VUCKOVIC, D.; PAWLISZYN, J. Recent developments in solid-phase microextraction. **Anal Bioanal Chem.**, v.393, p. 781-795, 2009.

ROCKWOOD, A.L.; JOHNSON-DAVIS, K.L. Mass spectrometry for clinical toxicology: therapeutic drug management and trace element analysis. **Clin Lab Med.**, v.31, n. 3, p. 407-428, 2011.

ROZET, E.; MARINI, R.D.; ZIEMONS, E.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, p. 848-858, 2011.

SANCHES L.R.; SEULIN, S.C.; LEYTON, V.; PARANHOS, B.A.; PASQUALUCCI, C.A.; MUÑOZ, D.R.; OSSELTON, M.D.; YONAMINE, M. Determination of opiates in whole blood and vitreous humor: a study of the matrix effect and an experimental design to optimize conditions for the enzymatic hydrolysis of glucuronides. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 36, p.162-170, 2012.

SANCHEZ, Z. M.; NAPPO, S. A. Seqüência de drogas consumidas por usuários de crack e fatores interferentes. **Rev Saúde Pública**, v. 36, n. 4, p. 420-30, 2002.

SCIENTIFIC WORKING GROUP FOR FORENSIC TOXICOLOGY (SWGTOX). **Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology**, 2013.

SKOPP, G. Postmortem toxicology. **Forensic Sci Med Pathol**, v. 6, p. 314-325, 2010.

SECRETARIA NACIONAL DE POLÍTICAS SOBRE DROGAS (SENAD). **II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país** : 2005 / E. A. Carlini (supervisão) [et. al.], -- São Paulo : CEBRID - Centro Brasileiro de Informação sobre Drogas Psicotrópicas: UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo. Brasília: SENAD, 2006.

\_\_\_\_\_. **VI Levantamento Nacional sobre o Consumo de Drogas Psicotrópicas entre Estudantes do Ensino Fundamental e Médio das Redes Pública e Privada de Ensino nas 27 Capitais Brasileiras – 2010**/ E. A. Carlini (supervisão) [et. al.], -- São Paulo: CEBRID - Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas: UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo 2010. Brasília – SENAD, 2010a. 503 p.

\_\_\_\_\_. **I Levantamento Nacional sobre o Uso de Álcool, Tabaco e Outras Drogas entre Universitários das 27 Capitais Brasileiras** / Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas; GREA/IPQ-HC/FMUSP; organizadores Arthur Guerra de Andrade, Paulina do Carmo Arruda Vieira Duarte, Lúcio Garcia de Oliveira. – Brasília: SENAD, 2010b. 284 p.

SECRETARIA NACIONAL DE SEGURANÇA PÚBLICA (SENASP). Ministério da Justiça investe na compra de equipamentos para perícia. Disponível em: [www.brasil.gov.br/defesa-e-seguranca/2014/02/ministerio-da-justica-repassa-equipamentos-para-pericias](http://www.brasil.gov.br/defesa-e-seguranca/2014/02/ministerio-da-justica-repassa-equipamentos-para-pericias). Acesso em: 13 jun. 2014.

SHEEHAN, C.M.; ROGERS, R.G; WILLIAMS, G.W.; BOARDMAN, J.D. Gender differences in the presence of drugs in violent deaths. **Addiction**, v. 108, p. 547-555, 2013.

SIMONSEN, K.W.; STEENTOFT, A.; BERNHOFT, I.M.; HELS, T.; RASMUSSEN, B.S.; LINNET, K. Psychoactive substances in seriously injured drivers in Denmark. **Forensic Science International**, n. 224, p.44-50, 2013.

SMITH, M.L.; VORCE, S.P.; HOLLER, J.M.; SHIMOMURA, E.; MAGLUILO, J.; JACOBS, A.J.; HUESTIS, M.A. Modern Instrumental Methods in Forensic Toxicology. **J Anal Toxicol.**, v. 31, n. 5, p. 237-239A, 2007.

SNOW, N.H. Solid-phase micro-extraction of drugs from biological matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p. 445-455, 2000.

SOUZA, J.; KANTORSKI, L. P. Embasamento político das concepções e práticas referentes às drogas no Brasil. SMAD. **Revista Electronica Saude Mental, Alcool e Drogas**, v. 3, n. 2, p. 1-16, 2007. Disponível em: <http://www.revistas.usp.br/smad/article/view/38656/41503>. Acesso em: 20 dez. 2015.

SOUZA-SILVA, E.A.; PAWLISZYN, J. Optimization of fiber coating structure enables direct immersion solid phase microextraction and high-throughput determination of complex samples. **Anal Chem.**, v. 84, n.16, p. 6933-6938, 2012.

SOUZA-SILVA, E.A.; REYES-GARCES, N.; GOMEZ-RIOS, G.A.; BOYACI, E.; BOJKO, B.; PAWLISZYN, J. A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices III. Bioanalytical and clinical applications. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 249-264, 2015.

STURNER, W.Q.; COUMBIS, R.J. The quantitation of ethyl alcohol in vitreous humor and blood by gas chromatography. **Am. J. Clin. Path.**, v. 46, p. 349-351, 1966.

SWIFT, P. G. F.; WORTHY, E.; EMERY, J.L. Biochemical state of the vitreous humour of infants at necropsy. **Archives of Disease in Childhood**, v.49, p. 680, 1974.

**SWGTOX- Scientific Working Group for Forensic**

**Toxicology.** Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology, 2013.

TIWARI, G.; TIWARI, R. Bioanalytical method validation: An updated review. **Pharm Methods**, v.1, n.1, p. 25-38, 2010.

TOLEDO, F.C.P. **Verificação do uso de cocaína por indivíduos vítimas de morte violenta na região de Bragantina-SP.** Dissertação de mestrado, USP- São Paulo, 2004.

TOLEDO, F.C.P., YONAMINE, M.; MOREAU, R.L. M.; SILVA, O.A. Determination of cocaine, benzoylecgonine and cocaethylene in human hair by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 798, p. 361-365, 2003.

TOMINAGA, M.; MICHIEU, T.; INAMORI-KAWAMOTO, O.; HISHMAT, A.M.; ORITANI, S.; TAKAMA, M.; ISHIKAWA T.; MAEDA, H. Efficacy of drug screening in forensic autopsy: Retrospective investigation of routine toxicological findings. **Leg Med (Tokyo)**, v.17, p. 172-176, 2015.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME (UNODC). **Recommended methods for the detection and assay of heroin, cannabinoids, cocaine, amphetamine, methamphetamine and ring-substituted amphetamine derivatives in biological samples.** New York, 1995. Disponível em: [http://www.unodc.org/pdf/publications/report\\_assay\\_1995-09-01\\_1.pdf](http://www.unodc.org/pdf/publications/report_assay_1995-09-01_1.pdf). Acesso em: 05 jan. 2016.

\_\_\_\_\_. **Methods for impurity profiling of heroin and cocaine-Manual for use by national drug testing laboratories.** United Nations, New York, 2005. Disponível em: [https://www.unodc.org/pdf/publications/report\\_st-nar-35.pdf](https://www.unodc.org/pdf/publications/report_st-nar-35.pdf). Acesso em: 10 dez. 2015.

\_\_\_\_\_. **Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in**

**Seized Materials and Biological Specimens**– United Nations, New York, 2009. Disponível em: [https://www.unodc.org/documents/scientific/validation\\_E.pdf](https://www.unodc.org/documents/scientific/validation_E.pdf). Acesso em: 05 jan. 2015.

\_\_\_\_\_. **Global study on homicide 2011**– United Nations, New York, 2011. Disponível em: [www.unodc.org/documents/data-and-analysis/statistics/Homicide/globa\\_study\\_on\\_homicide\\_2011\\_web.pdf](http://www.unodc.org/documents/data-and-analysis/statistics/Homicide/globa_study_on_homicide_2011_web.pdf). Acesso em: 13 jun. 2014.

\_\_\_\_\_. **World Drug Report 2014** – United Nations, New York, 2014. Disponível em: [https://www.unodc.org/documents/wdr2014/World\\_Drug\\_Report\\_2014\\_web.pdf](https://www.unodc.org/documents/wdr2014/World_Drug_Report_2014_web.pdf). Acesso em: 13 jun. 2014.

\_\_\_\_\_. **World Drug Report 2015** – United Nations, New York, 2015. Disponível em: [https://www.unodc.org/documents/wdr2015/World\\_Drug\\_Report\\_2015.pdf](https://www.unodc.org/documents/wdr2015/World_Drug_Report_2015.pdf). Acesso em: 10 out. 2015.

VALENTE, M.J.; CARVALHO, F.; BASTOS, M.L.; CARVALHO, M.; PINHO, P.G. Chromatographic methodologies for analysis of cocaine and its metabolites in biological matrices. **Gas Chromatography - Biochemicals, Narcotics and Essential Oils**. Porto-Portugal, p.163-194, 2012. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/gas-chromatography-biochemicals-narcotics-and-essential-oils/chromatographic-methodologies-for-analysis-of-cocaine-and-its-metabolites-in-biological-matrices>. Acesso em: 23 out. 2015.

VERMELHO, L.L.; JORGE, M.H.P.M. Mortalidade de jovens: análise do período de 1930 a 1991 (a transição epidemiológica para a violência). **Rev. Saúde Pública**, v. 30, n. 4, p. 319-31, 1996.

WAISELFISZ, J.J. **Mapa da violência 2013a: Homicídios e juventude no Brasil**. Disponível em: [www.mapadaviolencia.org.br/pdf2013/mapa2013\\_homicidios\\_juventude.pdf](http://www.mapadaviolencia.org.br/pdf2013/mapa2013_homicidios_juventude.pdf). Acesso em: 13 abr. 2014.

\_\_\_\_\_. **Mapa da violência 2013b: Acidentes de Trânsito e Motocicletas.** Disponível em: [http://www.mapadaviolencia.org.br/pdf2013/mapa2013\\_transito.pdf](http://www.mapadaviolencia.org.br/pdf2013/mapa2013_transito.pdf). Acesso em: 13 jan. 2016.

\_\_\_\_\_. **Mapa da violência 2014: Homicídios e Juventude no Brasil.** Atualização 15 a 29 anos. Disponível em: [http://www.mapadaviolencia.org.br/pdf2014/Mapa2014\\_Atualizacao\\_Homicidios.pdf](http://www.mapadaviolencia.org.br/pdf2014/Mapa2014_Atualizacao_Homicidios.pdf). Acesso em: 20 jan. 2016.

WANG, W.; DARWIN, W.D.; CONE, E.J. Simultaneous assay of cocaine, heroin and metabolites in hair, plasma, saliva and urine by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 660, p. 279-290, 1994.

WERCINSKI, S.A.S. **Solid phase microextraction: A practical guide.** New York: Dekker, 1999.

WHITE, S.M.; LAMBE, C.J.T. The pathophysiology of cocaine abuse. **Journal of Clinical Forensic Medicine**, v. 10, p. 27-39, 2003.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION **Global status report on road safety 2013: supporting a decade of action.** Switzerland, 2013. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44122/1/9789241563840\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44122/1/9789241563840_eng.pdf). Acesso em: 13 jan. 2016.

WIELENGA, V.; GILCHRIST, D. From gold-medal glory to prohibition: the early evolution of cocaine in the United Kingdom and the United States. **J R Soc Med.**, v. 0, p. 1-5, 2013.

WILCOX, H.C.; CONNERC, K.R.; CAINE, E.D. Association of alcohol and drug use disorders and completed suicide: an empirical review of cohort studies. **Drug and Alcohol Dependence**, v.76S, p. S11-S19, 2004.

WILLE, S.M.R.; PETERS, F.T.; DI FAZIO, V.; SAMYN, N. Practical aspects concerning validation and quality control for



forensic and clinical bioanalytical quantitative methods. **Accred Qual Assur.**, v.16, p. 279-292, 2011.

WINSLOW, T. **Retina**. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0022385/?figure=1>. Acesso em: 15 jul. 2015.

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

ZACCA, J.J.; BOTELHO, E.D.; VIEIRA, M.L.; ALMEIDA, F.L.A.; FERREIRA, L.S; MALDANER, A.O. Brazilian Federal Police drug chemical profiling - The PeQui Project. **Science and Justice**, v. 54, p. 300-306, 2014.

ZIMMERMAN, J.L. Cocaine Intoxication. **Crit Care Clin.**, v. 28, p.517-526, 2012.