

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**Faculdade de Farmácia**

**Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso I e II**

**A UTILIZAÇÃO DE IMUNOENSAIOS NA DETECÇÃO DE  
SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS**

**PAULA OTERO BOEHL**

**PORTO ALEGRE**

**2011**

**PAULA OTERO BOEHL**

**A UTILIZAÇÃO DE IMUNOENSAIOS NA DETECÇÃO DE  
SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS**

**Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao curso de Farmácia, da  
Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul, como requisito parcial para obtenção  
do título de Farmacêutica.**

**Orientadora: Profa Dr. Renata Pereira  
Limberger**

**Co-Orientadora: Eloisa Comiran**

**PORTO ALEGRE**

**2011**

## RESUMO

A aplicação de imunoenaios na detecção de substâncias psicoativas vem crescendo no contexto de análises toxicológicas. Diferentes matrizes biológicas são empregadas por essa técnica, destacando-se urina, sangue, cabelo, suor e fluido oral, sendo o último, a matriz que está em grande ascensão nas análises de substâncias psicoativas voltadas ao trânsito e ambiente de trabalho. O objetivo do trabalho é realizar uma revisão sobre a aplicação dos imunoenaios na detecção de substâncias psicoativas, bem como as matrizes biológicas mais empregadas para essa finalidade, além de realizar uma avaliação prática da especificidade de um kit de imunoensaio. Os artigos apresentados nesta revisão foram obtidos a partir da busca no banco de dados Pubmed, Science Direct e Portal de Periódicos da CAPES e foi realizado teste de especificidade em kits de cocaína,  $\Delta$ 9-THC e anfetamina, utilizando amostras de fluido oral negativas, adicionadas de solução padrão das substâncias cocaína, anfetamina (AF), alprazolam, diazepam, bromazepam, clonazepam, nitrazepam, oxazepam, lorazepam, cetamina, metilendioximetanfetamina (MDMA), heroína, anfepramona, delta-9-tetrahydrocannabinol ( $\Delta$ 9-THC), benzocaína, efedrina, cafeína, fenilefrina, femproporex, mazindol, metilfenidato, nicotina, sibutramina e *p*-sinefrina. O uso de imunoenaios é de grande aplicabilidade em análises toxicológicas de triagem, com muitos estudos sendo realizados na área, os quais conferem subsídios para a aplicação desta técnica em diferentes setores da sociedade para a detecção de substâncias psicoativas. Os kits de imunoensaio testados se mostraram efetivos para a detecção de cocaína e  $\Delta$ 9-THC, não apresentando reatividade cruzada com as substâncias testadas, porém o kit de anfetamina não foi efetivo para a identificação de estimulantes tipo anfetamina (ETA) consumidos no Brasil. Apesar do grande volume de publicações e aplicação desses kits em análises forenses em diversos países, ainda é necessário o desenvolvimento de kits direcionados aos ETAs mais utilizados no Brasil.

Palavras-chave: Monitoramento de drogas. Imunoensaio. Análise de drogas. On-site test.

## ABSTRACT

The application of immunoassays for the detection of psychoactive substances is growing in the context of toxicological analysis. Different biological matrices are employed by this technique, especially urine, blood, hair, sweat and oral fluid, the latter being cited the matrix that is in great rise in the analysis of psychoactive substances, mainly in drug and driving control and workplace drug control. The aim of this work is conduct a review of the application of immunoassays for the detection of psychoactive substances, as well as biological matrices commonly employed for this purpose, and performs a practical evaluation of the specificity of an immunoassay kit. The articles presented in this review were obtained from the search in the database PubMed, Science Direct and the Portal de periódicos CAPES, and the specificity test was performed in cocaine, amphetamine and  $\Delta^9$ -THC kits, using oral fluid samples negative were spiked with standard solutions of cocaine, amphetamine (AF), alprazolam, diazepam, bromazepam, clonazepam, nitrazepam, oxazepam, lorazepam, ketamine, methylenedioxyamphetamine (MDMA), heroin, amfepramone, delta-9-tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC), benzocaine, ephedrine, caffeine, phenylephrine, fenproporex, mazindol, methylphenidate, nicotine, sibutramine, and *p*-synephrine. The use of immunoassays is of wide applicability in toxicological analysis of screening, with many studies being conducted in this area, which provide subsidies for the application of this technique in different sectors of society for the detection of psychoactive substances. These tests detect cocaine and  $\Delta^9$ -THC effectively, showing no cross reactivity with the tested substances, but the amphetamine test kit was not effective for the identification of amphetamine type stimulants (ATS) consumed in Brazil. Despite the large volume of publications and application in forensic analysis of these kits in many countries, it is still necessary to develop specialized kits for ATS, for effective control of these substances and application of this technology in Brazil.

Keywords: Drug monitoring. Immunoassay. Drug test. On-site test.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Radioimunoensaio. (A) Método de competição com antígeno marcado, (B) método de competição com anticorpo marcado e (C) método de captura de antígeno .....	14
<b>Figura 2:</b> Imunoensaio multiplicado por enzima (EMIT) .....	16
<b>Figura 3:</b> Teste imunoenzimático para quantificação de antígenos em amostras: (A) competitivo com antígeno marcado e (B) competitivo com anticorpo marcado. Teste imunoenzimático para detecção de anticorpos: (C) indireto, (D) captura de IgM com antígeno marcado e (E) captura de IgM com anticorpo marcado. (F) Representação de resultado de um teste de ELISA em microplaca .....	19
<b>Figura 4:</b> Estrutura da molécula de anticorpo.....	23
<b>Figura 5:</b> Obtenção de anticorpos monoclonais.....	27
<b>Figura 6:</b> Dispositivos de coleta de saliva. A. Quantisal <sup>®</sup> e B. Salivette <sup>®</sup> .....	34
<b>Figura 7:</b> Principais metabólitos da cocaína .....	43
<b>Figura 8:</b> Estrutura do $\Delta^9$ -THC .....	44
<b>Figura 9:</b> (A) Diazepam; (B) Flunitrazepam; (C) Nitrazepam .....	44
<b>Figura 10:</b> (A) Heroína; (B) Morfina .....	45

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Alguns estimulantes tipo anfetamina comercializado no mundo. ....	42
--	----

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>6</b>
<b>2 OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>9</b>
<b>2.1 Objetivos Específicos</b> .....	<b>9</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>10</b>
<b>4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>10</b>
<b>4.1 Imunoensaios</b> .....	<b>10</b>
4.1.1 <i>Radioimunoensaio</i> .....	11
4.1.2 <i>Imunoensaio multiplicado por enzima</i> .....	14
4.1.3 <i>Ensaio Imunoabsorvente Ligado à Enzima</i> .....	16
4.1.4 <i>Imunocromatografia</i> .....	19
4.1.5 <i>Imunoensaio de Fluorescência Polarizada</i> .....	20
<b>4.2 Desenvolvimento de Kits de Imunodiagnóstico</b> .....	<b>22</b>
<b>4.3 Matrizes biológicas</b> .....	<b>29</b>
4.3.1 <i>Urina</i> .....	29
4.3.2 <i>Sangue</i> .....	30
4.3.3 <i>Fluido Oral</i> .....	32
4.3.4 <i>Cabelo</i> .....	34
4.3.5 <i>Suor</i> .....	36
<b>5 REVISÃO PRÁTICA DE ESPECIFICIDADE</b> .....	<b>37</b>
<b>5.1 Materiais e Métodos</b> .....	<b>37</b>
<b>5.2 Resultados</b> .....	<b>38</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>38</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>50</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O abuso de substâncias psicoativas (SPA) é considerado um problema de abrangência global atualmente. De acordo com a United Nations (2001) verificou-se um crescimento no abuso e má utilização de drogas consumidas tradicionalmente para fins medicinais, como anfetamínicos, opióides, benzodiazepínicos, barbitúricos, analgésicos. O United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC, 2010), em seu último relatório anual classifica os usuários de cannabis como o grupo que mais consome drogas ilícitas no mundo (129-190 milhões de pessoas), seguidos do elevado consumo de estimulantes tipo anfetamina (ETA), opióides e cocaína.

No Brasil, o consumo de drogas lícitas – especialmente o álcool e tabaco – é superior ao das drogas ilícitas. Em contrapartida, os dados sobre drogas ilícitas mostram que da população pesquisada 8,8% já fez uso de maconha e 2,9% de cocaína pelo menos uma vez na vida (*uso na vida*) (CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÕES SOBRE DROGAS PSICOTRÓPICAS, 2006). Uma comparação entre os dados do I Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas em 2001 e do II Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil em 2005 mostrou que o *uso na vida* de qualquer droga (exceto tabaco e álcool), entre entrevistados de 108 cidades, aumentou de 19,4% em 2001 para 22,8% em 2005 (CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÕES SOBRE DROGAS PSICOTRÓPICAS, 2006).

O Brasil encontra-se entre os três países que mais consomem substâncias anorexígenas, juntamente com Argentina e Estados Unidos, os quais ocupam o terceiro e primeiro lugar, respectivamente (INCB, 2009). Em relação aos medicamentos anorexígenos, foi verificado um *uso na vida* de 3,2% em 2005, o que corresponde a um aumento de 1,7% quando comparado ao ano de 2001. Essas

porcentagens são próximas as de países como Holanda, Espanha, Alemanha e Suécia, mas muito inferior aos Estados Unidos (6,6% em 2005). Vale ressaltar que foi a única categoria de drogas cujo aumento de 2001 para 2005 foi estatisticamente significativo (CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÕES SOBRE DROGAS PSICOTRÓPICAS, 2006).

O uso indevido de SPA e seus consequentes efeitos negativos afetam a estabilidade estrutural dos estados e das sociedades, ameaçam valores políticos, econômicos, humanos e culturais, além de infligir considerável prejuízo econômico aos países, contribuindo para o crescimento dos gastos com tratamento médico e internação hospitalar, para o aumento dos índices de acidentes de trabalho e trânsito, de violência urbana e de mortes prematuras e, ainda, para a queda de produtividade dos trabalhadores (CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÕES SOBRE DROGAS PSICOTRÓPICAS, 2009). Mundialmente, estima-se que 1,2 milhão de pessoas são mortas em acidentes rodoviários por ano e mais de 50 milhões sofrem ferimentos. Projeções indicam que esses números podem aumentar cerca de 65% nos próximos 20 anos (PEDEN et al., 2004). O Brasil, líder em acidentes de trânsito nas rodovias, registrou 172.000 mortes entre 1999 a 2006, considerando as mortes ocorridas apenas nos locais de acidentes (PECHANSKY et al., 2010).

O monitoramento de SPA pode ser realizado em diferentes setores da sociedade, com o intuito de diminuir o impacto do uso dessas substâncias na população. Nos últimos anos, diversos estudos têm mostrado a elevada prevalência do uso de substâncias psicoativas por motoristas (BERNHOF, 2005; WYLIE et al., 2005; GIOVANARDI et al., 2005; LABAT et al., 2008; DAVEY et al., 2009; GJERDE et al., 2010), de forma que em alguns países já há o monitoramento de SPA em



condutores (AUSTRALIA, 1986; DRUMMER et al., 2007; ARRIVE ALIVE; AUSTRALIA, 2009; BUTLER 2007; PORTUGAL, 2007). Existe também a possibilidade de se aplicar o controle de SPA no ambiente de trabalho (NOLAN, 2008; LILLSUNDE et al., 2008), em emergências médicas, monitoramento clínico (WAY et al., 1998), na área esportiva (SPYRIDAKI et al., 2006) e também no ambiente escolar (LEVY et al., 2006; ROCHE et al., 2009).

Diversas matrizes biológicas podem ser utilizadas na detecção de SPA, como sangue, urina, suor, cabelo e fluido oral. Tradicionalmente, a urina tem sido o exemplo mais comum de matriz biológica selecionada na triagem do uso de drogas. As matrizes convencionais foram, recentemente, complementadas pela utilização de fluido oral, o qual mais se aproxima do perfil de concentração e tempo exibido pela droga no sangue (KANKAANPÄÄ et al., 2004), assim, sendo considerado como a principal matriz alternativa ao sangue para a detecção do uso recente de medicamentos e drogas de abuso (CONCHEIRO et al., 2007).

Muitas metodologias podem ser utilizadas na detecção de SPA, destacando-se as técnicas cromatográficas, como cromatografia líquida e gasosa, e as técnicas imunológicas. Procedimentos rápidos no rastreamento de substâncias em amostras biológicas tem se tornado uma parte importante da análise toxicológica de rotina em laboratórios forenses (LALOUP et al., 2005), incluindo-se nesse contexto os imunoenaios, que consistem em um teste de triagem para identificação e quantificação de substâncias através da medida de uma resposta característica decorrente da interação entre a substância alvo e um anticorpo específico (HUESTIS e SMITH, 2006). Dentre as técnicas imunológicas existentes, podemos destacar os imunoenaios de precipitação (BUENO e VAZ, 2007), aglutinação (BUENO e VAZ, 2007), imunofluorescência (IF), radioimunoenaios (RIA), enzaimunoenaios (EIA)

e imunocromatografia (IC) (VAZ, 2007). As substâncias são inicialmente detectadas pelos imunoensaios, num processo de triagem, visto que são técnicas sensíveis, baratas e não requerem mão de obra qualificada no laboratório, sendo possível realizar a triagem de muitas amostras para uma ou mais classe de substâncias simultaneamente (HUESTIS e SMITH, 2006).

Devido à elevada ocorrência de resultados falsos positivos e falsos negativos, esses testes de triagem podem ser facilmente questionáveis, justificando o encaminhamento das amostras positivas, e 5% dos testes negativos (para averiguar a eficácia da triagem), para confirmação por procedimentos analíticos mais específicos, os quais devem ser, no mínimo, tão sensíveis quanto os testes de triagem e basear-se em princípio analítico diferente, a fim de não ser alvo dos mesmos interferentes e erros (LIMBERGER et al., 2010).

O presente trabalho tem por objetivo revisar sobre o uso de imunoensaios na detecção de substâncias psicoativas, bem como as diferentes matrizes biológicas, e as técnicas mais empregadas.

## **2 OBJETIVO GERAL**

Abordar sobre a utilização de testes imunológicos na detecção de substâncias psicoativas em diferentes matrizes biológicas.

### **2.1 Objetivos Específicos**

- Revisar a aplicação de técnicas imunológicas na detecção de SPA;
- Abordar sobre as vantagens e desvantagens das diferentes técnicas imunológicas utilizadas para detecção de drogas de abuso;
- Abordar aspectos tecnológicos e de produção de kits;

- Abordar sobre as vantagens e desvantagens de diferentes matrizes biológicas na aplicação de técnicas imunológicas;
- Realização de teste de especificidade em kits de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay);
- Discutir sobre a aplicabilidade destes testes no trânsito;
- Discussão de problemas éticos e legais da aplicação de testes *in loco* em análises de rotina.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

O trabalho foi desenvolvido através de pesquisa em livros didáticos, bem como nas bases de dados Pubmed, ScienceDirect e Portal de Periódicos da CAPES, utilizando as seguintes palavras-chave: drug monitoring/ monitoramento de drogas, immunoassay/imunoensaio, radioimmunoassay/ radioimunoensaio, enzaimmunoassay/ enzaimmunoensaio, screening tests/testes de triagem, oral fluid/saliva, urine/urina, hair/cabelo, blood/sangue, drug test/detecção de drogas, on-site test, workplace drug control/ drogas em ambiente de trabalho e drug and driver/ drogas e trânsito.

A pesquisa foi realizada no período de abril a maio de 2011.

### **4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **4.1 Imunoensaios**

Imunoensaios são métodos de elevada utilidade na detecção de substâncias em fluidos biológicos, devido a facilidade no pré-tratamento das amostras e na capacidade de analisar muitas amostras em um curto espaço de tempo (AOKI, YOSHIDA e KUROIWAB, 1996), além da elevada sensibilidade e baixo custo

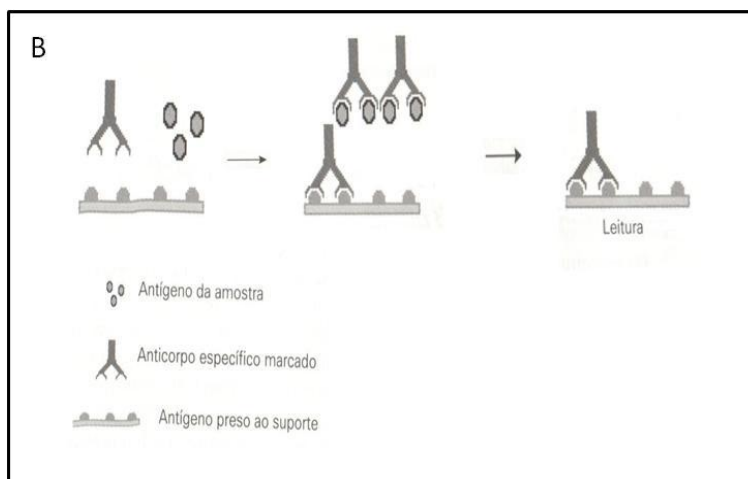
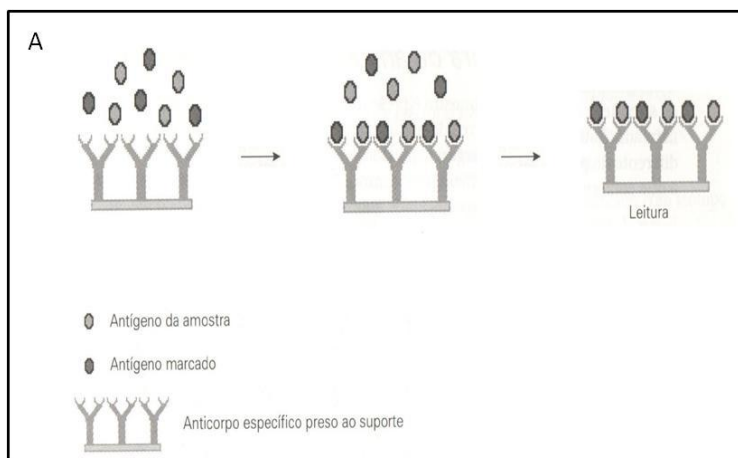
quando comparado a técnicas cromatográficas. Esses testes também evitam o uso de reagentes químicos perigosos, apresentam uma boa especificidade, além de fornecerem um rápido resultado qualitativo e, em alguns casos, resultado semi-quantitativo para uma variedade de substâncias ou grupo de substâncias (HAND e BALDWIN, 2008). Muitos imunoenaios têm sido desenvolvidos para a detecção de drogas em fluidos biológicos, na maioria, ensaios competitivos, em que a substância presente na amostra compete com uma substância marcada pelos sítios de ligação de um anticorpo, desenvolvido especificamente para determinado composto ou metabólito (CASLAVSKA, ALLEMANNB e THORMANNA, 1999). Uma melhor precisão dos resultados é obtida através da combinação da elevada sensibilidade dos imunoenaios com a elevada especificidade de técnicas cromatográficas, as quais são geralmente empregadas como método confirmatório da triagem por imunoenaios, permitindo maior confiabilidade na identificação e quantificação de SPA e seus metabólitos (HUESTIS e SMITH, 2006). As técnicas imunológicas mais empregadas na detecção de SPA são: radioimunoensaio (Radioimmunoassay - RIA), imunoensaio multiplicado por enzima (Enzyme-Multiplied Immunoassay Technique - EMIT), imunoensaio de fluorescência polarizada (Fluorescence Polarization Immunoassay - FPIA), ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA) e imunocromatografia (Immunochromatography - IC).

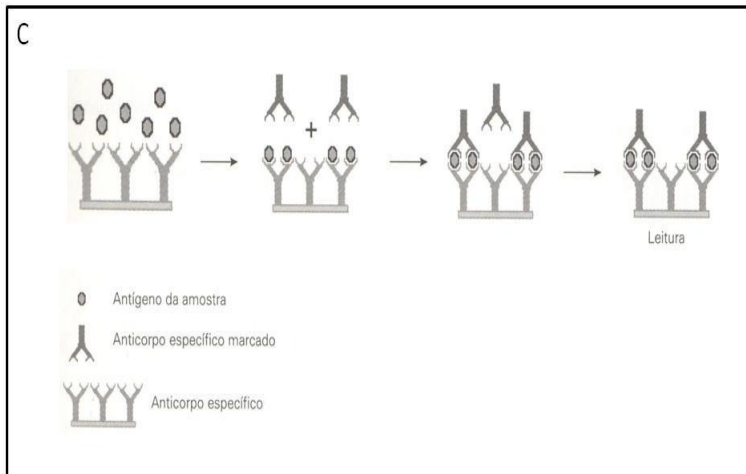
#### *4.1.1 Radioimunoensaio (Radioimmunoassay - RIA)*

O RIA foi a primeira técnica imunológica padronizada para a detecção e quantificação de pequenas quantidades de substâncias. O termo radioimunoensaio é usualmente utilizado quando o componente marcado é o antígeno (REIS, 1998). A detecção de SPA por este método consiste basicamente na utilização da técnica de

RIA competitivo, que se baseia na competição entre um antígeno marcado com um radioisótopo e o antígeno não-marcado, presente na amostra, pelos sítios de ligação do anticorpo, que está fixado na fase sólida. Adicionam-se, então, quantidades crescentes de amostra, contendo o antígeno não-marcado, o qual vai deslocar do sítio de ligação do anticorpo, os antígenos marcados. Dessa forma, quanto maior a quantidade de antígeno não-marcado, menor é a quantidade de antígeno marcado ligado ao anticorpo, e com isso, menor a intensidade do sinal detectado. A quantificação do antígeno é determinada pela contagem do material radioativo presente na reação, sendo os isótopos mais empregados como marcadores o iodo ( $I^{125}$ ), emissor de radiação gama, e o trítio ( $H^3$ ), emissor de radiação beta (STEVENS, 2003; VAZ, 2007a; KINDT, GOLDSBY e OSBORNE, 2008). O número de epítomos apresentados pelo antígeno marcado é sempre superior à quantidade total de sítios de ligação do anticorpo, para ocorrer, de forma efetiva, a competição entre o antígeno não-marcado presente na amostra com o antígeno marcado pelo anticorpo. Para determinar a quantidade de antígeno marcado que se ligou ao anticorpo, o complexo antígeno-anticorpo é precipitado (KINDT, GOLDSBY e OSBORNE, 2008) e a radioatividade é medida através da contagem de raios gama, por um contador gama de cristal sólido, ou de raios beta, através de um contador de cintilações (VAZ, 2007a). Sendo assim, é possível determinar, através da relação inversa, a quantidade de antígeno não marcado presente na amostra. Além da competição com antígeno marcado, há ainda como variações o método de competição com anticorpo marcado, não utilizado na detecção de SPA, e o método de captura de antígeno (sanduíche), no qual o antígeno é revelado pela utilização de um segundo anticorpo (REIS, 1998) (Figura 1).

O RIA é uma das técnicas mais sensíveis para detecção de antígenos e anticorpos (VAZ, 2007a; KINDT, GOLDSBY e OSBORNE, 2008). Alguns estudos relatando a utilização de RIA na detecção de drogas em diferentes matrizes biológicas foram encontrados na literatura (ARMBRUSTER et al., 1993; MARSH, EVANS e STRANG, 1995; TAGLIARO et al., 2000). No entanto, o tempo de meia-vida dos reagentes utilizados, o risco operacional, a necessidade de medidas especiais e o elevado custo de biossegurança e de descarte de material fizeram com que essa técnica fosse, gradativamente, sendo substituída por metodologias mais seguras e que empregam reagentes mais estáveis. Inicialmente, as pesquisas na área de drogas que empregavam técnicas imunológicas utilizavam como método o RIA, no entanto, com o passar dos anos, essa metodologia deu lugar para os enzimaímunoensaios, que atualmente, são mais amplamente empregados.





**Figura 1:** Radioimunoensaio. (A) Método de competição com antígeno marcado, (B) método de competição com anticorpo marcado e (C) método de captura de antígeno (Fonte: REIS, 1998).

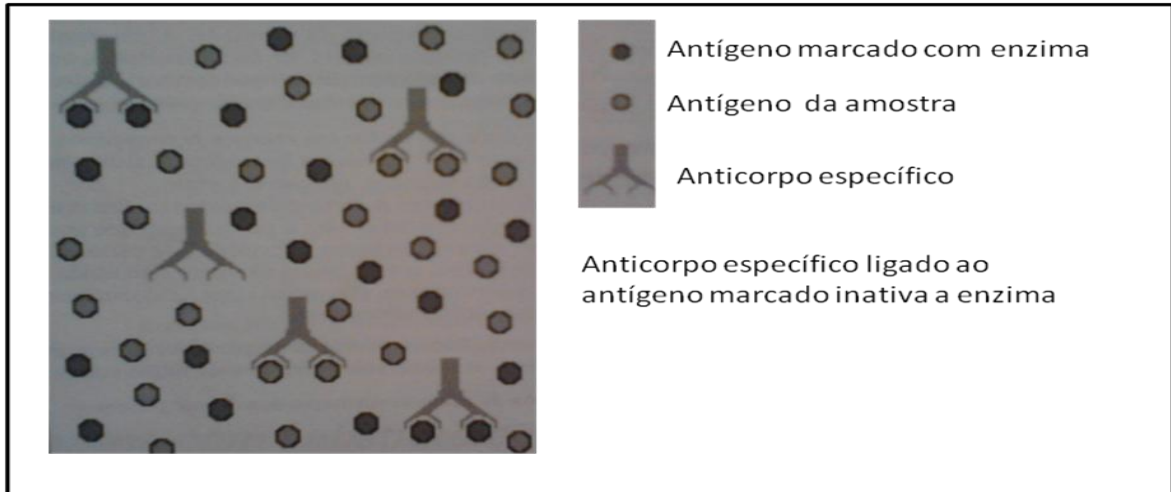
#### 4.1.2 Imunoensaio multiplicado por enzima (*Enzyme-Multiplied Immunoassay Technique - EMIT*)

O EMIT consiste em um enzimaímunoensaio, que permite medidas quantitativas diretas da interação antígeno-anticorpo através da medida de atividade enzimática sobre um substrato (REIS, 1998). Este enzimaímunoensaio é do tipo homogêneo, o que significa que a interação entre os reagentes empregados ocorre no mesmo meio, sem a necessidade de etapas de lavagem. Nesta técnica, o radioisótopo, antes empregado no RIA, é substituído por uma enzima. Este método baseia-se na interação entre o anticorpo específico anti-antígeno e o antígeno (neste caso uma SPA) ligado a uma enzima, denominado conjugado. Incubam-se quantidades conhecidas de conjugado antígeno-enzima com a amostra e com os anticorpos específicos anti-antígeno, promovendo-se, assim, uma competição entre o antígeno presente na amostra e o conjugado pelos sítios de ligação do anticorpo. Quando não há antígeno na amostra, o anticorpo livre se liga ao conjugado inativando a enzima, que não vai conseguir agir sobre o substrato. Quando há antígeno presente na amostra, este se liga ao anticorpo, deixando o conjugado livre

e mantendo a enzima na sua forma ativa para atuar sobre o substrato, gerando, assim, um produto mensurável (Figura 2). Dessa forma, a relação entre a quantidade de produto formado é diretamente proporcional à quantidade de antígeno livre na amostra (REIS, 1998; VAZ, 2007a; VAZ e LEONI, 2007). Nesses ensaios, as enzimas mais comumente utilizadas são a lisozima, a glicose-6-fosfato desidrogenase e a beta-galactosidase (VAZ, 2007a; VAZ e LEONI, 2007). Esta metodologia vem sendo empregada em diversos estudos voltados à detecção de SPA e seus metabólitos, sendo as matrizes sangue e urina as mais amplamente empregadas, seguidas do fluido oral (KANKAANPÄÄ et al., 2001; HINO et al., 2003; JONES, HOLMGREN e KUGELBERG et al., 2008; GJERDE et al., 2011).

O EMIT, além de não apresentar etapas de lavagem, por se tratar de um ensaio imunoenzimático homogêneo, possui como vantagens a rapidez, a fácil execução e a capacidade de se adaptar a diferentes automações, além de boa capacidade de detecção de moléculas pequenas. Considerando que os ensaios imunoenzimáticos são geralmente desenvolvidos para um determinado uso e tipo de amostra, os ensaios imunoenzimáticos homogêneos são mais propensos a interferentes e menos sensíveis do que os ensaios imunoenzimáticos heterogêneos. Isto porque nestes ensaios a amostra está presente no momento da geração do sinal, devido a ausência da etapa de lavagem que minimiza o efeito da matriz (STEVENS, 2003; KINTZ, SPIEHLER e NEGRUSZ, 2008).





**Figura 2:** Imunoensaio multiplicado por enzima (EMIT) (Adaptado de REIS, 1998).

#### 4.1.3 Ensaio Imunoadsorvente Ligado à Enzima (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA*)

Assim como o EMIT, a técnica de ELISA consiste em um enzimaimunoensaio, porém é do tipo heterogêneo, necessitando uma etapa de lavagem para separar as substâncias reagentes marcadas que estão livres das marcadas que se ligaram ao anticorpo (REIS, 1998). Nesta técnica, há a fixação do antígeno ou do anticorpo em uma fase sólida, geralmente de poliestireno, e a utilização de um conjugado, que por sua vez pode ser um antígeno ou um anticorpo ligado a uma enzima. Na detecção de SPA, geralmente têm-se um anticorpo sintético imobilizado na fase sólida, específico para o antígeno de interesse presente na amostra. Nesses testes é necessária uma etapa de lavagem após a adição dos reagentes, para separar o conjugado que se ligou ao anticorpo dos conjugados que ficaram livres. A enzima reage com o substrato incolor adicionado ao sistema, gerando um produto de reação colorido, monitorado visualmente ou por espectrofotômetro. A relação entre a intensidade de coloração e quantidade de antígeno na amostra é inversamente proporcional (REIS, 1998; STEVENS, 2003; VAZ, 2007a). No ELISA, as enzimas

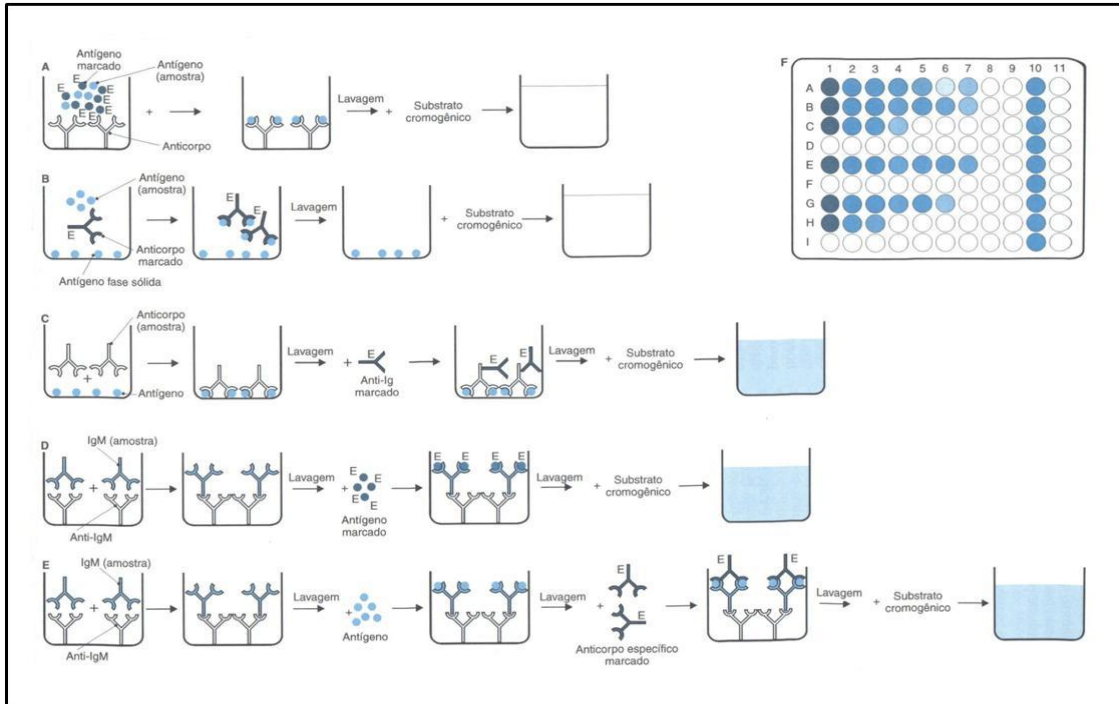
mais utilizadas são a peroxidase, a fosfatase alcalina e a beta-galactosidase. Diversas variantes da técnica foram desenvolvidas, como o ELISA indireto, o ELISA captura de antígeno (sanduíche) e o ELISA competitivo, sendo os dois últimos os mais aplicados para detecção de antígeno na amostra (KINDT, GOLDSBY e OSBORNE, 2008) e, portanto, os mais utilizados na detecção de SPA (Figura 3). A seguir estão descritas as duas variantes mais utilizadas:

- a) ELISA sanduíche: Neste método, o anticorpo é imobilizado na fase sólida e o antígeno, presente na amostra adicionada, interage com o anticorpo imobilizado. Após uma etapa de lavagem, para retirar os antígenos que permanecem livres, um segundo anticorpo, ligado a uma enzima e direcionado a um epítopo diferente, é adicionado ao sistema, ocorrendo a interação com o antígeno que se ligou ao anticorpo imobilizado. Depois de retirado o excesso do segundo anticorpo, o substrato é adicionado gerando um produto colorido (STEVENS, 2003; VAZ, 2007a; KINDT, GOLDSBY e OSBORNE, 2008). Essa variante da técnica apresenta algumas vantagens em relação aos métodos competitivos, como a maior sensibilidade e a possibilidade de se utilizar o mesmo conjugado em diferentes sistemas, na busca por diferentes antígenos (VAZ, 2007a; KINDT, GOLDSBY e OSBORNE, 2008).
- b) ELISA competitivo: Nesse teste, o antígeno ligado à enzima compete com o antígeno livre, presente na amostra do paciente, pelo sítio de ligação do anticorpo. Após uma etapa de lavagem, os antígenos que não se ligaram ao anticorpo são removidos e após a adição do substrato da enzima, a atividade enzimática é mensurada. Quanto maior a quantidade de antígeno presente na amostra, menor a quantidade de antígeno marcado com enzima se liga ao

anticorpo, sendo assim, a atividade enzimática é inversamente proporcional a quantidade de antígeno presente na amostra (REIS, 1998; STEVENS, 2003; IMMUNALYSIS CORPORATION, 2005; VAZ, 2007a).

Em todas as variantes do ELISA, antes da medida da intensidade da coloração, adiciona-se uma solução ácida ou alcalina que interrompe a reação enzimática e estabiliza a coloração para a realização da leitura em espectrofotômetro. Alguns estudos têm demonstrado a aplicabilidade desta técnica na detecção de SPA em diferentes matrizes, como sangue, urina, fluido oral e cabelo (MOORE et al., 1999; LALOUP et al., 2005; PUJOL, 2007; LABAT et al., 2008; KULIKOWSKA et al., 2009; MIYAGUCHI et al., 2009; DRUMMER et al., 2011; KIRSCHBAUM, 2011).

Assim como o EMIT, a técnica de ELISA apresenta rapidez, baixo custo e adaptação a diferentes graus de automação, além de objetividade na leitura, elevada sensibilidade e especificidade (REIS, 1998; LALOUP et al., 2005; VAZ, 2007a). Uma vantagem, comparada ao EMIT e outros ensaios homogêneos é a possibilidade de utilizar a amostra sem preparação prévia, pois ela será retirada em uma etapa de lavagem, não interferindo no teste, o que confere ao teste menores limites de detecção.



**Figura 3:** Teste imunoenzimático para quantificação de antígenos em amostras: (A) competitivo com antígeno marcado e (B) competitivo com anticorpo marcado. Teste imunoenzimático para detecção de anticorpos: (C) indireto, (D) captura de IgM com antígeno marcado e (E) captura de IgM com anticorpo marcado. (F) Representação de resultado de um teste de ELISA em microplaca (Fonte: VAZ, 2007a).

#### 4.1.4 Imunocromatografia (Immunochromatography- IC)

Os testes imunocromatográficos, também chamados de “on-site tests” ou testes rápidos, consistem em uma técnica de triagem que pode ser utilizada para indicar o uso de SPA, por serem de fácil utilização, apresentarem resultado rápido, “in loco” e confiável (BLENCOWE et al., 2010). A técnica emprega uma matriz sólida constituída de uma membrana de nitrocelulose ou de náilon, recobertas por um acetato transparente. Na utilização para SPA, o anticorpo é fixado na membrana na forma de linhas, denominadas linhas de captura. Como conjugado, utiliza-se um segundo anticorpo, marcado com um corante insolúvel como o ouro coloidal, de coloração rósea, ou o prata coloidal, de coloração azul-marinho. Com a aplicação da amostra o antígeno presente se liga ao conjugado e migra, por cromatografia, até

formar um imunocomplexo. Este imunocomplexo é revelado pelo depósito do corante coloidal na linha de captura. Esses testes possuem a vantagem de dispensarem o uso de reagentes adicionais, equipamentos e técnicos especializados, não sendo necessário um ambiente laboratorial para realização da análise, além de possuírem uma boa sensibilidade, suficiente para detectar intoxicações por superdosagem e SPA em pequenas quantidades. Foram inicialmente desenvolvidos para a utilização em urina, visto que a utilização de sangue impede o resultado rápido e *in loco* deste teste, além de haver interferência das células sanguíneas na migração. No entanto, o uso de fluido oral tem se tornado cada vez mais freqüente na detecção de SPA e utilizado na detecção e monitoramento dessas substâncias (GRONHOLM e LILLSUDE, 2001; KANKAANPAA et al., 2001; BIERMANN et al., 2004; TOENNES et al., 2005; HUESTIS e SMITH, 2006; LALOUP et al., 2006; BLENCOWE et al., 2010). Os testes imunocromatográficos são de elevado custo, e por esse motivo, é comum a utilização de dispositivos que utilizem um conjunto de anticorpos para detecção de algumas classes de SPA mais frequentes, permitindo a detecção simultânea de diferentes substâncias (VAZ, 2007a; VAZ e LEONI, 2007). Uma desvantagem associada a esses testes é a subjetividade na interpretação dos resultados, no entanto, esse problema tem sido contornado com o desenvolvimento de leitoras portáteis, permitindo maior exatidão no resultado (HAND e BALDWIN, 2008).

#### *4.1.5 Imunoensaio de Fluorescência Polarizada (Fluorescence Polarization Immunoassay - FPIA)*

O FPIA é uma técnica de imunofluorescência do tipo homogênea, também chamado de fluoroimunoensaio. As moléculas fluorescentes absorvem luz de um comprimento de onda (excitação) e emitem luz de outro comprimento de onda

(emissão), de forma que a detecção ocorre através da emissão de luz colorida quando as moléculas fluorescentes são excitadas por uma luz de comprimento de onda apropriado (KINDT, GOLDSBY e OSBORNE, 2008). Nessa técnica, para a detecção de SPA, os antígenos são marcados com fluorocromos, os quais vão competir com um antígeno não-marcado presente na amostra pelo sítio de ligação no anticorpo. Quando há uma grande quantidade de antígenos não-marcados na amostra, este vai se ligar ao anticorpo e deixar livres os antígenos marcados, os quais vão se movimentar rapidamente em solução e, quando excitados, emitem menos luz polarizada. Quando há uma menor quantidade de antígenos não marcados ocorre a ligação dos antígenos marcados com os anticorpos e a formação de um imunocomplexo, o qual possui uma movimentação limitada, devido ao seu elevado tamanho, e com isso a luz emitida pelo fluorocromo é mais polarizada. A leitura da luz polarizada é realizada em um microscópio de fluorescência, composto por uma fonte de luz UV de alta intensidade (lâmpada de quartzo-halogênio), filtros de excitação para fluorocromo e filtros barreira, que removem interferentes e garantem a transmissão eficiente de luz emitida. A quantidade de antígeno na amostra é inversamente proporcional a quantidade de luz polarizada detectada (VAZ, 2007a; VAZ e LEONI, 2007). Os fluorocromos mais utilizados são fluoresceína, que emite fluorescência amarelo-esverdeado, e rodamina e ficoeritrina, que emitem fluorescência vermelha (KINDT, GOLDSBY e OSBORNE, 2008).

O FPIA tem sido utilizado em alguns estudos para a detecção de SPA em diferentes matrizes biológicas (ENSSLIN, KOVAR e MAURER, 1996; CASLAVSKA, ALLEMANNB e THORMANNA, 1999; RADOVANOVIC et al., 2000; RAIKOS et al., 2002; SAMYN et al., 2002; KULIKOWSKA et al., 2009), pois é uma técnica de

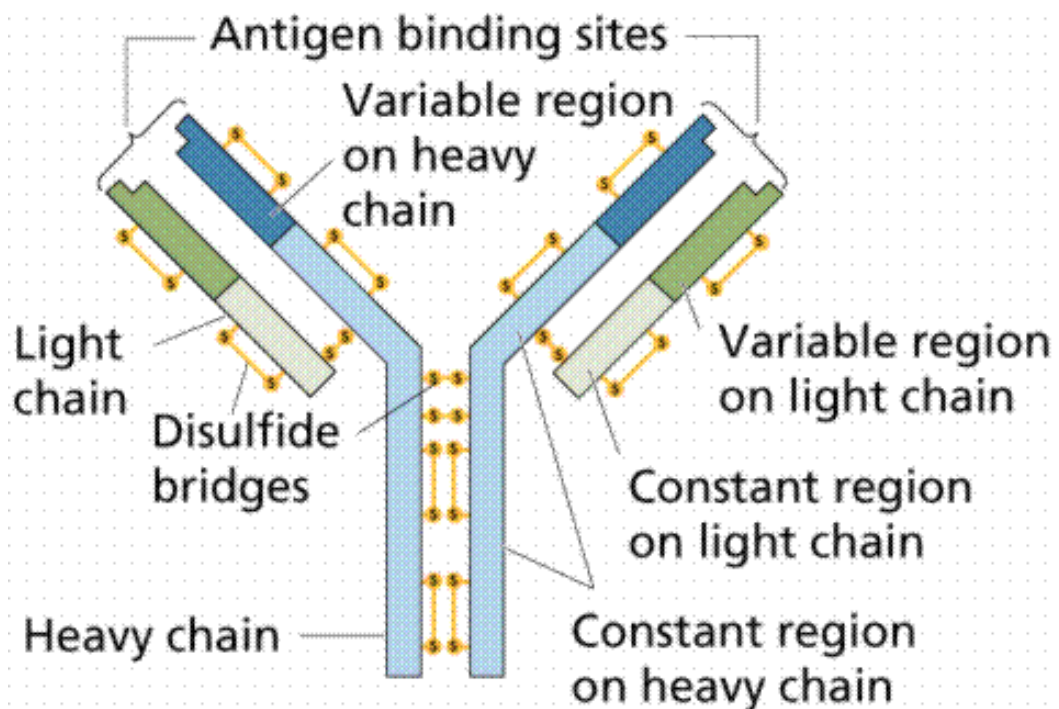
elevada sensibilidade e metodologia simples (STEVENS, 2003). Porém, em geral, tem sido gradativamente substituído por enzimaímoensaios, devido a fatores como a necessidade de microscopia e subjetividade de leitura, além de impossibilidade de automação (VAZ, 2007a).

#### **4.2 Desenvolvimento de Kits de Imunodiagnóstico**

No contexto da utilização de testes de imunoensaios na detecção de substância psicoativa, destaca-se a importância no desenvolvimento de kits de imunodiagnóstico. Esses kits empregam anticorpos como componente crucial para o desempenho do teste, os quais devem ser escolhidos ou desenvolvidos para apresentar especificidade e afinidade adequada para o antígeno correspondente. Outro fator importante no desenvolvimento de kits é a escolha do tipo de anticorpo mais adequado para ser utilizado no teste, sendo os mais empregados os monoclonais e policlonais.

Anticorpos são glicoproteínas pertencentes à família das imunoglobulinas, que consiste em diversas proteínas envolvidas na resposta imunológica e sistemas de defesa do organismo. A estrutura básica de um anticorpo consiste em duas cadeias polipeptídicas “pesadas” idênticas pareadas com duas cadeias polipeptídicas “leves” idênticas, resultando em uma estrutura flexível em forma de Y (STRASINGER e STEVENS, 2003). A cadeia leve está ligada a uma cadeia pesada através de uma ponte de dissulfeto e as duas cadeias pesadas estão ligadas entre si através de duas pontes dissulfídicas. As cadeias são subdivididas em domínios constituídos de aproximadamente 110 aminoácidos, ligados por variadas pontes de dissulfeto, formando uma estrutura globular. Tanto as cadeias pesadas quanto as leves

possuem regiões variáveis (V) aminoterminais e regiões constantes (C) carboxiterminais. A cadeia pesada possui um domínio variável (Vh) e três domínios constantes (Ch1, Ch2, Ch3), enquanto que a cadeia leve possui apenas um domínio variável (Vl) e um domínio constante (CL). A região Vh é justaposta a uma região Vl, formando o sítio de combinação. Esse sítio de combinação possui também regiões hipervariáveis, as quais estão presentes dentro de cada região variável das cadeias leves e pesadas, assim, existindo cerca de três regiões hipervariáveis na região Vh e três na região Vl. Essas regiões hipervariáveis são chamadas de regiões determinantes de complementaridade (complementarity determining region - CDRs). (LIDDELL, 2005; FERNANDES e ESPÍNOLA, 2007) (Figura 4).



**Figura 4:** Estrutura da molécula de anticorpo (Fonte: FMRP, 2011).

Os anticorpos policlonais são produzidos por diferentes linfócitos B, cada um produzindo um anticorpo reconhecendo um único epítipo. O soro policlonal consiste em uma mistura de anticorpos com diferentes afinidades, isotipos diferentes e com



diferentes especificidades, reconhecendo tanto epítomos da substância imunogênica quanto impurezas. Na produção dessa mistura de anticorpos, em escala laboratorial se utilizam, geralmente, coelhos, mas em escala industrial, outros animais podem ser utilizados, como ovelhas e cavalos. A escolha do local de injeção da substância imunogênica é importante, a aplicação subcutânea é feita em diferentes localidades, sendo que a aplicação próxima aos linfonodos é considerada a melhor região, por causar menor desconforto ao animal. Após a produção da mistura de anticorpo, pode ser necessária uma etapa de purificação, principalmente quando se deseja marcar o anticorpo com reagentes para detecção. A purificação pode ser realizada por vários processos, como *salting out*, que vai resultar na precipitação do anticorpo devido ao aumento da força iônica, obtendo-se uma pureza de 80 a 90%; método de troca iônica, o qual fornece maior pureza comparada ao *salting out*, mas o processo é mais demorado; ligação específica e reversível do anticorpo com lecitina, formando um complexo que quando dissociado, pela utilização de um tampão, libera anticorpo de elevada pureza, no entanto é uma técnica cara e limitante em grande escala; purificação por imunoafinidade na qual o antígeno é fixado a um suporte inerte e o anticorpo passa, lentamente, através da coluna e após a lavagem para retirar anticorpos não ligados, os que se ligaram aos antígenos são, então, eluidos (LIDDELL, 2005).

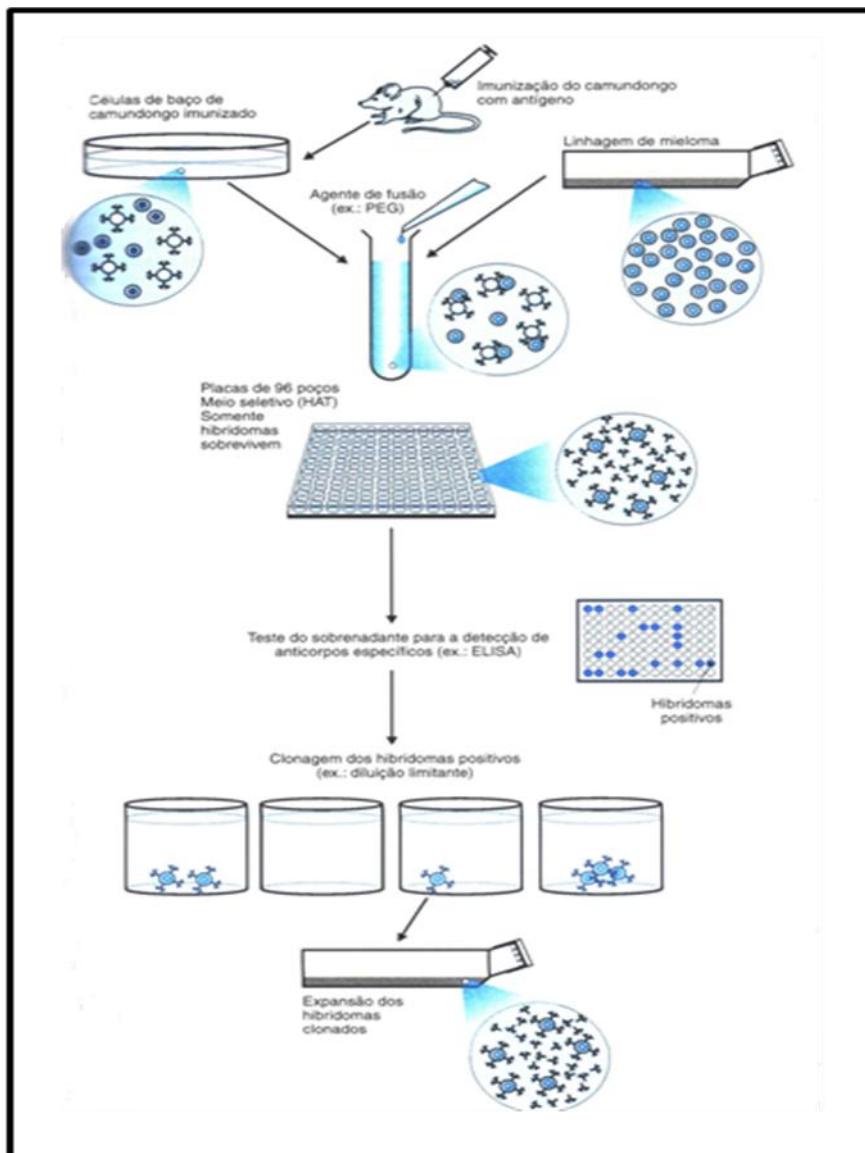
Os anticorpos monoclonais são obtidos a partir da fusão de um linfócito B com uma célula de mieloma, gerando uma célula híbrida, a qual herdou tanto a capacidade de gerar anticorpos específicos quanto a capacidade de se proliferar indefinidamente. Uma única célula de hibridoma pode ser isolada e através de processos mitóticos gerar anticorpos idênticos. As células de mieloma são células neoplásicas que têm a capacidade de produzir anticorpos, no entanto uma das

características de mielomas utilizados para produção de hibridomas é a não secreção de imunoglobulinas, além de uma deficiência enzimática, tanto da enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferase (HGPRT) como da enzima timidina quinase (TK). As células podem ser obtidas por coleção de culturas internacionais como a American Type Culture Collection e a European Collection of Animal Cell Cultures (STEVENSON, 2003; LIDDELL, 2005).

A deficiência na enzima HGPRT e TK impede a sobrevivência das células de mieloma no meio HAT, no qual crescem as células que já foram fundidas com anticorpos, enquanto que as células fundidas conseguem sobreviver por ter herdado a enzima HGPRT do linfócito. A fusão das células é realizada a partir da mistura entre a suspensão de células obtidas do baço ou linfonodos do animal imunizado com as células de mieloma, mas não é uma fusão específica, podendo permanecer em solução células do baço e mielomas não-fundidos, híbridos de mieloma/mieloma, híbridos de células do baço, híbridos de células do baço/mieloma, além de híbridos de mais de duas células. Essa fusão é realizada principalmente pela adição do agente surfactante polietilenoglicol (PEG) à mistura. A diferenciação entre os hibridomas formados ocorre com a incubação da mistura no meio HAT, isto porque esse meio é enriquecido com hipoxantina, aminopterina e timidina. A aminopterina é um antibiótico que bloqueia a via “de novo” de síntese de ácido nucléico, obrigando a célula a utilizar a via de salvamento alternativo, na qual as enzimas HGPRT e TK utilizam hipoxantina e tirosina, respectivamente, como substrato para síntese. Como as células de hibridoma de mieloma e linfócitos possuem essas enzimas conseguem sobreviver no meio utilizando os substratos presentes (STEVENSON, 2003; LIDDELL, 2005). Na tecnologia de hibridomas, as células de mieloma utilizadas são duplo mutantes, pois não possuem a enzima HGPRT e também perderam a capacidade

de sintetizar imunoglobulinas, garantindo que os anticorpos produzidos pelo hibridoma são provenientes apenas das células esplênicas e que o mieloma apenas contribui para o crescimento ininterrupto das células fusionadas (FERNANDES e ESPÍNOLA, 2007).

Outra etapa no processo de produção de anticorpo monoclonal é o teste de anticorpo, para se verificar se as células estão produzindo o anticorpo desejado. O teste é realizado com o sobrenadante da cultura de hibridomas, utilizando-se o antígeno, de maior pureza possível. O tipo de teste ideal é o ELISA, pois diversas amostras podem ser analisadas em poucas horas e os reagentes são facilmente encontrados no mercado, além de se poder determinar o resultado visualmente em determinadas concentrações, não necessitando equipamentos. Após o teste de triagem para o anticorpo produzido, realiza-se a etapa de clonagem das células. Essa etapa é necessária para que se possa isolar da mistura uma colônia de células secretoras de anticorpos, e esse processo geralmente é realizado através do método de diluição limitante. Nesse método, se contam as células na suspensão e se dilui a níveis que se possa aumentar a probabilidade de se semear uma única célula por poço, que então crescem em colônias individuais. Nos estágios iniciais é necessária a suplementação da cultura celular, geralmente com células que secretam fatores de crescimento celular ou com “equivalents media supplements”. A partir da identificação das colônias através da observação em microscópio, transfere-se a colônia para um meio de cultura maior e se faz uma reclonagem. A reclonagem e o teste de anticorpo são feitos até se obter a produção de anticorpo específico para se ter certeza que os anticorpos são monoclonais. A purificação de anticorpos monoclonais é a mesma já descrita para a purificação de anticorpos policlonais (STEVENS, 2003; LIDDELL, 2005) (Figura 5).



**Figura 5:** Obtenção de anticorpos monoclonais (Fonte: FERNANDES e ESPÍNDOLA, 2007).

Os anticorpos policlonais são fáceis, rápidos e baratos de se produzir, mas a limitação está na baixa especificidade, pureza e rendimento. Ao contrário dos anticorpos policlonais, os anticorpos monoclonais nem sempre precisam ser purificados, no entanto, possuem uma especificidade voltada a um único epítopo e não para a molécula inteira, e dessa forma, um epítopo comum em diversas moléculas faz com que o anticorpo se ligue a antígenos nem sempre relacionados.

Muitos anticorpos monoclonais estão disponíveis comercialmente, tanto na forma purificada quanto na forma nativa, além da possibilidade de adquirí-los marcados com enzimas ou substâncias fluorescentes. No entanto, a compra de anticorpos pode ser cara e a fabricação de um anticorpo de interesse pode ser uma solução, porém o tempo mínimo para a produção de anticorpos monoclonais é de aproximadamente quatro meses, podendo levar até um ano, além de ser um processo bastante intenso (LIDDELL, 2005).

O desenvolvimento de um kit de imunodiagnóstico é feito seguindo as normas estabelecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através das Boas Práticas de Fabricação e Controle (BPF), bem como de normas específicas relacionadas a produtos de diagnóstico *in vitro* publicados pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2002). O processo de desenvolvimento compreende diversas etapas, iniciando-se pelo projeto, que vai servir de guia para todo o desenvolvimento e validação do produto, até o registro do produto em órgão competente.

Todo o produto desenvolvido deve passar por uma etapa de validação, que tem por objetivo assegurar as condições adequadas do teste e que as instruções de uso estão bem definidas, monitorar o desempenho do produto, avaliar a dimensão de erros, estabelecer condições ideais de uso, entre outros fatores. A validação é realizada durante o desenvolvimento e após o término do produto. Durante o desenvolvimento, têm-se como objetivo obter a condição ideal para o desenvolvimento, testando-se quantidades de reagentes, ordem de adição dos reagentes, temperaturas. Para realizar essa validação, um dos pontos mais importantes é definir quais são as etapas críticas do processo de produção, ou seja, aquelas que interferem na qualidade do produto. A validação do produto acabado vai

confirmar se os limites impostos atendem aos requisitos predefinidos. Nessa etapa, o ideal é realizar a validação em três lotes, para verificar se o kit cumpre as especificações desejadas. Para o processo de validação, é importante ter definido um método de referência (IFI), que é o ensaio considerado padrão e confirmatório para determinado parâmetro. Diversos índices e parâmetros são utilizados no processo de validação: sensibilidade, especificidade, limite de detecção, análise de interferências, repetitividade, reprodutibilidade, estabilidade, erro aleatório e erro sistemático. Realiza-se também uma validação final, que se dá através da produção de um lote piloto em escala real de produção, sendo avaliado o produto final, com o objetivo de se verificar se os procedimentos e processos de produção estão corretos (MENEGHISSE, 2007).

### **4.3 Matrizes biológicas**

A escolha da melhor matriz biológica para determinada análise deve levar em consideração, principalmente, as características da substância de interesse e o período de tempo em que se deseja identificar a substância (WOLFF, 2006). As matrizes biológicas mais utilizadas para a detecção de SPA por imunoenensaio são urina, sangue, fluido oral, cabelo e suor.

#### *4.3.1 Urina*

A urina é um fluido biológico extensamente utilizado em análises toxicológicas, pois é uma das matrizes com menor número de interferentes endógenos, uma vez que é constituída principalmente por água. Essa matriz possui larga aplicação na detecção de SPA por técnicas imunológicas, sendo aplicada no monitoramento clínico de pacientes (MUSSHOF et al., 2006; LU e TAYLOR, 2006; KIRSCHBAUM, 2011; WANG et al., 2011), no trânsito (RADOVANOVIC et al., 2000;

TOENNES et al., 2005; LABAT et al., 2008; SENNA et al., 2010) no ambiente de trabalho (SILVA e YONAMINE, 2004; BUSH 2008; NOLAN 2008; WALSH et al., 2008) e em análises post-mortem (RASANEN et al, 2000; RAIKOS et al., 2002). Quando comparada ao sangue, a urina frequentemente apresenta concentrações mais altas de xenobióticos e/ou seus produtos de biotransformação (MOREAU e SIQUEIRA, 2008). A utilização da urina para análise de SPA possui como vantagens a elevada concentração das substâncias na amostra e a obtenção de volumes geralmente abundantes. No entanto, têm-se como desvantagens a facilidade de adulteração e a necessidade de a coleta ser realizada em local adequado e supervisionada. A janela de detecção de alguns dias não é adequada para detecção do uso recente das substâncias, mas útil para o monitoramento da utilização (HUESTIS e SMITH, 2006). Por esses e outros motivos, a urina vem sendo a matriz biológica mais comum na triagem do uso de SPA (KANKAANPAA et al., 2004). Além disso, nos últimos anos, houve um grande crescimento no desenvolvimento de kits do tipo imunocromatografia para análise de SPA em urina (WOLFF, 2006). A urina também é útil no monitoramento de pacientes dependentes de drogas (SAN et al., 1998; NURCO et al., 1995; KIDWEL et al., 2003), no entanto não é a matriz mais indicada para a abordagem de motoristas, pois um resultado positivo em exame de urina confirma a utilização da droga, mas não significa que o condutor estava sob o efeito da substância (HUESTIS e SMITH, 2006) nesses casos, a utilização de sangue ou seus derivados é mais indicado (GJERDE et al., 2010).

#### *4.3.2 Sangue*

Amostras de sangue e seus derivados (soro ou plasma) são de especial importância nas análises toxicológicas, pois por intermédio dos níveis sanguíneos de

determinados xenobióticos quase sempre é possível realizar correlações com os efeitos dessa substância sobre o organismo (MOREAU e SIQUEIRA, 2008). A substância presente no sangue costuma equilibrar-se rapidamente nas células sanguíneas e nas proteínas plasmáticas. Portanto, qualquer fluido (sangue total, plasma ou soro) pode ser utilizado para refletir o perfil sistêmico temporal da substância (TOZER e ROWLAND, 2009). O sangue é a melhor matriz biológica para relacionar as concentrações das substâncias com os efeitos prejudiciais perceptíveis (HUESTIS e SMITH 2006). Imunoensaios, inicialmente desenvolvidas para análise de urina, passaram a ter suas metodologias modificadas para tornar possível a utilização desses testes no rastreamento de SPA no sangue ou derivados, principalmente no que diz respeito às técnicas de preparação da amostra (LILLSUNDE et al., 1996). A utilização de sangue ou derivados em imunoensaios tradicionais exige uma preparação e limpeza da amostra para precipitar proteínas e hemoglobina presentes no sangue, as quais podem interferir na detecção do analito de interesse (LALOUP et al., 2005; VAZ, 2007b). Quando se trabalha com o plasma ou sangue total, o qual é utilizado com menor frequência em imunoensaios, é importante levar em consideração o anticoagulante utilizado na coleta, pois este pode interferir no teste utilizado, como por exemplo, a inativação da atividade enzimática da fosfatase alcalina pelo EDTA (VAZ, 2007b).

Apesar de se tratar de uma matriz biológica complexa e que possui um procedimento de coleta consideravelmente mais complicado por ser invasivo, quando comparado a urina e fluido oral, muitos estudos têm utilizado o sangue ou seus derivados como matrizes biológicas para a detecção do uso recente de SPA por imunoensaio (MOORE et al., 1999; RADOVANOVIC et al., 2000; RAIKOS et al., 2002; HINO et al., 2003; LALOUP et al., 2005; JONES, HOLMGREN e



KUGELBERG, 2008; KULIKOWSKA et al., 2009; SENNA et al., 2010; GJERDE et al., 2011; DRUMMER et al., 2011).

#### *4.3.3 Fluido Oral*

O fluido oral consiste de saliva e outros fluidos e de substâncias presentes na cavidade oral (SCHIPPER, SILLETT e VINGERHOEDS, 2007). Cada tipo de glândula salivar secreta um tipo de saliva com determinadas características, como diferenças na concentração de íons e proteínas totais. O fluido oral tem como composição água e íons, os quais podem conferir certa capacidade tamponante, uma elevada quantidade de compostos protéicos e possui um pH que varia de 5 a 7 quando coletado de forma não-estimulada, chegando a um valor máximo de 8, quando realiza-se estimulação (YONAMINE, 2004; APS e MARTENS, 2005; CHIAPPIN et al., 2007). As substâncias passam da circulação para as glândulas salivares através de mecanismos como transporte ativo, difusão passiva e ultrafiltração, sendo a difusão passiva a principal forma de transporte (YONAMINE, 2004; APS e MARTENS, 2005). Dessa forma, substâncias não-ionizáveis em pH sanguíneo ou que não se encontram ionizadas dentro dessa faixa de pH, são candidatas à monitorização através do fluido oral (APS e MARTENS, 2005; KINTZ, SPIEHLER e NEGRUSZ, 2008).

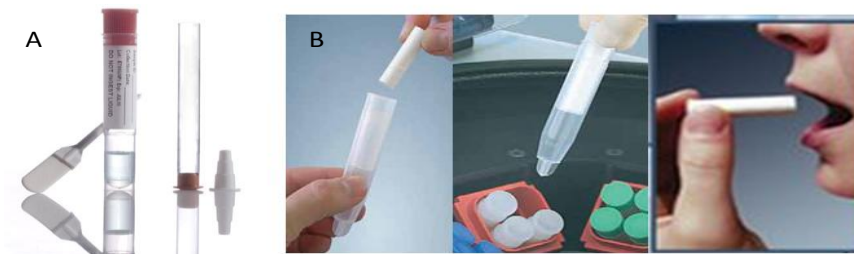
O fluido oral é considerado como a principal matriz alternativa ao sangue para a detecção do uso recente de medicamentos e drogas de abuso (CONCHEIRO et al. 2007), provavelmente por refletir um perfil de concentração sistêmico da droga comparável a essa matriz (KANKAANPAA et al., 2004; HUESTIS e SMITH 2006). Entretanto, de acordo com WALSH e colaboradores (2008), o uso de fluido oral como alternativa ao sangue pode ser de valor, mas com a carência de dados

farmacocinéticos e o conhecimento que se tem até o momento sobre essa matriz, sua aplicação é limitada.

A utilização dessa matriz para a monitorização do consumo de SPA vem sendo empregada em diversos países (SAMYN, DE BOECK e VERSTRAETE et al. 2002; BERNHOFT et al., 2005; TOENNES et al., 2005; WYLIE et al., 2005; DRUMMER et al., 2007), principalmente no trânsito e no ambiente de trabalho, sendo a imunocromatografia a técnica mais utilizada (PRESLEY et al., 2003; BIERMANN et al., 2004; COOPER et al., 2005; PEHRSSON et al., 2008; WILLE et al., 2010; ARRIVE ALIVE; PORTUGAL, 2007; WALSH 2008; BUSH, 2008; DAVEY et al., 2009).

Apresenta como principais vantagens em relação às matrizes convencionais (sangue e urina) a coleta fácil, não invasiva e não constrangedora, além de fornecer informação sobre o consumo recente (algumas horas), comprovando que o indivíduo está sob a influência de SPA, e de possuir boa correlação com concentrações sanguíneas da substância, o que fortalece o uso dessa matriz no trânsito e no ambiente de trabalho (YONAMINE, 2004; KINTZ, SPIEHLER e NEGRUSZ, 2008). A coleta pode ser realizada por drenagem, sucção e absorção, sendo comercializados atualmente diferentes dispositivos de coleta (Figura 6). A utilização de fluido oral também permite a determinação de parâmetros farmacocinéticos, sendo sua coleta mais vantajosa que a punção venosa (KINTZ, SPIEHLER e NEGRUSZ, 2008). As substâncias no fluido oral, na sua grande maioria, encontram-se na forma inalterada, o que pode ser uma vantagem ou uma desvantagem do ponto de vista analítico (YONAMINE, 2004). Geralmente as regulamentações utilizadas em análises toxicológicas consideram a droga não metabolizada como a entidade a ser analisada, sendo uma vantagem a possibilidade de se identificar a droga não

alterada e seus produtos de biotransformação, garantindo maior confiabilidade dos resultados (COWAN; HOUGHTON e JICKELLS, 2008). Porém, na utilização do fluido oral em imunoenaios, é considerada uma desvantagem, já que os anticorpos da maioria dos kits disponíveis são voltados aos produtos de metabolismo (YONAMINE, 2004). Como principais desvantagens apresentadas pelo fluido oral podem ser citadas o elevado conteúdo glicoprotéico (mucina), reduzido volume de amostra e baixa concentração de fármacos.



**Figura 6:** Dispositivos de coleta de saliva. A. Quantisal® (Fonte: IMMUNALYSIS COLLECTION DEVICE, 2011) e B. Salivette® (Fonte: SARSTEDT, 2011).

#### 4.3.4 Cabelo

O cabelo é uma matriz biológica alternativa bastante popular para teste de drogas (HUESTIS e SMITH, 2006) e apresenta diversas vantagens, como a possibilidade de monitoramento clínico, facilidade na coleta, transporte e armazenamento, baixo custo, além de oferecer informação sobre curto e longo período de exposição às substâncias (WOLFF, 2006; ESTEBAN e CASTANÕ, 2009). A maior desvantagem dessa matriz está na dificuldade de se diferenciar o que é exposição externa (contaminação) a uma substância ou o que é proveniente do uso de interno (SCHAFFER e HILL, 2005; ESTEBAN e CASTANÕ, 2009), além do fato de ser uma matriz complexa, cuja biologia ainda não é totalmente conhecida (NAKAHARA, 1999). A problemática da contaminação externa do dessa matriz pode

ser avaliada através de processos de lavagem, podendo ser realizada uma descontaminação efetiva da amostra antes da realização da análise toxicológica (CAIRNS et al., 2004). Nesta abordagem, tanto o líquido de lavagem, quanto o extrato devem ser analisados e os dados comparados, para liberação do resultado analítico com elevada confiabilidade.

A coleta da amostra é de grande facilidade, sendo preferencial a retirada do cabelo da região chamada de vértice superior, pois nessa região há menor variabilidade na taxa de crescimento, o número de pêlos na fase de crescimento é mais constante e há menor influência da idade e sexo, quando comparado ao cabelo retirado de outras regiões (KINTZ, SPIEHLER e NEGRUSZ, 2008). É bem estabelecido que as substâncias e seus metabólitos passam para o cabelo por diferentes mecanismos, tais como difusão passiva e secreções de glândulas sudoríparas sebáceas e apócrinas (KINTZ, SPIEHLER e NEGRUSZ, 2008). Em uma análise de fragmentos, para verificar o tempo de exposição ou uso, se realiza o corte do cabelo em fragmentos de 1 a 3 centímetros, sendo que cada centímetro corresponde a um período de crescimento de 1 mês (SCHAFFER e HILL, 2005; KINTZ, SPIEHLER e NEGRUSZ, 2008). Geralmente, a incorporação da substância no cabelo é controlada pelo seu mecanismo farmacológico de distribuição (PRAGST e BALIKOVA, 2006) e a quantidade incorporada ao cabelo pode ser influenciada pela dose, duração da exposição, propriedades químicas da substância, contaminação e cor do cabelo (KINTZ, SPIEHLER e NEGRUSZ, 2008). Quando comparado a sangue e urina, a técnica de preparação do cabelo e a extração das substâncias parecem ser mais complexas (MIYAGUCHI et al., 2009). Para a análise em imunoenensaio, a substância é solubilizada através de uma incubação em um tampão de característica aquosa, enquanto que para análise em cromatografia

gasosa é necessária a incubação em solvente orgânico, soluções ácidas ou básicas ou passar por um processo de digestão enzimática, seguido por um processo de extração, geralmente líquido-líquido (KINTZ, SPIEHLER e NEGRUSZ, 2008; MIYAGUCHI et al., 2009).

Atualmente, o uso do cabelo como matriz em toxicologia forense é aplicável para a investigação do histórico de uso de drogas de abuso (GOTTARDO et al., 2007), assim, metodologias analíticas têm sido desenvolvidas para a análise de substâncias nesta matriz (DEVEAUX et al., 2000; GOTTARDO et al., 2007; MUSSHOF e MADEA , 2007; COULTER et al., 2010). Dentre as metodologias utilizadas destacam-se os imunoenaios, sendo o RIA e FPIA as mais empregadas (MARSH, EVANS e STRANG, 1995; TAGLIARO et al., 2000; LACHENMEIER, MUSSHOF e MADEA, 2006; MOORE, RANA e COULTER, 2007; PUJOL et al., 2007). Também, há um grande emprego dessa matriz no controle de abstinência de pacientes, avaliação da exposição ocupacional de trabalhadores e em casos médico-legais (WOLFF, 2006; MUSSHOF et al., 2007; PUJOL et al., 2007).

#### *4.3.5 Suor*

O suor é uma matriz biológica alternativa, secretado por glândulas sudoríparas apócrinas e écrinas, sendo essa última glândula presente em diversas partes do corpo (KADEHJIAN, 2005). O suor, considerado um filtrado do plasma, é composto de 99% de água, possuindo uma característica hipotônica em relação ao sangue e um pH que varia de 5,8 a 6,4 (KIDWELL et al., 2003; KINTZ, SPIEHLER e NEGRUSZ, 2008). A coleta do suor pode ser não invasiva ou invasiva, dependendo do tipo de dispositivo de coleta utilizado e se é realizada ou não a sua estimulação. A quantidade de amostra obtida é muito pequena, na ordem de microlitros, podendo chegar até 5 mililitros quando há estimulação e a coleta utilizado pode demorar de

horas a dias, sendo a quantidade de substância coletada bastante variável dependendo do tipo de coleta. Uma característica importante dessa matriz é a janela analítica compreendida entre urina e cabelo (KINTZ, SPIEHLER e NEGRUSZ, 2008), no entanto, o suor não é uma matriz muito utilizada na detecção de SPA, sendo mais utilizadas no monitoramento de pacientes e tratamento de dependência química em situações forenses, como monitoramento de drogas no ambiente de trabalho e em presidiários (KIDWELL et al., 2003).

## **5 REVISÃO PRÁTICA DE ESPECIFICIDADE**

### **5.1 Materiais e Métodos**

Foi realizada uma avaliação da especificidade analítica de três kits comerciais: Amphetamine Direct ELISA™, Cocaine Direct ELISA™ e Cannabinoids Direct ELISA™, adquiridos da empresa Immunalysis Corporation (Pomona, CA, USA). Os valores de corte dos kits são de 50 ng/mL para anfetamina e cocaína e 4 ng/mL para canabinóides. Os kits foram testados para: cocaína, anfetamina, alprazolam, diazepam, bromazepam, clonazepam, nitrazepam, oxazepam, lorazepam, cetamina, metilendioximetanfetamina (MDMA), heroína, anfepramona, delta-9-tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC), benzocaína, efedrina, cafeína, fenilefrina, femproporex, mazindol, metilfenidato, nicotina, sibutramina e sinefrina. Todos os padrões analíticos utilizados foram adquiridos juntamente ao Setor Técnico-Científico da Superintendência Regional do Departamento de Polícia Federal no Rio Grande do Sul (SR/DPF/RS), com respaldo do termo de cooperação celebrado entre o Laboratório de Toxicologia da UFRGS e a SR/DPF/RS, de 09/07/2009.

As soluções padrão foram preparadas em metanol na concentração de 10 µg/mL e, então adicionadas à amostra de fluido oral negativo, a qual foi obtida de

voluntários. As amostras adicionadas de padrão foram testadas nas concentrações de 50 ng/mL, 100 ng/mL, 1000 ng/mL e 5000 ng/mL para cocaína e anfetamina; 100 ng/mL, 1000 ng/mL e 5000 ng/mL para alprazolam, diazepam, bromazepam, clonazepam, nitrazepam, oxazepam, lorazepam, ketamina, MDMA, heroína, benzocaína, efedrina, fenilefrina, femproporex, metilfenidato, anfepramona; 4ng/mL, 8ng/mL, 100ng/mL e 5000ng/mL para  $\Delta^9$ -THC. A avaliação da especificidade analítica foi realizada de acordo com as especificações do fabricante, utilizando o espectrofotometro Zenith 200 RT, modelo Anthus e lavadora de placas Asys, modelo Atlantis, localizados no Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

## 5.2 Resultados

Não foi observado nenhum resultado positivo, exceto para os padrões de cocaína, anfetamina e  $\Delta^9$ -THC, nos seus respectivos kits. Os resultados obtidos estão de acordo com o preconizado pelo fabricante, indicando que, dentre as substâncias testadas, os kits são específicos para as substâncias que se propõe identificar, não havendo indicação de reatividade cruzada. Tendo em vista que não se obteve nenhuma amostra com resultado positivo, além das respectivas doses testadas, não se julgou necessária a apresentação das leituras das absorvâncias obtidas por espectrofotômetro.

## 6 DISCUSSÃO

No Brasil o número de acidentes de trânsito tem aumentado de forma significativa, sendo a nona causa principal de mortes no país (ABREU, 2006). (BRASIL, 1997). No Brasil, o código de trânsito nacional (BRASIL, 1997) estabelece que dirigir em via pública com níveis de etanol no sangue igual ou superior a 0,6 g L<sup>-1</sup> ou sob a influência de qualquer outra substância psicoativa é crime, sujeito à prisão

e suspensão da licença de dirigir. A lei também estabelece que qualquer motorista que é abordado pelo controle policial e com suspeita de dirigir sob a influência de SPA vai ser submetido a exames clínicos e a teste de álcool e drogas para avaliar sua condição. Apesar da previsão legal para a fiscalização de condutores suspeitos de estarem sob efeito de SPA, atualmente só é possível a avaliação do teor estimado de etanol, pois o único aparato disponível para a polícia rodoviária é o etilômetro. Os policiais brasileiros não dispõem de testes para a detecção preliminar de SPA, nem de dispositivos de coleta de fluido oral. Em caso de motorista suspeito de estar sob o efeito de SPA, o condutor é levado a um local adequado e autorizado para a coleta de urina e sangue, o que pode ser demorado. Muitas fatalidades associadas a acidentes de trânsito podem ser atribuídas a alterações comportamentais e psicomotoras provocadas por SPA. Estudos recentes demonstram que pessoas com quantidades detectáveis de  $\Delta^9$ -THC, metilamfetamina e MDMA no sangue estão particularmente em risco (DRUMMER et al., 2011), e por consequência, com maior probabilidade de se envolver em acidentes de trânsito.

Os imunoenaios são técnicas capazes de facilitar a triagem para SPA de uso legal ou ilegal. Inicialmente desenvolvidos para utilização em casos clínicos, os testes possuíam valores de corte elevados, detectando apenas intoxicações agudas. Logo passaram a ser possíveis de aplicação em investigações de SPA no ambiente de trabalho e para finalidades forenses (KIRSCHBAUM et al., 2011), no entanto é muito discutido se esses testes apresentam sensibilidade suficiente para essas novas aplicações. Há um grande número de publicações demonstrando que esses testes imunológicos têm grande aplicabilidade (MOORE et al., 1999; PRESLEY et al., 2003; WALSH, 2008a; KULIKOWSKA et al., 2009; DAVEY, FREEMAN e LAVELLE, et al. 2009; DRUMMER et al., 2011) e que os kits utilizados podem



apresentar boa sensibilidade e especificidade para determinados grupos de SPA (LALOUP et al., 2005; BLENCOWE et al., 2010). Geralmente, apresentam valores de corte que variam de acordo com a substância de interesse, matriz biológica utilizada e tipo de imunoenensaio empregado na análise. Para análise em saliva, através de imunocromatografia e EIA, os valores de corte variam de 5 a 100ng/mL, dependendo da substância a ser analisada. Quando se utiliza a urina, os valores de corte utilizados nas análises toxicológicas são, geralmente, maiores. Por exemplo, na análise por EIA, os valores se encontram na faixa de 300 a 1000ng/mL (YONAMINE, 2004; DRÄGER DRUG TEST® 5000, 2010; DRUGWIPE, 2011; COZART® DDS, 2011; COZART® EIA KIT, 2011). No entanto, os resultados obtidos na etapa de triagem, devem ser confirmados por técnicas mais sensíveis e específicas, como as cromatográficas (HUESTIS e SMITH, 2006; SOFT/AAFS, 2006; WALSH, 2008; LIMBERGER et al., 2010).

Os imunoenensaio destinados à detecção de SPA identificam, na sua grande maioria, as substâncias anfetamina (AF), metanfetamina (MA) e êxtases, cocaína e produtos de biotransformação,  $\Delta^9$ -THC e outros canabinóides, benzodiazepínicos e opiáceos. A AF, uma feniletilamina com ação simpatomimética, possui uma boa absorção via oral e devido a sua lipossolubilidade, atravessa com facilidade as membranas biológicas (YONAMINE, 2004). Em pH urinário normal, cerca de 30% da dose é eliminada na forma inalterada em até 24h, sendo que em 3 a 4 dias 90% da dose é eliminada (YONAMINE, 2004). Poucos trabalhos foram publicados sobre a farmacocinética dos ETA, mas alguns estudos demonstram maiores concentrações de anfetamina e ETAs no fluido oral do que no plasma (YONAMINE, 2004; DRUMMER, 2005). Muitas substâncias de uso legal metabolizam a anfetamina ou a metilanfetamina, como clobenzorex e femproporex, sendo este último um ETA de

grande consumo no Brasil (SILVA et al., 2003; DRUMMER, 2008). Nesses casos, a presença da substância na forma inalterada permite identificar a origem da anfetamina presente na amostra (DRUMMER, 2008). No Brasil, não é comum o consumo de AF e MA, não havendo muitos registros de apreensões dessas substâncias pela Polícia Federal, e os registros de laboratórios clandestinos fica restrito à produção de MDMA (POLÍCIA FEDERAL), logo, o uso de AF e MA no Brasil não é comum no mercado ilícito (Tabela 1). Muitos estudos nacionais demonstram a elevada prevalência do consumo de medicamentos contendo ETA no país (NOTO, et al., 2002; CARNEIRO, 2008), especialmente por motoristas profissionais (WENDLER; BUSATO; MIYOSHI, 2003; NASCIMENTO, NASCIMENTO e SILVA, 2007; MOREIRA e GADANI, 2009). Algumas pesquisas realizadas através de questionários mostram, por meio de relatos, prevalências do uso de ETA (pelo menos uma vez) de 11% (SOUZA, PAIVA e REIMÃO, 2005), 65% (MOREIRA e GADANI, 2009), 66% (NASCIMENTO, NASCIMENTO e SILVA, 2007) e 97% (WENDLER, BUSATO e MIYOSHI, 2003). No entanto, estudos empregando fluido oral e urina para determinar o consumo de ETA através de análise por imunoenensaio mostram uma prevalência variando de 0,7% a 4,8% (Silva et al., 2003; Yonamine, 2004). A grande diferença entre os resultados obtidos com o relato de usuários e os obtidos por análise laboratorial leva a concluir que há uma problemática na detecção de ETA consumidos no Brasil pela técnica utilizada. Resultados de avaliação da especificidade de Kits de ELISA e imunocromatografia para AF e MA obtidos pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Toxicologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul demonstram que os kits comerciais disponíveis para detecção de AF e MA em fluido oral não são capazes de detectar

os ETA consumidos no Brasil. Essa problemática pode ser resultado, principalmente, da presença de anticorpos específicos direcionados para as moléculas de AF e MA.

**Tabela 1:** Alguns estimulantes tipo anfetamina comercializado no mundo.

ATS	Molecular structure	Biotransformed to AMP or MET	BRA	ARG	URY	PRY	COL	VEN	CHL	PER	MEX	USA	CAN	POR	SPA	ITA	FRA	GER	GBR	NLD	BEL	DNK	AUT	FIN	NOR	AUS
AMP		—	x	x	x	x	x	x	√	x	x	√	√	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
MET		AMP	x	x	x	x	x	x	x	x	x	√	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
FEN		AMP	√	x	x	√	x	x	√	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
CLO		AMP	x	x	x	x	x	x	x	x	√	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
BEZ		MET, AMP	x	x	x	x	x	x	x	x	x	√	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
PHT		UNB	x	x	x	x	x	√	x	x	√	√	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	√	x	√
PHD		UNB	x	x	x	x	x	x	x	x	x	√	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
DIE		UNB	√	x	x	x	x	x	√	x	√	√	x	x	x	x	x	√	x	x	x	√	x	x	x	√
MPH		UNB	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√

<sup>a</sup> AMP (d,l-Amphetamine or d-Amphetamine); MET (d-Methamphetamine); FEN (Fenproporex); CLO (Clobenzorex); BEZ (Benzphetamine); PHT (Phentermine); PHD (Phendimetrazine); DIE (Diethylpropion); MPH (Methylphenidate); UNB (not biotransformed to AMP or MET); x (not marketed); √ (marketed).

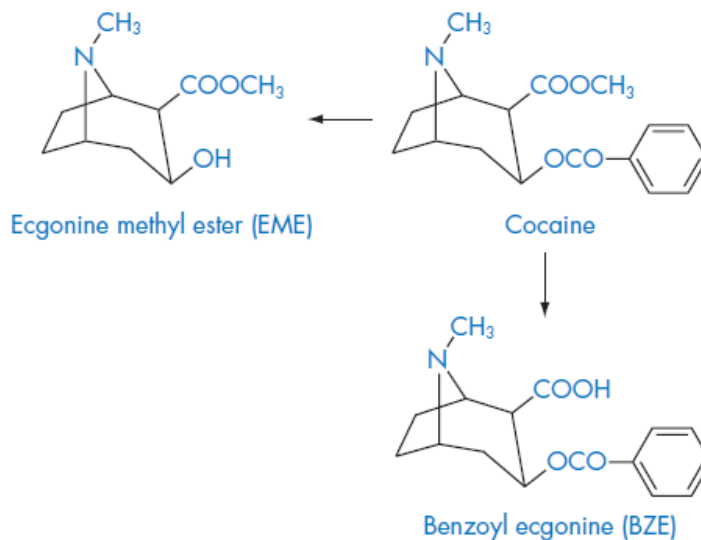
<sup>b</sup> BRA (Brazil); ARG (Argentina); URY (Uruguay); PRY (Paraguay); COL (Colombia); VEN (Venezuela); CHL (Chile); PER (Peru); MEX (México); USA (United States of America); CAN (Canada); POR (Portugal); SPA (Spain); ITA (Italy); FRA (France); GER (Germany); GBR (United Kingdom); NLD (Netherlands); BEL (Belgium); DNK (Denmark); AUT (Austria); FIN (Finland); NOR (Norway); AUS (Australia).

<sup>c</sup> Ethylamphetamine, Amfetaminil, Mefenorex, Prenylamine, Fenethyliline, Mesocarb, Fencamfamine, Dimethylamphetamine, Furfenorex, Famprofazone, Fencamine, Fenfluramine and Aminorex are not currently marketed in the countries surveyed.

Fonte: CONE e HUESTIS, 2007; MELO, 2009; P.R. VADEMÉCUM ONLINE, 2011; CHILE, 2011; MÉXICO, 2011; PERÚ, 2011; FDA, 2011; MEDLINE PLUS, 2011; DAILYMED, 2011; HEALTH CANADA, 2011; CIMA, 2011; INFARMED, 2011; AIFA, 2011; AFSSAPS, 2011; DIMDI, 2011; DATAPHARM, 2011; CBG, 2011; CBIP, 2010; TGA, 2011.

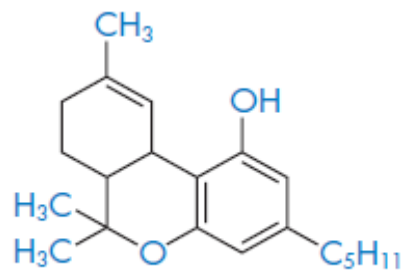
Além do elevado consumo de estimulantes tipo anfetamina, destaca-se também a grande utilização de cocaína e sua possível detecção por técnicas imunológicas. A cocaína, um alcalóide encontrado nas folhas de *Erythroxylon coca* L. (Erythroxylaceae) é convertida, quase em sua totalidade, a produtos de biotransformação que são excretados na urina, destacando-se a benzoilecgonina (15% a 50%), ecgonina metil ester (15% a 35%) como principais produtos de metabolismo, além da eliminação da substância na forma inalterada (cerca de 3%) (YONAMINE, 2004) (Figura 7). Um estudo mostrou que concentrações de cocaína, benzoilecgonina e ecgonina metil ester em fluido oral de usuários que relatam uso de 01 a 2 g diárias são de 31, 54 e 69 ng/mL, respectivamente, até 17h após a

última dose administrada. Outro trabalho relatou que minutos após uso de 40 mg de cocaína na forma fumada observou-se uma concentração máxima de 0,4–1,9 mg/mL e utilizando um limite de detecção de 1 ng/mL foi possível detectar a substância por um período de até 8h (DRUMMER, 2005).



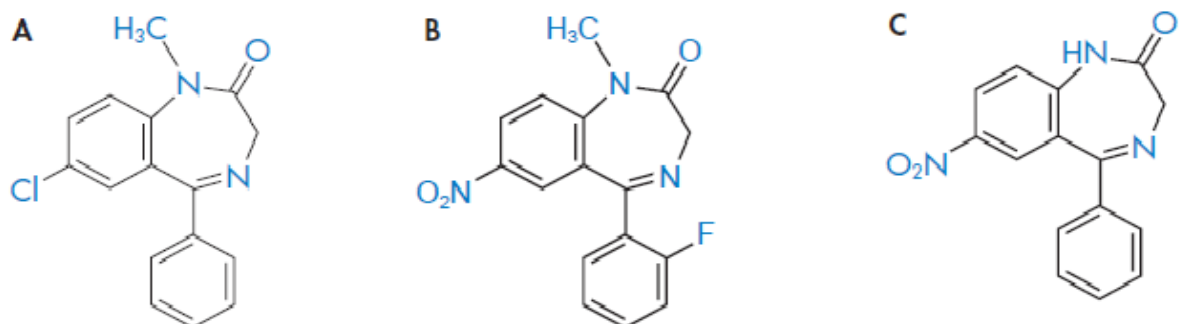
**Figura 7:** Principais metabólitos da cocaína (Fonte: DRUMMER, 2008).

O  $\Delta^9$ -THC é o principal componente ativo da planta *Cannabis sativa L.* (Canabaceae) e atua como um perturbador do sistema nervoso central, sendo as vias de administração mais utilizadas a oral e a pulmonar, esta última mais efetiva quando se trata da absorção do  $\Delta^9$ -THC (YONAMINE, 2004). Estudos mostram que depois do uso de 2 a 25 mg de cannabis na forma fumada, a concentração máxima em fluido oral foi de 70 ng/mL e se manteve acima de 1 ng/mL por até 16 h e quando comparado ao uso por via oral o pico de concentração foi menor (DRUMMER, 2005) (Figura 8).



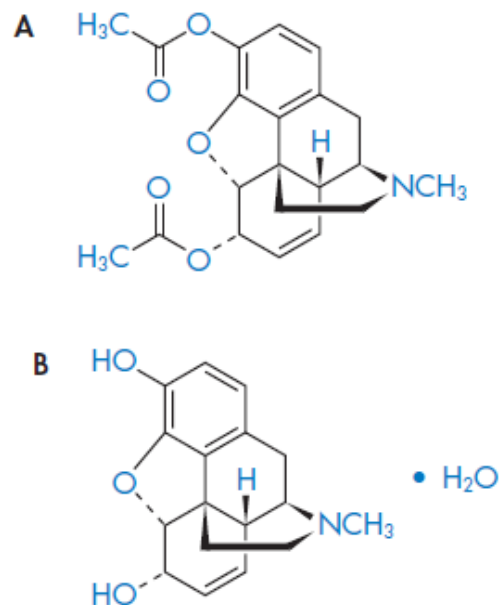
**Figura 8:** Estrutura do  $\Delta^9$ -THC (Adaptado de DRUMMER, 2008).

Os benzodiazepínicos são uma classe de fármacos que atuam como depressores do SNC, com propriedades ansiolíticas e sedativas, destacando-se o diazepam, lorazepam, flunitrazepam, clordiazepóxido, nitrazepam e oxazepam (Figura 9). Estudos que avaliam a quantidade de benzodiazepínicos em fluido oral mostram que diazepam e clordiazepóxido podem ser detectados através de RIA por um período de 24 horas e de 12 a 20 horas, respectivamente (KIDWELL, HOLLAND e ATHANASELIS, 1998). Há uma baixa concentração dos produtos de biotransformação na urina e no sangue, sendo importante a utilização de técnicas sensíveis, além de existir pouca concentração da substância inalterada na urina, sendo importante a identificação dos metabólitos individuais de cada substância da classe (DRUMMER, 2008).



**Figura 9:** (A) Diazepam; (B) Flunitrazepam; (C) Nitrazepam (Adaptado de DRUMMER, 2008)

Os opióides são alcalóides do ópio, látex obtido da cápsula da planta *Papaver somniferum L.* (Papaveraceae), e seus derivados sintéticos. Dentre as substâncias dessa classe, destacam-se a morfina, codeína e papaverina, os quais são fármacos com utilização clínica como hipnoanalgésico, antitussígeno e antiespasmódico respectivamente, e a heroína, utilizada como droga de abuso. A heroína é, preferencialmente, utilizada na forma injetável devido à sua metabolização rápida à morfina quando utilizada via oral (Figura 10). De acordo com diferentes guias internacionais estabelecidas para análise de drogas no ambiente de trabalho, os valores de corte para a triagem de opióides em urina são de 300 a 2000 ng/mL, enquanto que na análise confirmatória variam de 100 a 2000 ng/mL (KAZANGA, et al., 2011). Há relato da detecção de heroína e morfina em saliva, por RIA e EMIT, por um período de até 12 horas (KIDWELL, HOLLAND e ATHANASELIS, 1998).



**Figura 10:** (A) Heroína; (B) Morfina (Adaptado de DRUMMER, 2008).

Diversas matrizes biológicas podem ser utilizadas em imunoenaios visando a detecção de SPA. A urina é a matriz mais empregada, no entanto, o uso de sangue,

saliva, cabelo e suor podem gerar bons resultados (HAND e BALDWIN, 2008). Imunoensaios heterogêneos são os ideais para a aplicação dessas matrizes alternativas, pelo fato da sensibilidade do teste permitir detecção de baixas quantidades e também devido à etapa de lavagem, que minimiza o efeito da matriz (HAND e BALDWIN, 2008). O uso de fluido oral para detectar SPA lícitas e ilícitas tem se tornado popular e muitos dispositivos estão disponíveis no mercado para a coleta e análise de fluido oral (DRUMMER, 2005; HAND e BALDWIN, 2008). A utilização dessa matriz e dos testes imunológicos ganha destaque no controle do uso de SPA no trânsito e no ambiente de trabalho, monitoramento clínico de pacientes, em centros de tratamento de dependência química e emergências médicas (VERSTRAETE e PIERCE, 2001; PRESLEY et al., 2003; VERSTRAETE, 2005; VAZ e LEONI, 2007; CHIAPPIN et al., 2007; PEHRSSON et al., 2008; DAVEY, FREEMAN e LAVELLE, 2009; WILLE et al., 2010; DRUMMER et al., 2011; GJERDE et al., 2011). É bem estabelecido o uso de imunoensaios no monitoramento clínico de pacientes, sendo que os fármacos que mais requerem controle são os de baixo índice terapêutico ou que apresentam particularidades farmacocinéticas que dificultam o uso seguro, como por exemplo, digoxina, fenitoína, ciclosporina, fenobarbital e teofilina (VAZ e LEONI, 2007).

O monitoramento de drogas em trabalhadores vem se desenvolvendo e sendo utilizada em países como Estado Unidos, Nova Zelândia, Austrália e em diversos países europeus, e os testes, geralmente empregados no ramo de transporte, petroquímica, indústria farmacêutica e de computadores (VERSTRAETE e PIERCE, 2001). No entanto, nem todas as empresas possuem políticas ou programas antidrogas, e isso, provavelmente pelas ameaças de ações legais relativas à proteção da privacidade, custos, imprecisão dos testes de drogas, e a

difícil relação entre o uso de drogas e o baixo desempenho no trabalho (FRENCH, ROEBUCK e ALEXANDRE, 2004). Dentre esses países, os que se destacam por possuir guias regulamentadoras são a Finlândia, Estados Unidos e Nova Zelândia (NOLAN, 2008; LILLSUNDE et al., 2008; WALSH, 2008; BUSH, 2008). Segundo a Organização Internacional do Trabalho (OIT), os programas de álcool e drogas devem ser desenvolvidos de acordo com a política nacional e estar relacionado com ações e serviços comunitários, promovendo saúde, segurança, bem-estar e produtividade. Esses testes devem ser inseridos nas questões éticas e legais, considerando os direitos individuais e coletivos (LILLSUNDE et al., 2008). No trânsito a aplicação desses testes tem especial importância para a redução de acidentes, no entanto, é importante também considerar a repercussão social e legal que envolve o ato de dirigir sob o efeito de SPA (FERNÁNDEZ et al., 2008). O uso de fluido oral para essa finalidade tem ganhado destaque, no entanto, são discutidas questões legais de sua aplicação e questionamentos quanto à admissibilidade e relevância de testes de fluido oral em humanos, isso porque não há decisões legais estabelecidas que considere relevante o uso de fluido oral para análises toxicológicas, apesar de ser aceita como espécime biológico para análise (KADEHJIAN, 2005).

## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Um grande número de estudos e pesquisas empregando imunoenaios para a detecção de SPA foi encontrado na literatura, fortalecendo o uso dessas técnicas em análises forenses, sendo que os estudos mais recentes na área utilizam esses testes em rastreamento dessas substâncias no trânsito, sendo esta, uma área promissora para a aplicação desses ensaios. Dentre as técnicas apresentadas neste trabalho, destaca-se a imunocromatografia, por possuir uma fácil aplicação, resultado rápido e



“in loco”. Apesar de existir muitas informações sobre os imunoenaios e muitas pesquisas na área, as técnicas disponíveis ainda precisam ser aprimoradas para sua aplicação na área forense, devido principalmente a baixa especificidade para algumas combinações drogas/matriz, casos de falso-positivo relatados na literatura, além da possibilidade de falso-negativos. Assim como os imunoenaios, as matrizes alternativas são alvos de muitas pesquisas atualmente, principalmente o fluido oral, que possui muitas vantagens em relação às matrizes convencionais, principalmente por fornecer informação do uso recente, tal como o sangue, e por possuir coleta não invasiva. Conforme resultados de especificidade para o kit de anfetamina, obtidos pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Toxicologia da UFRGS, mencionado anteriormente, e resultados obtidos pelo teste de especificidade realizado neste trabalho, o kit Amphetamine Direct ELISA™ é específico para a anfetamina, não detectando substâncias relacionadas estruturalmente. O resultado obtido pelo teste de especificidade realizado com o kit de ELISA para cocaína e  $\Delta^9$ -THC demonstra boa especificidade dos kits e nenhuma reatividade cruzada com as substâncias e concentrações testadas. No Brasil, não há o consumo de anfetamina, por não existir especialidade farmacêutica com essa substância, de forma que para aplicar esses testes no país, haverá um elevado número de casos falso negativos. Dessa forma, os kits existentes para a detecção de anfetamina falham na detecção de ETAs, isso porque os anticorpos utilizados são direcionados à molécula de anfetamina. Considerando que femproporex, anfepramona e metilfenidato são os ETAs de uso controlado mais utilizados no Brasil, seria adequado o desenvolvimento de kits direcionados a essas moléculas e, para isso, sugere-se a utilização de uma mistura de anticorpos monoclonais ou anticorpos policlonais direcionados para cada molécula de ETA, devido à grande variabilidade estrutural entre as substâncias da

classe. Em suma, o controle do uso de cocaína e  $\Delta^9$ -THC através dos kits de imunoensaio existentes é adequado, no entanto, para o controle do uso de ETAs no país seria necessário o desenvolvimento de novos kits, direcionados aos fármacos consumidos pela população, realizando, assim, um monitoramento efetivo sobre o uso dessas substâncias.

## REFERÊNCIAS

ABREU, A.M.M. **Mortalidade nos acidentes de trânsito na cidade do rio de janeiro relacionada ao uso e abuso de bebidas alcoólicas**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2006. 154 p. Tese (Doutorado em Enfermagem), Escola de Enfermagem Anna Nery, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.

AFSSAPS - AGENCE FRANÇAISE DE SÉCURITÉ SANITAIRE DES PRODUITS DE SANTÉ, Relação de especialidades farmacêuticas. Disponível em <<http://www.afssaps.fr/>>. Acesso em: 27 maio 2011.

AIFA - AGENZIA ITALIANA DEL FARMACO, Serviço online, Fármacos autorizados. Disponível em: <<http://www.agenziafarmaco.it/>>. Disponível em: 27 maio 2011. Acesso em:

AOKI, K.; YOSHIDA, T.; KUROIWAB, Y. Forensic immunochemistry. **Forensic Science International**, v. 80, n.1-2, p. 163-173, 1996.

APS, J.K.M.; MARTENS, L.C. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. **Forensic Science International**, v. 150, n. 2-3, p. 119-131, 2005.

ARMBRUSTER, D.A. et al. Enzyme Immunoassay, Kinetic Microparticle Immunoassay, Radioimmunoassay, and Fluorescence Polarization Immunoassay Compared for Drugs-of-Abuse Screening. **Clinical Chemistry**, v. 39, n. 10, p. 2137-2146, 1993.

ARRIVE ALIVE, Random roadside drug testing. Disponível em: <[http://www.arrivealive.vic.gov.au/initiatives/safer\\_road\\_users/random\\_roadside\\_drug\\_testing.html](http://www.arrivealive.vic.gov.au/initiatives/safer_road_users/random_roadside_drug_testing.html)>. Acesso em: 26 abr. 2011.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14864**: Diagnóstico in vitro - Procedimentos para validação de reagentes ou sistema de diagnóstico. Rio de Janeiro, 2002. Disponível em: <<http://www.abntonline.com.br/consultanacional/projetodet.aspx?ProjetoID=6249>>. Acesso em: 20 abr. 2011.

AUSTRALIA, Road Safety Act 1986 - n. 127/1986, version 123 - Incorporating amendments as at 1 July 2010. Disponível em: <[http://www.legislation.vic.gov.au/Domino/Web\\_Notes/LDMS/LTObject\\_Store/LTObjSt6.nsf/DDE300B846EED9C7CA257616000A3571/95C8DFC6CBB88AE8CA257881000EB340/\\$FILE/86-127aa128%20authorised.pdf](http://www.legislation.vic.gov.au/Domino/Web_Notes/LDMS/LTObject_Store/LTObjSt6.nsf/DDE300B846EED9C7CA257616000A3571/95C8DFC6CBB88AE8CA257881000EB340/$FILE/86-127aa128%20authorised.pdf)>. Acesso em: 04 maio 2011.

BLENCOWE, T. et al. An analytical evaluation of eight on-site oral fluid drug screening devices using laboratory confirmation results from oral fluid. **Forensic Science International**, v. 208, n. 1-3, p. 173-179, 2011.

BEHRENSDORFF, I.; STEENTOFT, A. Medicinal and illegal drugs among Danish car drivers. **Accident Analysis & Prevention**, v. 35, n. 6, p. 851-860, 2003.

BERNHOF, I.M. et al. Drugs in injured drivers in Denmark. **Forensic Science International**, v. 150, n. 2-3, p. 181-189, 2005.

BIERMANN, T. et al. On-site testing of illicit drugs: the use of the drug-testing device "Toxiquick®. **Forensic Science International**, v. 143, n. 1, p. 21-25, 2004.

BRASIL, Lei nº. 9.503 de 23 de setembro de 1997. Institui o Código Brasileiro de Trânsito. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 24 set. 1997. Disponível em: <<http://www.planalto.gov.br/ccivil/leis/L9503.htm>>. Acesso em: 18 maio 2011.

BUENO, E.C.; VAZ, A.J. Imunoprecipitação. In: VAZ, A.J.; TAKEI, K.; BUENO, E.C. **Imunoensaios: fundamentos e aplicações**. 23 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Googan, 2007.

BUTLER, M. Australia's approach to drugs and driving, Of Substance. **Of Substance** - the national magazine on alcohol, tobacco and other drugs, v. 5, n. 3, p. 24-26, 2007. Disponível em: <[http://www.ofsubstance.org.au/images/archive/pdf/ofsubstance\\_2007\\_7.pdf](http://www.ofsubstance.org.au/images/archive/pdf/ofsubstance_2007_7.pdf)>. Acesso em: 04 maio 2011.

BUSH, D.M. The U.S. Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs: Current status and future considerations. **Forensic Science International**, v. 174, n. 2-3, p. 111-119, 2008.

CAIRNS, T. et al. Removing and identifying drug contamination in the analysis of human hair. **Forensic Science International**, v. 145, n. 2-3, p. 97-108, 2004.

CARNEIRO, M.F.G. et al. Prescrição, dispensação e regulação do consumo de psicotrópicos anorexígenos em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 24, n. 8, p. 1763-1772, 2008.

CASLAVSKAA, J.; ALLEMANNB, D.; THORMANNA, W. Analysis of urinary drugs of abuse by a multianalyte capillary electrophoretic immunoassay. **Journal of Chromatography A**, v. 838, n. 1-2, p. 197-211, 1999.

CBG - COLLEGE TER BEOORDELING VAN GENEESMIDDELEN, Netherlands, banco de dados. Disponível em: <<http://www.cbg-meb.nl/CBG/nl/humane-geneesmiddelen/geneesmiddeleninformatiebank>>. Acesso em: 27 maio 2011.

CBIP - CENTRE BELGE D'INFORMATION PHARMACOTHÉRAPEUTIQUE. Relação de medicamentos. – fevereiro 2010. Disponível em: <<http://www.cbip.be/>>. Acesso em: 27 maio 2011.

CEBRID - CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÕES SOBRE DROGAS PSICOTRÓPICAS. I Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil: Estudo Envolvendo as 107 Maiores Cidades do País. São Paulo, 2002. Disponível em: <<http://www.cebrid.epm.br/index.php>>. Acesso em: 28 abr. 2011.

CEBRID - CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÕES SOBRE DROGAS PSICOTRÓPICAS. II Levantamento Domiciliar Sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil: Estudo Envolvendo as 108 Maiores Cidades do País. São Paulo, 2005. Disponível em: <<http://200.144.91.102/sitenovo/conteudo.aspx?cd=644>>. Acesso em: 28 abr. 2011.

CHIAPPIN, S. et al. Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. **Clinica Chimica Acta**, v. 383, n. 1-2, p. 30-40, 2007.

CHILE. Instituto de Salud Pública de Chile, Productos com Registro. Disponível em <<http://www.ispch.cl/>>. Acesso em: 26 jun. de 2011.

CIMA - CENTRO DE INFORMACIÓN ON-LINE DE MEDICAMENTOS. Agencia Espanhõla de Medicamentos y Productos Sanitarios. Disponível em: <<http://www.aemps.es/>>. Acesso em: 27 maio 2011.

CONCHEIRO, M. et al. Confirmation by LC–MS of drugs in oral fluid obtained from roadside testing. **Forensic Science International**. v.170, n. 2-3, p.156–162, 2007.

COOPER, G. Evaluation of the Cozart® RapiScan drug test system for opiates and cocaine in oral fluid. **Forensic Science International**, v. 150, n. 2-3, p. 239-243, 2005.

CONE, E.J. Oral fluid testing: new technology enables drug testing without embarrassment. **Journal of the California Dental Association**, v. 34, n. 4, p. 311-315, 2006.

CONE, E.J.; HUESTIS, M.A. Interpretation of oral fluid tests for drugs of abuse. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1098, p. 51-103, 2007.

COULTER, C. Semi-quantitative analysis of drugs of abuse, including tetrahydrocannabinol in hair using aqueous extraction and immunoassay. **Forensic Science International**, v. 196, n. 1-3, p. 70-73, 2010.

COZART® EIA KIT. Technical Specifications, Concateno. Disponível em: <<http://www.concateno.com/products-and-services/laboratory-products/test-kits-and-reagents/technical-specifications/>>. Acesso em: 26 maio 2011.

COZART® DDS. Cozart® DDS 806 Drug Detection System CGP7189: technical specifications, Concateno, Abingdon. Disponível em: <[http://www.concateno.com/ddme\\_cms/userfiles/files/technical-specifications/CGP7189%20Cozart%20DDS%20806%20Technical%20Specification%2014JUL09.pdf](http://www.concateno.com/ddme_cms/userfiles/files/technical-specifications/CGP7189%20Cozart%20DDS%20806%20Technical%20Specification%2014JUL09.pdf)>. Acesso em: 27 maio 2011.

COWAN, D.A.; HOUGHTON, E.; JICKELLS, S. Drug abuse in sport. In: JICKELLS, S. e NEGRUSZ, A. **Clarke's Analytical Forensic Toxicology**. 3 ed. Londres: Pharmaceutical Press, 2008. p. 263-281.

DAILYMED. Current Information Medication. Disponível em: <<http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/about.cfm>>. Acesso em: 27 maio 2011.

DAMS, R. et al. Oral fluid as an alternative matrix to monitor opiate and cocaine use in substance-abuse treatment patients. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 87, n. 2-3, p. 258-267, 2007.

DATAPHARM. Electronic Medicines Compendium (eMC), Substância ativa ou nome genérico. Disponível em: <<http://emc.medicines.org.uk/browseingredients.aspx>>. Acesso em: 27 maio 2011.

DAVEY, J.; FREEMAN, J.; LAVELLE, A. Screening for drugs in oral fluid : illicit drug use and drug driving in a sample of urban and regional Queensland motorists. **Transportation Research Part F**, v. 12, n. 4, p. 311–316, 2009.

DEVEAUX, M. et al. The hair analysis proficiency testing program of the French Society of Analytical Toxicology. **Forensic Science International**, v. 107, n. 1-3, p. 389-394, 2000.

DIMDI - DEUTSCHE INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE DOKUMENTATION UND INFORMATION, bases de dados, produtos farmacêuticos, AMIS - Parte Pública. Disponível em: <<http://www.dimdi.de/static/de/db/>>. Acesso em: 27 maio 2011.

DRÄGER DRUG TEST® 5000. Dräger Safety AG & Co. KGaA, Dräger DrugTest® 5000 - Cross Reactivity Chart, Dräger, Lübeck, 2010. Ficha técnica do produto enviada pelo fabricante.

DRUGWIPE®. Drugwipe Flyer Inserts, Drugwipe® Technical Specifications, Securetec/ Affiniton, Williamsport. Disponível em: <<http://www.affiniton.com/drugwipeInserts.pdf>>. Acesso em: 27 maio 2011.

DRUMMER, O.H.; Review: Pharmacokinetics of illicit drugs in oral fluid. **Forensic Science International**, v. 150, n. 2-3, p. 133–142, 2005.

DRUMMER, O.H. Drug testing in oral fluid. **Clinical Biochemistry Review**, v. 27, n. 3, p. 147-59, 2006.

DRUMMER, O.H. et al. Drugs in oral fluid in randomly selected drivers. **Forensic Science International**, v. 170, n. 2-3, p. 105-110, 2007.

DRUMMER, O.H. Pharmacokinetics and metabolism. In: JICKELLS, S. e NEGRUSZ, A. **Clarke's Analytical Forensic Toxicology**. 3 ed. Londres: Pharmaceutical Press 2008. p. 13-41.

DRUMMER, O.H. et al. The prevalence of drugs in injured drivers. In Press, Corrected Proof. **Forensic Science International**. Available online: 5 mar. 2011.

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**, v. 683, p. 189-197, 1996.

ESTEBAN, M; CASTAÑO, A. Non-invasive matrices in human biomonitoring: A review. **Environment International**, v. 35, n. 2, p. 438-449, 2009.

FDA. United States Food and Drug Administration, National Drug Code Directory. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ucm142438.htm>>. Acesso em: 27 maio 2011.

FERNANDES, I.; ESPÍNDOLA, N.M. Imunodiagnóstico: antígenos, anticorpos e interação antígeno-anticorpo. In: VAZ, A.J.; TAKEI, K.; BUENO, E.C. **Imunoensaios: fundamentos e aplicações**. 23 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Googan, 2007b. p. 07-22.

FERNÁNDEZ, A.A. et al. Drogas de abuso en saliva de conductores: aspectos médico-legales. **Revista Española de Medicina Legal**, v. 34, n. 1, p.3-10, 2008.

FMRP. Departamento de Bioquímica e Imunologia – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. O Anticorpo: Estrutura da Molécula de Imunoglobulina. Disponível em: <<http://www.rbi.fmrp.usp.br/imunobiol/aulas/t3.htm>>. Acesso em: 10 de jun. 2011.

FRENCH, M.T.; ROEBUCK, M.C.; ALEXANDRE, P.K. To test or not to test: do workplace drug testing programs discourage employee drug use? **Social Science Research**, v. 33, n. 1, p. 45–63, 2004.

GIOVANARDI, D. et al. Prevalence of abuse of alcohol and other drugs among injured drivers presenting to the emergency department of the University Hospital of Modena, Italy. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 80, n. 1, p. 135-138, 2005.

GJERDE, H. et al. Alcohol, psychoactive drugs and fatal road traffic accidents in Norway: A case–control study. **Accident Analysis and Prevention**, v. 43, n. 3, p. 1197–1203, 2011.

GJERDE, H. et al. Prevalence of alcohol and drugs among Norwegian motor vehicle drivers : a roadside survey. **Accident Analysis & Prevention**, v. 40, n. 5, p. 1765-1772, 2010.

GJERDE, H.; VERSTRAETE, A. Can the prevalence of high blood drug concentrations in a population be estimated by analysing oral fluid? A study of tetrahydrocannabinol and amphetamine. **Forensic Science International**, v. 195, n. 1-3, p. 153-159, 2010.

GOTTARDO, R. et al. Hair analysis for illicit drugs by using capillary zone electrophoresis-electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1159, n. 1-2, n. 185-189, 2007.

GRÖNHOLM, M.; LILLSUNDE, P. A comparison between on-site immunoassay drug-testing devices and laboratory results. **Forensic Science International**, v. 121, n. 1-2, p. 37-46, 2001.

HAND, C. e BALDWIN, D. Immunoassays. In: JICKELLS, S. e NEGRUSZ, A. **Clarke's Analytical Forensic Toxicology**. 3 ed. Londres: Pharmaceutical Press 2008. p. 375-391.

HEALTH CANADA, Drugs and Health Products, Drug Product Database. Disponível em: <<http://www.hc-sc.gc.ca/index-eng.php>>. Acesso em: 27 maio 2011.

HINO, Y. et al. Performance of immunoassays in screening for opiates, cannabinoids and amphetamines in post-mortem blood. **Forensic Science International**, v. 131, n. 2-3, 28, p. 148-155, 2003.

HUESTIS, M.A.; SMITH, M.L. Modern analytical technologies for the detection of drug abuse and doping. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 3, n. 1, p. 49-57, 2006.

INCB - INTERNATIONAL NARCOTICS CONTROL BOARD. Report of the International Narcotics Control Board for 2008. Nova York, 2009. Disponível em: <[http://www.incb.org/pdf/annual-report/2008/en/AR\\_08\\_English.pdf](http://www.incb.org/pdf/annual-report/2008/en/AR_08_English.pdf)>. Acesso em: 28 abr. 2011.

IMMUNALYSIS COLLECTION DEVICE. Quantisal®. Disponível em: <<http://www.immunalysis.com/whyquantisal>>. Acesso em: 26 maio 2011.

IMMUNALYSIS CORPORATION. Amphetamine Elisa Kit for Oral Fluids [package insert]. Version 10/2005. Pomona: Immunalysis Corporation; 2005.

INFARMED. Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, Ministério da Saúde, Medicamentos de Uso Humano autorizados em Portugal. Disponível em: <<http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED>>. Acesso em: 27 maio 2011.

JONES, A.W.; HOLMGREN, A.; KUGELBERG, F.C. Concentrations of cocaine and its major metabolite benzoylecgonine in blood samples from apprehended drivers in Sweden. **Forensic Science International**, v. 177, n. 2-3, p. 133-139, 2008.

KADEHJIAN, L.J. Specimens for Drugs-of-Abuse Testing. In: Wong, R.C.; Tse, H.Y. **Drugs of abuse-Body fluid testing**. Ed, New Jersey:Humana press, 2005. p. 11-28.

KADEHJIAN, L. Legal issues in oral fluid testing. **Forensic Science International**, v. 150, n. 2-3, p. 151-160, 2005.

KANKAANPÄÄ, A. et al. Detection and assay of cis- and trans-isomers of 4-methylaminorex in urine, plasma and tissue sample. **Forensic Science International**, v. 121, n. 1-2, p. 57-64, 2001.

KANKAANPÄÄ, A. et al. Single-step procedure for gas chromatography–mass spectrometry screening and quantitative determination of amphetamine-type stimulants and related drugs in blood, serum, oral fluid and urine samples. **Journal of Chromatography B**, v. 810, n. 1, p. 57–68, 2004.

KAZANGA, I. Prevalence of drug abuse among workers: Strengths and pitfalls of the recent Italian Workplace Drug Testing (WDT) legislation. In Press, Corrected Proof. **Forensic Science International**. Available online: 9 apr. 2011.

KIDWELL, D.A.; HOLLAND, J.C.; ATHANASELIS, S. Testing for drugs of abuse in saliva and sweat. **Journal of Chromatography B**, v. 713, n. 1, p.111–135, 1998.

KIDWELL, D.A. et al. Comparison of daily urine, sweat, and skin swabs among cocaine users. **Forensic Science International**, v. 133, n. 1-2, p. 63-78, 2003.

KINTZ, P.; SPIEHLER, V. e NEGRUSZ, A. Alternative specimens. In: JICKELLS, S. e NEGRUSZ, A. **Clarke's Analytical Forensic Toxicology**. 3 ed. Londres: Pharmaceutical Press, 2008. p.153-189.

KINDT, T.J.; GOLDSBY, R.A.; OSBORNE, B.A. **Imunologia de Kuby**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. p. 172-194.

KINTZ, P.; SAMYN, N. Use of alternative specimens: drugs of abuse in saliva and doping agents in hair. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 24, n. 2, p. 239-246, 2002.



KIRSCHBAUM, K.M. Direct ELISA kits as a sensitive and selective screening method for abstinence control in urine. **Forensic Science International**, v. 207, n. 1-3, p. 66-69, 2011.

KULIKOWSKA, J. et al. Psychoactive drugs in the road traffic in the legal and consultative aspects—Experience gained by the Forensic Medicine Department, Silesian University of Medicine, Katowice. **Forensic Science International Supplement Series**, v. 1, n. 1, p. 80-82, 2009.

LIMBERGER, R.P.; FRÖEHLICH, P.E.; BOEHL, P.O.; SOUZA, D.Z.; ZANCANARO, I, MARIOTTI, K.C.; COMIRAN, E.; Prusch, D.S.; OLIVEIRA, F. Testes toxicológicos para aferição de substâncias psicoativas em condutores. In: **Uso de bebidas alcoólicas e outras drogas nas rodovias brasileiras e outros estudos** / Flavio Pechansky, Paulina do Carmo Arruda Vieira Duarte, Raquel Brandini De Boni (org.). Porto Alegre: Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas; 2010. p 40-45.

LABAT, L. et al. Prevalence of psychoactive substances in truck drivers in the Nord-Pas-de Calais region (France). **Forensic Science International**, v.174, n. 2-3, p. 90-94. 2008.

LACHENMEIER, K.; MUSSHOF, F.; MADEA, B. Determination of opiates and cocaine in hair using automated enzyme immunoassay screening methodologies followed by gas chromatographic–mass spectrometric (GC–MS) confirmation. **Forensic Science International**, v. 159, n. 2-3, p. 189-199, 2006.

LALOUP, M. et al. Validation of an ELISA-based screening assay for the detection of amphetamine, MDMA and MDA in blood and oral fluid. **Forensic Science International**, v.153, n. 1, p. 29-37, 2005.

LALOUP, M. et al. Correlation of  $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol concentrations determined by LC–MS–MS in oral fluid and plasma from impaired drivers and evaluation of the on-site Dräger DrugTest®. **Forensic Science International**, v. 161, n. 2-3, p. 175-179, 2006.

LEVY, S. et al. Drug testing of adolescents in general medical clinics, in school and at home: physician attitudes and practices. **Journal of Adolescent Health**, v. 38, n. 4, p. 336-342, 2006.

LIDDELL, E. Antibodies. In: WILD, D(ed). **The immunoassay handbook**. 3 ed. Amsterdam: Elsevier, 2005. p. 144-161.

LILLSUNDE, P. et al. Comprehensive drug screening in blood for detecting abused drugs or drugs potentially hazardous for traffic safety. **Forensic Science International**, v. 77, n. 3, p. 191-210, 1996.

LILLSUNDE, P. et al. Finnish guidelines for workplace drug testing. **Forensic Science International**, v. 174, n. 2-3, p. 99-102, 2008.

LU, N.T.; TAYLOR, B.G. Drug screening and confirmation by GC–MS: Comparison of EMIT II and Online KIMS against 10 drugs between US and England laboratories. **Forensic Science International**, v. 157, n. 2-3, p. 106-116, 2006.

MARSH, A.; EVANS, M.B.; STRANG, J. Radioimmunoassay of drugs of abuse in hair Part 2: The determination of methadone in the hair of known drug users. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 13, n. 7, p. 829-839, 1995.

MEDLINE PLUS. Drug Information. Disponível em: <<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginformation.html>>. Acesso em: 27 maio 2011.

MELO, J.M.S. (ed.). Dicionário de Especialidades Farmacêuticas – DEF 2009/10, 35 ed., **Publicações Científicas**, Rio de Janeiro, 2009.

MENEGHISSE, C.S. Desenvolvimento, produção, validação e boas práticas de fabricação de kits de imunodiagnósticos. In: **Imunoensaios: fundamentos e aplicações**. 23 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Googan, 2007. p. 99-107.

MÉXICO. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), Autorização Sanitaria, Registro Sanitário de Medicamentos, autorizações sanitárias. Disponível em: <<http://www.cofepris.gob.mx>>. Acesso em: 27 maio 2011.

MIYAGUCHI, H. et al. Rapid analysis of methamphetamine in hair by micropulverized extraction and microchip-based competitive ELISA. **Forensic Science International**, v. 184, n. 1-3, Pages 1-5, 2009.

MOORE, K.A. et al. Screening postmortem blood and tissues for nine cases of drugs of abuse using automated microplate immunoassay. **Forensic Science International**, v. 106, n. 2, p. 93-102, 1999.

MOORE, C.; RANA, S.; COULTER, C. Simultaneous identification of 2-carboxy-tetrahydrocannabinol, tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabidiol in oral fluid. **Journal of Chromatography B**, v. 852, n. 1-2, p. 459-464, 2007.

MOREAU, R. L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. **Toxicologia Analítica**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

MOREIRA, R.S.; GADANI, J.A.A.B. A prevalência do uso de anfetaminas por caminhoneiros que passam pela cidade de Dourados-MS. **Interbio**, v. 3, n.2, p. 27-34, 2009.

MUSSHOFF, F. et al. Results of hair analyses for drugs of abuse and comparison with self-reports and urine tests. **Forensic Science International**, v. 156, n. 2-3, p. 118-123, 2006.

MUSSHOFF, F.; MADEA, B. New trends in hair analysis and scientific demands on validation and technical notes. **Forensic Science International**, v. 165, n. 2-3, p. 204-215, 2007.

NAKAHARA, Y. Hair analysis for abused and therapeutic drugs. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 733, n. 1-2, p. 161-180, 1999.

NASCIMENTO, E.C.; NASCIMENTO, E.; SILVA, J.P. Uso de álcool e anfetaminas entre caminhoneiros de estrada. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, n. 2, p. 290-293, 2007.

NOLAN, S. Drug-free workplace programmes: New Zealand perspective. **Forensic Science International**, v. 174, n. 2-3, p. 125-132, 2008.

NOTO, A.R. et al. Analysis of prescription and dispensation of psychotropic medications in two cities in the State of São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.24, n. 2, p. 68-73, 2002.

NURCO, D.N. et al. Drug Abuse Treatment in the Context of Correctional Surveillance. **Journal of Substance Abuse Treatment**, v. 12, n.1, p. 19-27, 1995.

PECHANSKY, F. et al. Consumo de álcool e drogas entre motoristas privados e profissionais do Brasil. In: **Uso de bebidas alcoólicas e outras drogas nas rodovias brasileiras e outros estudos** / Flavio Pechansky, Paulina do Carmo Arruda Vieira Duarte, Raquel Brandini De Boni (org.). - Porto Alegre: Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas; 2010. p 54-62.

PEDEN, M. et al. World report on traffic injury prevention. CHAPTER 1 - The Fundamentals. Geneva: WHO; 2004. Disponível em: <<http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/9241562609.pdf>>. Acesso em: 04 maio 2011.

PEHRSSON, A. et al. Roadside oral fluid testing: comparison of the results of drugwipe 5 and drugwipe benzodiazepines on-site tests with laboratory confirmation results of oral fluid and whole blood. **Forensic Science International**, v. 175, n 2-3, p. 140-8, 2008.

PERÚ. Ministerio de Salud. Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas, Registro Sanitário de Produtos Farmacêuticos. Disponível em: <<http://www.digemid.minsa.gob.pe>>. Acesso em: 27 maio 2011.

PORTUGAL, Lei nº 18 de 17 de maio de 2007, Aprova o Regulamento de Fiscalização da Condução sob influência do álcool ou de substâncias psicotrópicas. Diário da República, num. 95, 17 maio 2007. Disponível em <<http://dre.pt/pdfgratis/2007/05/09500.pdf>> Acesso em: 04 maio 2011.

POLÍCIA FEDERAL, Brasil, Diretoria Técnico-Científica, Sistema Criminalística. Disponível em <<https://webvpn.dpf.gov.br/webvpn.html>>. Acesso restrito por senha. Acessado em: maio de 2010.

PRAGST, F.; BALIKOVA, M.A. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. **Clinica Chimica Acta**, v. 370, nº ??, p. 17–49, 2006.

PRESLEY, L. et al. High prevalence of 6-acetylmorphine in morphine-positive oral fluid specimens. **Forensic Science International**, v. 133, n. 1-2, 23, p. 22-25, 2003.

P.R. VADEMÉCUM ONLINE. Disponível em <[http://www.prvademecum.com/pantalla\\_paises.asp](http://www.prvademecum.com/pantalla_paises.asp)>. Acesso em: 26 maio 2011.

PUJOL, M-L. et al. Evaluation of the IDS One-Step™ ELISA kits for the detection of illicit drugs in hair. **Forensic Science International**, v. 170, n. 2-3, p. 189-192, 2007.

RAIKOS, N. et al. Amphetamine derivative related deaths in northern Greece. **Forensic Science International**, v. 128, n. 1-2, p. 31-34, 2002.

RASANEN, I. et al. Benzodiazepine findings in blood and urine by gas chromatography and immunoassay. **Forensic Science International**, v. 112, n. 2-3, p. 191-200, 2000.

REIS, M.M. **Testes imunológicos: manual ilustrado para profissionais da saúde**. Ed. Porto Alegre: AGE, 1998.

RADOVANOVIC, Z. et al. On substance abuse in Kuwait (1992-1997). Evidence from toxicological screening of patients. **Journal of Substance Abuse**, v. 12, n. 4, p. 363-371, 2000.

ROCHE, A. M. et al. Drug testing in Australian schools: policy implications and considerations of punitive, deterrence and/or prevention measures. **International Journal of Drug Policy**, v. 20, n. 6, p. 521-528, 2009.

SAN, L. et al. Monitoring Patterns of Substance Use in Drug-Dependent Patients. **Journal of Substance Abuse Treatment**, v. 15, n. 5, p. 425-430, 1998.

SAMYN, N.; DE BOECK, G.; VERSTRAETE, A.G. The use of oral fluid and sweat wipes for the detection of drugs of abuse in drivers. **Journal of Forensic Science**, v. 47, n. 6, p. 1380-1387, 2002.

SARSTEDT. Salivette®. Disponível em: <[http://www.sarstedt.com/pdf/katalog/en/SARSTEDT\\_E\\_0409%2042.pdf](http://www.sarstedt.com/pdf/katalog/en/SARSTEDT_E_0409%2042.pdf)>. Acesso em: 26 junho 2011.

SCHAFFER, M.I.; HILL, V.A. Hair Analysis in Drugs-of-Abuse Testing. In: Wong, R.C.; Tse, H.Y. **Drugs of abuse-Body fluid testing**. Ed, New Jersey: Humana press, 2005. p. 177-200.

SCHIPPER, R.G.; SILLETTI, E.; VINGERHOEDS, M.H. Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects. **Archives of Oral Biology**, v. 52, n. 12, p. 1114-1135, 2007.

SENNA, M.C. et al. First nationwide study on driving under the influence of drugs in Switzerland. **Forensic Science International**, v. 198, n. 1-3, p. 11-16, 2010.

SILVA, O.A. et al. **Drug use by truck drivers in Brazil, Drugs: Education, Prevention & Policy**, v. 10, n. 2, p. 135-139, 2003.

SILVA, O.A.; YONAMINE, M. Drug abuse among workers in Brazilian regions. **Revista de Saúde Pública**, v.38, n. 4, p.552-556, 2004.

SOFT/AAFS. Forensic Toxicology Laboratory Guidelines. 2006.

SOUZA, J.C.; PAIVA, T.; REIMÃO, R. Sleep habits, sleepiness and accidents among truck drivers. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 63, n.4, p. 925-930, 2005.

SPYRIDAKI, M.H. et al. Doping control analysis in human urine by liquid chromatography-electrospray ionization ion trap mass spectrometry for the Olympic Games Athens 2004: determination of corticosteroids and quantification of ephedrine, salbutamol and morphine. **Analytical Chimica Acta**, v. 573-574, p. 242-249, 2006.

STEVENS, C.D. **Clinical immunology and serology – A laboratory perspective**. 2 ed. Filadélfia: F.A Davis Company, 2003. p. 157-168.

STRASINGER, S.K; STEVENS, C. Safety and specimen preparation. In: STEVENS, C.D. **Clinical immunology and serology – A laboratory perspective**. 2 ed. Filadélfia: F.A Davis Company, 2003. p. 114-122.

TAGLIARO, F. et al. Hair analysis by using radioimmunoassay, high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis to investigate chronic exposure to heroin, cocaine and/or ecstasy in applicants for driving licences. **Forensic Science International**, v. 107, n.1-3, p. 121–128, 2000.

TGA - THERAPEUTIC GOODS ADMINISTRATION. Australia, Department of Health and Ageing, ARTG Current Medicines. Disponível em: <<https://www.ebs.tga.gov.au/>>. Acesso em: 27 maio 2011.

TOENNES, S.W. et al. Driving under the influence of drugs — evaluation of analytical data of drugs in oral fluid, serum and urine, and correlation with impairment symptoms. **Forensic Science International**, v. 152, n. 2-3, p. 149-155, 2005.

TOZER, T.N.; ROWLAND, M. **Introdução à Farmacocinética e à Farmacodinâmica: as bases quantitativas da terapia farmacológica**. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

UNODC - UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. World Drug Report 2010. Disponível em: <[http://www.unodc.org/documents/wdr/WDR\\_2010/2.0\\_Drug\\_statistics\\_and\\_Trends.pdf](http://www.unodc.org/documents/wdr/WDR_2010/2.0_Drug_statistics_and_Trends.pdf)> . Acesso em: 28 abril 2011.

UNITED NATIONS. United Nations International Drug Control Programme, Recommended Methods for the Detection and Assay of Heroin, Cannabinoids, Cocaine, Amphetamine, Methamphetamine and Ring-substituted Amphetamine Derivatives in Biological Specimens, United Nations, New York, 1995.

UNITED NATIONS. International Drug Control Programme. Guidelines for testing drugs under international control in hair, sweat and saliva. New York: United Nations, 2001. 23 p.

UNITED NATIONS - World Drug Report 2010. Disponível em: <[http://www.unodc.org/documents/wdr/WDR\\_2010/2.0\\_Drug\\_statistics\\_and\\_Trends.pdf](http://www.unodc.org/documents/wdr/WDR_2010/2.0_Drug_statistics_and_Trends.pdf)>. Acesso em: 15 abril 2011.

VAZ, A.J. Imunoensaios utilizando conjugados. In: VAZ, A.J.; TAKEI, K.; BUENO, E.C. **Imunoensaios: fundamentos e aplicações**. 23 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Googan, 2007a. p. 67-83.

VAZ, A.J. Amostras utilizadas em imunoensaios. In: VAZ, A.J.; TAKEI, K.; BUENO, E.C. **Imunoensaios: fundamentos e aplicações**. 23 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Googan, 2007b. p. 108-116.

VAZ, A.J. e LEONI, L.A.B. Detecção de antígenos e haptenos. In: **Imunoensaios: fundamentos e aplicações**. 23 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Googan, 2007. p. 132-141.

VERSTRAETE, A.G. Oral fluid testing for driving under the influence of drugs: history, recent progress and remaining challenges. **Forensic Science International**, v. 150, n. 2-3, p. 143-150, 2005.

VERSAETRE, A.G; PIERCE, A. Workplace drug test in Europe. **Forensic Science International**, v. 121, n. 1-2, p. 2-6, 2001.

VERSTRAETE, A. G.; RAES, E. (Ed.), Rosita-2 project: final report, Gent, 2006. Disponível em: < <http://www.rosita.org/>>. Acesso em: 15 maio 2011.

VICTORIA, Australia, Road Safety (General) Regulations 2009 - n.115/2009, version 003 - Incorporating amendments as at 1 July 2010. Disponível em <[http://www.legislation.vic.gov.au/Domino/Web\\_Notes/LDMS/LTObject\\_Store/LTObjSt6.nsf/DDE300B846EED9C7CA257616000A3571/81E729524B8F71BCCA25787001ABA74/\\$FILE/09-115sr005bookmarked.pdf](http://www.legislation.vic.gov.au/Domino/Web_Notes/LDMS/LTObject_Store/LTObjSt6.nsf/DDE300B846EED9C7CA257616000A3571/81E729524B8F71BCCA25787001ABA74/$FILE/09-115sr005bookmarked.pdf)>. Acessado em: 04 maio 2011.

YONAMINE, M. **A saliva como espécime biológico para monitorar o uso de álcool, anfetamina, metanfetamina, cocaína e maconha por motoristas profissionais**. São Paulo: USP, 2004. 126 p. Tese (Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2004.

WALSH, J.M. New technology and new initiatives in U.S. workplace testing. **Forensic Science International**, v. 174, n. 2-3, p. 120-124, 2008a.

WALSH, J.M. et al. Guidelines for research on drugged driving. **Addiction**, v. 103, n. 8, p.1258-1268, 2008.

WANG, G. et al. Development of a homogeneous immunoassay for the detection of fentanyl in urine. **Forensic Science International**, v. 206, n. 1-3, p. 127-131, 2011.

WAY, A.B. et al. Comparison between the CEDIA and EMIT II immunoassays for the determination of benzodiazepines. **Clinica Chimica Acta**, v. 271, v.1, p. 1-9, 1998.

WENDLER, E.A.; BUSATO, C.R.; MIYOSHI, E. Uso de anfetaminas por motoristas de caminhão para reduzir o sono. **Publication UEPG Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 9, n. 3-4, p. 7-13, 2003.

WYLIE, F.M. et al. **Drugs in oral fluid – part II. Investigation of drugs in drivers**. **Forensic Science International**, v. 150, n. 2-3, p. 199-204, 2005.

WILLE, S.M.R. et al. Evaluation of on-site oral fluid screening using Drugwipe-5+®, RapidSTAT® and Drug Test 5000® for the detection of drugs of abuse in drivers. **Forensic Science International**, v. 198, n. 1-3, p. 2-6, 2010.

WOLFF, K. Biological markers of drug use. **Psychiatry**, v. 5, n. 12, p. 439-441, 2006.