

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Thaís Spohr Christ

**Padronização e implantação de método
analítico para detecção de cocaína e
metabólitos, em amostras de urina,
utilizando cromatografia gasosa
acoplada à espectrometria de massas
(CG-EM)**

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

**Porto Alegre
2016**

Thaís Spohr Christ

Padronização e implantação de método analítico para detecção de cocaína e metabólitos, em amostras de urina, utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Dallegrave
Co-orientadoras: Profa. Dra. Sandra Manoela Dias Macedo
Profa. Ma. Viviane Cristina Sebben

Porto Alegre,
2016

Catálogo na Publicação

Christ, Thais Spohr

Padronização e implantação de método analítico para detecção de cocaína e metabólitos, em amostras de urina, utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) / Thais Spohr Christ. -- 2016.

115 p. : 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2016.

Orientador(a): Eliane Dallegrave ; coorientador(a): Sandra Manoela Dias Macedo, Viviane Cristina Sebben.

1. Cocaína. 2. Benzoilecgonina. 3. CG-EM. 4. SPE. 5. Éster metilandroecgonina. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (CIT/FEPPS) o qual disponibilizou todos os equipamentos e materiais necessários para a realização dos experimentos práticos para a elaboração da presente dissertação.

As Profas. Dras. Eliane Dallegrave e Sandra Macedo, pela paciência, confiança, amor pela profissão, dedicação, amizade e oportunidade de realizar esta dissertação.

A Profa. Ma. Viviane Sebben, por ter me orientado durante todo o período de análises no NAL, pela amizade, paciência e principalmente pela confiança.

Ao diretor do CIT, Alberto Nicolella, por permitir e apoiar o desenvolvimento do projeto no NAL-CIT/FEPPS.

A Renata Vianna, por me dar apoio técnico, científico, pessoal... Pela admiração, competência, mas principalmente pela amizade!

A Bruna Galle, que mesmo distante, esteve presente em todos os momentos. Obrigada por ser compreensiva e por me incentivar.

A Tati Oliveira, pela paciência, dedicação, confiança e principalmente pela amizade. Tua ajuda foi essencial durante todo esse trajeto!

Aos meus pais e irmão, por sempre me ensinar que o melhor caminho a ser seguido é o da busca pela educação. Pelo amor, carinho e compreensão. Muito obrigada!

A Elói da Rosa Soares Junior, pelo amor, apoio e compreensão durante esta etapa acadêmica.

Ao grupo do CIT, por me acolherem durante o período de desenvolvimento dos experimentos. Muito obrigada pela amizade!

A todo o pessoal do NAL: Iolanda Sebben, Sandra Costa, Paula Isoppo, Gabriela Acevedo e Evandro Postal, por me apoiarem durante o desenvolvimento analítico do projeto.

A Ananda Betto e Isa Cattoi, por se prontificarem a ouvir todas as reclamações possíveis... Muito obrigada pela amizade e admiração!

Enfim, muito obrigada a todos aqueles que de alguma forma se envolveram no desenvolvimento e redação deste trabalho.

“Qualquer coisa é possível se você tiver coragem.” – **J.K. Rowling**

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XII
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 REVISÃO DA LITERATURA	17
1.1.1 <i>Cocaína</i>	17
1.1.1.1 Apresentações da cocaína	18
1.1.1.2 Toxicocinética	20
1.1.1.3 Toxicodinâmica e efeitos tóxicos	23
1.1.1.4 Dependência e tolerância	26
1.1.1.5 Principais adulterantes da cocaína	27
1.1.2 <i>Metodologias analíticas</i>	29
1.1.2.1 Imunocromatografia (IC)	29
1.1.2.2 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)	30
1.1.2.3 Valores de <i>cutoff</i> para detecção de cocaína e metabólitos em amostras de urina	31
1.1.3 <i>Controle de qualidade</i>	31
1.1.3.1 Controle interno de qualidade	32
1.1.3.2 Controle externo de qualidade	32
1.1.4 <i>Preparo de amostras</i>	32
1.1.4.1 Extração em fase sólida (SPE)	32
1.1.5 <i>Derivatização para cromatografia gasosa</i>	34
1.2 JUSTIFICATIVA	37
1.3 MATERIAL E MÉTODOS	37
1.3.1 <i>Grupos amostrais</i>	37
1.3.2 <i>Equipamentos, acessórios e reagentes</i>	38
1.3.3 <i>Análises de triagem por imunocromatografia</i>	39
1.3.4 <i>Análises confirmatórias por CG-EM</i>	39
1.3.5 <i>Estudo do melhor Reagente de derivatização (RD) e melhor sistema solvente (SS), melhor volume de amostra (VA) e tempo de estabilidade do derivado formado (TED)</i>	40
1.3.5.1 Reagentes de derivatização (RD)	40
1.3.5.2 Sistemas de Solventes (SS)	41
1.3.5.3 Volume de Amostra (VA)	41
1.3.5.4 Tempo de estabilidade do derivado formado (TED)	42
1.3.6 <i>Método de extração</i>	42
1.3.6.1 Extração em fase sólida (SPE)	43
1.3.7 <i>Cutoff do método</i>	44
1.3.8 <i>Utilização do AMDIS</i>	45
1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
1.4.1 <i>Resultados obtidos na análise de triagem por imunocromatografia</i>	45
1.4.2 <i>Escolha do melhor reagente de derivatização (RD) e melhor sistema solvente (SS), do volume de amostra a ser utilizado (VA) e determinação do Tempo de Estabilidade do Derivado Formado (TED)</i>	47
1.4.2.1 Melhor reagente de derivatização (RD)	47
1.4.2.2 Melhor sistema de solvente (SS)	50
1.4.2.3 Melhor volume de amostra (VA)	51
1.4.2.4 Tempo de Estabilidade do Derivado formado (TED)	53
1.4.3 <i>Método de extração</i>	54
1.4.3.1 Extração em fase sólida (SPE)	54
1.4.4 <i>Interferência da clorpromazina</i>	55
1.4.5 <i>Cutoff do método</i>	56
1.4.6 <i>Controle de qualidade do método</i>	57
1.4.6.1 Controle interno de qualidade	57
1.4.6.2 Controle externo de qualidade	59

1.4.7	<i>Identificação do levamisol em amostra de paciente</i>	60
1.4.8	<i>Cromatograma de amostra de paciente</i>	61
1.4.9	<i>Avaliação das metodologias analíticas</i>	61
1.5	CONCLUSÃO.....	65
1.6	REFERÊNCIAS.....	66
2	OBJETIVOS	74
2.1	OBJETIVOS GERAIS	74
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	74
3	ARTIGO CIENTÍFICO EM INGLÊS	75
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
5	APÊNDICES E ANEXO	77
	APÊNDICE A.....	77
	APÊNDICE B.....	78
	APÊNDICE C	79
	APÊNDICE D	80
	APÊNDICE E.....	81
	APÊNDICE F.....	82
	APÊNDICE G	83
	ANEXO A	84
	ANEXO B	86

LISTA DE ABREVIATURAS

AMDIS	Do inglês, <i>Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System</i> .
BE	Benzoilecgonina
BSTFA + TMCS	N,O-bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida + Trimetilclorosilano
BSTFA	N,O-bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida
CE	Cocaetileno
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
COC	Cocaína
DA	Dopamina
EMA	Éster metilanidroecgonina
EME	Éster metilecgonina
EUA	Estados Unidos da América
eV	Elétron volt
HFBA	Ácido heptafluorobutírico anidrido
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
IE	Impacto Eletrônico
LC-MS	Do inglês, <i>Liquid Chromatography</i>
MBTFA	N-metil-N-bis(trifluoroacetamida)
MSTFA	N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida
MTBSTFA	N-(tert-Butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida
MTBSTFA+TMCS	N-Metil-N-tert-Butildimetilsililtrifluoroacetamida + trimetilclorosilano
NA	Noradrenalina
NAc	Núcleo Accumbens
NAL-CIT/FEPPS	Núcleo de Análise Laboratorial / Centro de Informação Toxicológica / Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
PFPA	Ácido pentafluoropropiônico anidrido
PNCQ	Programa Nacional de Controle de Qualidade
RD	Reagente de Derivatização
RIQAS	Do inglês, <i>Randox International Quality Assessment Schemes</i>
SCAN	Modo de varredura total
SIM	Do inglês, <i>Selected Ion Monitoring</i>
SPE	Do inglês, <i>Solid Phase Extraction</i>
SS	Sistema(s) Solvente(s)
TBDMS	Tertbutildimetilsilil
TED	Tempo de Estabilidade do Derivado
TFAA	Ácido trifluoroacético anidrido
TMS	Trimetilsilil
TR	Tempo de Retenção
u.m.a	Unidade de massa atômica
UFCSPA	Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
VA	Volume de Amostra
VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular da cocaína.....	17
Figura 2 – Vias de obtenção da cocaína.....	19
Figura 3 – Níveis plasmáticos de cocaína.....	21
Figura 4- Biotransformação da cocaína administrada em humanos.....	23
Figura 5 - Principais distúrbios causados pelo uso de COC.....	25
Figura 6 - Resultados obtidos com tiras de imunocromatografia para COC e metabólitos.....	30
Figura 7 - Etapas que constituem a SPE.....	33
Figura 8 - Organograma dos grupos amostrais.....	38
Figura 9 - Realização dos testes de melhor sistema solvente e melhor volume de amostra.....	42
Figura 10 - Protocolo de SPE para 5 mL de urina.....	43
Figura 11 - Protocolo de SPE para 2,5 mL de urina.....	44
Figura 12 - Resultados obtidos com as tiras individuais de imunocromatografia para COC e metabólitos com <i>cutoff</i> de 150ng/mL.....	46
Figura 13 - Reação de derivatização da BE com MTBSTFA.....	47
Figura 14 - Reação de derivatização do EME com MTBSTFA.....	48
Figura 15 - Cromatograma e espectro de massas de amostra derivatizada com BSTFA.....	49
Figura 16 - Cromatograma e espectro de massas de amostra derivatizada com MTBSTFA.....	49
Figura 17 - Cromatograma e espectro de massas de amostra positiva para benzoilecgonina em SCAN (5 mL de amostra) extraída com o SS (1).....	50
Figura 18 - Cromatograma e espectro de massas de amostra positiva para benzoilecgonina em SCAN (5 mL de amostra) extraída com o SS (2).....	51
Figura 19 - Cromatograma e espectro de massas de amostra positiva para benzoilecgonina em SCAN (5 mL de amostra).....	52
Figura 20 - Cromatograma e espectro de massas de amostra positiva para benzoilecgonina em SCAN (2,5 mL de amostra).....	52
Figura 21 - Cromatogramas sobrepostos do derivado obtido armazenado em freezer (-20°C) por período de duas semanas.....	54
Figura 22 - Estrutura molecular da clorpromazina e da benzoilecgonina.....	55
Figura 23 - Espectro de massas obtido de amostra com benzoilecgonina-TBDMS e clorpromazina coeluídas utilizando o AMDIS.....	55

Figura 24 - Cromatogramas sobrepostos de amostras de urina negativas fortificadas com EMA nas concentrações de 100 ng/mL, 150 ng/mL e 300 ng/mL	56
Figura 25 - Cromatogramas sobrepostos de amostras de urina negativas fortificadas com COC-d ₃ nas concentrações de 100 ng/mL, 150 ng/mL e 300 ng/mL.....	57
Figura 26 – Cromatograma e espectro de massas do CI de BE	58
Figura 27 - Cromatograma e espectro de massas do CI de EMA	58
Figura 28 – Cromatograma e espectro de massas do CI de COC-d ₃	59
Figura 29 - Razões m/z das moléculas de COC e COC-d ₃	59
Figura 30 – Cromatograma e espectro de massas de amostra do ensaio de proficiência RIQAS na concentração de 100 ng/mL.....	60
Figura 31 - Cromatogramas e espectro de massas de amostra positivas para cocaína e metabólitos com presença de levamisol	60
Figura 32 - Cromatograma e espectro de massas do padrão de levamisol	61
Figura 33 - Cromatograma de amostra de paciente.....	61
Figura 34 - Resultados obtidos com a confirmação por CG-EM de todas as amostras analisadas com IC.....	63
Figura 35 - Protocolo final de extração por SPE para cocaína e metabólitos em amostras de urina.....	79
Figura 36 - Resultados (cromatogramas e espectros) obtidos com o AMDIS para amostra derivatizada com MTBSTFA.....	80
Figura 37 - Resultados (cromatogramas e espectros) obtidos com o AMDIS para amostra derivatizada com BSTFA.....	81
Figura 38 - Autorização do comitê de ética em pesquisa.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Principais agentes de sililação	35
Tabela 2 - Principais agentes de acilação	36
Tabela 3 - Íons de identificação e tempo de retenção dos analitos	40
Tabela 4 - Área do pico de BE, amostra em amostrador (25°C)	53
Tabela 5 - Área do pico de BE, amostra em freezer (-20°C)	53
Tabela 6 - Resultados obtidos com a confirmação por CG-EM de todas as amostras analisadas com IC	63
Tabela 7 - Resultados obtidos com a não confirmação de amostras duvidosas	64
Tabela 8 - Reagentes utilizados na derivatização da Benzoilecgonina e os derivados	77
Tabela 9 - Reagentes utilizados na derivatização do Éster metilecgonina e os derivados formados	78
Tabela 10 - SPE com sistema solvente diclorometano : isopropanol : hidróxido de amônio com 5 mL de amostra	82
Tabela 11 - SPE com sistema solvente diclorometano : isopropanol : hidróxido de amônio com 2 mL de amostra	82
Tabela 12 -SPE com sistema solvente metanol : isopropanol : hidróxido de amônio com 5 mL de amostra	83
Tabela 13 - SPE com sistema solvente metanol : isopropanol : hidróxido de amônio com 2,5 mL de amostra	83

RESUMO

O consumo de cocaína no Brasil, ao contrário da tendência mundial de retração, tem aumentado ao longo dos anos. Pelo fato de ser uma substância proscrita, com alto poder para a dependência química e problemas relacionados ao uso, e pela existência de resultados falso-positivos nas análises de triagem por imunocromatografia, fazem-se necessárias a padronização e implantação de técnicas confirmatórias para a detecção de cocaína. Dessa forma, o presente trabalho teve o objetivo de padronizar e implantar, no Núcleo de Análise Laboratorial do Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul (NAL-CIT/RS) e na Central Analítica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), um método confirmatório, simples e rápido, para a detecção e identificação de cocaína, metabólitos e derivados (benzoilecgonina, éster metilecgonina, cocaetileno e éster metilanidroecgonina) em amostras de urina por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Devido às peculiaridades do analito, deu-se início com o estudo de tratamento da amostra, o qual foi realizado por meio das etapas de pré-concentração, purificação, extração e derivatização, no intuito de fornecer um extrato límpido/ livre de impurezas, para que assim houvesse um aumento na sensibilidade, linearidade e seletividade analítica. O método de extração utilizado foi: extração em fase sólida (SPE). Os resultados do estudo indicam que o MTBSTFA é o melhor reagente de derivatização, e que a SPE é adequada para a análise por CG-EM se levando em conta os reagentes e equipamentos disponíveis em ambos os locais de implantação do método. Além disso, o método padronizado permitiu a identificação de levamisol, adulterante da cocaína que vem preocupando médicos devido aos sinais e sintomas clínicos apresentados, demonstrando-se a necessidade de padronização para a análise associada à de cocaína englobando a busca por adulterantes possivelmente nocivos.

Palavras-chave: *Cocaína, benzoilecgonina, extração em fase sólida, cromatografia gasosa-espectrometria de massas, levamisol, adulterantes*

ABSTRACT

STANDARDIZATION AND IMPLANTATION OF AN ANALYTICAL METHOD FOR THE DETECTION OF COCAINE AND ITS METABOLITES IN HUMAN URINE BY GAS CHROMATOGRAPHY/MASS SPECTROMETRY (GC-MS)

Cocaine's consumption in Brazil, despite the decline in world trend, has increased along the years. Because it is a banned substance, which has a high potential for causing chemical dependency and clinical issues related to its use, due to false positive results in triage analysis by immunochromatography, the standardization and implementation of confirmatory methodologies for its detection is necessary. Therefore, the aim of this study was to standardize and introduce, at the Nucleus of Laboratorial Analysis of Toxicology Information Center of Rio Grande do Sul (NAL-CIT/RS) and at the Analytical Center of the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), a confirmatory, rapid and simple method for the detection and identification of cocaine and its metabolites (benzoilecgonine, ester methylecgonine, cocaethylene and ester methylandroecgonine) in human urine by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). In order to offer a clear extract / free of impurities, thus allowing the enhancement of analytical sensibility, linearity and selectivity and due to the analyte's peculiarities, the sample treatment procedure was performed by processes of pre-concentration, purification, extraction and derivatization, The extraction method used in this study was Solid Phase Extraction (SPE). The results obtained indicate that MTBSTFA is the best derivatization reagent and that SPE is the best extraction method for GC-MS analysis taking into account the reagents and equipment available in both implantation sites. Nevertheless, the standardized method allowed the identification of levamisole, cocaine's adulterant that is concerning physicians due to the clinical signs and symptoms presented, revealing the importance of the standardization of this method cocaine's now including all cocaine's adulterants that are potential hazards.

Keywords: *Cocaine, benzoilecgonine, solid phase extraction, gas chromatography-mass spectrometry, levamisole, adulterants.*

1 INTRODUÇÃO

Substâncias estimulantes do sistema nervoso central (SNC) são definidas como todas aquelas que proporcionam alterações nos estados de consciência, promovidas por um estágio de euforia inicial decorrente da estimulação do SNC (CHASIN *et al.*, 2014). No país, são exemplos destas substâncias a cocaína, sendo o seu uso proscrito; medicamentos constituídos por compostos anfetamínicos, e substâncias como a cafeína e o guaraná.

Segundo os relatórios das *United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC)* de 2013 e 2015, no Brasil, houve um crescimento do uso de drogas de abuso, com destaque para cocaína e seus derivados (*crack* e *merla*).

O consumo de drogas de abuso é uma das grandes preocupações em relação à saúde pública, o que leva as análises toxicológicas a se tornarem o meio mais seguro para a verificação da exposição dos indivíduos a determinadas drogas. Os resultados obtidos com este meio permitem que sejam tomadas medidas preventivas para que haja a minimização deste problema e, também, podem ser utilizados como evidência para a infração de leis, acordos e regras, permitindo que seja aplicada uma punição adequada aos infratores (CHRISTOPHERSEN e MORLAND, 1994).

A aplicação de análises toxicológicas, em matrizes biológicas, dá-se – inicialmente – pela realização de um procedimento de triagem (*screening*), que consiste na busca por um grupo de substâncias (o fármaco/droga e/ou seus metabólitos). Esta etapa da análise objetiva a obtenção de resultados qualitativos, para que seja possível a determinação da presença ou ausência do analito buscado. A segunda etapa da análise consiste na confirmação dos resultados obtidos pela primeira etapa.

Atualmente, a primeira etapa de uma análise toxicológica - para a detecção de cocaína, metabólitos e derivados - dá-se por meio de ensaios imunológicos (imunocromatografia ou imunofluorescência) (MOFFAT *et al.*, 2004). Estas são metodologias rápidas e de fácil execução, que não requerem nenhum tipo de pré-tratamento da amostra e que, por isso, permitem que o analista obtenha - em um curto intervalo de tempo - um *screening* da amostra com a qual ele está trabalhando. Com o resultado da etapa de triagem, o analista então determina

quais das amostras irão necessitar uma análise confirmatória, a qual será realizada por meio de uma metodologia mais específica e sensível (YONAMINE e SILVA, 2002).

Entende-se por procedimentos confirmatórios todos aqueles utilizados com o intuito de certificar-se que a identificação e/ou quantificação do analito buscado foi correta e que, dessa forma, excluem quaisquer falhas ocorridas durante a análise de triagem (WADA, 2012).

No ano de 2014, o NAL-CIT/FEPPS realizou 2915 análises para a detecção de cocaína e metabólitos em urina, sendo que 9,4% destas análises obtiveram resultados positivos no teste de triagem por imunocromatografia (IC), os quais não foram confirmados por outra metodologia, como a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)¹.

Sendo assim, a otimização e implantação de técnicas analíticas mais específicas, de caráter confirmatório, para a análise de cocaína e metabólitos em urina são essenciais para que resultados fidedignos sejam reproduzidos. Para tal fim, a CG-EM consegue combinar um alto poder de separação, detecção e identificação destes analitos com altos níveis de sensibilidade e especificidade. Dessa forma, esta metodologia é tida, na Toxicologia Analítica, como o padrão-ouro para este tipo de análise (MOFFAT *et al.*, 2004).

Todavia, para que metodologias como a CG-EM sejam executáveis, faz-se necessário o desenvolvimento de técnicas de pré-tratamento, pré-concentração e extração dos analitos de suas respectivas matrizes biológicas. Para isso, a padronização do método de extração é de extrema importância para que esta metodologia possa ser implantada na rotina laboratorial.

Apesar de já existirem metodologias que utilizem CG-EM (Chasin & Mídio, 2000; Yonamine & Silva, 2002) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) (Eiden *et al.*, 2015), fez-se necessária a padronização de uma metodologia equivalente às já existentes para ser implantada no NAL-CIT/FEPPS, de acordo com o material e equipamento disponíveis, com o objetivo de se ter uma análise confirmatória para a presença de cocaína, seus metabólitos e derivados.

¹ Estatística obtida no NAL do CIT/RS

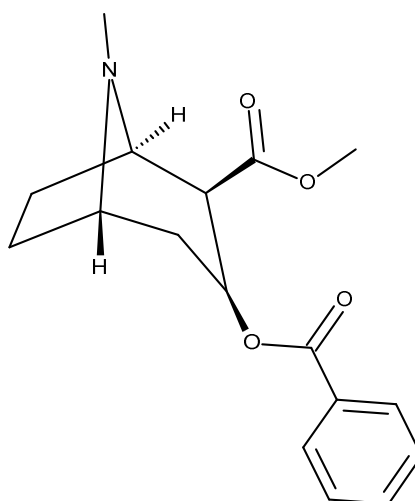
Tendo estes itens bem delineados, o presente trabalho foi executado com o intuito de proporcionar a padronização e a implantação de uma técnica analítica, confirmatória, para a detecção de cocaína, metabólitos e derivados [éster metilanidroecgonina (derivado que indica o consumo de *crack*, uma vez que só é detectado quando há a pirólise da droga), benzoilecgonina, éster metilecgonina e cocaetileno], em urina por CG-EM. Esta técnica foi implantada na rotina do NAL-CIT/FEPPS e disponibilizada para uso da Central Analítica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), visando o ensino e prestação de serviços para a comunidade.

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1.1 Cocaína

A cocaína (COC) é um alcaloide branco, inodoro, cristalino e de sabor amargo derivado de duas espécies do gênero *Erythroxylum*: a *Erythroxylum coca* (com teores de COC entre 0,13 a 0,68%) e *Erythroxylum novogranatense* (com teores de COC entre 0,17 a 0,76%), cujo nome químico é benzoilmetilecgonina (Figura 1). A planta é um arbusto nativo da América do Sul e tende a se desenvolver melhor em países com altitudes elevadas, como Peru, Bolívia e Colômbia (BARILE, 2010; CHASIN, *et al.*, 2014).

Figura 1 – Estrutura molecular da cocaína



Fonte: PubChem, 2015. (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

As folhas, após maceração, são convertidas em pasta de coca, que constitui a forma de tráfico e que eventualmente é utilizada para produzir o cloridrato de cocaína (-COCHCl), sal mais comumente utilizado na autoadministração. (CHASIN *et al.*, 2014). É um poderoso anestésico local e atua como agente simpatomimético com efeitos estimulantes no sistema nervoso central (SNC) (MOREAU e SIQUEIRA, 2010).

No VI levantamento nacional sobre consumo de drogas psicotrópicas entre estudantes do ensino fundamental e médio das redes pública e privada de ensino nas 27 capitais brasileiras, realizado pelo Centro Brasileiro de Informações Sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID, 2010), constatou-se que o uso de cocaína e *crack* é maior em adolescentes do sexo masculino, na faixa etária dos 19 anos, que estudam na rede de ensino pública. O CEBRID (2010), também demonstrou que o Brasil possui uma prevalência do uso na vida de cocaína entre estudantes de 15 a 16 anos de 3,4% e de *crack* ou pasta base de cocaína de 0,6%.

1.1.1.1 Apresentações da cocaína

Dependendo do solvente utilizado para a produção, a cocaína possui diferentes formas de apresentação. Atualmente, a droga pode ser vendida em forma de pasta base, cloridrato de cocaína, *crack*, cocaína base, merla e *oxi* (FILHO *et al.*, 2013).

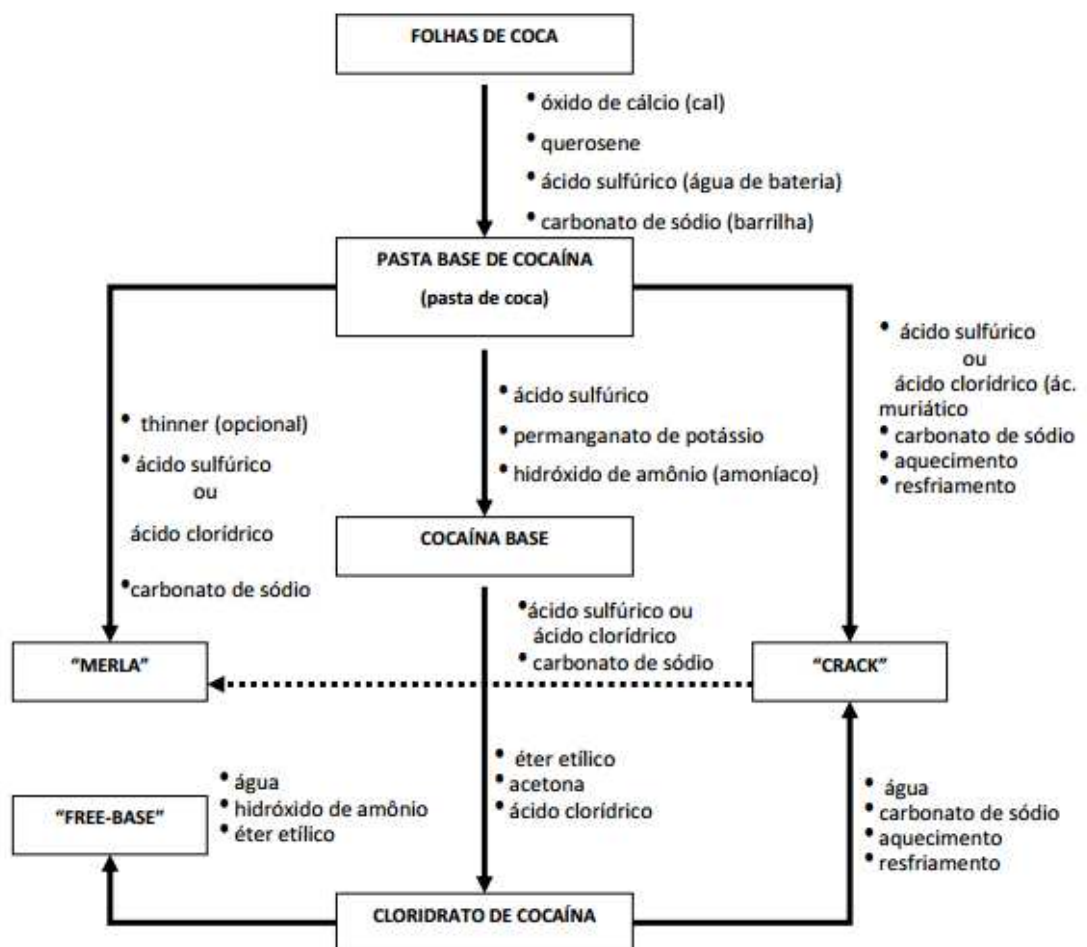
Segundo ALMEIDA (2003), as formas de utilização da cocaína são descritas da maneira a seguir² e suas vias de obtenção mostradas na Figura 2:

- **Pasta base:** é composta pela cocaína na forma de base livre, possui cor marrom ou amarela escura e é obtida na primeira etapa do processo de extração das folhas. Apresentada na forma de pó ou grumos e consumida na forma fumada pura ou misturada com maconha ou tabaco;
- **Cloridrato de cocaína:** é o sal solúvel da droga possui coloração esbranquiçada e um leve odor característico, pode ser administrado intranasal ou endovenosamente;

² Denominação adotada pelo: Serviços de Perícia de Laboratório e Balística (SPLB) / Instituto Nacional de Criminalística (INC) / Diretoria Técnico-Científica (DITEC) / Departamento de Polícia Federal (DPF)

- **Crack:** é a cocaína em forma de pedras (base livre), com coloração amarelada, destinadas ao fumo;
- **Cocaína base:** é a base livre refinada, de cor amarelada, que pode ser fumada ou aspirada;
- **Merla:** forma exclusivamente encontrada no Brasil, é a cocaína na forma de base livre, apresentada na forma de pasta branca, com altos teores de água (pode chegar a 70%) e de sais de sódio, destinada ao fumo misturada com tabaco ou maconha;
- **Oxi:** possui sua formulação bem parecida com a do *crack*, sendo administrado pela via fumada, mas os solventes utilizados na sua preparação são mais tóxicos, tornando-o mais deletério do que a cocaína na forma de *crack*.

Figura 2 – Vias de obtenção da cocaína



Fonte: FLORIANI, 2012.

1.1.1.2 Toxicocinética

Estuda a relação entre a quantidade de um agente tóxico que está atuando sobre o organismo e a concentração dele presente no plasma, relacionando os processos de absorção, distribuição, biotransformação e excreção do agente, em função do tempo (OGA *et al.*, 2014). Com relação à cocaína, estes processos podem ser definidos da seguinte maneira:

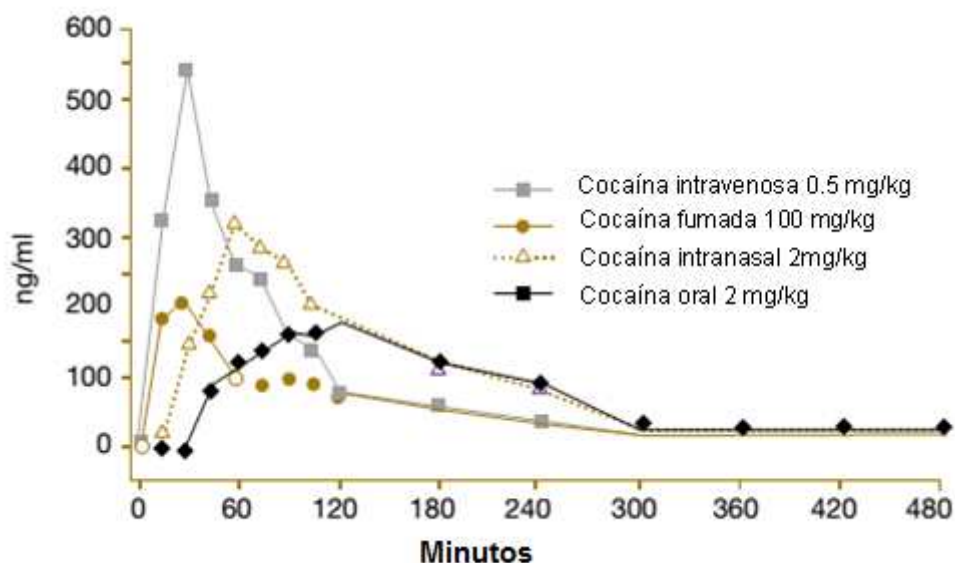
a) **Absorção**

A velocidade de absorção e a concentração plasmática máxima atingida são dependentes das vias de administração da droga (intranasal, respiratória (fumada), intravenosa e oral) (RANG *et al.*, 2007) e está representada na Figura 3 .

A via de absorção que proporciona o aparecimento dos efeitos mais rapidamente, levando cerca de oito segundos, é a respiratória, devido à vasta irrigação sanguínea dos alvéolos pulmonares. Esse tempo é bem menor quando comparado com outras vias, que levam em média entre 10 a 15 minutos, quando a droga for administrada por via intranasal e entre 3 a 5 minutos, quando por via intravenosa. Apesar das diferenças de início dos efeitos na via intranasal e pulmonar, a cinética de ambas é praticamente a mesma. As duas vias possuem efeitos com duração considerada curta, contudo mais prolongados quando obtidos por meio da via intranasal (CHASIN *et al.*, 2014; JENKINS e CONE, 1998).

A biodisponibilidade da COC fumada é de aproximadamente 70%, o que pode ser explicado pelo fato que há 26% de perda de cocaína na forma básica antes desta ser inalada, a qual pode se dar por decomposição ou condensação da mesma (CHASIN *et al.*, 2014).

Figura 3 – Níveis plasmáticos de cocaína



Fonte: adaptado de UNODC, 2013.

b) Distribuição

Por ser uma substância lipossolúvel, a COC é rapidamente distribuída pelo SNC e atravessa facilmente as barreiras hematoencefálica e placentária. Também se liga às proteínas plasmáticas, tendo alta afinidade pela α -1-glicoproteína ácida e baixa pela albumina. A fração livre de COC se concentra entre 67-68% da quantidade absorvida e, embora seja independente da concentração ingerida, esta fração varia com a mudança de pH (77 a 49%, respectivamente em pH sanguíneo 7,0 e 7,8) (CHASIN *et al.*, 2014).

A distribuição dá-se de forma rápida. Os órgãos com maior concentração de COC são: cérebro, baço, rins e pulmões, seguidos pelo sangue, coração e músculos (BORTOLOTTI *et al.*, 2012; JENKINS e CONE, 1998).

c) Biotransformação e excreção

A COC, administrada aos humanos, é biotransformada, principalmente, pela hidrólise das duas ligações ésteres presentes na molécula (um grupo metil éster e um grupo benzoato) (BORTOLOTTI *et al.*, 2012). A hidrólise do grupo benzoato, por ação de colinesterases plasmáticas e hepáticas, ocasiona a formação do éster metilecgonina (EME) (32-49% da excreção urinária), já a hidrólise do grupo metil

éster, por meio de carboxilesterases plasmáticas ou hepáticas ou pela hidrólise espontânea em pH 7,4, proporcionam a formação de benzoilecgonina (BE) (29-45% da excreção urinária) (WILLS, 2005). Estes dois metabólitos originam, em um segundo momento, a formação de ecgonina (1-8% da excreção urinária) que possivelmente ocorre por meio da hidrólise espontânea, pH dependente, muito parecida com a de formação de BE (BORTOLOTTI *et al.*, 2012). As reações que envolvem a hidrólise dos grupos éster geram metabólitos atóxicos (caso da BE, EME e ecgonina) (YAO, 2013)..

A norcocaína (NORCOC) é o metabólito ativo da COC, resultado de uma N-desmetilação mediada pelo complexo enzimático do citocromo P450 e excretada na urina em pequenas porcentagens (2-6%) (CHASIN *et al.*, 2014; YAO, 2014) .

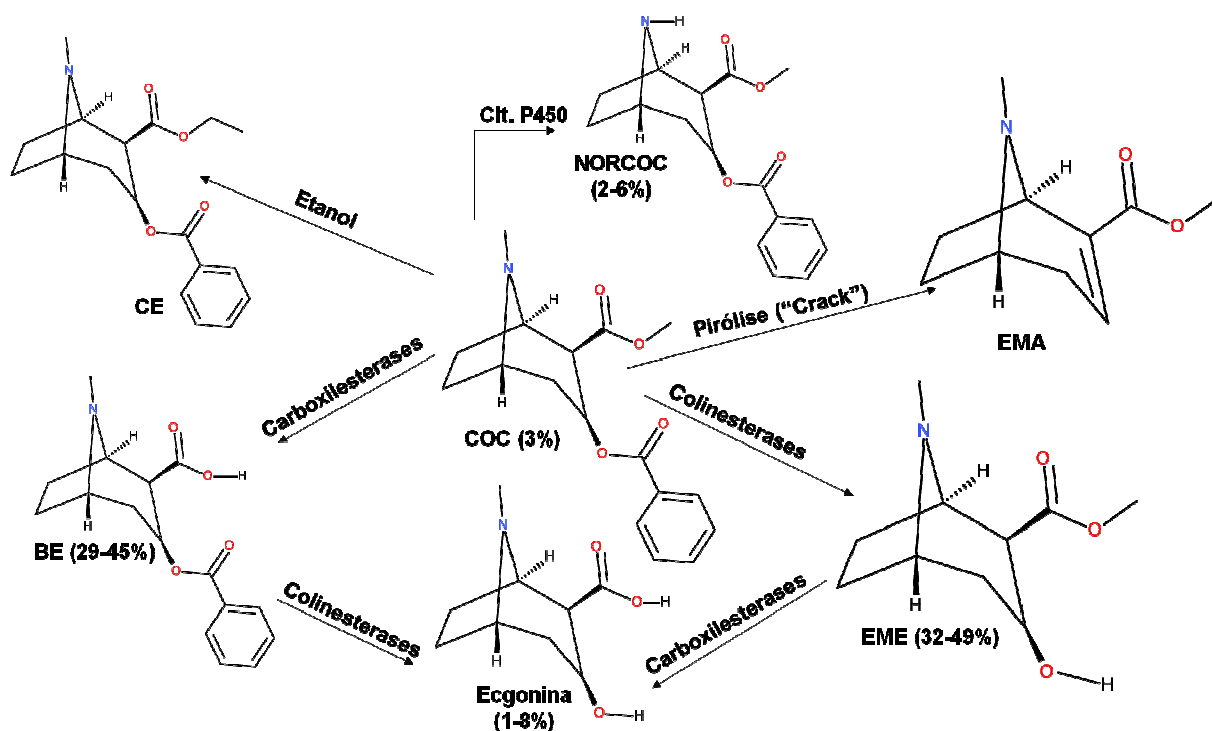
Além disso, o uso concomitante de cocaína e álcool etílico é o responsável pela formação do derivado cocaetileno (CE) por meio da transesterificação hepática. O CE apresenta efeitos semelhantes ao da cocaína, todavia mais prolongados (PROSSER *et al.*, 2011).

A pirólise da COC (forma fumada) proporciona a formação do derivado éster metilanidroecgonina (EMA), sendo este considerado o principal marcador de exposição ao *crack*, podendo ser utilizado para diferenciar os tipos de usuários (ISENSCHMID, 2010).

Aproximadamente apenas 3% da COC administrada é excretada na urina em forma inalterada (CHASIN *et al.*, 2014).

A Figura 4 ilustra as principais vias de biotransformação da cocaína, seus metabólitos e derivados.

Figura 4- Biotransformação da cocaína administrada em humanos



CE: cocaetileno; BE: benzoilecgonina; COC: cocaína; EME: éster metilecgonina; EMA: éster metilanidroecgonina; NORCOC: norcocaína.

Fonte: adaptada de CHASIN *et al.*, 2014

Estudos mostram que as meias vidas da COC, BE e EME são: 0,8h, 4,5h e 3,1h, respectivamente. (BORTOLOTTI *et al.*, 2012) (JENKINS e CONE, 1998). Em 2007, Huestis *et al.*, mostraram que há um aumento linear da concentração máxima dos metabólitos (BE, EME e ecgonina) quando se aumenta a concentração de administração da droga. O EME mostrou ser o metabólito com a maior janela de detecção (164h após administração de 40mg da droga). Cone *et al.* (2003), mostraram que a meia-vida de eliminação da COC e metabólitos segue a ordem crescente dependendo das vias de administração: respiratória < intravenosa < intranasal.

1.1.1.3 Toxicodinâmica e efeitos tóxicos

A toxicodinâmica estuda os mecanismos de ação tóxica exercidos por substâncias químicas sobre o sistema biológico. Elucida o mecanismo de ação

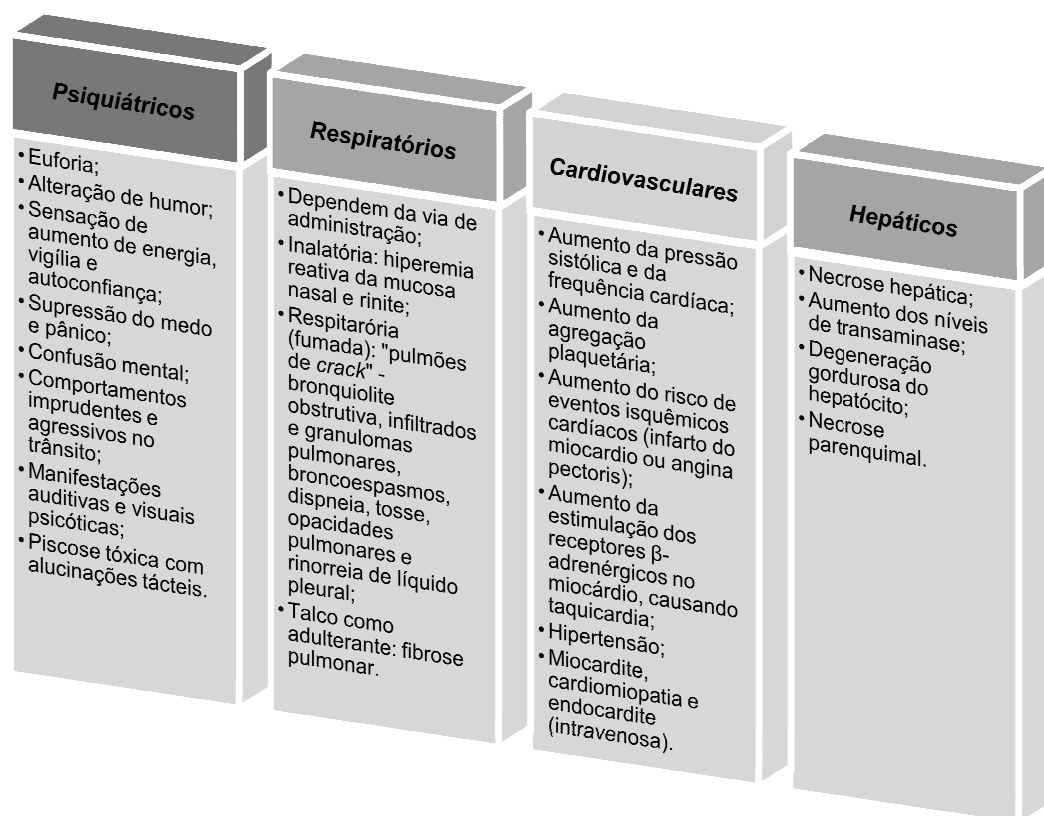
tóxica que xenobióticos exercem sob os pontos de vista bioquímicos e moleculares (OGA *et al.*, 2014).

A COC é um anestésico local com propriedades simpatomiméticas e potente estimulante do SNC. Ela inibe a recaptação pré-sináptica de dopamina (DA), serotonina (SE) e noradrenalina (NA), levando a uma potencialização do estímulo destes neurotransmissores nos receptores pós-sinápticos (BORTOLOTTI *et al.*, 2012). O acúmulo de neurotransmissores na fenda sináptica promove a sensação de euforia e prazer, bem como melhora as capacidades motora e intelectual, também proporciona a perda da sensação de cansaço e fadiga. Além disso, efeitos adversos como paranoia, alucinações e disforia também podem ocorrer (ISENSCHMID, 2010). Imediatamente a elevação dos níveis de DA e NA, a COC promove a redução destes neurotransmissores a valores abaixo do normal, e esta baixa concentração é relacionável ao estágio de depressão experimentado pelos usuários (CHASIN *et al.*, 2014).

O aumento da concentração de NA nas fendas sinápticas promove efeitos adrenérgicos como: midríase, vasoconstrição, hipertensão, taquicardia e taquipneia (ISENSCHMID, 2010). Já o aumento das concentrações de dopamina e sua atuação no sistema mesolímbico, no núcleo *accumbens* (NAc), promovem os efeitos desejados da droga: euforia e prazer. Por isso, este último neurotransmissor apresenta um papel extremamente importante na dependência da droga.

Além disso, a COC é conhecida por promover efeitos cardiotoxicos de extrema relevância e com potencial de letalidade. Episódios de infarto agudo do miocárdio (IAM) são frequentes em usuários de COC. Estudos relatam que os IAMs sofridos por usuários da droga estão ligados ao espasmo focal de artéria coronária. Além disso, lesão ateroscleróticas e isquêmicas associadas com trombose foram relatadas em autópsias. Para explicar estes fatos temos as seguintes informações: 1) um estudo com coelhos alimentados com dieta rica em colesterol indicou que a COC promove a aceleração da formação de processos aterogênicos; 2) estudos *in vitro* indicaram que há o aumento da produção de tromboxano e da resposta de agregação de plaquetas. 3) Outro estudo com coelhos relatou que a administração de cocaína promove o aumento da síntese de proteína aórtica, AMP cíclico e nos níveis de cálcio (NIDA, 1991; WELDER *et al.*, 1993). A figura 5 exemplifica os efeitos tóxicos apresentados pelo uso da cocaína.

Figura 5 - Principais distúrbios causados pelo uso de COC



Fonte: adaptada de Chasin *et al.*, 2014.

Além da droga inalterada produzir efeitos tóxicos, alguns dos metabólitos e derivados da cocaína também produzem. Os produtos da biotransformação da cocaína: benzoilecgonina, éster metilecgonina e ecgonina são determinados como inativos (atóxicos), portanto não têm papel na toxicodinâmica da droga. No entanto, a NORCOC e os derivados EMA e CE são metabólitos ativos (YAO, 2013).

A NORCOC é um metabólito com hepatotoxicidade mais elevada do que a cocaína inalterada, levando a disfunção e necrose hepática. Apesar de haver diferenças entre os efeitos provocados pela COC e NORCOC, esta é um anestésico local mais potente que a COC e tem uma maior capacidade de inibir a captação de NA na fenda sináptica. Assim como a COC, a NORCOC também promove a diminuição do reforçamento por razão fixa em ratos (CHASIN *et al.*, 2014).

Em estudo realizado por Schindler *al.* (1995) com coelhos, pôde-se comprovar que o EMA promove a diminuição da pressão arterial média, os batimentos cardíacos e a taxa respiratória. O efeito inotrópico negativo em miocárdio ventricular humano ocorre pela estimulação dos receptores muscarínicos, que são

concentração-dependentes e potenciados pelo óxido nítrico. A reação com estes receptores promove a inibição da disponibilidade de cálcio durante o processo de excitação-concentração. Por isso, sugere-se que os efeitos cardiotoxicos da COC combinados com o do EMA, no caso de usuários de *crack*, levam a complicações cardiopulmonares (CARVALHO, 2006).

Já sobre o derivado CE, sabe-se que este exerce ação tóxica muito parecida a da cocaína, contudo seu potencial de letalidade é mais elevado. Na presença de CE, os indivíduos apresentam aumentos significativos na frequência cardíaca, no débito cardíaco e na pressão sanguínea diastólica. Em um estudo *in vitro* de contração espontânea primária realizado em células de miocárdio, demonstrou-se que o CE pode ser mais potente que a COC em promover o efeito inotrópico negativo (WELDER, 1993).

1.1.1.4 Dependência e tolerância

A dependência é um processo dividido em uma série de elementos. Primeiramente ocorre o uso abusivo da substância, seguido pela busca de se manter um estoque da mesma a qualquer risco e uma alta tendência à recaída após um tempo em abstinência (FREYE, 2010).

Acredita-se que a ação da COC em neurônios dopaminérgicos (e adrenérgicos) seja a principal responsável pelo desejo intenso (*craving*) de se manter a droga no organismo (FREYE, 2010).

A COC bloqueia a ação dos transportadores de DA, aumentando assim a presença do neurotransmissor. A DA atua no NAc, produzindo sensações de prazer e satisfação. Quando o NAc possui uma alta concentração de DA, as sensações de prazer e satisfação são aumentadas, o que provoca no usuário a necessidade de estar sempre em contato com a droga. O sistema límbico também possui dois locais importantes para a memória: hipocampo e amígdala. Estes dois locais promovem a lembrança do que foi feito para que aquelas sensações promovidas pela liberação de DA no NAc tenham sido alcançadas. Quando se fala no uso de cocaína, estes dois locais são responsáveis por causar no usuário a lembrança do uso da droga e a necessidade de repetir a ação (NESTLER, 2005).

A síndrome de abstinência é atualmente definida pelo CID-10 (OMS,1992) como “um conjunto de sintomas, de agrupamento e gravidade variáveis, ocorrendo em abstinência absoluta ou relativa de uma substância, após uso repetido e usualmente prolongado e/ou uso de altas doses daquela substância”.

1.1.1.5 Principais adulterantes da cocaína

Muitas vezes, para que se potencialize o efeito da droga ou a fins de aumentar-se a massa e assim o lucro na venda, adulterantes e/ou diluentes são adicionados à cocaína.

Adulterantes são substâncias que apresentam algum efeito farmacológico, podendo potencializar ou assemelhar-se a algum dos efeitos da cocaína. Já os diluentes são usados apenas para dissolver a droga, sendo inativos e sem efeito farmacológico. Para adulteração optam-se, principalmente, por substâncias que tenham aparência semelhante à cocaína, propriedades anestésicas, sabor amargo e coloração esbranquiçada. Os adulterantes tanto podem simular os efeitos da droga, quanto reduzir efeitos indesejados provocados pela droga (COLE *et al.*, 2010).

Os produtos mais comumente encontrados misturados à cocaína são:

- Adulterantes: lidocaína, benzocaína, procaína, tetracaína, cafeína, efedrina, dipirona, fenacetina, levamisol, diltiazem, hidroxizina, prilocaína, ácido acetil-salicílico, paracetamol;
- Diluentes: açúcares e derivados (lactose, sacarose, glicose, manitol, amido, sorbitol), compostos inorgânicos (bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, carbonato de cálcio, sulfato de cálcio, sulfato de magnésio, sulfato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de magnésio, borato de sódio, ácido bórico), produtos alimentícios (leite em pó e farinhas em geral).

Mundialmente, um dos adulterantes que vem causando uma série de manifestações clínicas de grande relevância em usuários crônicos da cocaína é o levamisol. A droga distribuída nos Estados Unidos da América (EUA) vem sendo acrescida de levamisol desde 2005 e, hoje em dia, 70-80% da droga que entra no

referido país contém levamisol (BUCHANAN *et al.*, 2011; LYNCH *et al.*, 2011; NOLAN e JEN, 2015).

Lapachinske *et al.* (2014), conseguiram determinar que este acréscimo de levamisol observado na cocaína vendida nos EUA também se reproduz aqui no Brasil. No estado de São Paulo (SP), por exemplo, 54,5% das amostras apreendidas continham levamisol, 16,4% lidocaína e 10,9% cafeína. De acordo com pesquisas realizadas anteriormente (LAPACHINSKE *et al.*, 2014), a presença de levamisol não era identificada nas amostras de cocaínas do mercado brasileiro nos anos de 2001 a 2009, contudo, em amostras analisadas de 2009 a 2012, encontraram-se 18% de levamisol. E, o aumento da adição de levamisol em amostras de cocaína apreendidas no Brasil, pôde ser evidenciado pelo estudo publicado em 2014 por Lapachinske *et al.*, no qual 55,6% das amostras apreendidas por todo país em 2011 continham levamisol.

A utilização do levamisol como adulterante possui três justificativas: 1) é um anti-helmíntico utilizado no Brasil em medicina veterinária e humana, em forma de pó cristalino branco de baixo custo, que promove o aumento da massa da droga vendida sem que se perceba sua adulteração; 2) atua inibindo a síntese da monoaminaoxidase (MAO) e catecolamina-O-metiltransferase, potencializando os níveis de dopamina no SNC e levando a um aumento na ativação do sistema de recompensa; 3) além do seu metabólito, aminorex, ter propriedades cujos efeitos são semelhantes aos proporcionados pelo uso de compostos anfetamínicos (NOLAN e JEN, 2015).

Estes estudos indicam o aparecimento da tendência mundial de adição deste adulterante agora nas amostras brasileiras, o que pode representar um problema de saúde pública para o país, visto que o uso crônico de cocaína adulterada com levamisol provoca alterações hematológicas (agranulocitose severa e neutropenia); dermatológicas (lesões geralmente nos lóbulos das orelhas e arco zigomático, vasculite leucocitoclástica); renais (proteinúria, hematúria, lesão renal, insuficiência renal); pulmonares (hemorragia pulmonar com ou sem necessidade de ventilação mecânica); e, seu metabólito, está relacionado com a hipertensão pulmonar idiopática (NOLAN e JEN, 2015; DHERANGE *et al.*, 2015; HAHN e BOGOCH, 2015).

Portanto, o monitoramento de levamisol e aminorex em amostras de urina pode ser utilizado para determinar as causas dos efeitos adversos apresentados pelos pacientes. Neste trabalho, com a padronização da metodologia proposta, foi possível se detectar a presença de levamisol em amostras oriundas de pacientes atendidos pelo NAL-CIT.

1.1.2 Metodologias analíticas

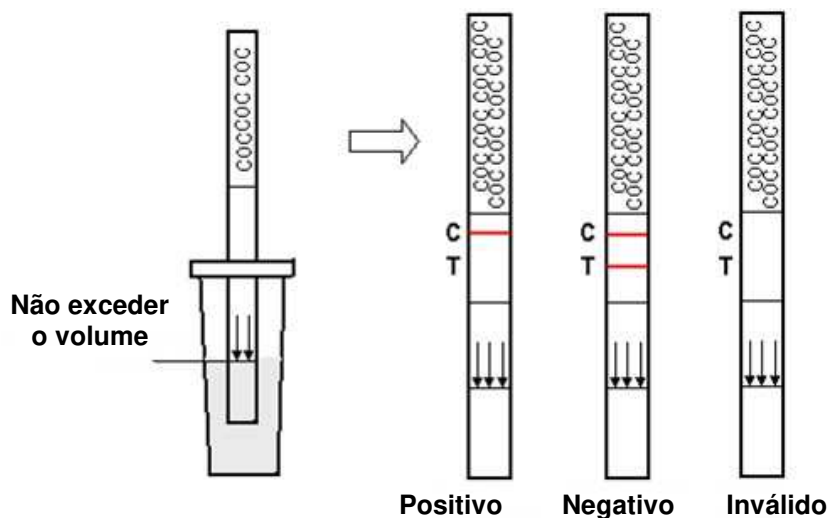
1.1.2.1 Imunocromatografia (IC)

Por ser uma metodologia que exige pouco do laboratorista, utiliza um baixo volume de amostra e reagentes, e possibilita a busca de uma vasta quantidade de analitos, a imunocromatografia é muito utilizada como teste de triagem, inclusive para drogas de abuso. (NIEDBALA e GONZALEZ, 2011).

Consiste em um ensaio imunológico no qual as drogas e metabólitos presentes na urina competem com o conjugado da droga presente na membrana do teste para formar pontes com o anticorpo. A urina migra, por capilaridade, levando consigo os anticorpos. Estes, em casos negativos, se depositam na banda que contém o conjugado da droga com a qual eles possuem afinidade.

Quando a droga e/ou metabólitos estão presentes na urina, os anticorpos presentes no teste migram, contudo não se ligam ao conjugado da droga, portanto, não forma a banda no local do teste, uma vez que estes têm maior afinidade pela droga e/ou seus metabólitos (antígenos) (INSTANT-VIEW®, 2012). A Figura 6 exemplifica os resultados obtidos com imunocromatografia para COC e metabólitos.

Figura 6 - Resultados obtidos com tiras de imunocromatografia para COC e metabólitos



Fonte: adaptada do folheto explicativo do kit Accu-tell®.

1.1.2.2 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

A cromatografia gasosa é uma técnica responsável pela separação dos compostos de interesse de determinada matriz. Os compostos são separados em consequência da partição entre eles, uma fase móvel (gás de arraste inerte) e uma fase estacionária sólida (revestimento da coluna capilar). A amostra, após extração, é injetada na “cabeça” da coluna capilar e eluída por todo comprimento por meio de um gás inerte. A fase móvel diz-se inerte, uma vez que não interage com nenhum componente da matriz extraída, somente transporta a amostra por todo comprimento da coluna (SKOOG *et al.*, 2011)

Para que os compostos separados pela cromatografia gasosa sejam identificados e quantificados, é necessário que se faça o uso de um detector, responsável por promover a identificação dos picos dos analitos. A combinação cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas é conhecida pela sigla CG-EM. A CG-EM vem sendo muito utilizada para monitoramento do uso de drogas de abuso, uma vez que é a metodologia preconizada como confirmatória para este fim (DAWLING, 2011).

Atualmente, um dos sistemas mais utilizados é o CG-EM de quadrupolo único com ionização por impacto eletrônico (IE). A IE utiliza feixes de elétrons de alta

energia, normalmente 70 eV, durante o processo de ionização. Um fluxo de elétrons é formado a partir de um filamento metálico aquecido, sendo estes então acelerados e dirigidos para colidir com a amostra vaporizada, causando a explosão eletrônica dos analitos e formação de cátions que posteriormente são separados em função da razão m/z no EM, gerando um espectro de massas (SILVERSTEIN *et al.*, 2006).

O quadrupolo permite que as análises sejam operadas em modo *full scan*, ou seja, um intervalo m/z em u.m.a é escolhido, sendo monitorados todos os íons obtidos no analisador e em *Selected Ion Monitoring* (SIM), selecionando-se apenas os íons m/z de interesse para a detecção do analito em questão (IUPAC, 1991).

1.1.2.3 Valores de *cutoff* para detecção de cocaína e metabólitos em amostras de urina

Valor de *cutoff*, na toxicologia analítica, é um valor expresso na forma da concentração da droga presente em determinada matriz biológica, utilizado para auxiliar os analistas na determinação de resultados positivos e negativos. Portanto, quando uma nova metodologia analítica qualitativa é criada, é necessário que seja estabelecido o valor de *cutoff* (menor concentração da droga detectável pelo teste qualitativo criado) para que assim os analistas saibam determinar o resultado da análise. Estes valores são estabelecidos mundialmente. Atualmente, o órgão norte americano que determina os valores de *cutoff* utilizados nos EUA para a detecção de drogas de abuso é o *Substance Abuse and Mental Health Services Administration* (SAMHSA).

O SAMHSA determina que a metodologia de triagem para cocaína possua um *cutoff* da droga e metabólitos de 150ng/mL e que a metodologia confirmatória possua um *cutoff* para benzoilecgonina de 100ng/mL (SAMHSA, 2008).

1.1.3 Controle de qualidade

O controle de qualidade é definido como todas as operações e atividades técnicas que são realizadas para garantir a qualidade de um produto ou serviço prestado para satisfazer determinadas necessidades (NASCIMENTO e PARMIGIANI, 2010). O controle de qualidade realizado por laboratórios de análises toxicológicas deve ser feito levando-se em conta dois

1.1.3.1 Controle interno de qualidade

O Controle Interno (ou material de referência) é responsável pelo monitoramento frequente da reprodutibilidade da fase analítica, identificando e eliminando erros inerentes ao processo das análises quantitativas e qualitativas. Quando as análises realizadas são de cunho qualitativo, os controles internos utilizados são determinados como “Positivo” e “Negativo” e podem ser preparados no próprio laboratório (controle *in house*) ou industrializados (ANVISA, 2006).

1.1.3.2 Controle externo de qualidade

O controle externo de qualidade ou Ensaio de Proficiência (Ensaio interlaboratorial) é responsável pelo monitoramento periódico da exatidão do laboratório, por meio de comparação com a média do consenso do grupo de laboratórios participantes com uma mesma metodologia. Os ensaios de proficiência podem ser nacionais, como o Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ) e Controllab ou internacionais, como o *Randox International Quality Assessment Scheme* (RIQAS) (INMETRO, 2015).

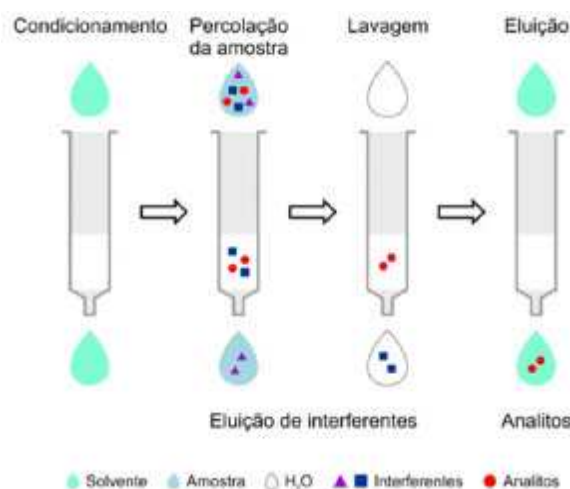
1.1.4 Preparo de amostras

1.1.4.1 Extração em fase sólida (SPE)

Atualmente a extração em fase sólida (SPE) é uma das técnicas altamente utilizadas na extração e/ou pré-concentração de analitos em concentrações muito baixas, para que estes possam ser detectados por CG-EM (JARDIM, 2010).

É um método de separação sólido-líquido, baseado nos mecanismos da cromatografia líquida de baixa pressão que inicia com o condicionamento do leito cromatográfico para que se retenha o analito desejado, se eliminem interferentes e se concentre o mesmo. A fase estacionária é constituída por diferentes sorventes e fica contida em cartuchos de extração (Figura 7), formados por polipropileno, contendo cerca de 50 a 500 mg de sorvente (fase sólida) com porosidade de 40-60 μm .

Figura 7 - Etapas que constituem a SPE



Fonte: CALDAS *et al.*, 2011

De acordo com Lanças (2004), a SPE para cocaína é constituída pelas seguintes etapas:

1) Condicionamento

a) Ativação da fase estacionária com metanol ou outro solvente orgânico que tenha uma polaridade intermediária para que os sítios ativos tornem-se disponíveis e evite-se a secagem e quebra do sorvente.

b) Condicionamento com solvente adequado para que se ajustem as forças do solvente de eluição com a do solvente da amostra. Nessa fase, normalmente se utiliza um solvente que tenha uma composição parecida com a da matriz utilizada, em termos de força iônica e pH, podendo ser a solução tampão usada para diluir a amostra.

2) Adição da amostra: fase na qual ocorre a adsorção do analito desejado e de alguns interferentes. É interessante que se dilua a amostra previamente e que se mantenha um pH < 7,0.

3) Lavagem: etapa de remoção dos interferentes deixados pela adição da amostra. Estes podem ser removidos, uma vez que têm uma menor afinidade à fase estacionária não afetando no tempo de retenção nem na recuperação do analito.

4) Eluição do analito por troca iônica: solventes orgânicos polares podem ser utilizados em conjunto com bases fortes (pH 12). Geralmente volumes de eluição

maiores que 1mL são necessários para garantir a eluição do analito, contudo, duas etapas de eluição com volumes menores são mais eficientes do que apenas uma.

O mecanismo de troca iônica é utilizado para o isolamento dos analitos de caráter ácido ou básico presentes nas soluções aquosas. Por exemplo, analitos anfóteros como a benzoilecgonina precisam ser acidificados para que haja a neutralização (pH 6,0) da função orgânica ácida, apresentando assim somente a carga positiva proveniente do grupamento amina, sendo retidos por sorventes de carga negativa (SCX= Strong Cation Exchanger) como ácidos carboxílico ou sulfônico, consistindo um trocador forte de cátions (SCX) do tipo $[SO^{-3}]$, aprisionado à estrutura básica da sílica (LANÇAS, 2004; VARIAN, 2006).

1.1.5 Derivatização para cromatografia gasosa

A derivatização é uma reação química que modifica a estrutura molecular do analito de interesse para que se possam contornar as principais limitações da cromatografia gasosa: elevada polaridade da molécula, baixa volatilidade, baixa estabilidade do composto, especificidade, precisão sensibilidade do método, perda do analito por adsorção à fase estacionária ou decomposição térmica. Com isso, muitas substâncias que na forma livre, sem reação de derivatização, poderiam estar sendo excluídas da análise, acabam sendo devidamente analisadas em forma de um derivado. (SEGURA *et al.*, 1998; LANÇAS, 1993).

O aumento do peso molecular, gerado pela reação de derivatização, é benéfico, uma vez que produz íons de massa maior, mais específicos para o analito de interesse, facilitando a análise dos dados pelo analista. (SEGURA *et al.*, 1998; SEBBEN, 2007).

A derivatização para detecção de drogas de abuso geralmente é feita por um dos dois tipos de reações: sililação ou alcilação (SCHUMMER *et al.*, 2009; SEGURA *et al.*, 1998; REGIS, 2008; BAIRROS, 2014; ENSSLIN *et al.*, 1996).

Sililação é o tipo de derivatização mais empregado em análises com CG-EM. Derivados silil são formados geralmente quando um hidrogênio ativo dos grupos –OH, –SH ou –NH é substituído por um grupo alquilsilil, normalmente trimetilsilil (TMS) ou *tert*-butildimetilsilil (TBDMS) convertendo a molécula em um éter ou um éster silil. A habilidade de diversos grupos funcionais em formar derivados silil em ordem é:

alcoóis > fenóis > ácidos carboxílicos > aminas > amidas (SEGURA *et al*, 1998; ENSSLIN *et al.*, 1996; CASTILHO e SILVEIRA, 1998).

Há uma variedade de agentes de derivatização TMS: TMS-aminas, TMS-amidas, TMS-éster, mas normalmente se utilizam os TMS-amidas, entre eles, os mais comuns são o N,O-bis-trimetilsilil-trifluoracetamida (BSTFA) e o N-metil-N-trimetilsilil-trifluoracetamida (MSTFA). No entanto, os derivados de TMS são menos estáveis à hidrólise do que os TBDMS, como o N-Metil-N-tert-Butildimetilsililtrifluoracetamida (MTBSTFA), que é utilizado para doar grupos TBDMS a compostos com hidrogênios ativos em grupos hidroxila (-OH), carboxila (-COOH) e tiol (-SH). Além disso, muitas vezes os reagentes TMS e TBDMS recebem a adição de catalisadores como trimetilclorosilano (TMCS), trimetilsililimidazol (TMSim) e trimetiliodosilano (TMSI) para aumentar o poder da sililação (BAIRROS, 2014).

Os principais agentes sililantes estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1- Principais agentes de sililação

Sililantes	Sigla
N,O-bis-trimetilsilil-trifluoracetamida	BSTFA
N,O-bis-trimetilsilil-trifluoracetamida + Trimetilclorosilano	BSTFA + TMCS 1 ou 10%
N-metil-N-trimetilsilil-trifluoracetamida	MSTFA
N-Metil-N-tert-Butildimetilsililtrifluoracetamida	MTBSTFA
N-Metil-N-tert-Butildimetilsililtrifluoracetamida + trimetilclorosilano	MTBSTFA + TMCS 1 ou 10%

Fonte: adaptada de Bairros, 2014

Acilação: consiste na introdução de um grupo acil em uma molécula com um hidrogênio ativo. Oferece propriedades semelhantes aos sililantes, contudo atinge mais facilmente alvos extremamente polares. Geralmente são comercializados como ácidos anidros, acil derivados ou acil halogênios. Para detecção de drogas de

abuso, normalmente, faz-se o uso de ácidos anidros. Os principais agentes acilantes estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Principais agentes de acilação

Acilantes	Sigla
Ácido heptafluorobutírico anidrido	HFBA
Ácido pentafluoropropiônico anidrido	PFPA
<i>N</i> -metil- <i>N</i> -bis(trifluoroacetamida)	MBTFA
Ácido trifluoroacético anidrido	TFAA

Fonte: adaptada de Bairros, 2014

Wang *et al.*(2006), mostraram que os metabólitos da COC (BE, NORCOC, EG e EME) possuem sítios que podem sofrer derivatização, sendo que a BE e a EG somente são detectadas quando derivatizadas, uma vez que seus volatilidade é muito elevada quando não há a derivatização.

1.2 JUSTIFICATIVA

A grande dificuldade de emissão de resultados com acurácia elevada mediante a utilização de testes de triagem, a falta de análises confirmatórias para a detecção de cocaína e derivados e a tendência dos dependentes destas substâncias serem os usuários que procuram, com maior frequência, os tratamentos em ambulatórios e em serviços de internação em dependência química (UNODC, 2013), têm motivado o desenvolvimento de técnicas analíticas que sejam capazes de identificar, com maior exatidão a presença destas substâncias no organismo.

Preconizam-se métodos que utilizem o menor volume de solventes orgânicos de menor toxicidade (reduzindo exposição ocupacional e geração de resíduos tóxicos para o ambiente), que sejam mais rápidos e fáceis de serem executados (otimizando o tempo e minimizando possíveis falhas na execução) e de baixo custo (viabilizando utilização pelos serviços públicos). Dessa forma, o presente estudo objetivou suprir a necessidade de muitos laboratórios em reproduzir resultados sensíveis e específicos para determinada droga de abuso, por meio de testes confirmatórios, padronizados utilizando solventes orgânicos de menor toxicidade e com redução de volume. Além disso, contribuir com a farmacoeconomia, uma vez que resultados falso-positivos podem prolongar a internação de pacientes sem o uso da droga, ou mesmo resultados falso-negativos, que induzem a liberação do paciente usuário.

1.3 MATERIAL E MÉTODOS

1.3.1 Grupos amostrais

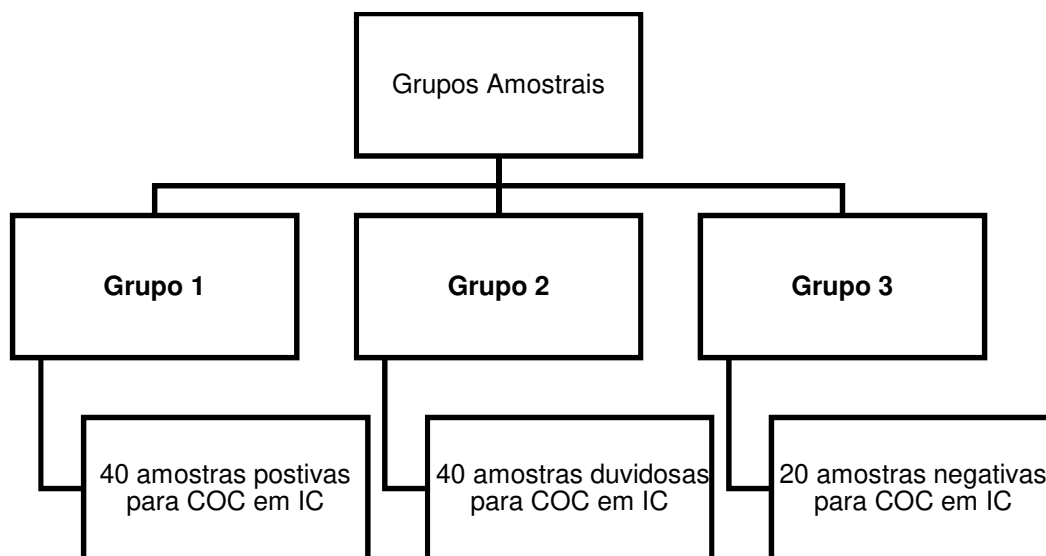
As amostras biológicas utilizadas neste projeto foram provenientes do banco de amostras do NAL-CIT/FEPPS, as quais são coletadas ocasionalmente para análise de monitoramento de drogas de abuso. Obtiveram-se 3 grupos amostrais determinados da seguinte maneira (Figura 8):

Grupo 1: amostras de pacientes com resultado positivo para cocaína em teste de triagem por IC.

Grupo 2: amostras de pacientes com resultado duvidoso em teste de triagem por IC.

Grupo 3: amostras de pacientes com resultado negativo em teste de triagem por IC.

Figura 8 - Organograma dos grupos amostrais



A utilização das amostras de pacientes foi aprovada pelo Comitê de Ética da UFCSPA com o nº 31797814.3.0000.5345 em 17 de junho de 2014 (ANEXO A).

1.3.2 Equipamentos, acessórios e reagentes

Equipamentos e Acessórios

- Agitador mecânico tipo vórtex da marca *Phoenix*;
- Bomba de vácuo da marca Primatec;
- Câmara de extração a vácuo (LiChrolut®) da marca Merck;
- Colunas de extração em fase sólida ChromaBond® da marca Macherey Nagel (MN) de troca catiônica (DRUG I) de 500mg (3mL);
- Cromatógrafo gasoso/espectrômetro de massas Agilent, modelo 7890A/5975C, equipado com injetor *split/splitless*, coluna capilar HB5-MS (5% fenil, 95% metil siloxano, *low bleed*, com dimensões 30m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de fase);

- Evaporador com fluxo de nitrogênio, *Pierce*;
- Gases especiais para cromatografia gasosa: nitrogênio e hélio White Martins;
- pHmêtro da marca Quimis;
- Software Chemstation de aquisição de dados versão E.02.02.1431
- Vials para cromatografia gasosa da marca Agilent®;
- Purificador de água MS-LAB Gehaka.

Reagentes

- Acetona (C₃H₆O), P.A da marca Merck;
- Acetonitrila (C₂H₃N), LC-MS da marca Merck;
- Ácido Clorídrico (HCl), P.A da marca Vetec;
- Diclorometano (CH₂Cl₂), P.A da marca Vetec;
- Fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄), da marca Vetec;
- Hidróxido de Amônio (NH₄OH), P.A da marca Vetec;
- Isopropanol (C₃H₈O), P.A da marca Merck;
- Metanol (CH₄OH), P.A da marca Merck;
- MTBSTFA [CF₃CON(CH₃)Si(CH₃)₂C(CH₃)₃], >97% da Sigma Aldrich;
- BSTFA [CF₃C[=NSi(CH₃)₃]OSi(CH₃)₃], ≥ 99% da Sigma Aldrich.

1.3.3 Análises de triagem por imunocromatografia

As análises de triagem para cocaína foram realizadas com tiras individuais de imunocromatografia da marca ABON® com um *cutoff* de 150ng/mL disponíveis no NAL-CIT/FEPPS. A partir da análise de triagem, puderam-se dividir as amostras entre os três grupos amostrais de acordo com o item 1.3.1.

1.3.4 Análises confirmatórias por CG-EM

A metodologia de CG-EM foi adaptada de CHASIN e MÍDIO (1999) e YONAMINE (2000). Os valores de *cutoff* foram atribuídos de acordo com os preconizados pela SAMHSA (2012), sendo de 100ng/mL para benzoilecgonina em metodologia confirmatória.

Os extratos provenientes da SPE foram injetados no cromatógrafo 7890a Agilent® e analisados no espectrômetro de massas 5975C Agilent®. A coluna capilar utilizada foi Agilent J&W HP-5MS Ultra Inert GC Column (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). O gás de arraste utilizado foi hélio 6.0 (99,9999%) em fluxo constante de 1 mL/min. O forno foi operado inicialmente em 70°C por 1min, com rampa de 15°C/min até 280°C por 3min. A temperatura do injetor foi mantida a 250°C e o *transferline* (*auxiliar heater*) a 280°C. O volume de injeção foi de 1µL em modo de injeção *splitless*. As análises foram realizadas no modo de IE com energia de ionização de 70eV.

Para a análise qualitativa, inicialmente utilizou-se o espectrômetro de massas em modo *full SCAN* monitorando-se o intervalo m/z de 40 a 500 u.m.a. Após a otimização da metodologia, operou-se o EM em modo SIM para os íons (m/z) de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3 - Íons de identificação e tempo de retenção dos analitos

Analito	Íons (m/z)	T_R (min)
COC	82, 182, 303	14,6
BE-TBDMS	82, 282, 346, 403	15,9
EME-TBDMS	82, 96, 182, 256, 282, 313	11,2
EMA	152, 166, 181	8,1
COC-d₃	85, 185, 306	14,1

T_R: tempo de retenção; m/z: razão massa/carga.

1.3.5 Estudo do melhor Reagente de derivatização (RD) e melhor sistema solvente (SS), melhor volume de amostra (VA) e tempo de estabilidade do derivado formado (TED)

1.3.5.1 Reagentes de derivatização (RD)

Apesar do processo de derivatização ser uma etapa que pode favorecer uma análise cromatográfica, esta – se não realizada de maneira adequada – é uma fonte de erros. Vários aspectos são importantes para se determinar qual o RD mais

adequado para a derivatização dos analitos de interesse, destacando-se entre eles: determinação do tempo e temperatura de reação, a determinação da estabilidade do derivado formado e a disponibilidade do mesmo no ambiente de trabalho.

Visto que os reagentes de derivatização do tipo TBDMS são mais estáveis à hidrólise do que os TMS e têm a função de doar grupos TBDMS, que promovem o aumento do peso molecular do analito de interesse, deixando-o com íons característicos de massa maior, mais específicos e fáceis de identificar, baseando-se nos dados da literatura sobre uso dos reagentes TBDMS descritos na Tabela 1 e verificando-se a disposição destes reagentes no NAL-CIT/FEPPS, optou-se pela utilização do MTBSTFA como reagente de derivatização para a detecção de BE e EME em amostras de urina. Posteriormente, adaptou-se o método para a utilização de BSTFA.

Para se comprovar qual dos reagentes é o mais adequado ao NAL-CIT/FEPPS, fez-se uma análise de comparação dos cromatogramas obtidos, para a mesma amostra, com o uso de BSTFA e MTBSTFA.

A reação de derivatização com MTBSTFA está descrita nas figuras 13 e 14 do item 1.4.2.1.

1.3.5.2 Sistemas de Solventes (SS)

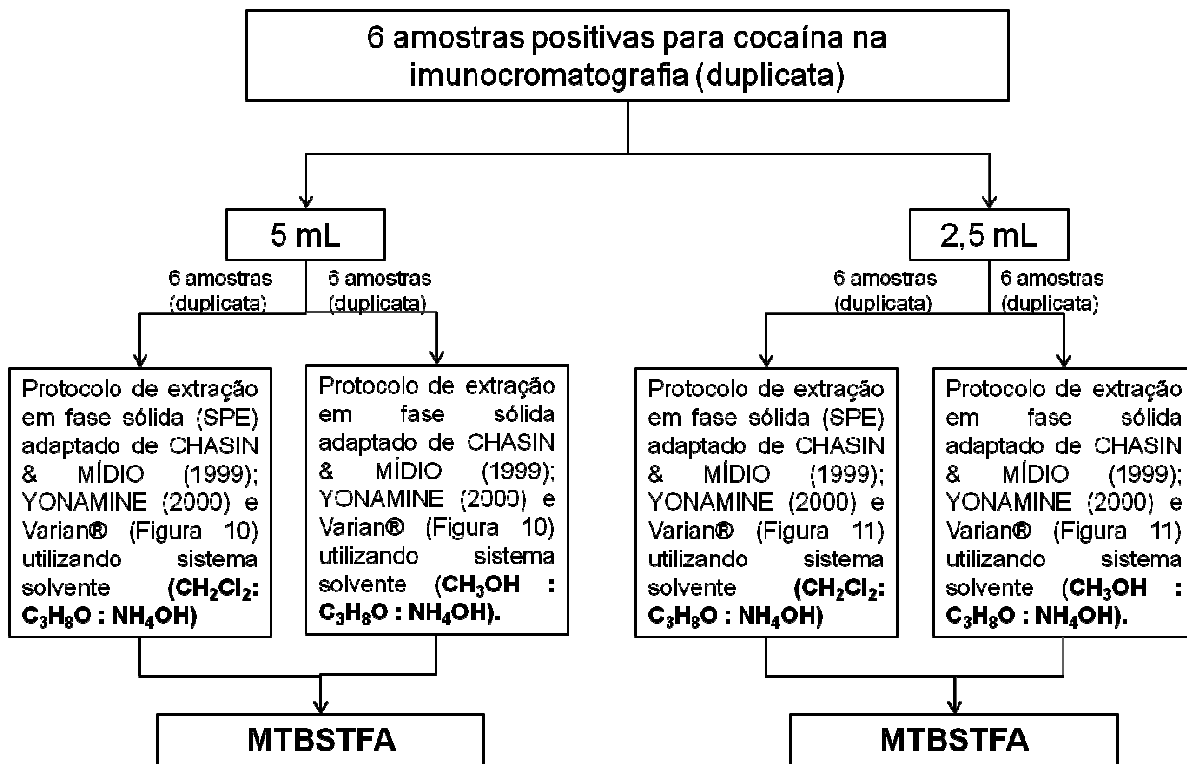
Para a determinação do melhor SS, foram testados dois SS diferentes. Amostras idênticas (em duplicata) (6 amostras, totalizando 12 análises para cada SS) foram submetidas à SPE com o SS (CH_2Cl_2 : $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$: NH_4OH) (78:20:2) (1) e posteriormente com o SS (CH_4OH : $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$: NH_4OH) (78:20:2) (2).

1.3.5.3 Volume de Amostra (VA)

Para a determinação do melhor VA, foram testados dois volumes de amostra para a otimização da extração por SPE. Inicialmente realizou-se a extração com 5mL de amostras idênticas (em duplicata) (6 amostras, totalizando 12 amostras para cada volume). Posteriormente, as mesmas amostras foram submetidas à SPE, todavia utilizando-se o volume de 2,5mL (em duplicata).

Os itens 1.3.5.2 e 1.3.5.3 foram realizados de acordo com a Figura 9.

Figura 9 - Realização dos testes de melhor sistema solvente e melhor volume de amostra



MTBSTFA: N-Metil-N-tert-Butildimetilsililtrifluoracetamida

1.3.5.4 Tempo de estabilidade do derivado formado (TED)

Para a determinação do TED, visando a utilização do amostrador automático com os derivados mantidos em temperatura ambiente, realizou-se, após a determinação do melhor SS, RD e VA, a injeção do mesmo derivado no cromatógrafo nos seguintes tempos: (1) imediatamente após a derivatização, (2) 1h após a derivatização, (3) 2h após a derivatização, (4) 3h após a derivatização e (5) 24h após a derivatização.

Também, para se analisar o TED, visando o armazenamento do derivado em *freezer* (-20°C), realizou-se a injeção do mesmo extrato nos tempos (1) imediatamente após a derivatização, (2) 1h após, (3) 2h após, (4) 3h após.

1.3.6 Método de extração

1.3.6.1 Extração em fase sólida (SPE)

Os procedimentos empregados para SPE foram adaptados de CHASIN e MÍDIO (1999), YONAMINE (2000) e da bula de SPE do kit Bond Elut Certify Varian®.

As amostras de pacientes foram eluídas em cartuchos do tipo ChromaBond® Drug da marca Macherey-Nagel (mistura 500mg C₈/SA Strong Cation Exchanger – Ácido Benzenossulfônico) por 2min em vácuo 5 polegadas de Hg.

Para a padronização da SPE, utilizaram-se dois VA (5mL e 2,5mL) e dois SS (CH₂Cl₂ : C₃H₈O : NH₄OH e CH₄OH : C₃H₈O : NH₄OH). Os dois protocolos utilizados estão descritos nas figuras 10 e 11.

Figura 10 - Protocolo de SPE para 5 mL de urina

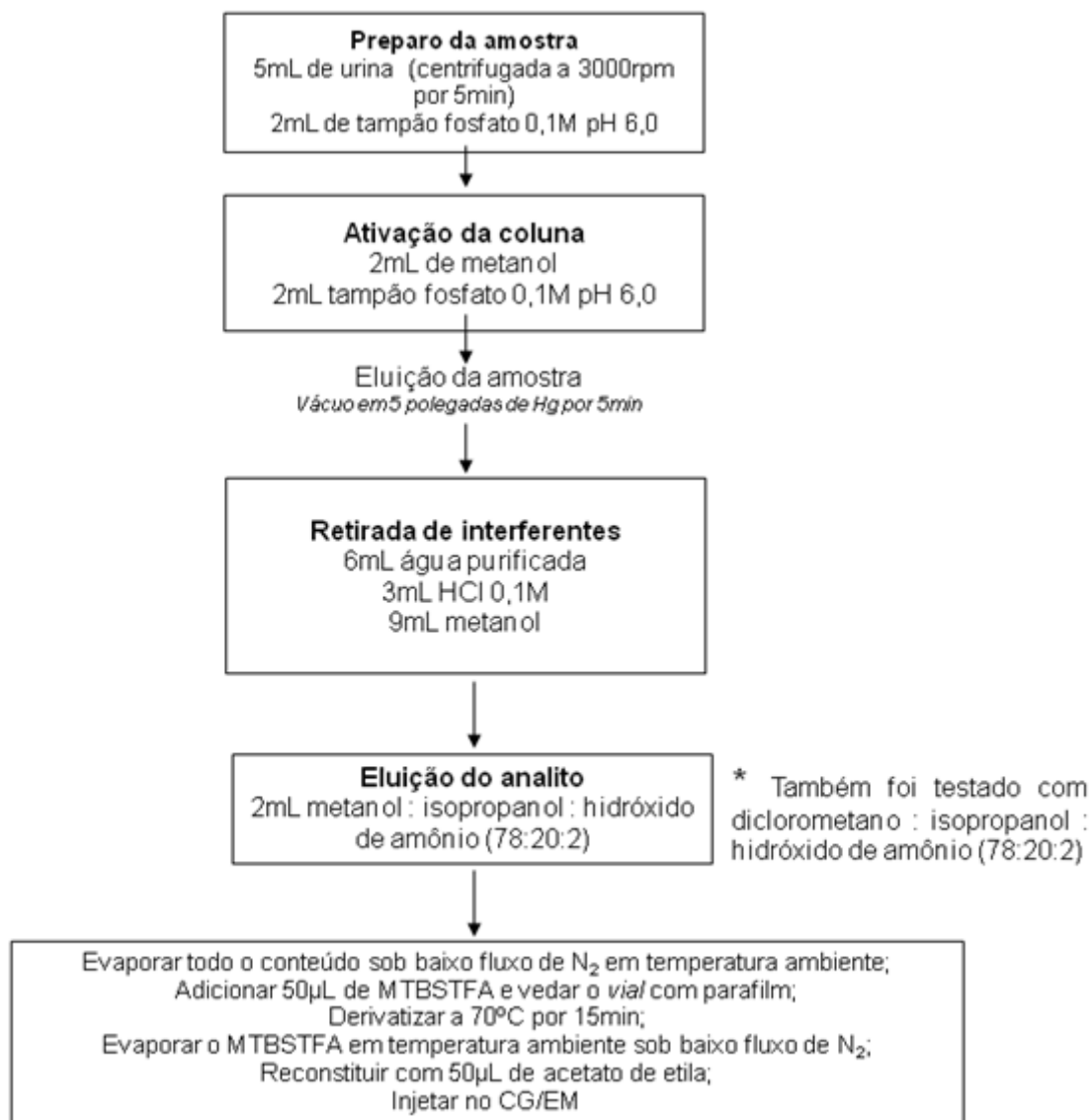
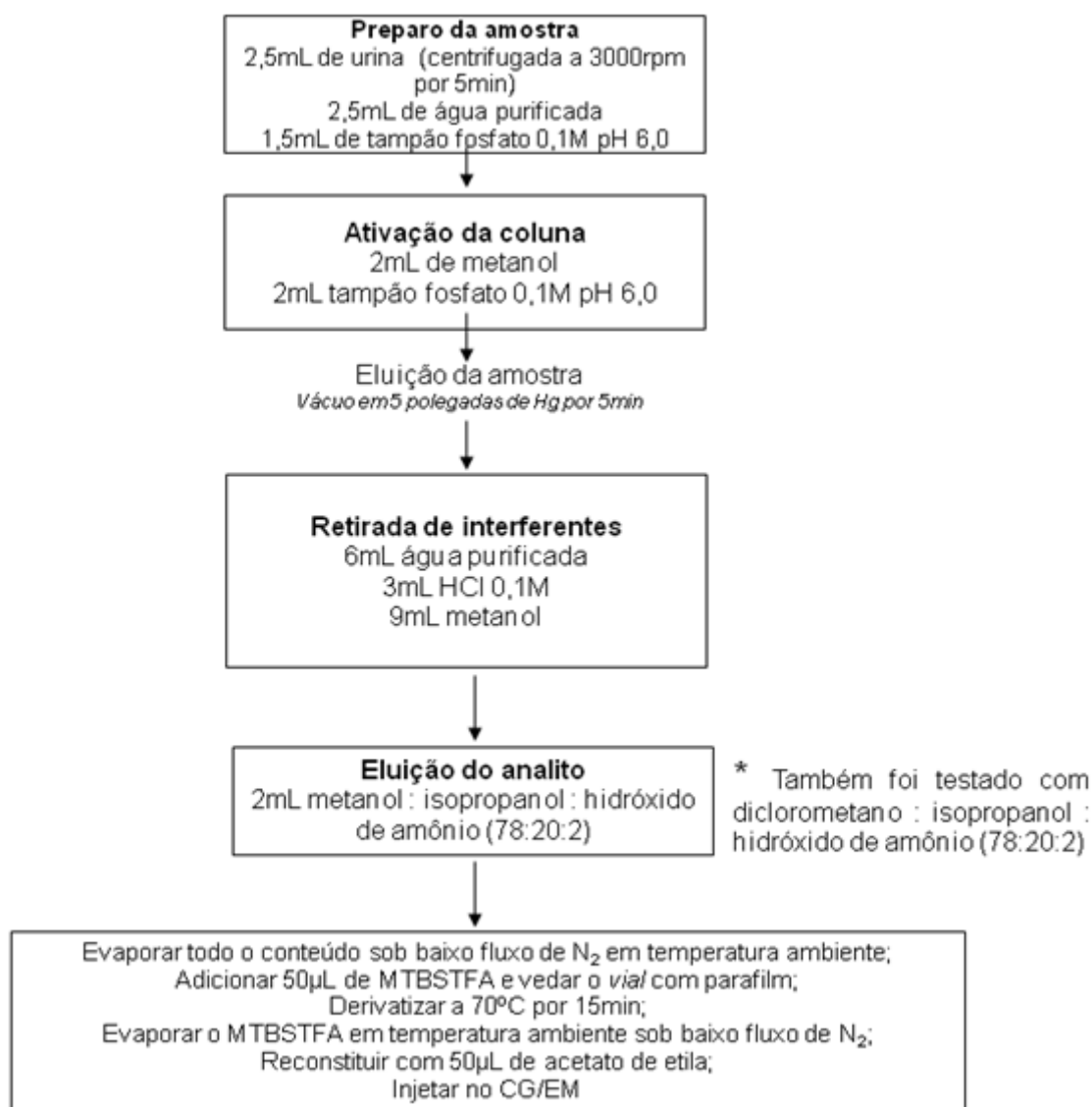


Figura 11 - Protocolo de SPE para 2,5 mL de urina



1.3.7 *Cutoff* do método

Como o intuito do trabalho era apenas de implantar um método que fosse eficiente para a detecção da cocaína e seus metabólitos em amostras de urina e levando-se em conta os níveis de *cutoff* determinados pela SAMHSA, foram preparadas soluções mãe de COC deuterada (d3) e EMA em acetonitrila na concentração de 10µg/mL. Esta solução mãe foi utilizada para fortificar amostras de urina negativas nas concentrações de 100ng/mL, 150ng/mL e 300ng/mL. Visto que os resultados positivos são liberados somente como positivos se atingirem um valor

de *cutoff* de 100ng/mL, testou-se o método proposto com as amostras nestas concentrações para certificar-se que este está detectando os valores necessários para a confirmação.

1.3.8 Utilização do AMDIS

O AMDIS (*Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System*) é um *software* utilizado para auxiliar os analistas a interpretar os cromatogramas e espectro de massas obtidos com a análise de matrizes complexas. Serve tanto para facilitar a identificação de substâncias que estão em baixas concentrações, como para separar aquelas que ficaram coeluídas devido à presença de interferentes (D'ARCY e MALLARD, 2004). Uma ferramenta de suma importância neste trabalho, visto que houve a coeluição da benzoilecgonina com a clorpromazina (medicamento corriqueiramente utilizado pelos pacientes atendidos pelo NAL).

O AMDIS é um algoritmo que consegue separar as substâncias coeluídas por meio do processo de deconvolução, o qual é um processo computacional que proporciona a separação dos componentes, criando um espectro puro de cada um deles (DU e ZEISEL, 2013).

1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

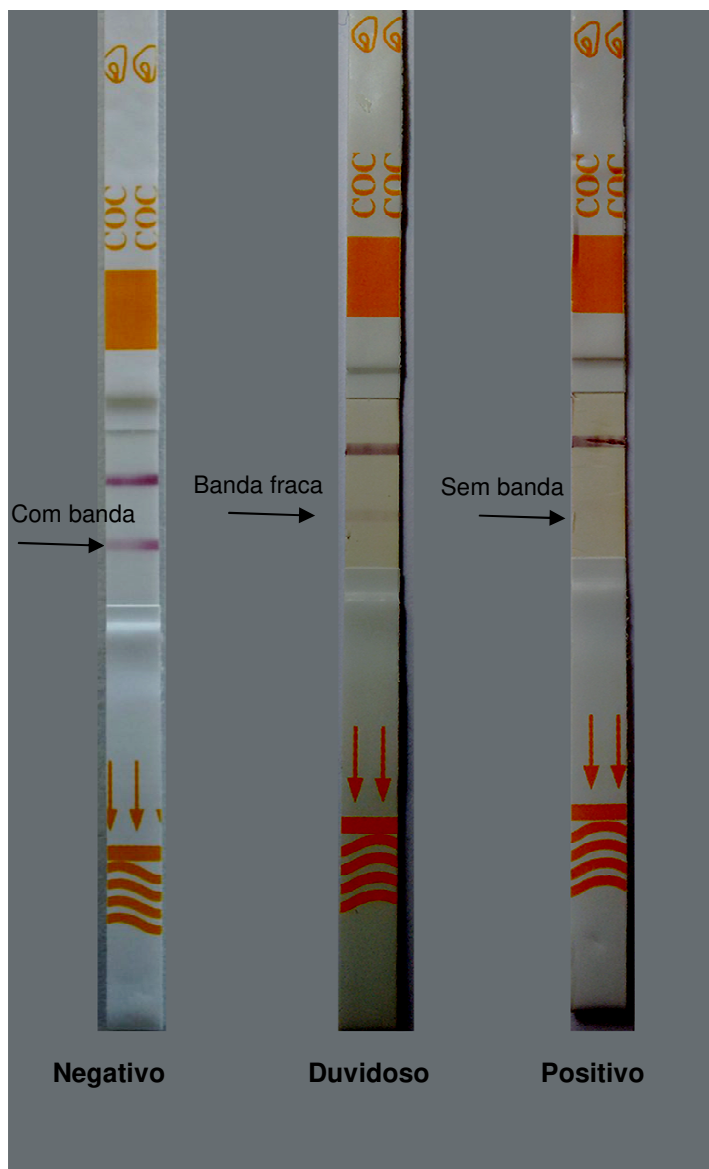
Os resultados do presente trabalho foram apresentados demonstrando a maneira lógica de como os experimentos foram realizados, iniciando com as análises de triagem, escolha do reagente de derivatização, condições para a derivatização, melhor sistema solvente, melhor volume de amostra, métodos de extração, aplicação em amostras de pacientes e compilação dos resultados obtidos.

1.4.1 Resultados obtidos na análise de triagem por imunocromatografia

As análises realizadas por IC reproduziram três resultados que estão exemplificados na Figura 12. O resultado considerado positivo por IC é aquele que não apresenta banda nenhuma no local do teste (banda inferior). O resultado duvidoso (para os analistas do NAL e pesquisadores deste trabalho) é aquele que

apresenta uma banda fraca no local do teste (banda inferior). E o negativo é aquele que apresenta banda nítida no local do teste (banda inferior).

Figura 12 - Resultados obtidos com as tiras individuais de imunocromatografia para COC e metabólitos com *cutoff* de 150ng/mL



1.4.2 Escolha do melhor reagente de derivatização (RD) e melhor sistema solvente (SS), do volume de amostra a ser utilizado (VA) e determinação do Tempo de Estabilidade do Derivado Formado (TED)

Nota: o tempo de retenção para benzoilecgonina apresentados nos cromatogramas dos itens 1.4.2.2 e 1.4.2.3 mostram um tempo de retenção aumentado devido a um ajuste realizado na coluna durante o desenvolver do trabalho.

1.4.2.1 Melhor reagente de derivatização (RD)

As figuras 13 e 14 elucidam a reação de derivatização da BE e do EME com MTBSTFA. Os APÊNDICES A e B determinam os derivados formados com ambos os reagentes utilizados (MTBSTFA E BSTFA).

Figura 13 - Reação de derivatização da BE com MTBSTFA

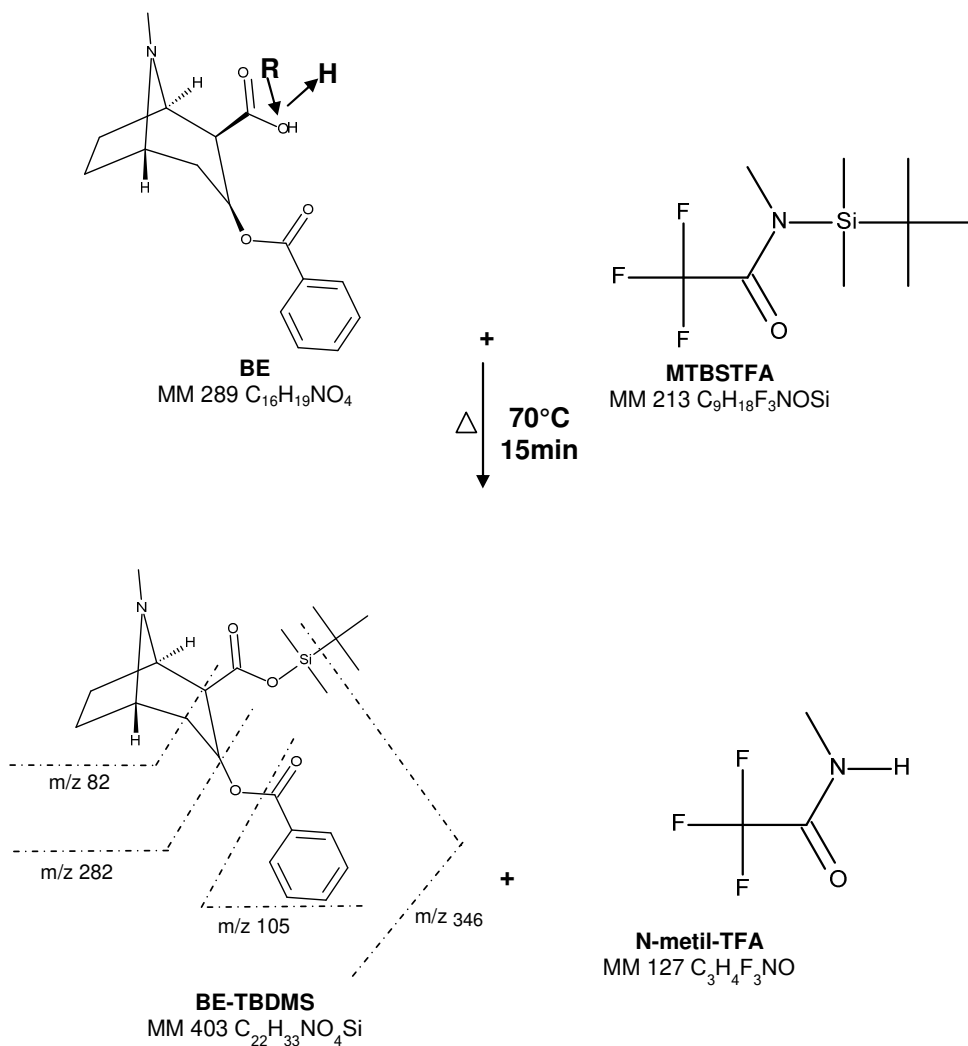
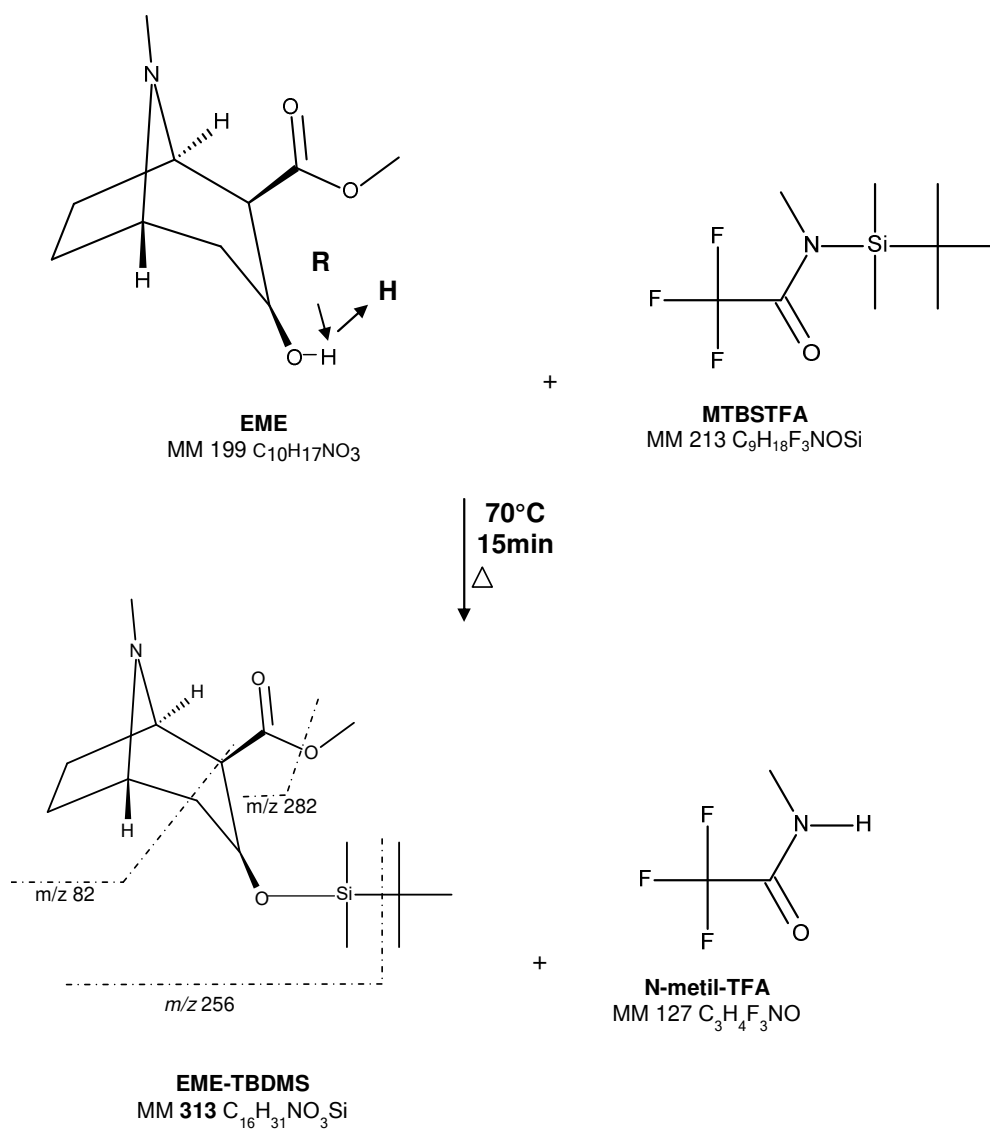


Figura 14 - Reação de derivatização do EME com MTBSTFA



A partir dos cromatogramas e espectros de massas apresentados nas figuras 15 e 16, referentes ao mesmo extrato, extraído em duplicata, porém tratado com diferentes reagentes de derivatização (MTBSTFA e BSTFA), foi possível se determinar que o MTBSTFA é o reagente mais adequado para o NAL-CIT/FEPPS, devido à maior disponibilidade, à formação de derivados com massas maiores, à estabilidade e principalmente devido à maior facilidade do AMDIS em detectar os picos característicos dos derivados formados na reação com MTBSTFA (Resultados do AMDIS nos APÊNDICE D e E).

Figura 15 - Cromatograma e espectro de massas de amostra derivatizada com BSTFA

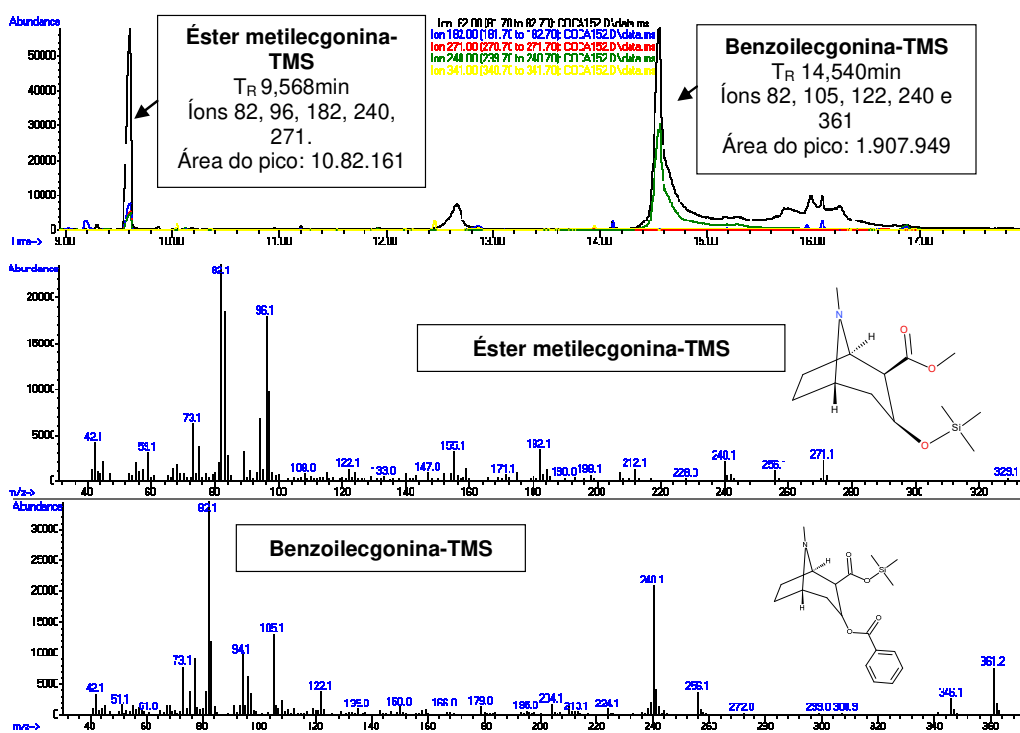
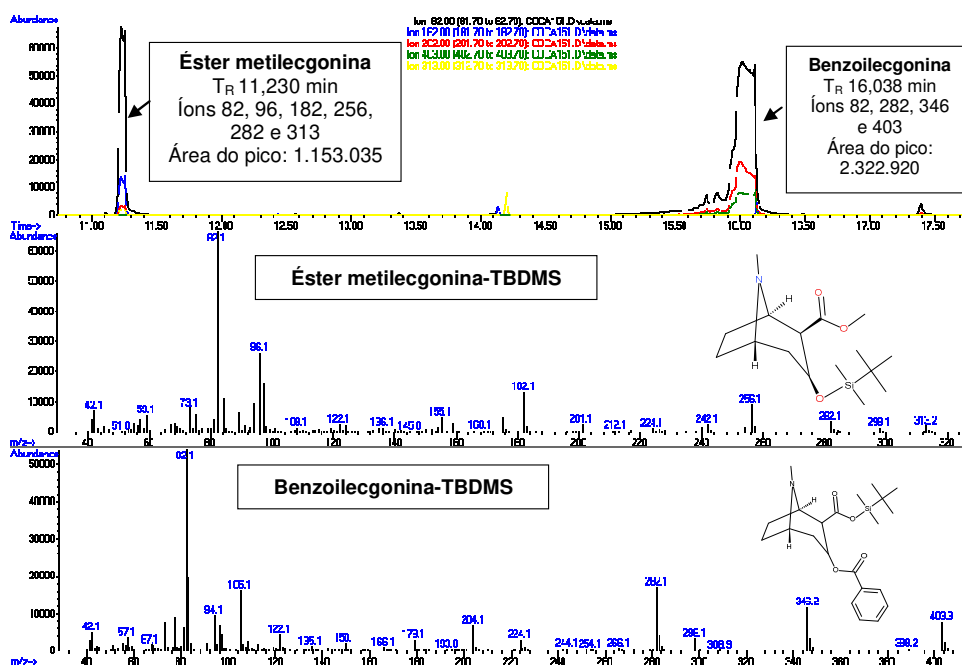


Figura 16 - Cromatograma e espectro de massas de amostra derivatizada com MTBSTFA

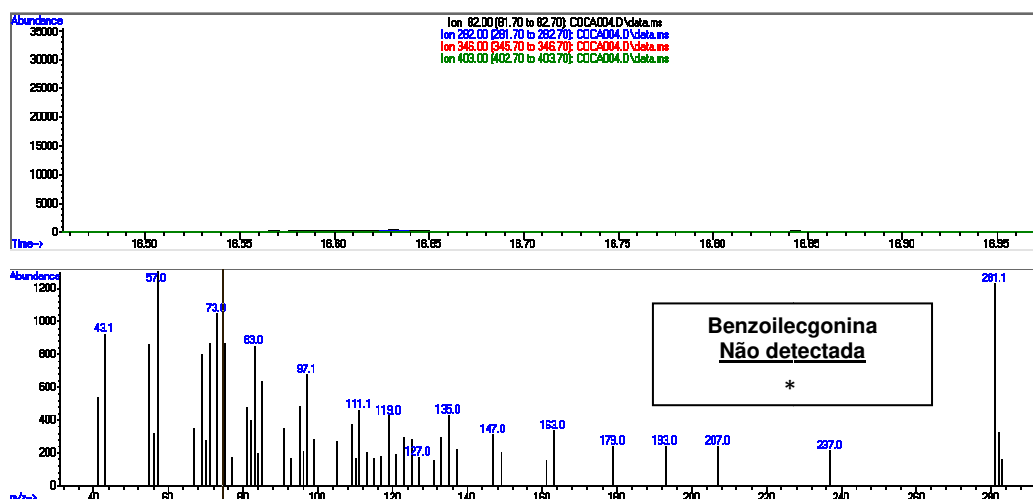


1.4.2.2 Melhor sistema de solvente (SS)

Foram testados dois sistemas solventes para a extração do analito das colunas de SPE CH_2Cl_2 : $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$: NH_4OH (80:20:2) (1) e CH_4OH : $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$: NH_4OH (80:20:2) (2). De acordo com os resultados mostrados nas figuras 17 e 18, o sistema (2), mostrou-se mais eficiente do que o sistema (1).

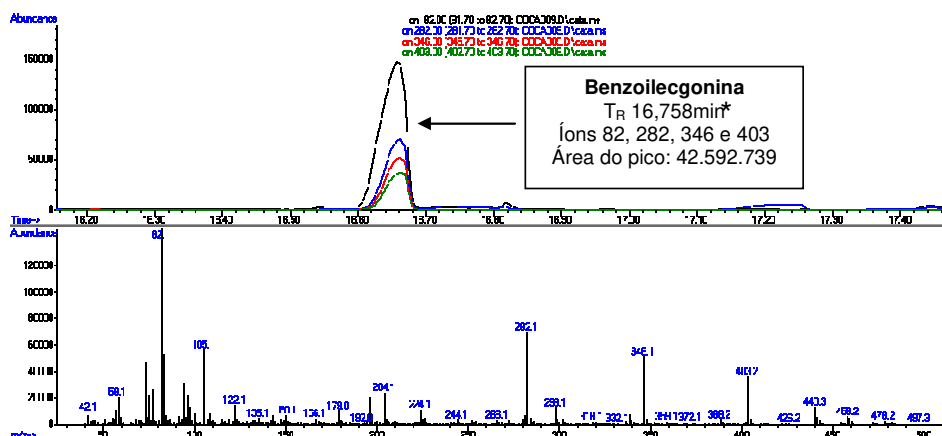
As figuras 17 e 18 fazem uma comparação dos resultados obtidos para a mesma amostra quando SS utilizados para a extração foram diferentes ((1) e (2)). As tabelas 10, 11, 12 e 13 dos APÊNDICES F e G evidenciam a comparação dos resultados.

Figura 17 - Cromatograma e espectro de massas de amostra positiva para benzoilecgonina em SCAN (5 mL de amostra) extraída com o SS (1)



*Tempo de retenção aumentado com relação ao descrito na Tabela 3 devido ao corte da coluna durante o decorrer do experimento

Figura 18 - Cromatograma e espectro de massas de amostra positiva para benzoilecgonina em SCAN (5 mL de amostra) extraída com o SS (2)



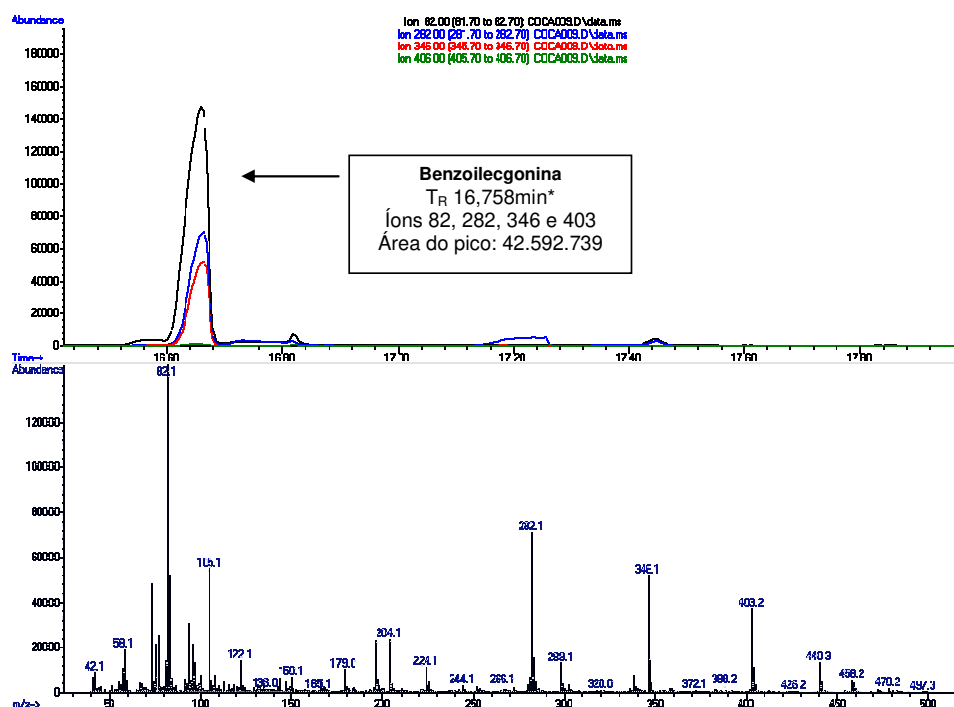
*Tempo de retenção aumentado com relação ao descrito na Tabela 3 devido ao corte da coluna durante o decorrer do experimento

Com estes dados, foi possível se concluir que o SS (1) não é eficiente para a extração do analito do cartucho de SPE, uma vez que não se obteve o pico para benzoilecgonina na amostra da Figura 17. Em contrapartida, o SS (2) é eficiente para a extração do analito do cartucho de SPE, uma vez que se obteve o pico de benzoilecgonina no tempo de retenção adequado.

1.4.2.3 Melhor volume de amostra (VA)

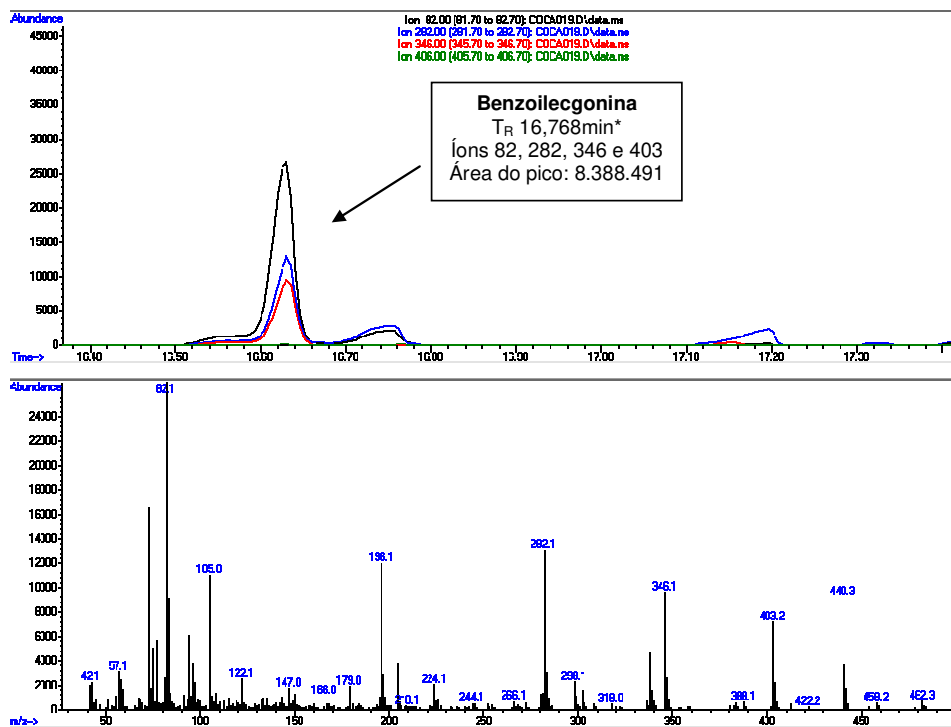
O melhor VA a ser utilizado no método proposto foi determinado em 5 mL. As figuras 19 e 20 fazem uma comparação dos resultados obtidos para a mesma amostra quando os volumes utilizados para a extração foram diferentes (5 mL e 2,5 mL). As tabelas 10, 11, 12 e 13 dos APÊNDICES F e G evidenciam a comparação dos resultados.

Figura 19 - Cromatograma e espectro de massas de amostra positiva para benzoilecgonina em SCAN (5 mL de amostra)



*Tempo de retenção aumentado com relação ao descrito na Tabela 3 devido ao corte da coluna durante o decorrer do experimento

Figura 20 - Cromatograma e espectro de massas de amostra positiva para benzoilecgonina em SCAN (2,5 mL de amostra)



A partir desses resultados, pôde-se comprovar que o volume de 5 mL de amostra é o ideal para a utilização deste método de extração. Quando 2,5 mL de urina são utilizados, a abundância e a área do pico de benzoilecgonina presente na urina são reduzidas. Ainda constata-se que, de 6 amostras analisadas como positivas com 5 mL de urina 4 negativaram no uso de apenas 2,5 mL de amostra (APÊNDICE G).

1.4.2.4 Tempo de Estabilidade do Derivado formado (TED)

Para a avaliação do TED a temperatura ambiente durante período de injeção automática com amostrador automático CombiPAL® utilizaram-se os extratos de 3 amostras já derivatizados com MTBSTFA e armazenados em vials alocados na bandeja de injeção.

Foram realizadas 4 injeções em tempos diferentes de acordo com o item 1.3.5.4. Analisou-se a estabilidade de acordo com a área apresentada para o pico de benzoilecgonina em cada injeção. Os resultados encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 - Área do pico de BE, amostra em amostrador (25°C)

Amostra	T1	T2(1h)	T3(2h)	T4(3h)	T5(24h)
Coca113	1.874.232	2.180.074	903.231	ND	ND
Coca114	1.185.684	1297757	1.096.305	ND	ND
Coca115	34.915.787	30.560.977	17.845.132	3.915.647	ND

ND= Não detectado

A partir destes resultados, pode-se inferir que as amostras não devem ficar mais de 1h fora do freezer alocadas na bandeja de injeção, uma vez que a área do pico diminui (indicando estabilidade baixa em temperatura ambiente).

No entanto, o mesmo teste foi realizado para a mesma amostra, todavia mantendo-a em freezer (-20°C) até o momento da injeção. Os resultados estão expressos na tabela 5.

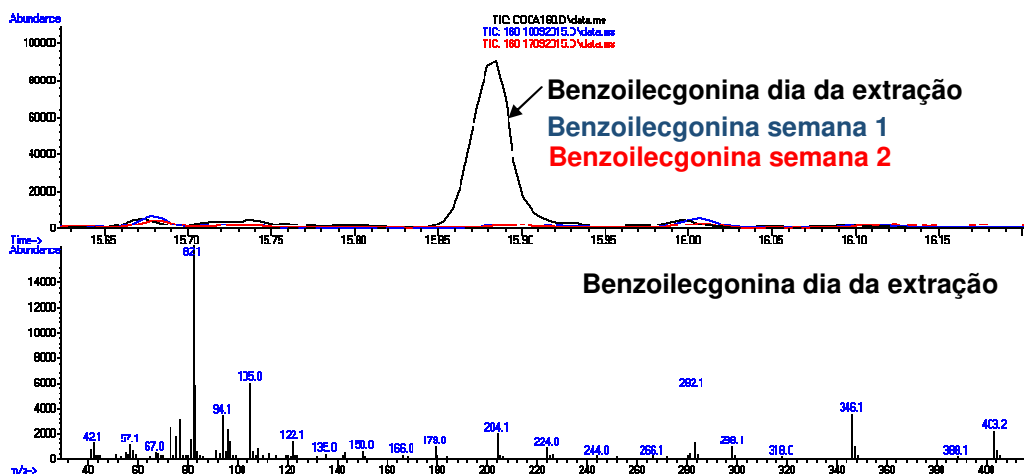
Tabela 5 - Área do pico de BE, amostra em freezer (-20°C)

Amostra	T1	T2(1h)	T3(2h)	T4(3h)
MTBSTFA	25.622.056	28.873.465	23.203.234	28.244.534

Os resultados obtidos indicam que, quando armazenado em freezer, o derivado com MTBSTFA mantém-se estável por no mínimo 3h. O que indica que os extratos não devem ser mantidos alocados na bandeja de injeção por mais de 1h, todavia podem ser armazenados por um período de pelo menos 3 horas no freezer (-20°C).

Os resultados obtidos no teste de estabilidade por 2 semanas em freezer (-20°C) com uma injeção por semana do derivado, encontram-se no cromatograma da Figura 21. O pico determinado em 15,85 min na cor preta é o da benzoilecgonina no dia da extração. Os picos em azul e vermelho, que não foram detectados, representavam – respectivamente – a primeira e a segunda semana após a aquisição do derivado. Os resultados obtidos com a análise de estabilidade do derivado formado indicam que este não é estável por períodos muito longos quando armazenado em freezer em vials âmbar vedados.

Figura 21 - Cromatogramas sobrepostos do derivado obtido armazenado em freezer (-20°C) por período de duas semanas



1.4.3 Método de extração

1.4.3.1 Extração em fase sólida (SPE)

Foram comparados dois protocolos de extração para cocaína e metabólitos por SPE. Os protocolos estão descritos nas Figuras 10 e 11. Ao final de estudo,

construiu-se o protocolo ideal para o NAL-CIT/FEPPS e para a Central Analítica da UFCSPA que está descrito no APÊNDICE C.

1.4.4 Interferência da clorpromazina

Apesar de possuírem uma estrutura molecular diferente (Figura 22), a clorpromazina e a benzoilecgonina aparecem coeluídas quando se derivatiza o extrato, obtido pela extração por SPE, com MTBSTFA. A coeluição dá-se pelo fato de ambas as substâncias serem de caráter básico e se encontrarem na forma catiônica, quando em pH 6,0, favorecendo a extração com o uso de cartuchos SCX. Ela pode ser discernida quando se utiliza o AMDIS para deconvolução do pico do medicamento e o da droga (Figura 23).

Figura 22 - Estrutura molecular da clorpromazina e da benzoilecgonina

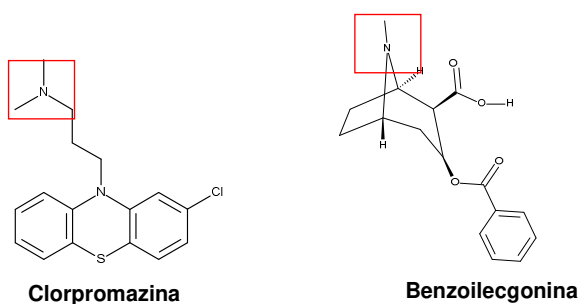
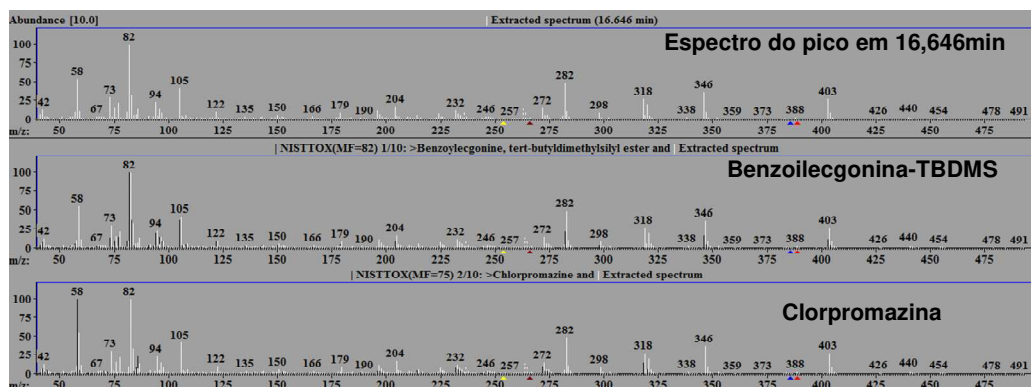


Figura 23 - Espectro de massas obtido de amostra com benzoilecgonina-TBDMS e clorpromazina coeluídas utilizando o AMDIS



Íons em branco: íons obtidos no espectro. Íons em preto: íons de acordo com a biblioteca NIST 2011.

O AMDIS proporcionou a fácil identificação de ambas substâncias, auxiliando o analista na obtenção de espectros puros de cada uma delas, por meio da deconvolução de picos coeluídos.

A clorpromazina aparece coeluída com a benzoilecgonina, uma vez que ambas são aminas de caráter básico que ficam retidas nos cartuchos de troca catiônica e conseguem ser eluídas com o uso da mistura de solventes CH₃OH: C₃H₈O: NH₄OH.

1.4.5 *Cutoff* do método

O método foi testado com urinas negativas fortificadas com padrões analíticos certificados nas concentrações de 100 ng/mL, 150 ng/mL e 300 ng/mL para se comprovar que este está detectando amostras que contenham esta concentração da droga e metabólitos. Os resultados para EMA e COC-d₃ encontram-se nas figuras 24 e 25, respectivamente. Para benzoilecgonina, enfrentou-se dificuldade de aquisição do padrão analítico devido à demora da entrega do mesmo, portanto para determinação do *cutoff* da benzoilecgonina, utilizou-se o processo de diluição dos controles de qualidade interno e externo descritos no item 1.4.6.

Figura 24 - Cromatogramas sobrepostos de amostras de urina negativas fortificadas com EMA nas concentrações de 100 ng/mL, 150 ng/mL e 300 ng/mL

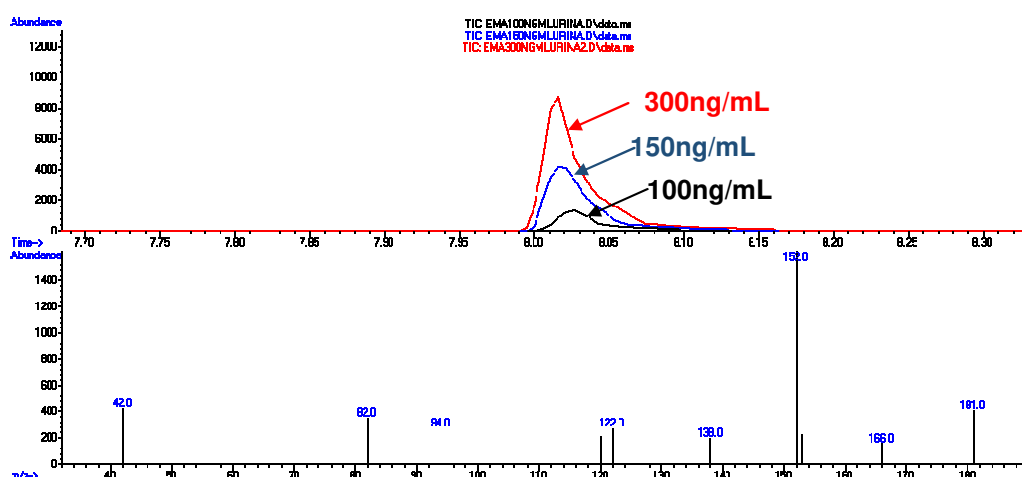
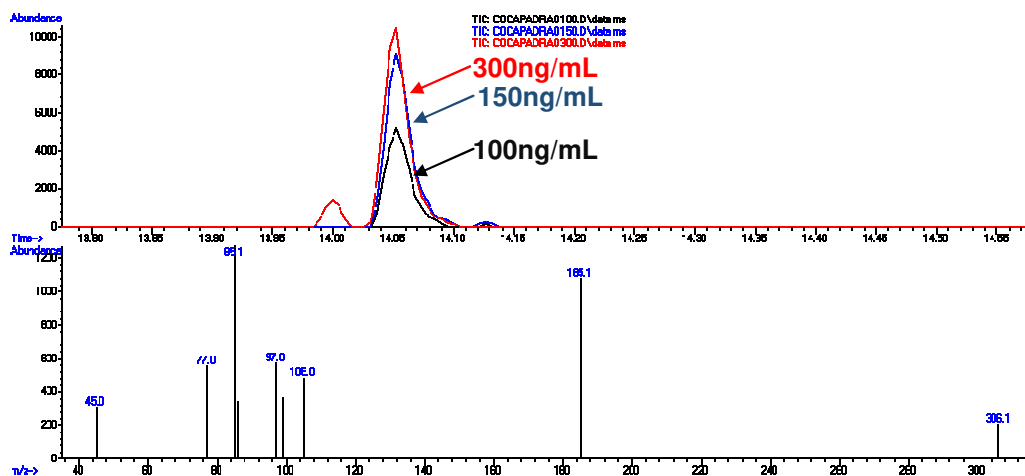


Figura 25 - Cromatogramas sobrepostos de amostras de urina negativas fortificadas com COC-d₃ nas concentrações de 100 ng/mL, 150 ng/mL e 300 ng/mL



1.4.6 Controle de qualidade do método

1.4.6.1 Controle interno de qualidade

O controle interno (CI) de qualidade do método (avaliação de precisão), foi realizado por meio do uso de controles industrializados (LiquiChek™ - Urine Toxicology Control da Bio-Rad), para benzoilecgonina. A concentração inicial da urina controle foi de 366 ng/mL. Visando o limite de detecção preconizado pela SAHMSA, anteriormente à análise, estas urinas controle foram diluídas para obter-se uma concentração de 100 ng/mL.

Para COC e EMA, foram preparados controles *in house* de urinas negativas fortificadas com padrões na concentração de 100 ng/mL.

A cada corrida analítica foram utilizados um controle positivo de BE (LiquiChek™, Bio-Rad), um de COC, um de EMA e ainda um controle negativo (urina sem presença de COC e/ou metabólitos e derivados). As figuras 26, 27 e 28 mostram os cromatogramas e espectro de massas dos CI de COC, BE e EMA. A figura 29 elucida das razões m/z obtidas com a análise das moléculas de COC e COC-d₃.

Figura 26 – Cromatograma e espectro de massas do CI de BE

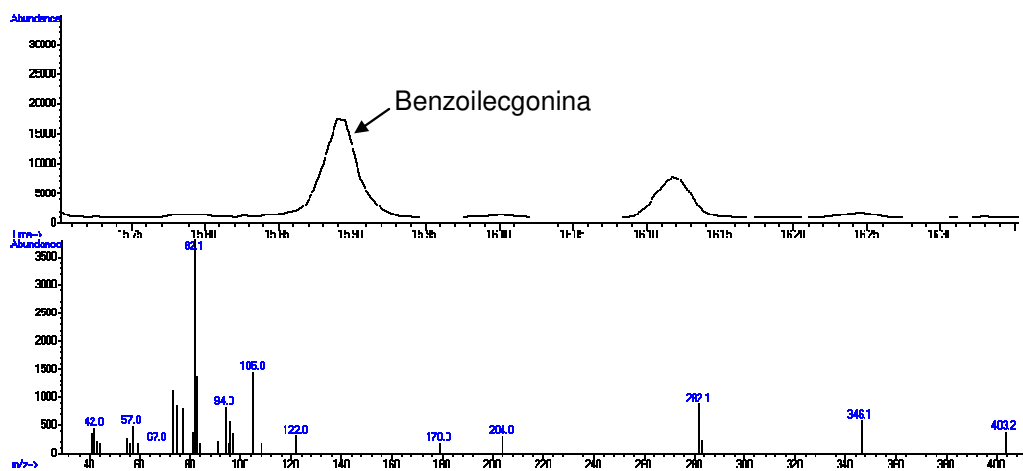


Figura 27 - Cromatograma e espectro de massas do CI de EMA

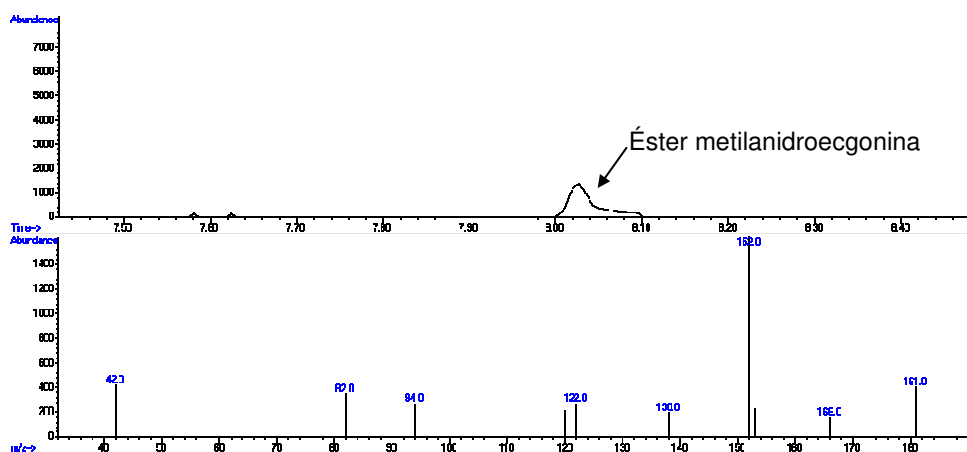


Figura 28 – Cromatograma e espectro de massas do CI de COC-d₃

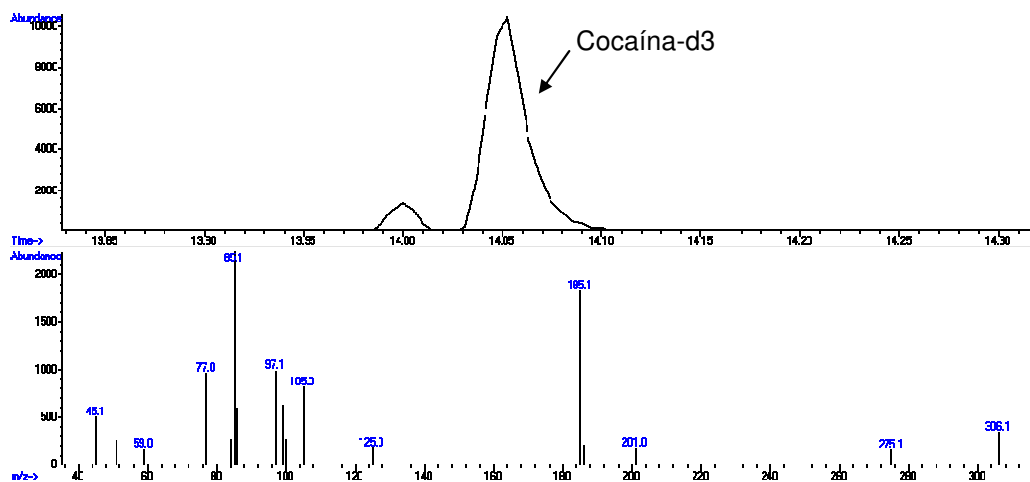
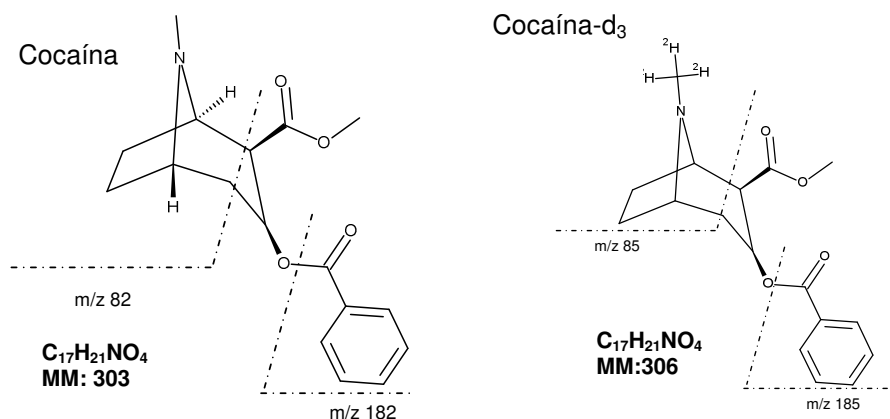


Figura 29 - Razões m/z das moléculas de COC e COC-d₃

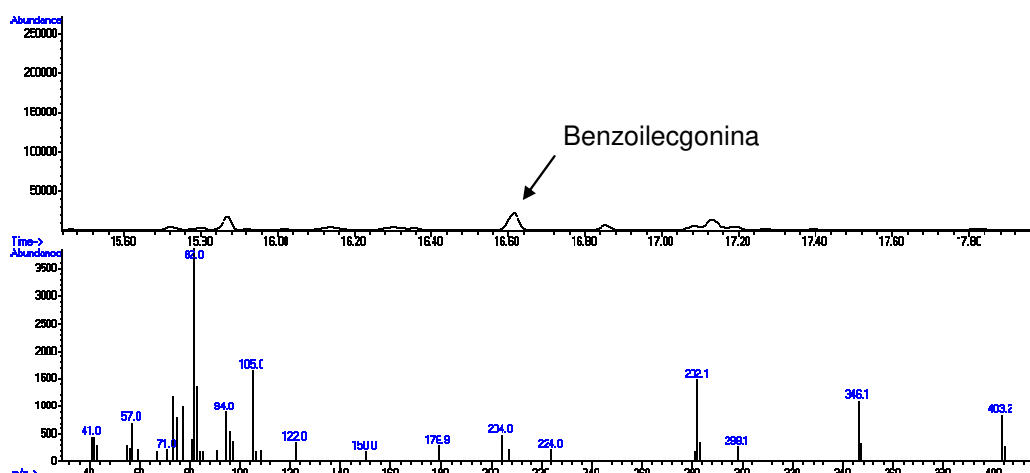


1.4.6.2 Controle externo de qualidade

Para controle externo de qualidade do método (avaliação de exatidão), o NAL-CIT/FEPPS participa do ensaio de proficiência RIQAS *Urine Toxicology Programme* da Randox. O qual possui 2 ciclos anuais, cada ciclo contendo 6 amostras.

A figura 30 mostra o cromatograma obtido para uma amostra do ensaio de proficiência RIQAS com concentração determinada pela RANDOX em 375 ng/mL (a qual foi diluída, com adição de urina negativa, para a concentração de 100 ng/mL para determinação do *cutoff* da benzoilecgonina).

Figura 30 – Cromatograma e espectro de massas de amostra do ensaio de proficiência RIQAS na concentração de 100 ng/mL



1.4.7 Identificação do levamisol em amostra de paciente

A Figura 31 demonstra uma das amostras de pacientes utilizadas na pesquisa com a presença de levamisol. Este fato sugere que outra pesquisa complementar seja realizada para que a metodologia seja expandida para a detecção de levamisol em amostras de urina, uma vez que este adulterante vem preocupando pesquisadores e médicos, visto que poderá se tornar um problema de saúde pública pelos efeitos que causa em pacientes expostos por longo prazo. A Figura 32 expressa o cromatograma e o espectro de massas do padrão de levamisol.

Figura 31 - Cromatogramas e espectro de massas de amostra positivas para cocaína e metabólitos com presença de levamisol

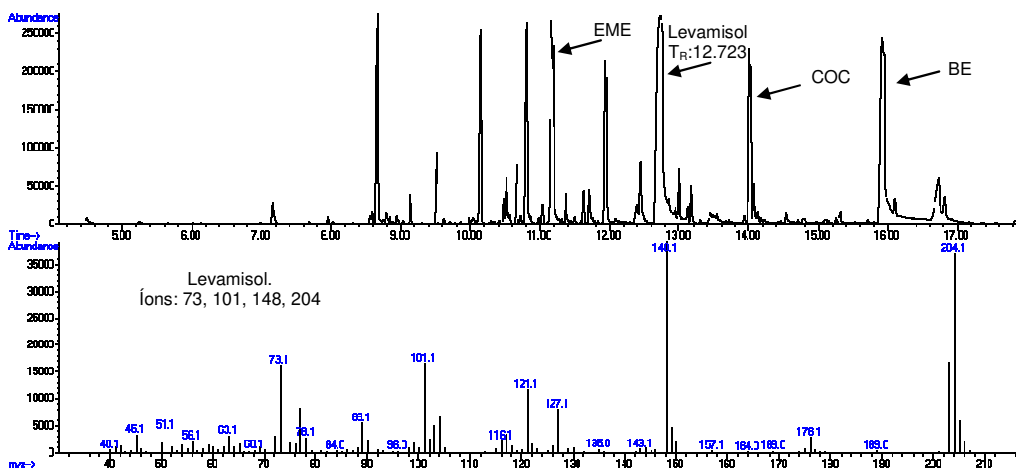
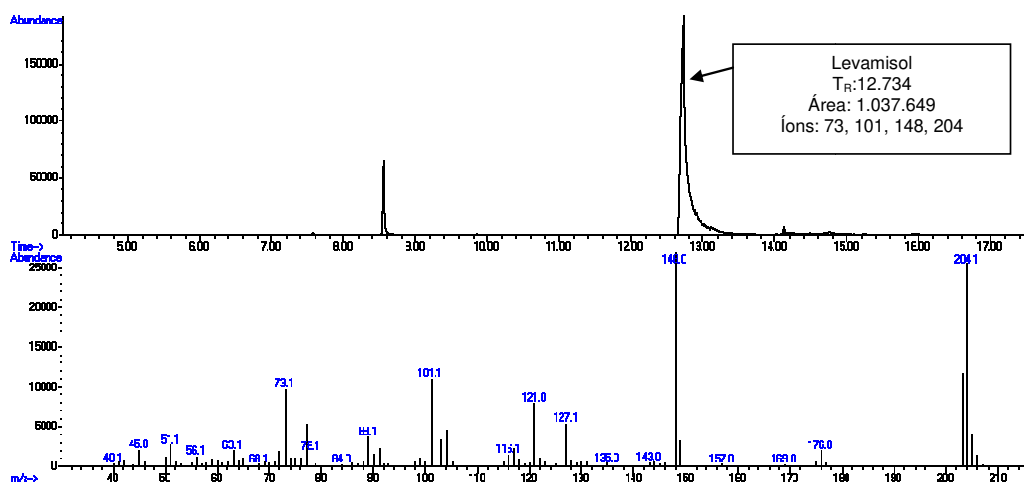


Figura 32 - Cromatograma e espectro de massas do padrão de levamisol

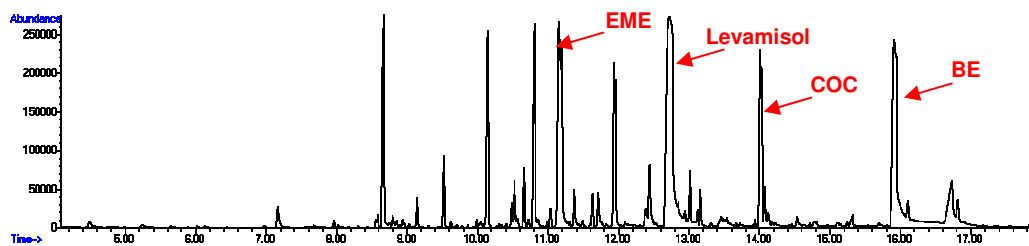


1.4.8 Cromatograma de amostra de paciente

Para análise de amostras de pacientes segue-se com o modo de aquisição SCAN, visto que a quantidade de analitos que podem ser identificados em uma mesma amostra é muito vasta.

A Figura 33 demonstra a análise de uma amostra de paciente recebida pelo NAL.

Figura 33 - Cromatograma de amostra de paciente



EME: éster metilecgonina; BE: benzoilecgonina; COC: cocaína.

1.4.9 Avaliação das metodologias analíticas

Como foi visto no item 1.4.1, os resultados obtidos com os testes de triagem são classificados pelos analistas do NAL em três categorias: positivos, duvidosos e negativos.

A partir destes resultados e da posterior confirmação dos mesmos, propôs-se que as amostras com resultados duvidosos (bandas fracas), assim como as com resultados positivos, fossem incluídas na análise confirmatória.

A bula das tiras individuais utilizadas no trabalho e dos outros painéis para análise de drogas de abuso por IC disponíveis no NAL sugerem que os resultados duvidosos (com bandas fracas) sejam considerados negativos. No entanto, comprovou-se que parte destes resultados são realmente negativos enquanto outros são falso-negativos (Tabela 6).

Pensando no propósito principal de uma bula, que é o de guiar o usuário a fazer o uso correto do dispositivo ou medicamento em questão, decidiu-se demonstrar o impacto que a determinação de não confirmar resultados duvidosos causa no desempenho dos testes de IC, por meio da avaliação das metodologias analíticas utilizadas no presente trabalho.

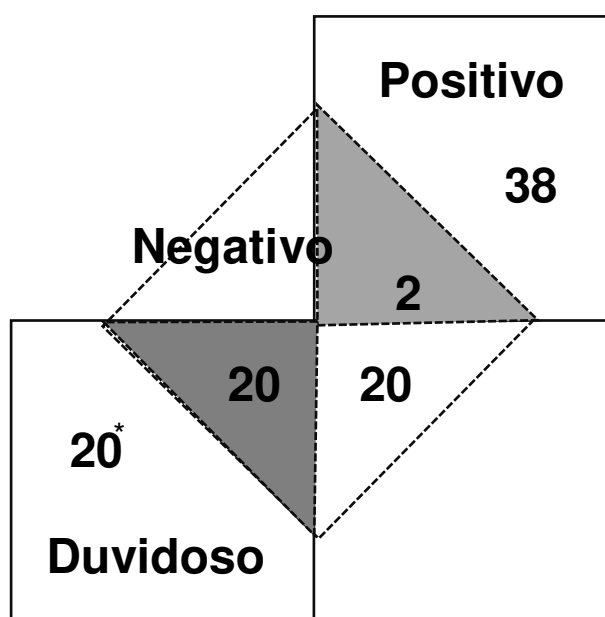
A avaliação foi realizada por meio de duas comparações: IC (triagem) e CG-EM (confirmatória). Considerando o CG-EM como padrão ouro para detecção de cocaína e metabólitos, das 100 amostras testadas, dentro das quarenta (n=40) positivas por IC, trinta e oito (n=38) foram verdadeiro-positivas e duas (n=2) falso-positivas. Dentre as 20 (n=20) amostras negativas por IC, vinte (n=20) foram verdadeiro-negativas. Contudo, avaliando-se as amostras duvidosas de acordo com a bula do fornecedor do kit de IC, que indica que estas devem ser consideradas negativas, das quarenta (n=40) amostras analisadas por IC, vinte (n=20) foram falso-negativas e vinte (n=20) verdadeiro-negativas. A Figura 33 e a Tabela 6 exemplificam os resultados obtidos com a confirmação por CG-EM de todas as amostras analisadas por IC.

Tabela 6 - Resultados obtidos com a confirmação por CG-EM de todas as amostras analisadas com IC

		CG/EM		Total
		Positivo	Negativo	
IC	Positivo	38 VP	2 FP	40
	Negativo	20 FN	40 VN	60
	Total	58	42	100

VP= verdadeiro-positivo; VN= verdadeiro-negativo; FP= falso-positivo; FN= falso-negativo.

Figura 34 - Resultados obtidos com a confirmação por CG-EM de todas as amostras analisadas com IC



*Resultados confirmados como positivos por CG-EM.

Se mantivermos a indicação de não confirmar os resultados duvidosos, o desempenho dos testes de IC comparado com a metodologia de CG-EM, de acordo com este estudo, resulta em valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) descritos na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados obtidos com a não confirmação de amostras duvidosas

	Resultado (%)
Sensibilidade	65,5
Especificidade	95,2
VPP	95,0
VPN	66,7

VPP= Valor preditivo positivo; VPN= Valor preditivo negativo; Sensibilidade= $VP/VP+FN$;
Especificidade= $VN/VN+FP$; VPP= $VP/VP+FP$ e VPN= $VN/VN+FN$

A sensibilidade e o VPN demonstram um desempenho relativamente baixo dos testes de imunocromatografia quando não se realiza a confirmação de resultados duvidosos, visto que a quantidade de resultados falso-negativos é elevada [50% (de 40 amostras duvidosas, apenas 20 eram negativas de fato)]. Este resultado se dá, quando se determina que as amostras duvidosas devam ser consideradas negativas, não se realizando a confirmação das mesmas. No entanto, se as bulas dos kits indicarem que resultados dúbios devam ser confirmados por CG-EM, ou até mesmo cromatografia líquida/espectrometria de massas (LC-MS), a sensibilidade e o VPN serão consideravelmente melhorados, já que desta forma os resultados duvidosos não poderão ser classificados mediante interpretação dos testes de IC, somente por resultado confirmatório.

Portanto, a etapa de triagem de análises toxicológicas para drogas de abuso é de extrema importância, pois descarta a necessidade de confirmação de amostras negativas (aquelas que obtêm a presença de uma banda bem definida no local do teste), contudo necessita a combinação com análises confirmatórias por metodologias mais sensíveis, como a CG-EM ou LC-MS, para amostras positivas e especialmente para aquelas amostras que obtiveram um resultado dúbio na IC, visando à eliminação de resultados falso-negativos e falso-positivos.

1.5 CONCLUSÃO

Concluiu-se que para utilização do método confirmatório para análise de cocaína e metabólitos em urina de pacientes sob monitoramento de drogadição no NAL-CIT/RS, o melhor preparo da amostra e as condições para separação e detecção mais adequadas são:

- O MTBSTFA é o melhor reagente de derivatização;
- O volume de amostra adequado para extração por SPE é de 5mL;
- O sistema solvente adequado para a extração por SPE é Metanol : Isopropanol : hidróxido de amônio (78:20:2);
- O método desenvolvido mostrou ser eficiente para a detecção de cocaína, benzoilecgonina, éster metilecgonina e éster metilanidroecgonina;
- O método desenvolvido é capaz de discernir usuários de cloridrato de cocaína e usuários de *crack* (por meio da detecção do éster metilanidroecgonina);
- É necessário que se faça o uso de controles interno de qualidade (positivo e negativo) em cada corrida analítica para que se garanta precisão do método analítico. Além disso, a participação em ensaios de proficiência torna-se um adendo da análise, demonstrando exatidão dos métodos ofertados pelo laboratório.
- Amostras duvidosas para a presença de cocaína e metabólitos analisadas por IC devem ter seus resultados confirmados por outra metodologia, sendo a de CG-EM a recomendada;
- Apesar da clorpromazina (fármaco utilizado no tratamento dos pacientes) ter sido encontrada como interferente na análise, sua interferência pode ser excluída com o auxílio do processo de deconvulsão proporcionado pelo uso do *software* AMDIS;
- A metodologia implantada foi capaz de detectar o levamisol em algumas amostras de urina. No entanto, este resultado deve ser analisado com maior cuidado em estudos posteriores.

1.6 REFERÊNCIAS

ACCU-TELL®, folheto informativo para Cocaine Rapid Saliva Test. China: AccuBioTech Co., LTDA. Bula do teste. Disponível em: http://www.accubiotech.com/templates/T_yestem_News/index.aspx?nodeid=49epage=ContentPagecontentid=209#1. Acesso em 24 de julho de 2015.

ALMEIDA, F.L.A.A. Análise Comparativa de Amostras de Cocaína Apreendidas em Diferentes Estados Brasileiros. 2003. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade de Brasília.

BAIRROS, A.V. Desenvolvimento de métodos analíticos para identificação de drogas facilitadoras de crime em amostras de urina. 2014. 148 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2014.

BARILE, F. A. Clinical toxicology: principles and mechanisms. 2nd ed. New York: Informa Healthcare, 2010. 467 p.

BORTOLOTTI, F. et al. Toxicokinetics of Cocaine and Metabolites: The Forensic Toxicological Approach. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 33, p. 5658-5663, 2012. ISSN 0929-8673/1875-533X. Disponível em: < <http://www.eurekaselect.com/node/104769/article> >.

BOTELHO, E.D. Desenvolvimento de uma nova metodologia analítica para identificação e quantificação de truxilinas em amostras de cocaína baseada em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM). 30 de novembro de 2011. 156p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília. Brasília, 30 de novembro de 2011.

BRASIL, ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Termo de Cooperação nº37. Controle Interno de Qualidade para Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos. Disponível em:

http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/manual_testes_antimicrobianos.pdf. Acesso em 16 de dezembro de 2015.

CALDAS, S. S. et al. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. *Quím. Nova* [online]. v.34, n.9, p 1604-1617. 2011.

CARLINI, E.A; NOTO, A.R; SANCHEZ, Z.M; CARLINI, C.M; LOCATELLI, D.P, ABEID, L.R. VI Levantamento Nacional sobre o Consumo de Drogas Psicotrópicas entre Estudantes do Ensino Fundamental e Médio das Redes Pública e Privada de Ensino das 27 Capitais Brasileiras. São Paulo: CEBRID; 2010.

CARVALHO, V. M. Pesquisa dos indicadores do uso do crack em amostras de urina de indivíduos submetidos a exame médico legal. 2006. 125p. Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2006.

CASTILHO, M.C.; SILVEIRA, M.I.N. Técnicas de derivatização química para cromatografia em fase gasosa: I – Sililação. *Revista Portuguesa de Farmácia*, v. XLVII, n.2, 1998.

CHASIN, A.A.M.; SILVA, E.S.; CARVALHO, V.M. Estimulantes do sistema nervoso central. In: OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A.O (Orgs). *Fundamentos de toxicologia*. 4ª ed. São Paulo. Editora Atheneu São Paulo. 2014. p.366-383.

CHRISTOPHERSEN, A.S; MORLAND, J. Drug analysis for control purposes in forensic toxicology, work place testing, sports medicine and related areas. *Pharmacol. Toxicol. Copenhagen*. V.74, p.202-210, 1994.

COLE, C.; JONES, L.; MCVEIGH, J.; KICMAN, A.; SYED, Q.; BELLIS, M.A. CUT: A guide to adulterants, bulking agents and other contaminants found in illicit drugs [Internet]. Liverpool, UK: Liverpool John Moores University; 2010.

CONE E.J.; SAMPSON-CONE A.H.; DARWIN, W.D.; HUESTIS, M.A.; OYLER, J.M. Urine testing for cocaine abuse: metabolic and excretion patterns following different routes of administration and methods for detection of false-negative results. *J Anal Toxicol.*, 2003, v.27, p.386-401.

D'ARCY, P.; MALLARD, W.G. AMDIS-USER GUIDE. National Institute of Standards and Technology (NIST). Maryland, Estados Unidos. 2004. 224 p.

DHERANGE, P. A.; BEATTY, N.; AL-KHASHMAN, A. Levamisole-adulterated cocaine: a case of retiform. *BMJ Case Reports*, p. 1-2, Julho 2015.

DAWLING, S. Gas Chromatography. In: MOFFAT, A.C.; OSSELTON, D.M.; WIDDOP, B. *Clarke's Analysis of drugs and poisons*. 4. Ed. [S.I]: Pharmaceutical Press, 201. Cap: 40, p. 636-717

DU, X; ZEISEL, S.H. Spectral Deconvolution for Gas Chromatography Mass Spectrometry-Based Metabolomics: Current Status and Future Perspectives. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2013; 4e.

EIDEN, C.; PEYRIÈRE, H.; DIOT, E.; OLIVER, M. Prevalence of levamisole and aminorex in patients tested positive for cocaine in a French University Hospital. *Clinical Toxicology*. v. 53, p. 604-608, 2015.

ENSSLIN, H.K; KOVAR, K.A.; MAURER, H.H. Toxicological detection of the designer drug 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDE, "Eve") and its metabolites in urine by gas chromatography-mass spectrometry and fluorescence polarization immunoassay. *Journal of Chromatography B: biomedical applications*, v.683, p. 189-197, 1996.

FILHO, A. A. de; CAMPOLINA, D; DIAS, M. B. *Toxicologia na prática clínica*. 2. ed. Belo Horizonte: Folium, 2013. 675 p.

FLORIANI, G. Desenvolvimento e validação de método por CLAE para análise de cocaína, seus produtos de degradação e adulterantes. 80f. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná (UFPR). Paraná, 2012.

FREYE, E. *Pharmacology and Abuse of Cocaine, Amphetamines, Ecstasy and Related Designer Drugs*. 1.ed. Netherlands. Springer Netherlands. 2010. 300p.

HAHN, E.; BOGOCH, I. I. Levamisole-induced Vasculitis in a Cocaine User. *The Journal of Rheumatology*, v. 42, p. 1924-1925, 2015.

HUESTIS, M. A. et al. D. Cocaine and metabolites urinary excretion after controlled smoked administration. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 31, p. 462, 2007.

INMETRO. Atividades de Ensaio de Proficiência. Disponível em <http://www.inmetro.gov.br/metcientifica/ensaioProficiencia.asp>. Acesso em 16 de dezembro de 2015.

INSTANT-VIEW®. Multi-drug screen urine test, folheto explicativo. Bélgica: Obelis S.A. 2012. p.1-4. Bula do teste.

ISENSCHMID, D.S. Cocaine. In: LEVINE, B., ed. *Principles of forensic toxicology*. 3.ed. Washington: AACC Press, 2010. p.245-268.

IUPAC, PAC, 1991, 63, 1541. Recommendations for nomenclature and symbolism for mass spectroscopy (including an appendix of terms used in vacuum technology). (Recommendations 1991). Great Britain: Pure e Appl. Chem. v.63. n.10. p. 1541-1566. 1991.

JARDIM, I. C. S. F. *Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas*. *Scientia Chromatographica*, v. 2, p. 13-25, 2010.

JENKINS, A.J.; CONE, E.J. in *Drug Abuse Handbook*, Karch S.B, Ed., CRC press, Boca Raton, 1998, p. 184-187

LANÇAS, F.M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos. Acta. 1993. 240p.

LANÇAS, F.M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos. Rima. 2004. 96p.

LAPACHINSKE, S. F. et al. Ana lysis of cocaine and its adulterants in drugs for international trafficking seized by the Brazilian Federal Police. *Forensic Science International*, v. 247, p. 48-53, Dezembro 2014.

LYNCH, K. L. et al. Detection of levamisole exposure in cocaine users by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 35, p. 176-178, Abril 2011.

MOFFAT, A.C; JACKSON, J.V; MOSS, M.S; WIDDOP, B. eds. *CLARKE'S analysis of drugs and poisons: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material*. 3 ed. London: Pharmaceutical Press, 2004. v. 2. 1935p.

MOREAU, R.L.M.; SIQUEIRA, M.E.P.B. *Toxicologia analítica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010-2011. 318 p. (Ciências farmacêuticas).

NASICMENTO, E. D. S.; PARMIGIANI, M. P. D. C. V. D. Garantia de qualidade em análises toxicológicas. In: MOREAU, R. L. D. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. **Toxicologia Analítica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. Cap. 2, p. 318.

NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE (NIDA). *Research Monograph Series (1991) Cardiovascular Toxicity of Cocaine: Underlying Mechanisms*. No. 108; DHHS publication No. (ADM) 91.-1767, Government Printing Office, Washington, DC.

NIEDBALA, R. S.; GONZALEZ, J. M. Immunoassays. In: MOFFAT, A. C.; OSSELTON, D. M.; WIDDOP, B. *Clarke's Analysis of drugs and poisons*. 4. ed. [S.I.]: Pharmaceutical Press, 2011. Cap. 31, p. 496-506.

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

OGA, S.; FARSKY, S.H.P.; MARCOURAKIS, T.; Toxicocinética. In: OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A.O (Orgs). *Fundamentos de toxicologia*. 4ª ed. São Paulo. Editora Atheneu São Paulo. 2014. p. 7.-21.

OGA, S.; MARCOURAKIS, T.; FARSKY, S.H.P.; Toxicodinâmica. In: OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A.O (Orgs). *Fundamentos de toxicologia*. 4ª ed. São Paulo. Editora Atheneu São Paulo. 2014. p.21.-29.

OMS. Classificação de Transtornos Mentais e de Comportamento da CID 10: Descrições Clínicas e Diretrizes Diagnósticas (Artes Médicas – Porto Alegre, 1992)

PROSSER, J.M; HOFFMAN, R.S. Cocaine. In: NELSON, L.S.; LEWIN, N.A.; HOWLAND, M.A; HOFFMAN, R.S; GOLDFRANK, L.R; FLOMENBAUM, N.E, eds. Goldfrank's toxicologic emergencies. 9 ed. Maidenhead: McGraw Hill Medical. 2011. cap. 76, p.1091-1102.

QUEIROZ, Maria Eugênia C.; LANCAS, Fernando M.. Análise de fármacos em material biológico: acoplamento microextração em fase sólida "no tubo" e cromatografia líquida de alta eficiência. Química Nova, São Paulo , v. 28, n. 5, p. 880-886, Oct. 2005 .

Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttextepid=S0100-40422005000500027eIng=enenrm=iso. Acessado em: 20 de junho de 2015.

REGIS Technologies. Derivatization. Disponível em: http://www.registech.com/Library/Catalog/GC_Derivatization_2008.pdf. Acesso em 07 de junho de 2015

SCHINDLER, C.W.; TELLA, S.R.; ERZOUKI, H.K. Pharmacological mechanisms in cocaine's cardiovascular effects. *Drug Alcohol Depend*, 1995. v. 37. P.183-19

SCHUMMER, C.; DELHOMME, O.; APPENZELLER, B. M. R.; WENNIG, R.; MILLET, M. Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. *Talanta*, v. 77, n. 4, p. 1473-82, 15 fev 2009.

SEBBEN, V.C. Análise de Efedrinas e Anfetaminas em urina empregando SPE e SPME por CG/EM/EM. 30 de agosto de 2007. 127p. Dissertação. Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFRGS. Porto Alegre, 2007.

SEGURA, J; VENTURA, R.; JURADO, C. Derivatization procedures for gas chromatographic-mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents. *Journal of Chromatography B*, V. 173, P. 61-90, 1998

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7 ed. Rio de Janeiro. Editora LTC, 2006.

SKOOG, D. A., et al. Fundamentos de química analítica. São Paulo: Cengage Learning, 2011. 999 p. Tradução de: fundamentals of analytical chemistry.

SUBSTANCE ABUSE AND MENTAL HEALTH SERVICE ADMINISTRATION (SAMHSA). Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs, 2008. Disponível em: <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2008-11-25/pdf/E8-26726.pdf>. Acesso em 15/10/2015.

UNODC. United Nations Office on Drugs and Crime. World Drug Report 2015. Vienna.: United Nations Publication Sales, 2015, 162p.

UNODC. United Nations Office on Drugs and Crime. World Drug Report 2013. Vienna.: United Nations Publication Sales, 2013, 151p.

VARIAN, Inc. Certify Methods Manual. Califórnia, EUA. 2006. Manual de usuário.

VAS, G.; VÉKEY, K. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry*. v. 39, p. 233-254. 2004

.

WELDER, A. A.; GRAMMAS, P.; MELCHERT, R.B. Cellular mechanisms of cocaine cardiotoxicity. *Toxicology Letters*. v. 69. p. 277-238. 1993.

WANG, S.-M., WU, M.-Y., LIU, R. H., LEWIS, R. J., e CANFIELD, D. V. (2006). Evaluation of isotopically labeled internal standards and methods of derivatization for quantitative determination of cocaine and related compounds. *Forensic Toxicol*, 24(1), 23-35, 1860-8965.

WILLS, S. Cocaine. In: *Drugs of Abuse*. 2.ed. London: Pharmaceutical Press, 2005. Cap.5, p.93-114.

WORLD ANTI-DOPING AGENCY – WADA. International standard for tories, 2012. Disponível em: http://www.wadaama.org/Documents/World_Anti-

Doping_Program/WADPISLaboratories/ISL/WADA_Int_Standard_Laboratories_2012_EN.pdf acesso em: 30 ago. 2015.

YAO, D.; SHI, X.; WANG, L.; GOSNELL, B.A; CHEN, C. Characterization of Differential Cocaine Metabolism in Mouse and Rat through Metabolomics-Guided Metabolite Profiling. *Drug Metabolism & Disposition*. v. 41. p. 79-88. 2013.

YONAMINE, M. Derivação de benzoilecgonina urinária com diazometano para a verificação de exposição à cocaína por técnicas cromatográficas. 24 de agosto de 2000. 110 p. Dissertação. Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP. São Paulo, 2000.

YONAMINE, M; SILVA, O.A; Confirmation of cocaine exposure by gas chromatography–mass spectrometry of urine extracts after methylation of benzoilecgonine. *Journal of Chromatography B*. v. 723.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Padronizar e implantar, no NAL do CIT/RS, um método confirmatório, rápido e simples, para a identificação e detecção de cocaína (COC), seus metabólitos e derivados [éster metilandroecgonina (EMA) e benzoilecgonina (BE), éster metilecgonina (EME)], em amostras de urina, por meio da cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).

2.2 Objetivos específicos

- Identificar o pré-tratamento ideal das amostras contendo cocaína e metabólitos:
 - Avaliar o uso de diferentes reagentes de derivatização;
 - Aperfeiçoar o protocolo analítico para extração e pré-concentração por extração em fase sólida (SPE); Determinar as condições para a detecção e identificação de cocaína e metabólitos, em urina, por CG-EM;
- Comparar os resultados positivos, para cocaína, obtidos com os testes de triagem (imunocromatografia) aos resultados obtidos por CG-EM.
- Extrapolar a metodologia proposta para amostras de urina de pacientes (amostras reais) contendo cocaína e metabólitos para que esta possa ser implantada no NAL do CIT/RS e em outros laboratórios que realizem este tipo de análise;

3 ARTIGO CIENTÍFICO EM INGLÊS

Artigo científico a ser submetido ao “*Journal of pharmacological and toxicological methods*” (INSS: 1056-8719. Fator de impacto: 2,390. Medicina I. Qualis: B1).

Development and application of a method for detection of cocaine, benzoylecgonine and anhydroecgonine methyl ester (crack biomarker) in human urine by gas chromatography coupled to mass spectrometry

Thaís Spohr Christ¹, Viviane C. Sebben³, Sandra M. Dias Macedo², Eliane Dallegrave^{2,*}.

¹Graduate Program of Health Sciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil;

²Pharmacosciences Department, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil;

³Nucleus of Laboratorial Analysis, Toxicology Information Center of Rio Grande do Sul, Porto Alegre (CIT/RS), Rio Grande do Sul, Brazil.

*Corresponding author: Eliane Dallegrave

Departamento de Farmacociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rua Sarmento Leite, 245, Porto Alegre 90050-170, Rio Grande do Sul, Brazil.

Phone: +55 5133038794

E-mail address: elianedal@ufcspa.edu.br (E., Dallegrave).

ARTIGO EM CORREÇÃO. LIBERAÇÃO NÃO AUTORIZADA PELA AUTORA

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como um dos objetivos do trabalho foi o de demonstrar que testes de IC são eficientes para o processo de triagem de amostras para detecção de drogas de abuso, mas que precisam ser interpretados de maneira criteriosa e cautelosa, e – por isso – necessitam de confirmação em casos de amostras positivas ou com resultados confusos (duvidosos), foi necessário a padronização e implantação de metodologia confirmatória por CG-EM no NAL-CIT/RS e a disponibilização do protocolo para a central analítica da UFCSPA.

A determinação do melhor reagente de derivatização para a detecção de cocaína e metabólitos em amostras de urina por meio da CG-EM é de extrema importância, visto que proporciona um aumento na sensibilidade, permite a

volatilização de metabólitos pouco voláteis, melhora o desempenho cromatográfico e, principalmente, gera espectros de massas mais característicos, já que promove o aumento da massa molecular e assim o aumento da especificidade dos fragmentos gerados.

Analisando-se aspectos como redução do volume e da toxicidade dos solventes utilizados, a possibilidade de pré-concentração do analito para quantificação, sensibilidade, especificidade da metodologia e disponibilidade dos materiais e reagentes nos locais de implantação e disponibilização do método, concluiu-se que a SPE é o melhor tipo de extração para a detecção e identificação de COC e metabólitos (BE, EME e EMA e CE) em amostras de urina.

Além disso, a comparação dos resultados da metodologia confirmatória proposta com os resultados da metodologia de triagem mostraram que a metodologia implantada é indispensável para a liberação dos resultados, para que se evite que resultados falso-negativos (geralmente amostras com banda fraca no teste de triagem) e falso-positivos sejam liberados por IC.

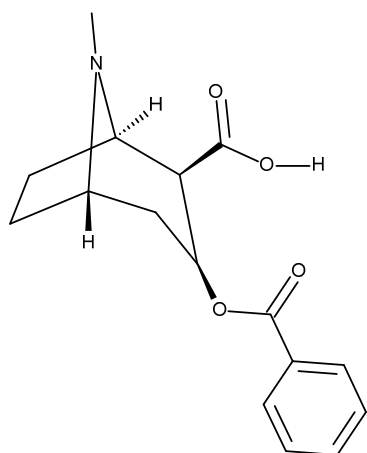
A implantação do método proposto promoveu uma maior atenção dos analistas envolvidos na análise de triagem quando se constatou que bandas de intensidade fraca na linha do teste indicavam que a amostra em questão deveria ser confirmada.

A metodologia padronizada foi capaz de detectar todos os metabólitos (BE, EME e EMA) propostos. E, com o uso dela, é possível se distinguir usuários de cloridrato de cocaína (via inalatória) e de *crack* (via pulmonar), uma vez que é possível se identificar o EMA.

Não obstante, o trabalho desenvolvido conseguiu mostrar que seria interessante que os fabricantes de kits de IC colocassem em suas bulas que qualquer dúvida no resultado obtido com o kit deveria ser esclarecida pela confirmação por outra metodologia mais sensível e específica.

5 APÊNDICES E ANEXO

APÊNDICE A – Derivatização da Benzoilecgonina

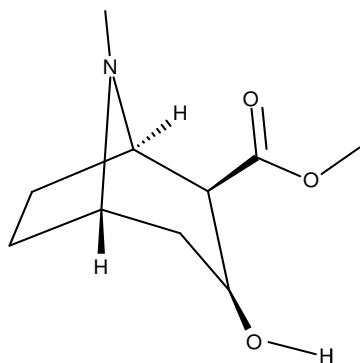


Benzoilecgonina

Tabela 8 - Reagentes utilizados na derivatização da Benzoilecgonina e os derivados

Reagente	Grupo Substituente	T _R (min)	Derivado	Estrutura
MTBSTFA	-Si(CH ₃) ₂ C(CH ₃) ₃	16,03	O-tertbutildimetilsililbenzoilecgonina, também benzoilecgonina-TBDMS	
BSTFA	-Si(CH ₃) ₃	14,54	O-trimetilsililbenzoilecgonina	

APÊNDICE B – Derivatização do Éster metilecgonina



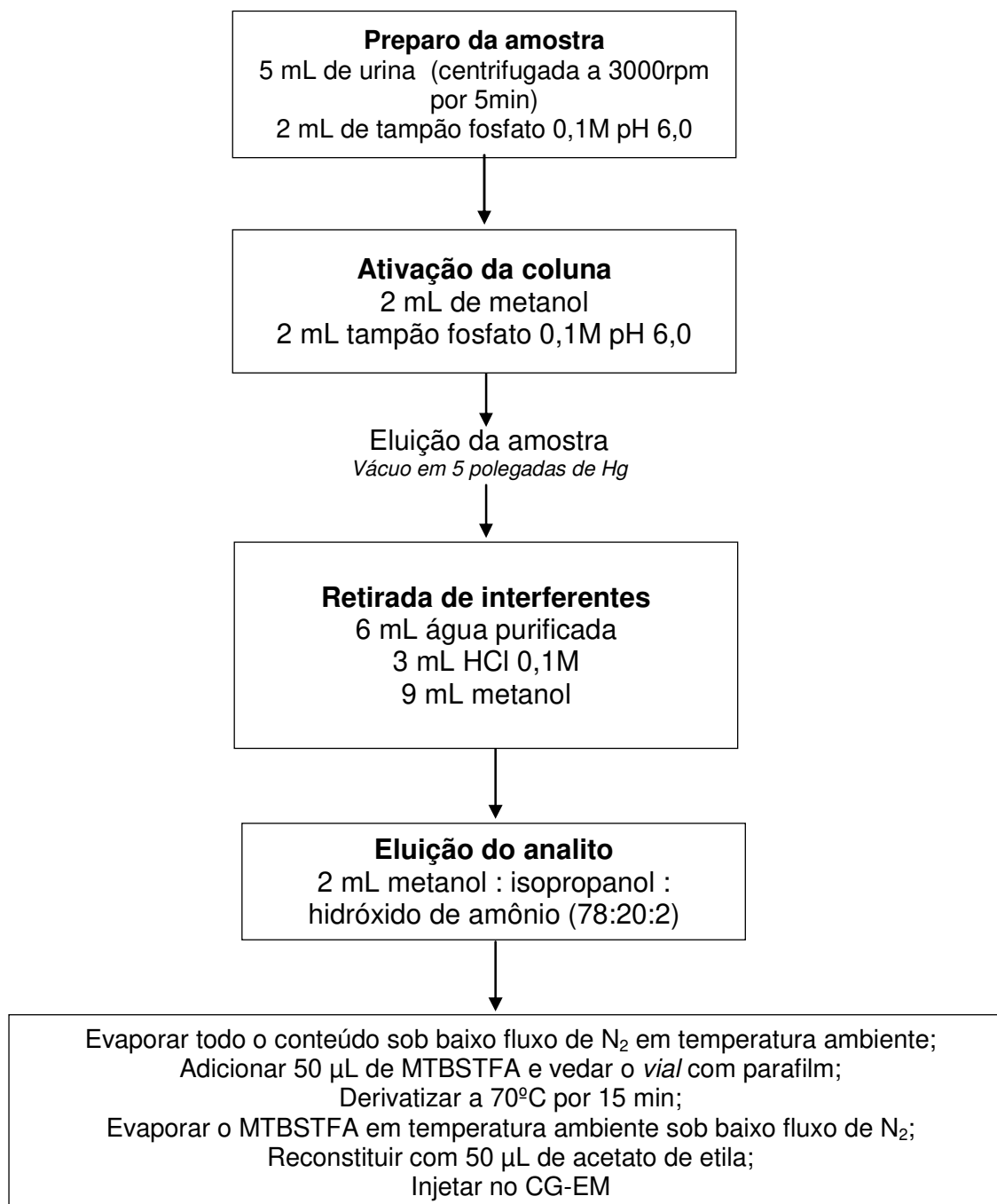
Éster metilecgonina

Tabela 9 - Reagentes utilizados na derivatização do Éster metilecgonina e os derivados formados

Reagente	Grupo Substituente	T _R (min)	Derivado	Estrutura
MTBSTFA	-Si(CH ₃) ₂ C(CH ₃) ₃	16,03	O- tertbutildimetilsililbenzoilecgonina, também benzoilecgonina- TBDMS	
BSTFA	-Si(CH ₃) ₃	14,54	O-trimetilsililbenzoilecgonina	

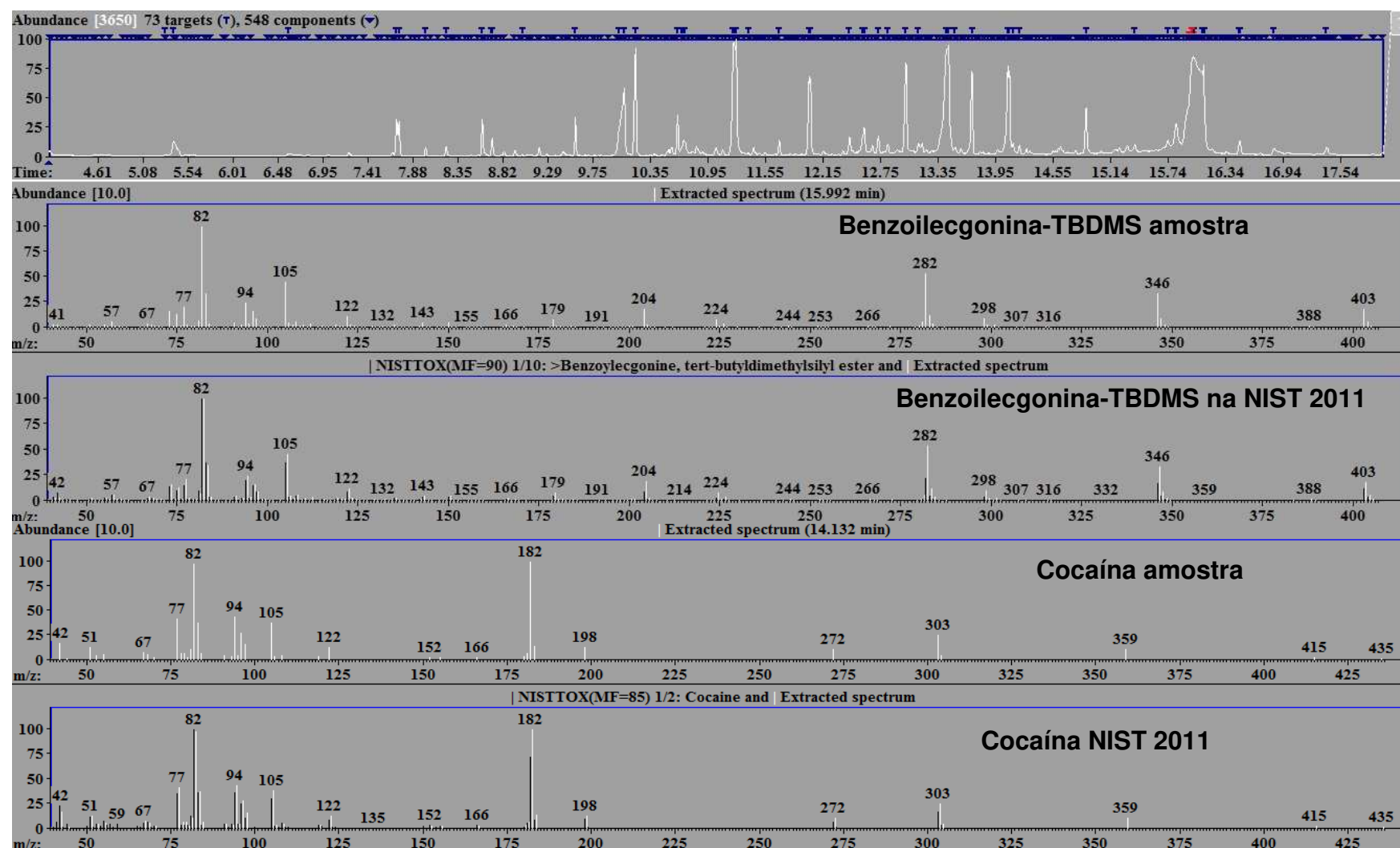
APÊNDICE C – Protocolo final de SPE

Figura 35 - Protocolo final de extração por SPE para cocaína e metabólitos em amostras de urina



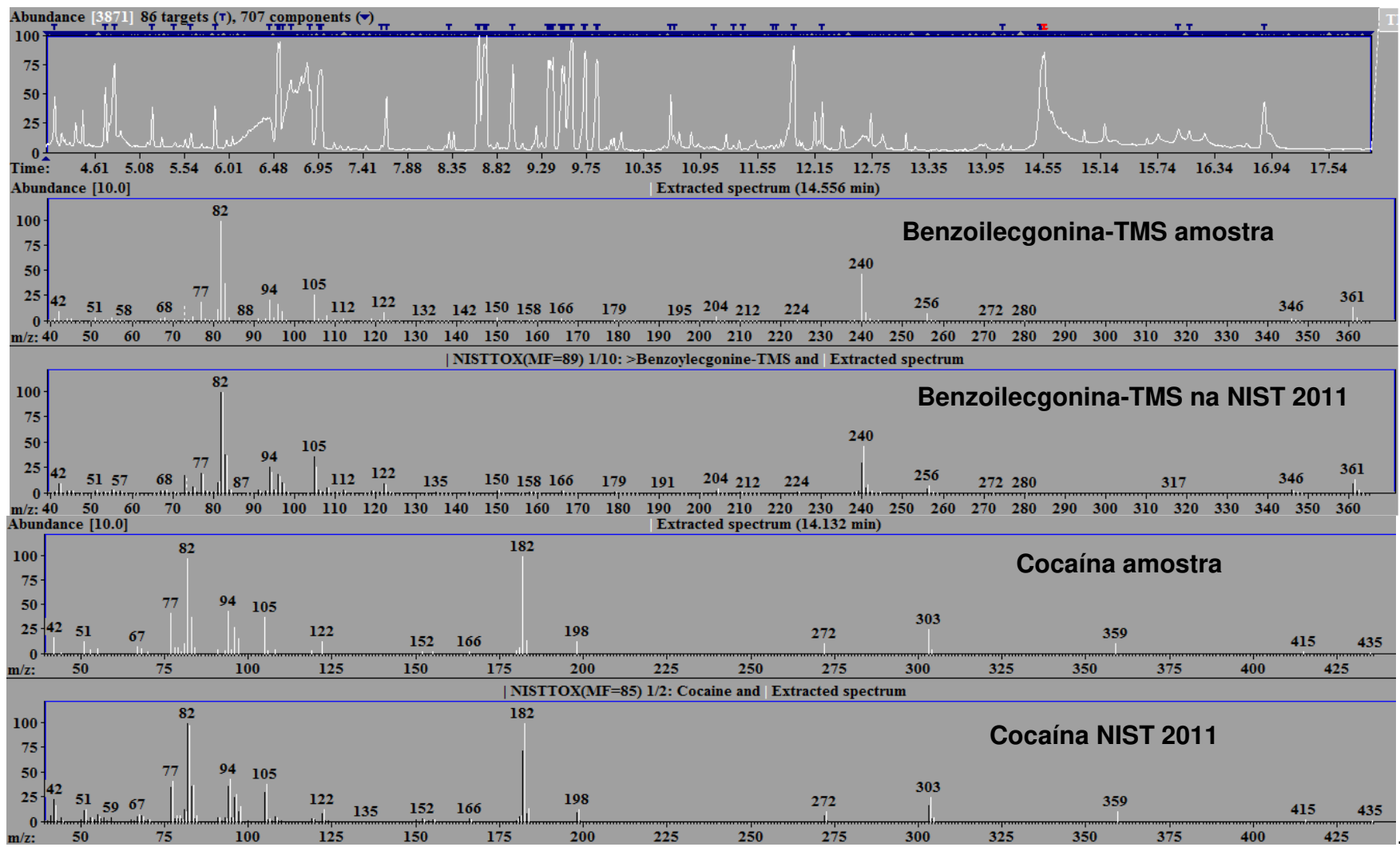
APÊNDICE D – Utilização do AMDIS

Figura 36 - Resultados (cromatogramas e espectros) obtidos com o AMDIS para amostra derivatizada com MTBSTFA



APÊNDICE E – Utilização do AMDIS

Figura 37 - Resultados (cromatogramas e espectros) obtidos com o AMDIS para amostra derivatizada com BSTFA



APÊNDICE F – Otimização do protocolo de SPE

Tabela 10 - SPE com sistema solvente diclorometano : isopropanol : hidróxido de amônio com 5 mL de amostra

Amostra	ID	Área do Pico	Benzoilecgonina	SS	VA (mL)
15970	COCA001	-	NI	1	5
15970	COCA001	-	NI	1	5
15949	COCA002	-	NI	1	5
15949	COCA002	-	NI	1	5
17647	COCA003	-	NI	1	5
17647	COCA003	-	NI	1	5
16475	COCA004	-	NI	1	5
16475	COCA004	-	NI	1	5
18315	COCA005	-	NI	1	5
18315	COCA005	-	NI	1	5
15679	COCA021	-	NI	1	5
15679	COCA021	-	NI	1	5

ID: identificação; SS: sistema solvente; VA: volume de amostra;
NI: não identificado

Tabela 11 - SPE com sistema solvente diclorometano : isopropanol : hidróxido de amônio com 2 mL de amostra

Amostra	ID	Área do Pico	Benzoilecgonina	SS	VA (mL)
15970	COCA033	-	NI	1	2,5
15970	COCA033	-	NI	1	2,5
15949	COCA034	-	NI	1	2,5
15949	COCA034	-	NI	1	2,5
17647	COCA035	-	NI	1	2,5
17647	COCA035	-	NI	1	2,5
16475	COCA036	-	NI	1	2,5
16475	COCA036	-	NI	1	2,5
18315	COCA37	-	NI	1	2,5
18315	COCA037	-	NI	1	2,5
15679	COCA038	-	NI	1	2,5
15679	COCA038	-	NI	1	2,5

ID: identificação; SS: sistema solvente; VA: volume de amostra;
NI: não identificado.

APÊNDICE G – Otimização do protocolo de SPE

Tabela 12 -SPE com sistema solvente metanol : isopropanol : hidróxido de amônio com 5 mL de amostra

Amostra	ID	Área do Pico	Benzoilecgonina	SS	VA (mL)
15970	COCA006	9.528.775	I	2	5
15970	COCA006	9.430.280	I	2	5
15949	COCA007	71.813.486	I	2	5
15949	COCA007	69.802.500	I	2	5
17647	COCA008	2.621.005	I	2	5
17647	COCA008	2.302.072	I	2	5
16475	COCA009	42.592.739	I	2	5
16475	COCA009	40.286.950	I	2	5
18315	COCA028	1.082.617	I	2	5
18315	COCA028	1.020.675	I	2	5
15679	COCA027	318.513	I	2	5
15679	COCA027	287.952	I	2	5

ID: identificação; SS: sistema solvente; VA: volume de amostra;
NI: não identificado

Tabela 13 - SPE com sistema solvente metanol : isopropanol : hidróxido de amônio com 2,5 mL de amostra


Amostra	ID	Área do Pico	Benzoilecgonina	SS	VA (mL)
15970	COCA016	-	NI	2	2,5
15970	COCA016	-	NI	2	2,5
15949	COCA017	1.726.234	I	2	2,5
15949	COCA017	1.462.343	I	2	2,5
17647	COCA018	-	NI	2	2,5
17647	COCA019	-	NI	2	2,5
16475	COCA019	8.388.491	I	2	2,5
16475	COCA019	8.025.390	I	2	2,5
18256	COCA048	-	NI	2	2,5
18256	COCA048	-	NI	2	2,5
15679	COCA047	-	NI	2	2,5
15679	COCA047	-	NI	2	2,5

ID: identificação; SS: sistema solvente; VA: volume de amostra;
NI: não identificado

ANEXO A – Comitê de Ética

Figura 38 - Autorização do comitê de ética em pesquisa

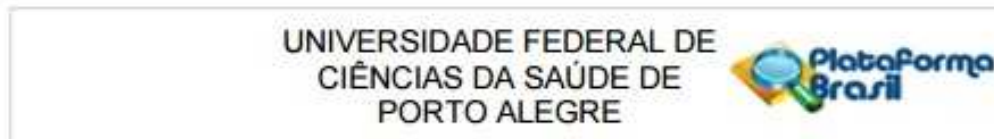
(continuação)

<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE</p> 
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA
Título da Pesquisa: Padronização e implantação de método analítico para detecção de cocaína e metabólitos, em amostras de urina, utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM).
Pesquisador: ELIANE DALLEGRAVE
Área Temática:
Versão:
CAAE: 31797814.3.0000.5345
Instituição Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
DADOS DO PARECER
Número do Parecer: 689.775
Data da Relatoria: 12/06/2014
Apresentação do Projeto: Projeto apresentado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UFCSPA.
Objetivo da Pesquisa: Padronizar e implantar, no NAL do CIT/RS e na Central Analítica da UFCSPA, um método confirmatório, rápido e simples, para a identificação e detecção de cocaína (COC) e seus metabólitos [éster metilamidoecgonina (EMA) e benzoilecgonina (BE)], em amostras de urina, por meio da cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM).
Avaliação dos Riscos e Benefícios: Tendo estes itens bem delineados, o presente projeto será executado com o intuito de proporcionar a padronização e a implantação de uma técnica analítica, confirmatória, para a detecção de cocaína e metabólitos [éster metilamidoecgonina (derivado que indica o consumo de crack, uma vez que só é detectado quando há a pirólise da droga) e benzoilecgonina], em urina por CG/EM. Esta técnica será colocada em prática na rotina do NAL-CIT/FEPPS e disponibilizada para uso da Central Analítica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, visando prestação de serviços para a comunidade.
Endereço: Rua Sarmento Leite, 245 Bairro: CEP: 90.050-170 UF: RS Município: PORTO ALEGRE Telefone: (51)303-8804 E-mail: cep@ufcspa.edu.br

Página 01 de 02

Figura 38 - Autorização do comitê de ética em pesquisa

(Conclusão)



Continuação do Parecer: 689.775

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto pertinente, com relevância social e tecnológica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos apresentados

Recomendações:

Aprovação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Término do projeto 12/2015.

PORTO ALEGRE, 17 de Junho de 2014

Assinado por:
José Geraldo Vernet Taborda
(Coordenador)

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245
Bairro: CEP: 90.050-170
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)303-8804 E-mail: cep@ufcspa.edu.br

ANEXO B – Normas da revista científica



JOURNAL OF PHARMACOLOGICAL AND TOXICOLOGICAL METHODS

AUTHOR INFORMATION

PACK

CONTENTS

- Description p.1
- Audience p.1
- Impact Factor p.1
- Abstracting and Indexing p.1
- Editorial Board p.2 • Guide for Authors p.3

ISSN: 1056-8719

TABLE OF



DESCRIPTION

Journal of Pharmacological and Toxicological Methods publishes original articles on current methods of investigation used in **pharmacology** and **toxicology**. Pharmacology and toxicology are defined in the broadest sense, referring to actions of drugs and chemicals on all living systems. With its international **editorial board** and noted contributors, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* is the leading journal devoted exclusively to experimental procedures used by **pharmacologists** and **toxicologists**.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#) .

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our support pages: <http://support.elsevier.com>

AUDIENCE

Pharmacologists, Toxicologists, Biochemists.

IMPACT FACTOR

2014: 2.390 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2015

ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS
Chemical Abstracts
Current Contents/Life Sciences
MEDLINE®
International Pharmaceutical Abstracts
EMBASE
Scopus
EMBiology

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief:

M.J. Curtis, Cardiovascular Div. School of Medicine, St Thomas' Hospital, King's College London, Lambeth Palace Rd, London, SE17EH, UK, Fax: +44 207 1883902

Editorial Board:

- D. Andersson**, London, England, UK
T.J. Baird, Mataawan, Michigan, USA
F.A. Barile, Queens, New York, USA
R. Bialecki, Newark, Delaware, USA
D. Bishop-Bailey, London, England, UK
A. Bomzon, Haifa, Israel
H. Buikema, Groningen, Netherlands
G. Cirino, Napoli, Italy
H. Clements-Jewery, Lewisburg, West Virginia, USA
D. Cooper, London, England, UK
P. Ferdinandy, Budapest, Hungary
R. Forster, Evreux Cedex, France
R. Franklin, Boulder, Colorado, USA
D.J. Gallacher, Beerse, Belgium
M.A. Giembycz, Calgary, Alberta, Canada
J.H. Gill, Durham, UK
J.C. Hancox, Bristol, UK
W.C. Hodgson, Clayton, Victoria, Australia
W. Jian, Raritan, New Jersey, USA
X. Jin, Atlanta, Georgia, USA
M. Klonizakis, Lincoln, UK
S. Kortagere, Philadelphia, Pennsylvania, USA
R. Martin, Palo Alto, California, USA
P.J. Pauwels, Lyon, France
S.C. Pitchford, London, UK
K.R. Pitts, Broomfield, Colorado, USA
M.K. Pugsley, Cranbury, New Jersey, USA
N.E. Saadé, Beirut, Lebanon
M.F. Santillo, Laurel, Maryland, USA
D.J. Sellers, Robina, Queensland, Australia
D. Spina, London, UK
R. Tabrizchi, St. John's, Newfoundland and Labrador, Canada

- M.B. Thomsen**, Copenhagen, Denmark
S. Ventura, Parkville, Victoria, Australia
S. Visser, North Wales, Pennsylvania, USA
T. Wisialowski, Groton, Connecticut, USA
J.-T. Wu, Cambridge, Massachusetts, USA

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Journal of Pharmacological and Toxicological Methods publishes articles on methods used in pharmacology, safety pharmacology and toxicology. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* is the leading international journal devoted exclusively to the elaboration and validation of experimental methods.

Please visit our [Pharmacology Author Resources](#) page for guidance on manuscript preparation.

Types of paper

The *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* publishes papers in a range of categories:

"Research paper": description and characterization of a new or modified disease model, method, technique, apparatus or approach to analysis of data. This may include interspecies comparisons that contrast drug actions from a model relevance perspective; "Short communication" detailing simple modifications of an existing model, method, technique, apparatus or approach to analysis of data; "How To" articles that provide step-by-step guidance on the execution of a specific technique; "Appraisal of state-of-the-art" or "Historical review" of particular models, methods, techniques or apparatus; "Methods in drug discovery" - perhaps the most important category. Here, by showing how a method was used to select a drug that was eventually found to be clinically effective, the author establishes validation of the method.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <https://www.elsevier.com/publishingethics> and <https://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans, <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals, <http://www.icmje.org>. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive](#)

2010/63/EU for animal experiments, or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. **All animal studies need to ensure they comply with the ARRIVE guidelines.** More information can be found at <http://www.nc3rs.org.uk/page.asp?id=1357>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <https://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/supporthub/publishing.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <https://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <https://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article by signing the submission cover letter: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <https://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <https://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <https://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <https://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <https://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <https://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <https://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through universal access programs (<http://www.elsevier.com/access>).
- No open access publication fee payable by authors.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 3300**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information (<http://elsevier.com/greenopenaccess>). Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 12 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX)

are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Additional information

Manuscripts will be evaluated by a member of the board of editors of the Journal, and a panel of international reviewers. An editorial decision will normally be made within 4 weeks of receipt of the manuscript, and publication will normally take place within 3 months of final acceptance.

PREPARATION

Note that papers focused on the actions of drugs are beyond the scope of the journal.

Specific instructions for "regular articles":

Introduction

This must outline the reason for the study and justify the approach taken.

Methods

This section should be sufficiently detailed to permit the reader to replicate the study. It should be a full recipe, with step by step instructions. We prefer the bulk of the descriptions in prose, but tables summarising sequences of procedures are a good accompaniment to the text. Subcomponents of the method that have been described in detail in the literature should be described in full, but appropriate citation of the original source method is mandatory.

Results

This section should be concise and must not contain repetition of the methods. Data in the text must not replicate data in tables or figures. SI units must be used.

Discussion

The potential value of the data to pharmacological or toxicological or safety pharmacology research methods must be clearly explained, with appropriate reference to existing methods and their limitations. This section must not contain paragraphs dealing with topics that are beyond the scope of the study. Use subheadings for clarity.

Specific instructions for "How To" articles:

" How To" articles provide step-by-step guidance on the execution of specific techniques.

Introduction

For "How To" articles, this section will be very brief, and will simply identify the therapeutic area, the goal of the method, and give mention to published alternatives descriptions if available. It is unlikely that many papers will be cited in this section.

Methods

This section should be sufficiently detailed to permit the reader to replicate the study. It should be a full recipe, with step by step instructions. We prefer the bulk of the descriptions in prose, but tables summarising sequences of procedures are a good accompaniment to the text. Subcomponents of the method that have been described in detail in the literature should be described in full, but appropriate citation of the original source method is mandatory.

Methods

This section should be sufficiently detailed to permit the reader to replicate the study. It should be a full recipe, with step by step instructions. We prefer the bulk of the descriptions in prose, but tables summarising sequences of procedures are a good accompaniment to the text. Subcomponents of the method that have been described in detail in the literature should be described in full, but appropriate citation of the original source method is mandatory.

Results

This section should be concise and must not contain repetition of the methods. Data in the text must not replicate data in tables or figures. SI units must be used.

Discussion

The potential value of the data to pharmacological or toxicological research methods must be clearly explained, with appropriate reference to existing methods and their limitations. This section must not contain paragraphs dealing with topics that are beyond the scope of the study.

Specific instructions for "Appraisal of State of the Art"-articles:

Appraisal articles are reviews about the current best models. The article should identify and describe the current best model, and discuss the evidence (or lack of) to support this. A good model should demonstrably detect drugs that work (or cause adverse effects) in humans, and demonstrably have few false positives or negatives. This evidence should be presented. The review should contrast the current best model with other available but inferior models, thereby illustrating why one is the state-of-the-art model.

Text to be divided into sections according to author choice.

Specific instructions for "Historical review" articles:

Historical reviews can be more personal and less formal. Senior figures in a field may have decades of experience with models, methods, techniques of apparatus. It is of immense value and interest to the research community to learn the history of the development of a model, understand why one model was abandoned and another developed, and get insight into the thinking behind a model, and the impact of good and bad models in drug development in a particular field. In addition, in many fields many models are still used that are transparently inadequate - it would be of great value to obtain a candid expose from an experienced practitioner as to why this might be, including insight into personal perspective as it changed over the years.

Text to be divided into sections according to author choice

Specific instructions for "Methods in drug discovery" articles:

These articles are specifically intended to showcase, for the wider audience, exactly how methods were applied by a pharmaceutical company in the preclinical development of one of their own drugs. While it is appreciated that companies may wish to keep certain information confidential, it would be of great interest to the reader to be able to understand the logic (or lack of) behind the choice of each preclinical test used in the drug's development. Demonstration that use of a series of models, methods, techniques and apparatus gave rise to a drug that works in man is the closest we can get to a methods validation - a much neglected area. The reader would also benefit by having revealed the logic behind the decision-making that allowed the successful drug to proceed in development, while analogues and other compounds were dropped. Consideration of whether this decision was making based on proof, or on the exercise of judgment, or a mixture of both will be of value to the author as well as the reader as it will identify weak areas in the process for future improvements in pharmacological and toxicological methods.

Text to be divided into the following sections

Brief overview of evidence that drug X is now established as being clinically effective
Original hypothesis that triggered the search for a drug of type X
Preclinical models used in defining drug X's properties (subsections in sequence, explaining logic behind choice)
Outcome of tests (subsections in sequence, explaining logic behind successive decision making)
Conclusions

Specific instructions for all articles:

Essential title page information for all articles

Title. Please be concise and informative. Titles are used in information-retrieval systems so avoid abbreviations. **Author names and affiliations.** Please type the family name last (e.g., Michael J Curtis) . Type the authors' affiliation addresses below the names. Use letters in lower-case superscript immediately after the author's name and in front of the appropriate address if there are multiple addresses. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and , the e-mail address of each author. **Corresponding author.** Clearly indicate the corresponding author and ensure their telephone and fax numbers (with country and area code) are provided. **Present/ permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a " Present address" (or " Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

This must not exceed 250 words and should be subdivided into four subsections headed: Introduction, Methods, Results, Discussion.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 10 keywords (one of which should be "methods") in alphabetical order, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, " and" , " of"). These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible.

Chemical compounds

You can enrich your article by providing a list of chemical compounds studied in the article. The list of compounds will be used to extract relevant information from the NCBI PubChem Compound database and display it next to the online version of the article on ScienceDirect. You can include up to 10 names of chemical compounds in the article. For each compound, please provide the PubChem CID of the most relevant record as in the following example: Glutamic acid (PubChem CID:611). The PubChem CIDs can be found via <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>. Please position the list of compounds immediately below the 'Keywords' section. It is strongly recommended to follow the exact text formatting as in the example below:

Chemical compounds studied in this article

Ethylene glycol (PubChem CID: 174); Plitidepsin (PubChem CID: 44152164); Benzalkonium chloride (PubChem CID: 15865)

More information is available at: <https://www.elsevier.com/PubChem>.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

- Use uniform lettering and sizing of your original artwork, and select a font as large as possible
- Use a sans serif fonts in your illustrations such as: Arial, Helvetica, Tahoma or Calibri and use only one font throughout the figures
- Number the illustrations according to their sequence in the text
- Use a logical naming convention for your artwork files
- Do not put legends in the figures
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version
- Submit each illustration as a separate file

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here. *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black and white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in

the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles (<http://citationstyles.org>), such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and Zotero (<https://www.zotero.org/>), as well as EndNote (<http://endnote.com/downloads/styles>). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/journal-of-pharmacological-and-toxicological-methods> When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered from <http://books.apa.org/books.cfm?id=4200067> or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

Reference to a website:

Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK. (2003). <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> Accessed 13.03.03.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations:

<http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <https://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a

PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <https://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- All necessary files have been uploaded, and contain:
 - Keywords
 - All figure captions
 - All tables (including title, description, footnotes)
- Further considerations
 - Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
 - References are in the correct format for this journal
 - All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
 - Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including theInternet)
- Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white
- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at <https://www.elsevier.com/track-submission>. You can track your accepted article at <https://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>