**Amostra biológica não convencional na toxicologia forense: desenvolvimento, validação e aplicação de um método para identificar o consumo de cocaína (COC)**

**INTRODUÇÃO:** A cocaína (COC) é um alcaloide extraído da planta *Erythroxylon coca*, isolado em 1859 por Albert Niemann. Apesar de já ter sido utilizada para fins medicinais (FERREIRA; MARTINI, 2001), atualmente o uso recreativo tem se difundido virtiginosamente. As formas de administração mais comuns são a intranasal e intravenosa. No organismo a COC é biotransformada em diferentes compostos, sendo um dos majoritários a benzoilecgonina (BE) (FEROGOLO; SIGNOR, 2007). Considerando sua relação com a violência, a COC e seus metabólitos são analitos importantes para a toxicologia forense. Neste âmbito, as amostras biológicas mais utilizadas são sangue e urina. No entanto, possuem limitantes, como janela de detecção pequena e muitas vezes não estão disponíveis para coleta, como em cadáveres em estado avançado de decomposição. Assim, as amostras não convencionais como cabelo (CB) e unha ganham destaque. Além da ampla janela de detecção, chegando a meses, se distinguem devido a sua constituição, a qual as confere resistência, física e química, permitindo serem decompostas mais lentamente em um cadáver que outros tecidos, sendo muitas vezes a única opção para coleta (BALIKOVA, 2006 apud GORDO, 2013). Para a análise de compostos no CB faz-se necessária uma etapa de preparo da matriz, que engloba, por exemplo, o processo de extração. A Extração em Fase Sólida (EFS) é muito utilizada por, não formar emulsões, facilitar a automação e altos porcentuais de recuperação do analito (HERNÁNDEZ-BORGES et al., 2007). Para a etapa analítica, vários métodos estão disponíveis, dentre eles a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD). Esta técnica consiste na partição dos componentes de uma mistura (analitos) entre a Fase Móvel (FM) e a Fase Estacionária (FE), possibilitando separações bastante eficientes dos analitos (ANÁLISE INSTRUMENTAL CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO, 2000). Após o desenvolvimento da metodologia torna-se necessária sua validação para comprovação da sua efetividade e segurança analítica (UNODC, 2009). **OBJETIVOS:** Desenvolver, validar e aplicar um método para quantificação de COC e BE em amostras de CB por CLAE-DAD. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Na lavagem da amostra foi utilizada sequência de twenn 80 0,1% e diclorometano, submetidos ao banho de ultrasson (5min) seguido de enxague com água do tipo 1. A fragmentação foi realizada com tesoura seguida de pulverização com grau e pistilo de vidro. Alíquotas de 100mg de CB foram obtidas para a digestão. Nesta etapa, foram avaliadas 4 soluções digestoras: metanol (2mL), ácido clorídrico 0,1M (2mL), solução metanólica de ácido clorídrico 0,1M (2mL) e metanol (2ml) com ácido clorídrico 0,1M (1mL). Todas foram submetidas à 45ºC por 16 horas. Após, o sobrenadante foi recolhido, resfriado e elevado ao pH 6 com tampão fosfato 0,02M, para a EFS com cartuchos DSC-MCAX 300mg, 3mL (Sigma Aldrich®). Usou-se para o condicionamento 3mL de metanol, 3mL de tampão fosfato pH 6, seguido da aplicação da amostra, processo de lavagem com tampão fosfato pH 6, HCl 0,1M e metanol, 2mL de cada, e eluição da amostra com 2mL de amônio 5% em metanol. Para secagem foi empregado concentrador rotativo a vácuo. O resíduo foi ressuspendido em 250µL de acetato de amônio 10mM. As amostras foram analisadas por CLAE-DAD, com coluna C18 250mm x 4,6mm com poros de 5µm. A FM foi acetonitrila:acetato de amônio e eluida em modo gradiente 13:87 a 80:20, fluxo de 0,6mL/min. A articaína foi o Padrão Interno (PI). A validação contemplou: linearidade, limite de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão e exatidão, recuperação, especificidade/seletividade e *carryover*. Para a linearidade utilizou-se 5 concentrações (0,5, 2,5, 5, 7,5 e 10µg/mL), avaliando-as em 6 dias distintos. O LD e LQ foram calculados com as seguintes fórmulas: LD=SD x 3/α e LQ=SD x 10/α, onde SD representa o desvio padrão das 6 análises da concentração de 0,5µg/mL e “α” o coeficiente angular da curva de calibração. Para os parâmetros de precisão e exatidão foram analisadas 3 concentrações (baixa, média e alta – 1,5, 6 e 9µg/mL) em triplicatas e em 3 dias distintos. Para avaliação do primeiro, foram calculados os coeficientes de variação (CVs) em % para cada concentração, e para o segundo, seguiu-se a fórmula: exatidão(%)=CO/CE x 100, onde CO é a concentração obtida na análise e CE a esperada. Como critério de aceitação para ambos considerou-se 20% para a concentração mais baixa e 15% para as demais (UNODC, 2009). Quanto ao ensaio de recuperação, a 5 amostras brancas foram adicionados os padrões de CO e BE nas mesmas concentrações utilizadas para a precisão e exatidão (A1). Estas foram submetidas à ESF e na sequência foi adicionado o PI (A2) (5ug/mL). Paralelamente, 3 soluções para cada uma das 3 concentrações foram analisadas (A3) com o PI (A4) na mesma concentração das amostras de CB. Os valores de área obtidos foram aplicados na fórmula: recuperação(%)=[(A1/A2)/(A3/A4)] X 100. Na especificidade e seletividade foram avaliadas 10 amostras de fontes distintas de CB e 3 amostras com 14 compostos adicionados (nicotina, cafeína, tramadol, quetamina, morfina, midazolam, propofol, anfepramona, GHB, teofilina, fentanil, lidocaína, diazepam, haloperidol). Para o *carryover* amostras brancas foram analisadas imediatamente após as adicionadas de padrões na concentração de 50µg/mL. Verificou-se a presença de sinal nos tempos de retenção (TRs) dos analitos de interesse nas amostras brancas. O método foi aplicado em 22 amostras de CB de vítimas de morte violenta provenientes do Instituto Geral de Perícias de Joinville – IGP/Joinville-SC. **RESULTADOS:** Na digestão a melhor opção foi: 2mL de metanol com 1mL de HCl 0,1M. Para a linearidade obteve-se um r de 0,9993 para BE e 0,9995 para COC. Os LD e LQ em ng/mg de CB obtidos para BE e COC foram: 0,28, 0,27 e 0,95, 0,91, respectivamente. Para a precisão obteve-se um CV de 17,76 (BE) e 12,18 (COC) para a concentração mais baixa, 10,17 (BE) e 6,08 (COC) para a concentração média, e 7,13 (BE) e 3,96 (COC), para a concentração alta. A exatidão em percentual foi de 94 (BE) e 94,67 (COC) para a concentração de 1,5µg/mL, 94,33 (BE) e 100 (COC), para 6µg/mL, e 96,11 (BE) e 98,22 (COC) para 9µg/mL. Os percentuais de recuperação foram de 78 (BE) e 87,4 (COC) para a concentração mais baixa, 83,7 (BE) e 70,9 (COC) para a concentração média, e por fim, 95,2 (BE) e 82,8 (COC) para a concentração mais alta. Na especificidade e seletividade observou-se que amostras com tinta preta apresentaram muita interferência, inviabilizando a quantificação. Nenhum dos 14 compostos avaliados apresentou TR semelhante aos analitos de interesse. Entretanto, ocorreu similaridade nos TRs da lidocaína e do PI. No *carryover* observou-se contaminação da amostra branca analisada posteriormente a amostra adicionada de padrão a partir de 50µg/mL. Das 22 amostras reais, em 7 não foi detectado nada, em uma delas apenas COC e em outra somente BE. Nas 13 restantes foram detectadas BE e COC. As concentrações variaram de 0,93 a 49,21µg/mL de BE e 0,87 a 50,82µg/mL de COC. **DISCUSSÃO:** Os resultados da otimização da solução digestora corroboram com os obtidos por Barroso et al. (2008). Com relação ao processo de validação, o método mostrou-se linear na faixa de concentração selecionada para ambos analitos. Os LD e LQ são considerados baixos ponderando o equipamento utilizado. Os parâmetros de precisão e exatidão apresentaram bons resultados, aceitos pelo guia da UNODC (2009). Ainda conforme este guia, os percentuais de recuperação devem variar em 15%, o que não ocorreu em todas as concentrações avaliadas. No entanto, os valores foram próximos ao estabelecido, não inviabilizando a utilização do método. A EFS é amplamente utilizada e fornece recuperações maiores que outros procedimentos, como a extração líquido-líquido (HERNÁNDEZ-BORGES et al., 2007). Os resultados da especificidade e seletividade demonstraram a necessidade de buscar alternativas para quantificação em amostras com tintura. Alguns autores relatam essa possibilidade de interferência e fundamentam que os compostos da tintura de cabelo possuem características básicas, igual à COC (JURADO et al., 1997). A coeluição da lidocaína com o PI ocorreu provavelmente porque ambos possuem estruturas químicas semelhantes. O uso do PI é uma recomendação em métodos quantitativos para auxiliar o analista a reduzir erros intrínsecos ao método, não sendo obrigatório (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1997). Assim, a coeluição não impede a utilização do método, somente o uso do PI nesta análise específica. Dos 14 compostos analisados, nenhum apresentou TR próximo dos analitos de interesse, tornado o método seletivo e específico. Após constatar-se contaminação no *carryover* esta foi eliminada modificando o método de lavagem da seringa e agulha de injeção das amostras. O solvente foi alterado para acetonitrila e o volume aumentando para 5mL. **CONCLUSÃO:** O método desenvolvido e validado para quantificação de COC e BE em CB demostrou linearidade na faixa de trabalho selecionada, boa precisão e exatidão. Apresentou recuperação aceitável e boa sensibilidade e especificidade. Mostrou-se igualmente eficiente na quantificação de BE e COC em amostras provenientes de vítimas de morte violenta. O presente método demonstrou ser uma importante ferramenta para o âmbito forense. O seu emprego viabiliza o uso de uma amostra biológica não convencional, muitas vezes a única matriz biológica disponível para análise toxicológica forense.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. (UNODC) United Nations Office on Drugs and Crime. **Guidance for theValidationofAnalyticalMethodologyandCalibrationofEquipmentused for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens.**Viena: United Nation, 2009. 67 p.
2. **ANÁLISE INSTRUMENTAL CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO.**Rio de Janeiro:Cefet-quÍmica, 2000. 29 p. Disponível em: <http://www.ifrj.edu.br/webfm\_send/546>. Acesso em: 09 maio 2015.
3. BARROSO, M. et al. Development and validation of an analytical method for the simultaneous determination of cocaine and its main metabolite, benzoylecgonine, in human hair by gas chromatography/mass spectrometry. **Rapid Communications In Mass Spectrometry,**[s.l.], v. 22, n. 20, p.3320-3326, 30 out. 2008. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/rcm.3738>.
4. COLLINS, Carol H.; BRAGA, Gilberto L.; BONATO, Pierina S. **Introdução a Métodos Cromatográficos.**Campinas: Unicamp, 1997.
5. FERIGOLO, Maristela; SIGNOR, Luciana. **Cocaína.**2007. Disponível em:<http://www.ibb.unesp.br/Home/UnidadesAuxiliares/CentrodeAssistenciaToxicologica-CEATOX/cocaina.pdf>. Acesso em: 15 jul. 2017.
6. FERREIRA, Pedro Eugênio M; MARTINI, Rodrigo K. Cocaína: lendas, história e abuso. **Revista Brasileira de Psiquiatria,**Porto Alegre, v. 2, n. 23, p.96-99, jan. 2001.
7. GORDO, José Miguel de Oliveira. **O cabelo como amostra biológica em toxicologia forense: colheita, análise e áreas de aplicação.**2013. 87 f. Dissertação (Mestrado)-Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2013.
8. HERNÁNDEZ-BORGES, Javier et al. Sample treatments prior to capillary electrophoresis–mass spectrometry. **Journal Of Chromatography A,**[s.l.], v. 1153, n. 1-2, p.214-226, jun. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2006.10.070>.
9. JURADO, C. et al. Influence of the cosmetic treatment of hair on drug testing. **International Jornal Of Legal Medicine,**Sevilha, v. 1, n. 110, p.159-163, jan. 1997.