

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica**

**Verificação do uso de cocaína por pacientes atendidos no PS-HCFMUSP:
validação de metodologia e análise em amostras de sangue.**

Iris Tikkanen Belitsky

Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Orientador(a):
Profa. Dra. Vilma Leyton

São Paulo
2019

AGRADECIMENTOS

À Professora Vilma Leyton, por ser a melhor orientadora que eu poderia ter! Pela sua disponibilidade, flexibilidade, ajuda e carinho.

Ao Henrique Bombana, pelas inúmeras vezes que, de prontidão, levantou de sua cadeira para me ajudar com os diversos “pepinos” ao longo do desenvolvimento desse projeto.

À Professora Inar Castro, pela grande ajuda em analisar meus dados.

Ao meu pai, por me ajudar em todas minhas dúvidas.

À minha mãe, por escutar e me ajudar em todas minhas reclamações.

Às Professoras Denise Botter e Mônica Sandoval, pela rica discussão em estatística.

Ao meu amigo Ghi, por ceder seus talentos de “showman” ao meu TCC.

À minha amiga Sté, por me dar broncas da maneira mais amorosa.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS.....	9
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1. Material.....	10
3.1.1. Equipamentos.....	10
3.1.2. Reagentes e outros materiais	10
3.1.3. Amostras de sangue negativas.....	11
3.1.4. Amostras de pacientes vítimas de acidentes de trânsito.....	11
3.2. Métodos.....	12
3.2.1.Procedimento para determinação de cocaína e produtos de Biotransforamação em sangue	12
3.2.2.Condições cromatográficas.....	13
3.2.3.Otimização da metodologia.....	13
3.2.4. Validação da metodologia.....	14
3.2.4.1. Limites de Detecção (LoD) e Quantificação (LoQ)	14
3.2.4.2. Linearidade	15
3.2.4.3. Precisão intra e inter-ensaio	15
3.2.4.4. Exatidão.....	16
3.2.4.5. Carryover.....	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4.1. Cromatogramas.....	17
4.2. Validação da metodologia	18
4.2.1. Limite de Detecção e Quantificação.....	18
4.2.2. Linearidade	19
4.2.3. Precisão e Exatidão	20
4.2.4. Carryover.....	21
4.3. Análise das amostras dos pacientes vítimas de trânsito	21
5. CONCLUSÕES.....	22
6. BIBLIOGRAFIA	23
7.ANEXOS	27

LISTA DE ABREVIATURAS

AEME	Anidroecgonina metil éster
ANOVA	Análise de variância
AT	Acidentes de trânsito
CE	Cocaetileno
CEd3	Cocaetileno deuterado
CG-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
COC	Cocaína
COCd3	Cocaína deuterada
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
LLE	Extração líquido-líquido (do inglês <i>liquid-liquid extraction</i>)
LoD	Limite de detecção
LoQ	Limite de quantificação
LPME	Microextração em fase líquida (do inglês <i>liquid-phase microextraction</i>)
MMLLE	Extração líquido-líquido com membrana microporosa (do inglês <i>microporous membrane liquid-liquid extraction</i>)
PE	Ponto de ebulação
R²	Coeficiente de regressão linear
rpm	Rotações por minuto
SDME	Microextração em gota suspensa (do inglês <i>single drop microextraction</i>)
SIM	Monitoramento do íon selecionado (do inglês <i>selec ion monitoring</i>)
SLM	Extração em membranas (do inglês <i>supported liquid membrane</i>)

SNC	Sistema nervoso central
SPE	Extração em fase sólida (do inglês <i>solid-phase extraction</i>)
SPME	Microextração em fase sólida (do inglês <i>solid-phase microextraction</i>)
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
UHPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (do inglês <i>Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry</i>)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Metabólitos da cocaína e enzimas envolvidas no processo de biotransformação. Obtido de WOLFF; WHITE; KARCH, 2016.....	4
Figura 2 – Representação esquemática da LPME. A) Sistema de duas fases. B) Sistema de três fases. Obtido de ELLER, 2014.....	9
Figura 3 – Cromatogramas de amostras negativas de sangue, adicionadas dos padrões da COC(B), COCd3(A), CE(D), CEd3(C) e AEME(E).....	17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Rampa de aquecimento do GC-MS.....	13
Tabela 2 – Íons utilizados na qualificação e quantificação dos analitos de cocaína e seus respectivos deuterados po GC-MS.....	13
Tabela 3 – parâmetros avaliados durante a etapa de otimização do método.....	14
Tabela 4 – Limites de detecção (LoD) e de quantificação (LoQ) dos analitos de cocaína.....	19
Tabela 5 – Curva de calibração e coeficiente de correlação linear (R^2) dos analitos de cocaína.....	20
Tabela 6 – Precisão e exatidão dos analitos de cocaína.....	21
Tabela 7 – Resultados das análises das amostras de sangue de pacientes.....	22

RESUMO

BELITSKY, I. T. Verificação do uso de cocaína por pacientes atendidos no PS-HCFMUSP: validação de metodologia e análise em amostras de sangue. 2019. 36 f Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Palavras-chave: Acidentes de trânsito; Cocaína; LPME; Toxicologia.

INTRODUÇÃO: Dirigir sob influência de alguma substância que altere o estado psíquico do condutor é um grande agravante na possibilidade de envolvimento em um acidente e na gravidade e lesividade do mesmo. Porém, o conhecimento a respeito da magnitude dos riscos causados no trânsito ainda é escasso. Para avaliar o consumo de drogas pelos condutores, busca-se analisar o sangue do indivíduo. Entre os métodos mais empregados estão a extração em fase líquida (LLE) e sólida (SPE), entretanto estes métodos utilizam uma grande quantidade de solventes, que gera um impacto negativo ao meio ambiente. Em vista disso, métodos de microextração vêm sendo desenvolvidos. **OBJETIVO:** Validar um método de análise de cocaína e seus metabólitos em amostras de sangue, utilizando técnica de microextração em fase líquida (LPME) e aplicar a metodologia desenvolvida em amostras de sangue de pacientes atendidos no Pronto Socorro Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. **MATERIAL E MÉTODOS:** Para proceder com a análise de sangue via LPME, não é necessário nenhum aparato muito complexo. Este método exige apenas o emprego de uma fibra porosa de polipropileno e poucos volumes de solvente. Após a extração, os analitos são injetados no cromatógrafo gasoso acoplado à espectrometria de massas (CG-MS). Os parâmetros obtidos durante a etapa de validação foram avaliados de acordo com guias nacionais e internacionais. **RESULTADOS:** Após a etapa de validação, o método foi aplicado em amostras de pacientes internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, onde foram encontrados resultados positivos para os analitos da cocaína. **CONCLUSÃO:** O método de extração proposto foi considerado adequado para quantificar cocaína (COC) e cocaetileno (CE), entretanto só foi possível determinar de maneira qualitativa o consumo de *crack* pelos indivíduos.

1. INTRODUÇÃO

Acidentes de trânsito (AT) são a oitava maior causa de óbitos no mundo, ficando atrás apenas de doenças cardíacas, pulmonares e neurológicas, como acidente vascular cerebral e Alzheimer, alguns tipos de cânceres e diabetes mellitus. Apenas em 2016, foram registrados 1.35 milhão de fatalidades pelo mundo, e no Brasil, 38.651. Nosso país perde apenas para Índia (150.785) e China (58.022). (OMS, 2018)

No município de São Paulo apenas em 2017, 16.000 indivíduos envolveram-se em ATs; sendo 49% com motocicletas, 24% em decorrência de acidentes com automóveis e 22% das vítimas eram pedestres. Porém, em se tratando das mortes, os índices são diferentes: 4,1% das vítimas envolvendo motocicletas e 9% dos pedestres vieram a óbito, contra apenas 3,2% devido a acidentes envolvendo automóveis. (CET, 2017) Este fato pode ser explicado pela maior vulnerabilidade dos condutores de motocicletas e dos pedestres que, quando envolvidos em acidentes, sofrem traumas mais graves e de difícil recuperação.

Dirigir é um ato complexo que envolve múltiplos processos psicológicos e cognitivos. Frente às diversas situações que surgem repentinamente no trânsito, o condutor deve ser capaz de responder de uma maneira rápida, precisa e como julgar necessário para evitar o risco. Para tanto, são necessárias ações que demandam memória, atenção, concentração, percepção do ambiente e habilidades motoras. Fatores como imprudência ao volante, personalidade e sentimentos também influenciam no resultado frente ao risco. (BALBINOT; ZARO; TIMM, 2011)

O fator humano é considerado a principal causa de ocorrência de acidentes, porém não podemos deixar de mencionar que a reprovável falta de conservação das vias do país, a falta de sinalização vertical e horizontal e o precário sistema de formação de novos condutores têm grande impacto na probabilidade do condutor se envolver em um acidente. (CNT, 2018)

Desta forma, por ser considerado um problema de saúde pública, foram tomadas providências para diminuir a sua prevalência. Leis foram elaboradas, propostas,

aprovadas e sancionadas, afim de minimizar fatores de risco relacionados aos acidentes. Assim surgiram os limites de velocidade, a obrigatoriedade do uso do cinto de segurança por condutores e passageiros de veículos automotores e de capacetes por motociclistas, a proibição do uso do celular, do consumo de álcool e de substâncias psicoativas. (OMS, 2018)

Dirigir sob influência de alguma substância que altere o estado psíquico do condutor é um grande agravante na possibilidade de envolvimento em um acidente e na gravidade e lesividade do mesmo. (BALBINOT; ZARO; TIMM, 2011).

Um estudo que comparou o histórico de infrações e acidentes de trânsito pré e pós tratamento de dependência química, constatou maior probabilidade de violação de leis de trânsito e de colisões provocadas por usuários de álcool e cocaína antes do tratamento. (MACDONALD; MANN, 2004). Drummer et al., 2003 avaliou a incidência de diversas drogas em AT fatais. Das 3398 amostras analisadas, 125 foram positivas para álcool em concentrações menores de 0,05g/100ml e 990 para concentrações sanguíneas superiores; 460 fizeram uso de Cannabis, 167 de opioides, 138 consumiram estimulantes do sistema nervoso central (SNC) e a mesma quantidade de amostras foram positivas para benzodiazepínicos. Um estudo de caso-controle, realizado por Li; BRADY; CHEN, 2013 constataram que o uso substâncias psicoativas dobra o risco de envolvimento em acidentes, independente da idade, sexo, hora do dia e região, e é ainda maior quando o consumo é concomitante ao etanol. Brown et al., 2013 avaliou a influência de etanol e triazolam, por meio de um estudo experimental, realizado em simulador, a variação do carro em relação a linha central da rodovia e variação e média da velocidade, em comparação ao limite permitido. Os resultados observados demonstram que houve maior variação de desvio padrão dos parâmetros avaliados quando sob influência de etanol, do que quando administrado triazolam ou placebo.

Carvalho et al., 2016 determinou a presença de drogas em sangue de motociclistas acidentados no Estado de São Paulo e constatou que das 273 amostras analisadas, 29 foram positivas para etanol, 47 demonstraram o consumo de etanol e drogas, 24 usaram Cannabis e 23 foram positivas para cocaína.

Em se tratando do etanol, por ser um depressor do SNC, afetando principalmente o córtex cerebral e cerebelo, funções fisiológicas desempenhadas por essas áreas do cérebro sofrem alterações. Sendo assim, sintomas como sedação, sonolência, alteração de humor, falta de coordenação motora e prejuízo na cognição são manifestados pelos indivíduos e, se apresentados por um condutor, podem interferir na direção segura. (BALBINOT; ZARO; TIMM, 2011; COSTA, 2003)

A cocaína (COC) é um potente estimulante do SNC, uma vez que aumenta a concentração de dopamina nas fendas sinápticas através de mecanismos de ligação ao transportador de recaptura da catecolamina. Consequentemente, o indivíduo que a consome apresenta sintomas como euforia, aumento da autoestima e da capacidade físico e motora, características que quando alteradas durante a condução de um veículo podem acarretar na ocorrência de um acidente. (MOVIG, 2004; OGA, 2014;)

É um alcaloide, obtido a partir das folhas da planta do gênero *Erythroxylum coca*. Sua extração é iniciada com a alcalinização das folhas maceradas misturadas com solventes orgânicos, resultando na pasta de coca. (OGA, 2014)

Após sua acidificação e purificação, é produzido o cloridrato de cocaína, que corresponde à forma mais usual do tráfico, o sal refinado. O crack surge a partir do tratamento dos resíduos gerados no processo anterior com bicarbonato de sódio e aquecimento, tornando a molécula final básica, em formato de pedras porosas. (DORTA et al., 2018; NEVES, 2013; OGA, 2014)

A pequena modificação na estrutura é responsável pelas diferenças no padrão de uso e na maneira de confirmar o consumo das duas formas da cocaína.

A forma salina é administrada pelas vias oral, intranasal e intravenosa, isso porque a molécula tem ponto de ebulação (PE) a 197°C e sua queima não atinge a temperatura de volatilização. Já a forma básica, o *crack*, apresenta PE 98°C, e quando aquecida é capaz de volatilizar, sendo absorvida pela via respiratória após o ato de fumar. (PEREIRA, 2012)

Para ser eliminada, a molécula da cocaína sofre mudanças em sua estrutura, afim de torná-la mais polar, e consequentemente facilitar a excreção urinária. Esse processo

é conhecido como biotransformação e envolve enzimas hepáticas específicas. (STORPITIS et al., 2011) A partir dessas transformações, surgem os metabólitos inativos benzoilecgonina e ecgonina metil éster e dos metabólitos ativos norcocaina e cocaetileno, sendo este último presente apenas em amostras de indivíduos que fizeram uso concomitante ao etanol, resultado da transesterificação do grupo etil do etanol para a molécula. (MAURER et al., 2006).

O processo de pirólise da cocaína ocasiona na eliminação de um ácido benzoico da molécula. Essa modificação origina o composto anidroecgonina metil éster (AEME) e, por não sofrer biotransformação hepática, é utilizado como marcador da exposição ao crack. (CARVALHO, et al, 2008)

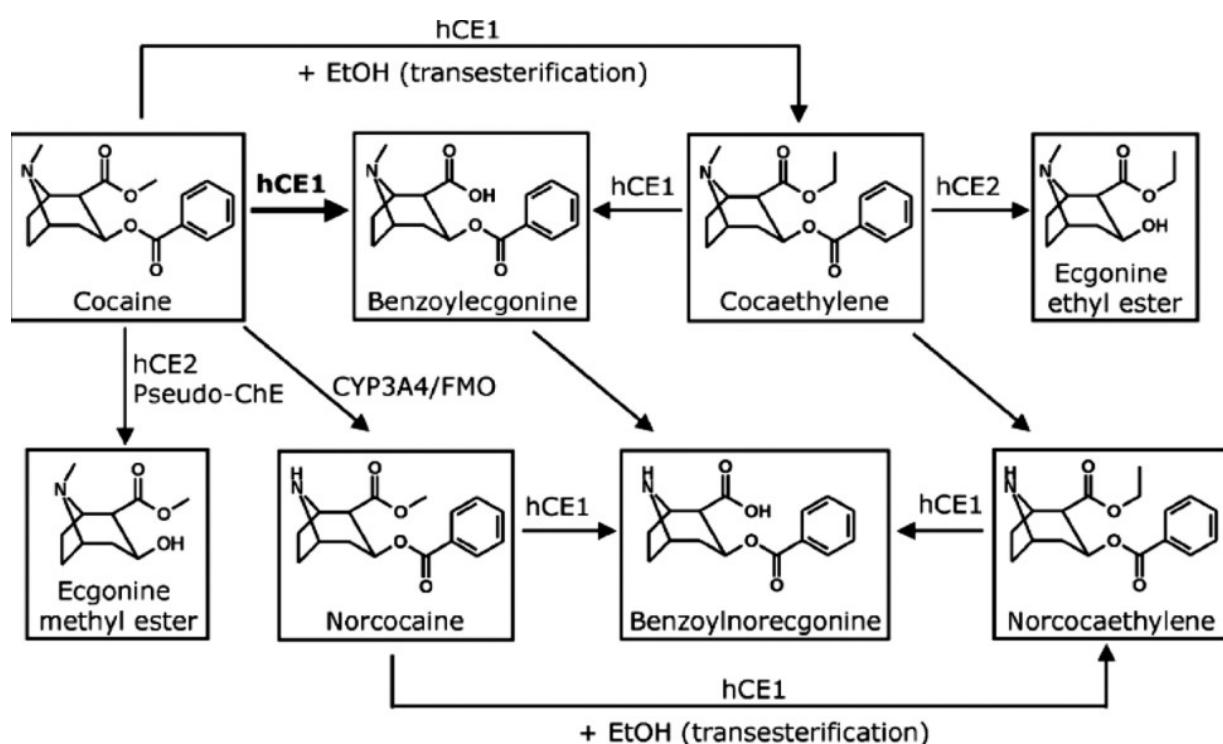


Figura 1 – Metabólitos da cocaína e enzimas envolvidas no processo de biotransformação. Obtido de WOLFF; WHITE; KARCH, 2016.

Após o processo de absorção, qualquer substância pode ser encontrada no organismo. Sendo assim, o conhecimento dos processos de distribuição,

biotransformação e excreção das drogas é necessário para escolher a matriz ideal de acordo com o objetivo do estudo. (DORTA, et al., 2018). Somado a isso, a escolha da matriz depende ainda do custo da amostragem, dos métodos de preparo e análise da amostra, da concentração e estabilidade da droga na matriz e do intervalo de tempo que busca-se determinar a exposição. (GJERDE; ØIESTAD, 2011)

O sangue é capaz de estimar a concentração da substância psicoativa no SNC e por isso, sua identificação possibilita indicar se o indivíduo está sob seu efeito no momento da coleta. A análise da saliva também é capaz de predizer seus efeitos farmacológicos, pois como está em íntimo contato com o sangue, possibilita estimar a concentração sanguínea no momento da coleta. Ressalva-se que, por utilizar fatores de conversão, sua quantificação não gera resultados precisos. A vantagem de analisá-la se deve ao fato de a sua coleta ser não invasiva, auxiliando na cooperação do indivíduo no momento da amostragem. Porém, deve-se ter cuidado ao coletá-la, uma vez que resquícios da própria droga ou resíduos de alimentos podem alterar o resultado confiável. (GJERDE; ØIESTAD, 2011). No caso do etanol e outras substâncias voláteis, a determinação da concentração sanguínea pode ser feita pela relação da concentração encontrada no ar exalado, sendo o método mais utilizado para avaliar o consumo dessa substâncias. (ALLEN, 2011)

Quando o objetivo é avaliar a exposição, matrizes de excreção como urina e fezes são as mais indicadas e, em toxicologia post mortem, se as matrizes convencionais estão suspeitas de contaminação, não estão disponíveis ou estão em avançado estágio de decomposição, órgãos, tecidos e até humor vítreo podem ser analisados. (DORTA et al., 2018)

Como o consumo de etanol é muito antigo, são diversos os métodos capazes de detectar a substância e, sendo assim, é bem estabelecido o conhecimento do impacto que seu o consumo tem sob a condução. (JONES, 1996). Porém, o conhecimento a respeito da magnitude dos riscos causados no trânsito por substâncias psicoativas ainda é escasso. (ELVIK, 2013; OMS, 2018). Dos estudos realizados, muitos são epidemiológicos; ou seja, buscam fazer a associação entre o uso de alguma substância psicoativa e o incidente já ocorrido. (DUSSALT, 2002; MACDONALD; MANN, 2004;

STODUTO et al, 2011). Porém este tipo de estudo não é apropriado para fazer a relação direta entre o consumo de drogas e seu impacto na direção, uma vez que as circunstâncias dos acidentes podem ser diversas e não só relacionadas com a exposição a droga. Sendo assim, estudos experimentais - onde são simuladas situações de trânsito sob influência de drogas - em conjunto com métodos de análise quantitativos, são os mais confiáveis para estabelecer a real relação entre dose, efeito e impacto nos acidentes. (EMCDDA, 2014).

Para proceder com a investigação do consumo de substâncias psicoativas pelo condutor, recorre-se a métodos cromatográficos. Os cromatógrafos gasoso e líquido são os mais empregados. Eles são capazes de separar, analisar e quantificar diversos componentes, desde moléculas biatómicas a moléculas mais complexas como ácidos graxos e esteróides. O seu funcionamento se baseia numa fase estacionária que é capaz de reter os componentes da mistura de acordo com características físico-químicas da molécula, como polaridade, pressão de vapor, e liberá-los um a um de acordo com a natureza do eluente e dos parâmetros do próprio equipamento, como tipo de coluna e temperatura do sistema. (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 1998)

Porém, devido a complexidade de componentes presentes no sangue, como células, proteínas e lipídeos, é necessário realizar um pré-tratamento da amostra. Seu objetivo é separar os analitos a serem analisados dos componentes naturais da matriz, evitando que estes compostos adsorvam na coluna e interfiram na eficiência extractiva. Caso isso ocorra, além de diminuir sua eficiência, estes podem ficar retidos na coluna, iniciando-a. (ALSHARIF et al., 2017; QUEIROZ; COLLINGS; JARDIM, 2001)

Um dos métodos mais empregados para a segregação dos analitos é a extração líquido-líquido (LLE). Seu princípio de funcionamento baseia-se em particionar as moléculas de interesse para uma fase líquida imiscível daquela em que o analito se encontra. Para isso, demanda-se um grande volume de solvente. Essa grande quantidade utilizada interfere no enriquecimento amostral, uma vez que, se o analito está presente em pequenas quantidades, sua concentração após extração será muito baixa. Além disso, a manipulação dos solventes podem ocasionar efeitos tóxicos ao analista e ao meio ambiente, dado que seu tratamento para posterior descarte, além de ser caro,

não é feito da melhor maneira. (DE OLIVEIRA, 2008; HO; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN; KATAOKA, 2003; QUEIROZ; COLLINGS; JARDIM, 2001)

Portanto, a necessidade de obter-se maior seletividade, para ser possível analisar traços, e a preocupação de causar um menor impacto ambiental negativo, levaram ao desenvolvimento de técnicas miniaturizadas, onde exige-se o emprego de volumes de solventes na ordem de microlitros. (FILIPPOU, et al., 2017; KATAOKA, 2003; QUEIROZ; COLLINGS; JARDIM, 2001)

Entre essas técnicas, estão a microextração em fase sólida (SPME), a microextração em gota suspensa (SDME), extração em membranas (SLM), Extração líquido-líquido com membrana microporosa (MMLLE), e a microextração em fase líquida (LPME). Esta última destaca-se como uma das mais promissoras. Para ser realizada, não são necessárias técnicas de automação e nem aparelhos específicos, demandando apenas o emprego de uma fibra oca porosa que cumpre a função de membrana semi-permeável. (DE OLIVEIRA et al., 2008).

Ele consiste em mobilizar os poros da fibra com um solvente imiscível em água e preencher seu lúmen com uma fase aceptora. O conjunto é colocado em contato com a matriz biológica (fase doadora), da onde busca-se extrair os analitos.

Esse método opera-se em dois diferentes modos e sua escolha baseia-se nas características físico-químicas dos analitos.

O modo de duas fases, usado para particionar moléculas apolares sem grupos ionizáveis, consiste em condicionar os poros e o lúmen da fibra com o mesmo solvente. A transferência e recuperação dependem do coeficiente de partição do analito entre as fases doadora e aceptora.

No modo de três fases, utilizado para separar componentes que apresentam grupos ionizáveis, consiste em condicionar o lúmen da fibra com um solução diferente do utilizado para preencher seus poros. Nesse caso, dois coeficientes de partição estão envolvidos no equilíbrio do analito entre as fases. Aquele que faz a relação entre o solvente e a fase doadora e entre a fase aceptora e o solvente orgânico.

É importante estipular o pH de ambas fases, pois este influencia na solubilidade, dissolução e equilíbrio ácido-base do analito. Na fase doadora, busca-se deixar o pH três unidades acima do pKa da molécula; neste meio ela se encontrará na forma molecular, diminuindo sua solubilidade na solução. Assim, a transferência para o solvente orgânico será favorecida. Por outro lado, o pH da fase aceptora deve ser mantido de tal maneira a manter a molécula no seu estado ionizável; para isso o pH deve estar abaixo do valor de pKa da molécula. Deste modo, ela ficará retida no interior da fibra pois terá pouca interação com o solvente orgânico.

Além do pH, outros parâmetros devem ser estipulados no desenvolvimento e otimização do método. A agitação do sistema é importante para aumentar a cinética da extração e a adição de sal à fase doadora pode aumentar a eficiência extrativa, uma vez que aumenta a força iônica da solução, tornando as moléculas do analito menos solvatadas e mais disponíveis para serem transferidas para a fase aceptora.

O método LPME, em comparação à LLE, confere resultados mais precisos e exatos e com maiores valores de recuperação, enriquecimento e especificidade, além de ser um método de baixo custo e de simples operação. Porém é considerado um método demorado, pois a boa transferência ocorre entre trinta a sessenta minutos. Quanto a isso, estudos estão sendo realizados para diminuir o tempo de extração, utilizando a aplicação de um potencial elétrico ao sistema. (BJERGAARD; RASMUSSEN, 2007; OCANA-GONZALEZ et al, 2016; MERIB; CARASEK, 2014; HO; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2002.)

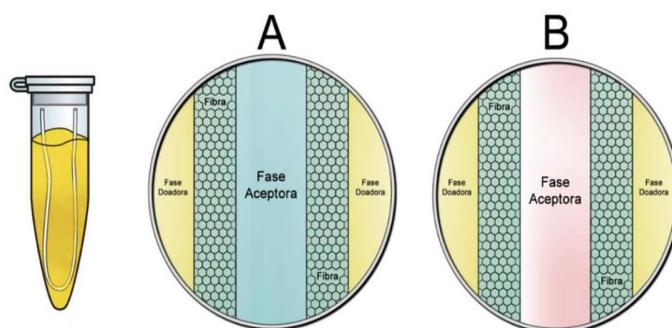


Figura 2 – Representação esquemática da LPME. A) Sistema de duas fases. B) Sistema de três fases.
Obtido de ELLER, 2014.

Assim sendo, é interessante adaptar essa técnica de microextração, que faz uso de quantidades mínimas de solventes e que é ainda pouco utilizada em amostras de sangue, para que seja utilizada em análises toxicológicas voltadas para diversas finalidades como, por exemplo, na fiscalização de motoristas que dirigem sob o efeito de drogas, em outros casos forenses como em sangue coletado em necropsias para auxiliar o patologista na determinação da causa da morte, bem como para verificar se pacientes atendidos em hospitais de emergência, vítimas de traumas diversos, fizeram uso ou não de drogas.

2. OBJETIVOS

Validar um método de extração de cocaína e seus metabólitos em amostras de sangue, utilizando técnica de LPME e aplicar a metodologia desenvolvida em amostras de sangue de pacientes atendidos no Pronto Socorro Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Equipamentos

- Cromatógrafo gasoso, modelo GC 2010, equipado com coluna capilar HP – 5MS (Hewlett Packard) com as seguintes dimensões: 30m x 0,25mm x 0,10µm, acoplado a espectrômetro de massas quadrupolo modelo QP 2010 ambos da Shimadzu®, Japão.
- Agitador magnético com aquecimento multiestações da marca IKATM, modelo RT 10 Power;
- Fibras oca de micro extração em fase líquida (*hollow-fiber*) de polipropileno, com 600 µm diâmetro interno, 200 µm espessura de parede e 0,20 µm tamanho do poro, adquirido da Membrana TM, (Wuppertal, Alemanha);
- Concentrador TE-019 da marca Tecnal, Brasil.

3.1.2. Reagentes e outros materiais

- Acetato de Etila, Ácido Clorídrico e Dodecano foram obtidos da Merck® (Darmstadt, Alemanha);
- Acetonitrila foi obtida da JT. Baker® (Phillipsburg, New Jersey, EUA);
- Bicarbonato de Sódio e Carbonato de Potássio foram obtidos da LabSynth® (Diadema, São Paulo, Brasil);
- Gases especiais para cromatografia foram obtidos da Linde, Brasil;
- Vidrarias especiais e outros itens para as análises cromatográficas foram adquiridos de empresas especializadas existentes no mercado brasileiro;
- Os seguintes padrões de referência para as análises toxicológicas foram obtidos da Cerilliant Corporation (Round Rock, Texas, EUA), em acetonitrila na concentração de 1mg/mL:
 - Cocaína
 - Cocaína-d3

- Cocaetileno
- Cocaetileno-d3
- Anidroecgonina metil éster

Todos os padrões foram diluídos com acetonitrila em soluções de trabalho nas concentrações de 100µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL e 0,1 µg/mL

3.1.3. Amostras de sangue negativas

Foram doadas ao Laboratório de Toxicologia do Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho da FMUSP duas bolsas de sangue que seriam descartadas pela Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo. Essas amostras foram utilizadas durante a validação da metodologia. À elas foram adicionadas concentrações conhecidas de cada analito para avaliação dos parâmetros durante a validação.

3.1.4. Amostras de pacientes vítimas de acidentes de trânsito

As amostras foram obtidas de um projeto maior, denominado “Fatores relacionados com os acidentes de trânsito com vítimas atendida no Pronto Socorro Central e que ficaram internadas no Hospital das Clínicas da FMUSP”, que está sendo desenvolvido com apoio da FAPESP pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Toxicologia do Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho da FMUSP.

- **Casuística**

Para ser elegível, a vítima devia ser atendida com seis ou menos horas depois da ocorrência, ficar internada e concordar em participar do estudo, assinando o TCLE. Os pacientes que vieram a óbito no atendimento de emergência foram incluídos para análise toxicológica após consentimento do familiar mais próximo. Pacientes transferidos para

outras unidades hospitalares, menores de 18 anos e aqueles que não concordaram em participar da coleta inicial, foram excluídos do projeto.

- **Coleta**

Na unidade de emergência, realizou-se a coleta de 5 ml de sangue em dois tubos Vacutainer® contendo fluoreto de sódio/EDTA como anticoagulante com técnica de assepsia adequada sem o uso de solução alcoólica, além de avaliar a gravidade da lesão de acordo com o formulário em anexo.

3.2. Métodos

3.2.1. Procedimento para determinação de cocaína e produtos de biotransforamação em sangue

O preparo das amostras consiste em adicionar a um vial de vidro de 4 mL, 0,5ml de sangue, 15 μ l dos padrões internos de cocaína e cocaetileno e os próprios analitos (no caso da validação da metodologia). Adicionar 2,5ml de água MiliQ e 0,13g de uma mistura de NaHCO₃ e KCO₃ (2:1); a adição dos sais torna o pH da solução ao redor de 10. Ao final desta etapa, uma barra magnética é adicionada à mistura.

Em paralelo, duas fibra oca de polipropileno são imersas em dodecano, e retira-se o excesso do solvente. Uma a uma, com auxílio de uma ponteira de eletroforese em gel, seu lúmen é preenchido com ácido clorídrico 0,3mol/L e é colocada em formato de "U" no interior da fase doadora. O sistema é submetido a 30 minutos de agitação a 1500 rmp e a 45°C. Após esse período, novamente com o auxílio de uma nova ponteira de eletroforese em gel, a solução do interior da fibra é transferida para um vial de 1ml para secagem a 40°C sob fluxo de N₂.

Os analitos são ressuspensos pela adição de 50 μ l de acetato de etila e o conteúdo é introduzido em um insert, para injeção no CG-MS.

3.2.2. Condições cromatográficas

Foram aplicadas as seguintes condições cromatográficas para separação dos analitos da cocaína:

- Temperatura do injetor: 250°C
- Fluxo do gás de arraste (He): fluxo constante de 0,61 mL/min.
- Rampa de aquecimento:

Tabela 1 - Rampa de aquecimento do CG-MS.

Taxa de aumento (°C/min)	Temp. final (°C)	Permanência na temp.(min)
0	90	1
15	250	2
25	280	2

A injeção se deu pelo modo *splitless* e o espectrômetro de massas operou no modo SIM com a fonte de íons a 260°C e temperatura da interface de 280°C.

Os íons utilizados para identificação dos analitos estão descritos da **Tabela 2**.

Tabela 2 – Íons utilizados na qualificação e quantificação dos analitos de cocaína e seus respectivos deuterados po CG-MS.

Analito	AEME	COC	COC-d3	CE	CE-d3
Íon (m/z)	<u>152</u>	<u>182</u>	<u>185</u>	<u>196</u>	<u>199</u>
	166	272	275	275	240
	181	303	306	320	346

* Os íons sublinhados foram utilizados para a quantificação dos analitos.

3.2.3. Otimização da metodologia

Após o desenvolvimento do método e anteriormente à etapa de validação o método foi otimizado via análise fatorial, sendo avaliados quatro fatores em dois níveis cada, resultando em um total de 16 tratamentos, buscando-se aquele que apresentasse a maior eficiência de extração. Em todos os tratamentos, as amostras foram fortificadas com 15µl dos padrões dos analitos e seus respectivos padrões internos na concentração de 10ug/ml.

Após análise dos dados, comprovou que a melhor combinação de fatores era a fase doadora com água destilada e sal, ácido clorídrico 0,3mol/L como fase aceptora, dodecano como solvente e trinta minutos de agitação do sistema.

Os parâmetros avaliados estão descritos na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Parâmetros avaliados durante a etapa de otimização do método.

Fator	Fase doadora	Fase aceptora	Solvente	Tempo de agitação
Nível	NaOH	Ác. Fórmico 0,1M	Éter diexílico	15 min
	H ₂ O + sal	Ác. Clorídrico 0,3M	Dodecano	30 min

3.2.4. Validação da metodologia

O método foi validado de acordo com guias nacionais e internacionais e foram estabelecidos os parâmetros de limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão intra e interensaio, exatidão, recuperação e carryover. (ANVISA, 2017; PETERS; DRUMMER; MUSSHOF, 2006; SWGTOX, 2013)

3.2.4.1. Limites de Detecção (LoD) e Quantificação (LoQ)

Limite de detecção caracteriza-se pela menor concentração de um analito que pode ser distinguida do ruído da linha de base e, para isso, pode ser determinado de diversas maneiras.

Primeiramente aplica-se o método extractivo sem adicionar os padrões dos analitos - o chamado limite do branco, determinando a linha de base do método. Após isso, concentrações decrescentes dos analitos são analisadas e, o LoD será a menor concentração que apresenta amplitude do pico três vezes maior que a linha de base.

O limite de quantificação corresponde à menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão. É realizado em conjunto com o LoD não podem exceder 20% de variação em relação ao valor de concentração esperada. (SWGTOX, 2013)

3.2.4.2. Linearidade

A linearidade avalia a capacidade do método em obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração dos analitos nas amostras de sangue. (ANVISA, 2017)

Recomenda-se que este parâmetro seja avaliado em pelo menos 5 diferentes concentrações com o mínimo de duas replicatas.

O modelo linear só será válido se o coeficiente de correlação estiver acima de 0,990 e quando comprovado a homogeneidade das variâncias dos resultados obtidos. Para isso, realiza-se o estudo da homoscedasticidade e, caso as variâncias não coincidam, o modelo deve ser ajustado pelo método da regressão linear ponderada ou outro modelo não-linear (ALMEIDA; CASTEL-BRANCO; FALCAO, 2002; PETERS; DRUMMER; MUSSHOF, 2006).

A relação matemática entre a resposta obtida e a concentração do analito pode ser descrita pela equação da reta:

$$y = ax + b$$

Onde:

y = resposta obtida (área relativa entre o analito e seu respectivo padrão interno)

a = inclinação da curva

x = concentração do analito

b = intersecção com o eixo y, quando x=0

Sendo assim, a curva de calibração foi adquirida avaliando a resposta obtida pelas concentrações de 50, 200, 400, 600, 800, 1000ng/ml

3.2.4.3. Precisão intra e inter-ensaio

Precisão é o parâmetro que avaliar a proximidade dos resultados quando analisadas diversas amostras na mesma concentração, submetidas às mesmas condições. Em procedimentos quantitativos devem ser medidos dois tipos: intra-ensaio,

também chamada de repetibilidade, que expressa a precisão realizada no mesmo dia; e o inter-ensaio, que garante que o método é capaz de fornecer os mesmos resultados quando analisados no mesmo laboratório, porém em dias diferentes ou por outro analista ou em diferentes laboratórios. (ANVISA, 2017; PETERS; DRUMMER; MUSSHOF, 2006)

Esse parâmetro deve ser conduzido em três dias consecutivos com pelo menos cinco replicatas de concentrações baixa, média e alta (80, 400 e 800ng/ml), contempladas no intervalo linear do método.

O desvio padrão considerado aceitável, que determina que o método é preciso, é de 20% para concentração baixa e 15% para as concentrações média e alta. Os dados foram avaliados pela ANOVA fator único. (SWGTOX, 2013)

3.2.4.4. Exatidão

A exatidão avalia a proximidade dos valores obtidos pelo método extrativo em comparação com o valor nominal esperado. (PETERS; DRUMMER; MUSSHOF, 2006)

Este parâmetro é conduzido juntamente com a precisão, sendo necessário também avaliar cinco replicatas de três concentrações diferentes em três dias consecutivos.

É expressa em porcentagem, calculada a partir da fórmula:

$$\% = \frac{\text{média da concentração obtida} - \text{concentração nominal}}{\text{concentração nominal}} \times 100$$

O seu critério de aceitação é de até 20% para concentração baixa e de 15% para as concentrações média e alta.

3.2.4.5. Carryover

O efeito *carryover* é definido por resquícios de analitos provenientes de amostras anteriores que são detectados nas amostras subsequentes. Isso pode acontecer devido ao acúmulo da substância, no injetor, no *liner* ou na coluna. Quando esse fenômeno é observado, a concentração obtida pode ser superestimada.

Para avaliar a influência desse efeito, amostras de branco são analisadas posteriormente a injeção de uma amostra de concentração alta. (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003.)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Cromatogramas

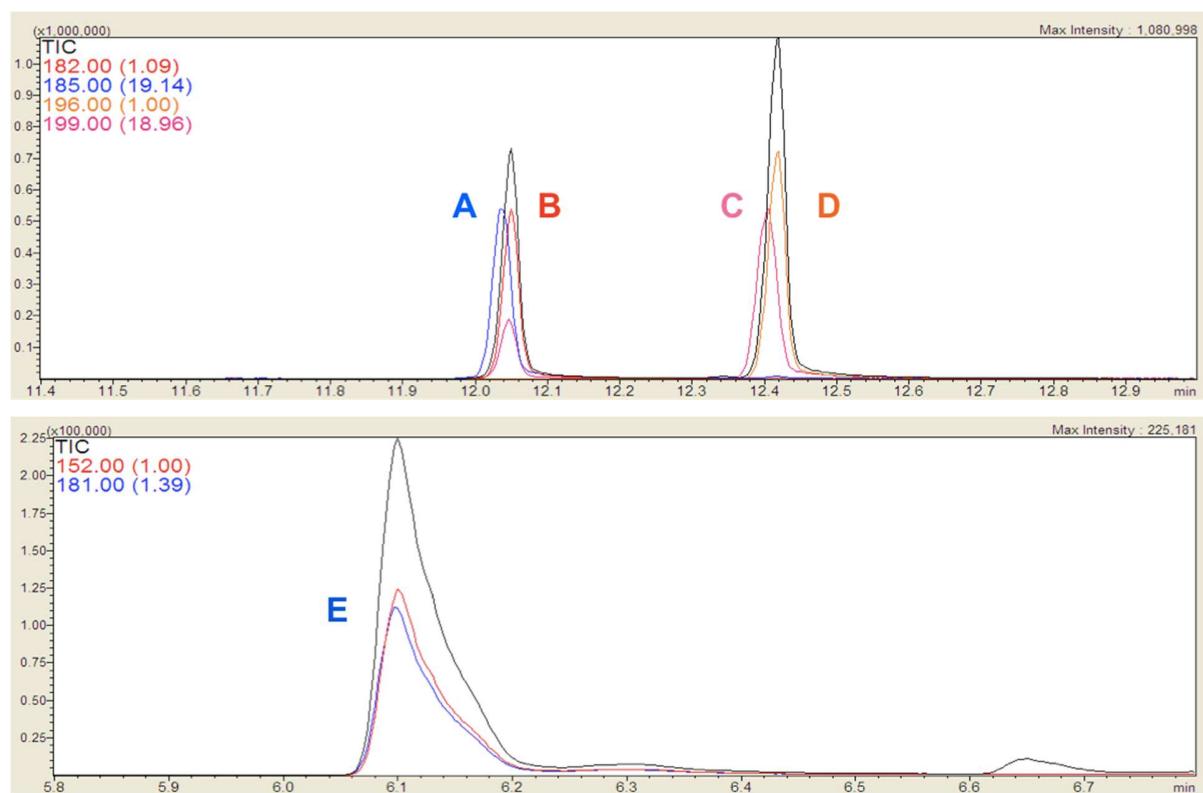


Figura 3 – Cromatogramas de amostras negativas de sangue, adicionada dos padrões da COC(B), COCd3(A), CE(D), CE_d3(C) e AEME(E).

Como observado nos cromatogramas acima, os picos obtidos para os analitos da cocaína e cocaetileno apresentam boa resolução, seletividade e eficiência. Porém, quando analisado o pico cromatográfico da AEME, este apresenta uma má eficiência extrativa, já que observa-se um alargamento de sua base. A dificuldade de analisar os

três analitos com eficiência, seletividade e resolução pode ser explicada pelas diferentes características físico-químicas de cada molécula. A cocaína apresenta valores muito próximos de pKa e LogP, quando comparado ao cocaetileno ($pK_a=8,85$, $\text{LogP}=2,3$; $pK_a=8,77$, $\text{LogP}=2,7$). (DRUGBANK). Sendo assim, é de se esperar que que ambas moléculas, submetidas as mesmas condições cromatográficas e de pré-extração, tenham perfis de extração parecidos. Em se tratando do AEME, a busca queda do LogP (1,1) e o aumento da alcalinidade da molécula ($pK_{a1}=9,04$, $pK_{a2}= 14,6$) (DRUGBANK) alteram seu comportamento quando submetida às mesmas condições. Fato que pode ser observado no alargamento da base do pico cromatográfico.

4.2. Validação da metodologia

4.2.1. Limite de Detecção e Quantificação

Os resultados de limite de detecção obtidos neste trabalho diferem um pouco dos obtidos em outros estudos científicos. Não existem estudos na literatura que quantificam cocaína e seus metabólitos no sangue através de LPME. Ao analisar o sangue, utilizando extração em fase sólida (SPE) e CG-MS, Bravo et al., 2012 obteve, para a cocaína, 3,6ng/ml de LoD e 10,9 ng/ml de LoQ. Ainda utilizando esse método extrativo, Yang et al, 2006, encontrou para cocaína, o valor de 2.5ng/ml e para a anidroecgonina metil éster, 5ng/ml.

Ainda utilizando sangue, Takitane et al., 2018, desenvolveu um método por LLE e analisou seus resultados por meio de UHPLC-MS/MS e obteve para cocaína, cocaetileno e anidroecgoninametiléster os valores, respectivamente de 0,3ng/ml, 0,3ng/ml e 0,4ng/ml de limite de detecção, e para o limite de quantificação, 0,7ng/ml para cocaína, 0,8ng/ml para cocaetileno e 1ng/ml para anidroecgoninametiléster.

Nesse caso, o alcance de limites tão baixos é devido ao uso do equipamento muito mais sensível, todavia o equipamento utilizado é muito mais caro, não se enquadrando no cenário da toxicologia brasileira.

Silveira, et al., ao analisar leite materno, via LPME, encontrou os valores de LoD de 6ng/ml para cocaína e 7ng/ml para cocaetileno e, em relação aos valores de LoQ, 10ng/ml e 12ng/ml, para cocaína e cocaetileno, respectivamente. Valores muito próximos com os obtidos no presente trabalho.

Os limites estão apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Limites de detecção (LoD) e de quantificação (LoQ) dos analitos de cocaína.

Analito	LoD (ng/ml)	LoQ (ng/ml)
AEME	9	9
COC	9	9
CE	9	9

4.2.2. Linearidade

As equações das retas das curvas de calibração e os coeficientes de correlação linear estão descritos na **Tabela 5**.

Como observado, os resultados encontrados para COC e CE estão dentro dos limites especificados. Porém, mais uma vez, o AEME encontra dificuldade de se encaixar nos parâmetros estabelecidos.

Uma boa curva de calibração é aquela que apresenta um modelo linear, com um R^2 superior a 0,990. Apenas assim o método é confiável para inferir a concentração de amostras desconhecidas.

A análise de variância dos analitos foi realizada e todos se apresentam heteroscedásticos, sendo assim, o modelo teve que ser ajustado, de acordo com a regressão linear ponderada.

Para o CE, a regressão que apresentou a menor porcentagem de soma dos resíduos foi a ponderação $1/Y^2$ e o melhor método foi o $1/X^2$ para a COC e AEME. (ALMEIDA; CASTEL-BRANCO; FALCAO, 2002).

Tabela 5 – Curva de calibração e coeficiente de correlação linear (R^2) dos analitos de cocaína.

Analito	Ponderação	Curva de calibração	Coeficiente de correlação linear (R^2)
AEME	1/ X^2	$y = 0,0066 - 0,24651$	0,918
COC	1/ X^2	$y = 0,01501 - 0,02687$	0,997
CE	1/ Y^2	$y = 0,0214 - 0,24651$	0,999

4.2.3. Precisão e Exatidão

De acordo com os resultados apresentados na **Tabela 6**, o método mostrou-se preciso e exato para os analitos COC e CE, entretanto o mesmo não foi observado para o AEME. As diferentes características físico-químicas discutidas anteriormente podem diminuir a precisão do método, uma vez que a má interação com o solvente impregnado na fibra e as ionizações distintas dos grupos funcionais, impedem sua boa captação para o interior da fibra. Em relação a exatidão, a curva de calibração não ideal para o AEME, interfere em seus valores, impedindo um bom resultado. Ademais, não existe no mercado o padrão deuterado dessa molécula e, uma vez que a função do padrão interno é eliminar os erros provenientes do analista e do equipamento, é necessário que este seja o mais parecido com o analito, certificando que as mesmas variações ocorram em ambas moléculas.

Os cálculos das áreas relativas do AEME em todas as concentrações realizadas foram feitos usando o COC-d3 e CE-d3 como padrão interno, separadamente e não houve diferenças significativas em seus resultados.

Tabela 6 – Precisão e exatidão dos analitos de cocaína.

Analito	Concentração (ng/ml)	Precisão		Exatidão (%; n=5)
		Intra ensaio (RDS%; n=5)	Inter ensaio (RDS%; n=5; dias=3)	
AEME	80	81,03	96,36	85,54
	400	85,67	76,58	48,74
	800	82,84	64,58	54,08
COC	80	97,43	95,60	91,95
	400	94,07	96,58	92,75
	800	97,54	97,66	96,01
CE	80	97,73	96,96	95,65
	400	98,53	97,94	92,54
	800	98,48	98,36	96,22

4.2.4. Carryover

Após a prévia injeção de uma amostra contendo 1200ng/ml dos analitos não foi observado o efeito de *carryover* nas amostras de branco subsequentes, como esperado.

4.3. Análise das amostras dos pacientes vítimas de acidentes de trânsito

Do projeto “Fatores relacionados com os acidentes de trânsito com vítimas atendida no Pronto Socorro Central e que ficaram internadas no Hospital das Clínicas da FMUSP” foram selecionadas oito amostras previamente determinadas como positivas para os analitos da cocaína, afim de determinar se o método proposto é adequado para analisar amostras de indivíduos que fizeram uso da droga. Os resultados estão apresentados na **Tabela 7**.

Tabela 7 – Resultados das análises das amostras de sangue de pacientes.

Amostra	AEME	COC (ng/ml)	CE (ng/ml)
1	+	20,1	22,37
2	-	14,74	9,31
3	-	23,26	19,86
4	-	31,59	14,48
5	+	5,53	4,97
6	-	12,99	12,86
7	-	39,21	0
8	-	9,04	6,05

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho, além de utilizar menores quantidades de solventes, diminuindo o custo da análise e o impacto ambiental, se mostrou eficaz para prosseguir com a quantificação de COC e CE, porém apenas podemos utilizá-lo como método qualitativo para determinação de AEME.

Desse modo, o método é apropriado para estabelecer a relação entre o consumo da cocaína em suas duas formas de consumo, sendo possível ainda, determinar se houve uso concomitante ao etanol.

A contribuição do projeto é importante pois, pode-se detectar e monitorar continuadamente a evolução da geração de acidentes pela influência da cocaína, sendo possível determinar a escala do problema e desenvolver medidas apropriadas. Porém, vale ressaltar que não é apenas a proibição de seu consumo que é importante diminuir os riscos gerados quando em conjunto com a direção. A conscientização de seus efeitos e riscos relacionados e o aconselhamento e tratamento dos usuários são de suma importância para diminuir a prevalência dos acidentes de trânsito. (OMS, 2016)

6. BIBLIOGRAFIA

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **RDC No 166, de 24 de julho de 2017.** Validação de métodos analíticos, 2017.

ALLEN, K. R. Screening for drugs of abuse: Which matrix, oral fluid or urine? **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 48, n. 6, p. 531–541, 2011.

ALMEIDA, A.M.; CASTEL-BRANCO, M.M.; FALCÃO, A.C. Liner regression for calibrations lines revisited: qeighting schemes for bioanalytical methods. **Jornal of Chromatography B**, v.774, p. 215-222, 2002.

ALSHARIF, A. M. A. et al. Efficiency of hollow fiber liquid-phase microextraction chromatography methods in the separation of organic compounds: A review. **Journal of Chromatographic Science**, v. 55, n. 3, p. 378–391, 2017.

BALBINOT, A. B.; ZARO, M. A.; TIMM, M. I. Funções psicológicas e cognitivas presentes no ato de dirigir e sua importância para os motoristas no trânsito. **Ciências & Cognição**, v. 16, n. 2, p. 13–29, 2011.

BRAVO, F. et al. Validation of a method to detect cocaine and benzoylecgonine in human whole blood by gas chromatography-mass spectrometry and application in body packers and stuffers cases in the North of Chile. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 57, n. 3, p. 1253–1255, 2012.

BROWN, T.; MILAVETZ, G.; MURRAY, D. J. Alcohol, drugs and driving: implications for evaluating driver impairment. **Annals of advances in automotive medicine. Association for the Advancement of Automotive Medicine. Annual Scientific Conference**, v. 57, p. 23–32, 2013.

CARVALHO, H. B. DE et al. Alcohol and drug involvement in motorcycle driver injuries in the city of São Paulo, Brazil: Analysis of crash culpability and other associated factors. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 162, p. 199–205, 2016.

CARVALHO, V. M.; DA MATTA CHASIN, A. A.; DE CARVALHO, D. G. A study on the stability of anhydroecgonine methyl ester (crack biomarker), benzoylecgonine, and cocaine in human urine. **Revista de Psiquiatria Clinica**, v. 35, n. 1, p. 17–20, 2008.

Companhia de Engenharia de Tráfego – CET. **Relatório Anual de Acidentes de Trânsito**. São Paulo, 2017.

Confederação Nacional do Transporte – CNT. **Acidentes Rodoviários e a Infraestrutura**. Distrito Federal, 2018.

COSTA, R. M. R. **O álcool e seus efeitos no Sistema Nervoso**. 2003. 17f. Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas – Faculdade de Ciências da Saúde, Centro Universitário de Brasília, Distrito Federal, 2003.

DE OLIVEIRA, A. R. M. et al. Microextração em fase líquida (LPME): Fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 637–644, 2008.

DORTA, D.J. et al. **Toxicologia Forense**. 1 ed. São Paulo, Blucher, 2018.

Drug Bank. Disponível em: <<https://www.drugbank.ca/>>. Acesso em: 10/04/2019.

DRUMMER, O.H. et al. The incidence of drugs in drivers killed in Australian road traffic crashes. **Forensic Science International**, v. 134, p. 154–162, 2003.

DUSSAULT, C. et al. The Contribution of Alcohol and Other Drugs Among Fatally Injured Drivers in Quebec : Some Preliminary Results. n. August, p. 1–9, 2002.

ELLER, S.C.W.S. **Estudo da incerteza de medição em análises toxicológicas de substâncias psicoativas em urina**. Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

ELVIK, R. Risk of road accident associated with the use of drugs: A systematic review and meta-analysis of evidence from epidemiological studies. **Accident Analysis and Prevention**, v. 60, p. 254–267, 2013.

European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction – EMCDDA. **Drug use, impaired driving and traffic accidents**, ed.2, Luxemburg, 2014

FILIPPOU, O.; BITAS, D.; SAMANIDOU, V. Green approaches in sample preparation of bioanalytical samples prior to chromatographic analysis. **Journal of Chromatography B**. v.1043, p. 44-62, 2017.

GJERDE, H; ØIESTAD, E.L. Using biological samples in epidemiological research on drugs of abuse. **Norsk Epidemiologi**, v. 21, p. 5-14, 2011

HO, T.S.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K.E. Recovery, enrichment and selectivity in liquid-phase microextraction Comparison with conventional liquid–liquid extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 963 p. 3–17, 2002.

JONES, A. W. Measuring Alcohol In Blood and Breath for Forensic Purposes: A Historic Review. **Forensic Science Review**, v. 8, p. 43, 1996.

- KATAOKA, H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 4, p. 232–244, 2003.
- LI, G.; BRADY, J. E.; CHEN, Q. Drug use and fatal motor vehicle crashes: A case-control study. **Accident Analysis and Prevention**, v. 60, p. 205–210, 2013.
- MACDONALD, S.; MANN, R.E. Collisions and traffic violations of alcohol, cannabis and cocaine abuse clients before and after treatment. **Accident Analysis and Prevention**, v. 36, p. 795–800, 2004.
- MAURER, H.H.; SAUER, C; THEOBALD, D.S. Toxicokinetics of Drugs of Abuse: Current Knowledge of the Isoenzymes Involved in the Human Metabolism of Tetrahydrocannabinol, Cocaine, Heroin, Morphine, and Codeine. **Ther Drug Monit** , v. 28, p. 43, 2006.
- MERIB, J.; CARASEK, E. Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME): Fundamentos e aplicações recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 4, p. 249–262, 2014.
- MOVIG, K.L.L. et al. Psychoactive substance use and the risk of motor vehicle accidents. **Accident Analysis prevention**, v. 36, p. 631-636, 2004.
- NEVES, G.O. **Caracterização de Amostras de Cocaína Apreendidas pela Polícia Civil do Estado de Rondônia**. Porto velho, 2013. 86p. Dissertação -Fundação Universidade Federal de Rondônia, 2013.
- OCANA-GONZALEZ, J.A. et al. New developments in microextraction techniques in bioanalysis. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 905, p. 8-23, 2016.
- OGA, S; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A.O. **Fundamentos de Toxicologia**. 2 ed. São Paulo. Atheneu Editora, 2003.
- Organização Mundial da Saúde – OMS. **Drug use and road safety: a policy brief**. Geneva, 2016.
- Organização Mundial da Saúde - OMS. **Global status report on road safety**. Geneva, 2018
- PEDERSEN-BJERGAARD, S; RASMUSSEN, K.E. Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid–liquid extraction. **Journal of Chromatography A**, v.1184, p.132-142, 2008.

PEREIRA, L.L. **Aspectos Toxicológicos e Sociais Relacionados à Cocaína e ao Crack.** 2012. 61f. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia – Universidade Católica de Brasília, Distrito Federal, 2012.

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

PSILLAKIS, E., KALOGERAKIS, N. Developments in liquid-phase microextraction. Trends in Analytical Chemistry, v. 22, n. 9, p. 565 - 574, 2003.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Methods of extraction and/or concentration of compounds found in biological fluids for subsequent chromatographic determination. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68–76, 2001.

TAKITANE, J. et al. Determination of cocaine, metabolites and a crack cocaine biomarker in whole blood by liquid–liquid extraction and UHPLC–MS/MS. **Forensic Science International**, v. 289, p. 165–174, 2018.

SCIENTIFIC WORKING GROUP FOR FORENSIC TOXICOLOGY – SWGTOX. **Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology**, Rev. 1, 2013.

SILVEIRA, G.O. et al. Development of a method for the determination of cocaine, cocaethylene and norcocaine in human breast milk using liquid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Forensic Science International**, v.265. p.22-28, 2016.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J., CROUCH, S.R. **Principles of Instrumental Analysis**. 6 ed. EUA, Brooks/Cole, 1998.

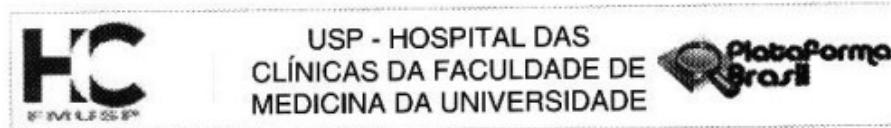
STODUTO, G; MANN, R.E. Examining the link between collision involvement and cocaine use. **Drug and Alcohol Dependence** , v. 123, p. 260-263, 2013.

STORPITIS, S. et al. **Farmacocinética Básica e Aplicada**. 1 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2011.

WOLFF, K.; WHITE, J.; KARCH, S. **The SAGE Handbook of drug & alcohol studies volume 2**. Londres. SAGE Publications, 2016.

YANG, W. et al. Simultaneous quantification of methamphetamine, cocaine, codeine, and metabolites in skin by positive chemical ionization gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 833, n. 2, p. 210–218, 2006.

7. ANEXOS



USP - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Fatores relacionados com os acidentes de trânsito nas vítimas internadas de acordo com a gravidade e funcionalidade.

Pesquisador: Julia Maria D'Andrea Greve

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 67919517.3.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.071.227

Apresentação do Projeto:

Os recursos do Sistema Único de Saúde (SUS) aplicados no atendimento aos pacientes que entram nas unidades de emergência, hospitais e centros de reabilitação pelas causas externas de morbimortalidade vêm aumentando, particularmente pelo aumento do número e gravidade das lesões decorrentes dos acidentes de trânsito. Faltam dados de morbidade nacional, mas os dados do Sistema de Informação de Mortalidade do Ministério da Saúde (SIM/MS) mostram a progressão destes números nos últimos dez anos, fato que certamente está relacionado com a crescente morbidade desses eventos. São várias as causas externas, mas dentre estas se destacam os acidentes de trânsito pela prevalência e gravidade das lesões. Conforme relato da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2010 morreram 1,24 milhões de pessoas por acidentes de trânsito e metade destas mortes foram de pedestres, ciclistas e motociclistas e 92% delas ocorreram nos países com renda baixa e média. A proporção média de mortes por acidente de trânsito no Brasil é de 19,9/100 mil habitantes, acima da média mundial de 18/100 mil habitantes. Comparado com países semelhantes em nível de desenvolvimento e tempo de motorização, o Brasil tem taxas semelhantes às do México, mas acima da Argentina e do Chile. Os dados anuais da CET – São Paulo mostram diminuição do número de acidentes pelo número de veículos, mas com menor repercussão na mortalidade, havendo, inclusive, aumento do número de pedestres.

Endereço: Rua Ovidio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira César CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fmr.usp.br

Página 01 de 04



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parágrafo: 2.071.227

mortos nos anos de 2013 e 2014. Acidentes com motocicletas continuam sendo a segunda causa de mortes, também, mostrando aumento em 2014. Os dados do HCFMUSP de 2010 mostram que 43% dos atendimentos do Pronto-Socorro Cirúrgico foram traumas e dentre as vítimas mais graves internadas, predominam os acidentes automotores, com destaque para os atropelamentos, seguido pelas motocicletas. No Pronto Socorro do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do HCFMUSP (PSIOT), no ano de 2010 foram atendidos 6848 pacientes por trauma, dos quais 19,3 % (1284) foram acidentes de trânsito, dentre os quais, 582 (45% dos acidentes de trânsito) foram acidentes com motocicletas. Segundo a Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo de 2003 a 2013, houve aumento de 20% no número de casos graves atendidos na unidade de emergência do IOT- HCFMUSP, principalmente por politraumas com fraturas complexas e múltiplas. Este aumento é atribuído à melhoria do atendimento pré-hospitalar, mas também, ao grande número de acidentes de motocicleta com impactos de alta energia. Muitos dos pacientes, acima referidos, cursam com sequelas graves, que demandam um longo período de tratamento e nem sempre voltam às condições de vida prévia ao acidente. Ainda que, os dados de morbidade sejam pontuais, é evidente a associação da gravidade das lesões com os acidentes que envolvem pedestres, ciclistas e motociclistas, principalmente porque o HCFMUSP é o centro de referência de atendimento das lesões traumáticas de alta complexidade. Reconhecer e conhecer o problema nas suas causas, extensão e consequências, avaliando quais são os principais fatores implicados com os acidentes de trânsito é o primeiro passo para que se possa desenvolver programas e políticas que sejam eficientes na sua prevenção. A análise inicial mostra a carência de estudos sobre as causas (fatores relacionados) e a repercussão na morbidade dos acidentes de trânsito. A maioria das pesquisas usam dados de mortalidade e do número de internações, mas não se aprofundam na relação entre os fatores causais e a gravidade das lesões das vítimas e incapacidades geradas. Este presente estudo pretende avaliar e identificar quais são os fatores associados com as internações por acidentes de trânsito no Hospital das Clínicas das FMUSP e qual a relação destes fatores com a gravidade das lesões no momento da ocorrência e trinta dias após a internação. JUSTIFICATIVA: O atendimento às vítimas de acidentes de trânsito que necessitam de internação drena parte significativa dos recursos SUS pela gravidade e complexidade das lesões e há necessidade de se avaliar quais os principais fatores associados a estas ocorrências, para que se implantem políticas públicas de prevenção eficientes que sejam baseadas em evidências científicas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira César CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappeaq.adm@hc.fmn.usp.br

Página 02 de 04



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 2.071.227

- Identificar quais os principais fatores relacionados com os acidentes de trânsito:
- Entrevista com vítima/ acompanhante:
 - _Pessoais: dados demográficos, habilitação e histórico relatado de infrações, acidentes anteriores; tipo de vítima. Veículo (s) envolvido (s). Circunstâncias e local de ocorrência do acidente; tipo de acidente. Condições da via de ocorrência do acidente.
 - _Análise toxicológica do sangue sobre o uso de drogas psicoativas.
- Objetivo Secundário:
 - Avaliar a gravidade dos casos internados a partir da coleta dos índices de gravidade: RTS (internação), Escala de coma Glasgow, AIS(indice de gravidade abreviados) e ISS (índice geral de gravidade).
 - Correlacionar os índices de gravidade na sala de emergência com os dados coletados na entrevista.
 - Avaliar impacto na funcionalidade 30 dias após a ocorrência com a aplicação da Medida de Independência Funcional.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Risco mínimo para pacientes e pesquisadores.

Benefícios: não tem benefícios diretos para os pesquisados, no entanto, ao levantarmos as causas dos acidentes, ações preventivas poderão ser sugeridas aos órgãos competentes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Desfecho Primário: Relação das drogas com os números de acidentes.

Desfecho Secundário: Caracterização sócio demográfica e das características dos acidentes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram todos apresentados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não apresenta óbices éticos que impeçam sua aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Corqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Página 03 de 24



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer 2.071.227

conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJECTO_826495.pdf	04/05/2017 08:41:27		Aceito
Outros	CadastroDaPesquisa15904.pdf	04/05/2017 08:40:53	Julia Maria D'Andréa Greve	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto15904.pdf	04/05/2017 08:40:24	Julia Maria D'Andréa Greve	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_final.docx	24/04/2017 16:19:00	Julia Maria D'Andréa Greve	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	24/04/2017 16:16:04	Julia Maria D'Andréa Greve	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 18 de Maio de 2017

Assinado por:

ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Carqueirão Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Página 04 de 04

PLANILHA COLETA DE DADOS VÍTIMAS ACIDENTES INTERNADOS

Data: ____/____/201.. Horário atendimento: ____:

Coletor: _____

LOCAL COLETA: Cirurgia () IOT () UTI() Neurologia () Queimados ()
Cirurgia Plástica ()

NOME VÍTIMA: _____

REGISTRO HOSPITALAR: _____ **NÚMERO LEITO:** _____
LOCAL INTERNAÇÃO: _____

IDADE: ____ anos **GÊNERO:** () Fem. () Masc.
RACA: () Branca () Parda () Negra () Amarela

NÍVEL DE INSTRUÇÃO: ()Fund. incompleto ()Fund. Completo () Médio incompleto ()Médio
completo () Superior

PROFISSÃO: _____ **DESEMPREGADO:** () Sim () Não

DOENÇAS: () Hipertensão () Diabetes () Cardiopatia
() Doença musculoesquelética () Depressão () Doença digestiva
() Outras _____

TIPO DE ACIDENTE:

() Colisão frontal () Colisão lateral () Capotamento () Queda () Atropelamento pedestre

VÍTIMA: () Condutor () Passageiro () Pedestre () Ciclista

VEÍCULO: () Motocicleta () Carro () Bicicleta () Pedestre

VC TEM PREVIDÊNCIA: () Sim () Não

JÁ SE ENVOLVEU EM OUTROS ACIDENTES? () Sim () Não

QUANTOS? ____ **COMO CONDUTOR?** () Sim () Não

FUMANTE: () Sim () Não **DROGAS:** () Sim () Não

QUAL? _____

MEDICAMENTOS PSICOTRÓPICOS () Sim () Não **QUAL?** _____

ALCOOLIZADO NO MOMENTO: () Sim () Não *(de acordo com a percepção do paciente)*

SOB EFEITO DE DROGAS NO MOMENTO DO ACIDENTE: () Sim () Não (de acordo com a percepção do paciente)

QUAIS DROGAS SÃO VOCÊ USA COM MAIS FREQUÊNCIA? () cocaína () maconha () heroína () outras

CONSUMO DE ÁLCOOL SEIS HORAS ANTES DO ACIDENTE

Nas 6 horas que antecederam a sua lesão, você consumiu álcool – até mesmo uma única dose? ()
Sim () Não

Que horário você começou a beber?	
Data	d d m m y y y y
Horário	h h m m
Quantas horas/minutos se passaram entre o consumo da última dose e a hora do acidente/ferimento?	

CONSUMO DE ÁLCOOL UMA SEMANA ANTES

Pensando na semana anterior no mesmo momento do acidente, você havia bebido qualquer quantidade de álcool nas seis horas que antecederam esse momento? () Sim () Não

Ainda pensando na semana anterior no mesmo momento, o que você havia bebido? Quantas doses consumiu?

HÁBITOS CONSUMO DE ÁLCOOL 12 MESES ANTES

Nos últimos 12 meses, com que frequência você bebe tipicamente qualquer tipo de bebida alcoólica?

- () Todos os dias
- () Quase todos os dias
- () 3 ou 4 vezes por semana
- () Uma vez ou duas por semana
- () 2 ou 3 vezes por mês
- () Por volta de uma vez por mês
- () 6-11 vezes por ano
- () 1-5 vezes por ano
- () Nenhum álcool durante os últimos 12 meses
- () Desconhecido

CONSUMO DE DROGAS SEIS HORAS ANTES DO ACIDENTE

Nas 6 horas que antecederam o acidente, você consumiu drogas (maconha, cocaína) – () Sim () Não

Que horário você começou a usar drogas?	
Data	d d m m y y y y
Horário	h h m m
Quantas horas/minutos se passaram entre o consumo da última dose e a hora do acidente?	

UMA SEMANA ANTES

Pensando na semana anterior no mesmo momento do acidente, você havia usado qualquer tipo de droga nas seis horas que antecederam esse momento? () Sim () Não

Ainda pensando na semana anterior no mesmo momento, o que você usou? Que drogas consumiu?

HÁBITOS CONSUMO 12 MESES ANTES

Nos últimos 12 meses, com que frequência você usa drogas?

- () Todos os dias
() Quase todos os dias
() 3 ou 4 vezes por semana
() Uma vez ou duas por semana
() 2 ou 3 vezes por mês
() Por volta de uma vez por mês
() 6-11 vezes por ano
() 1-5 vezes por ano
() Nenhum álcool durante os últimos 12 meses
() Desconhecido

CONSCIENTE: () Sim () Não (momento do acidente) RTS INICIAL: _____ (0 a 8)

$$\text{Cálculo RTS} = (0,9368 \times \text{ECG.v}) + (0,7326 \times \text{PAS.v}) + (0,2908 \times \text{FR.v})$$

$$(0,9368 \times \underline{\hspace{1cm}}) + (0,7326 \times \underline{\hspace{1cm}}) + (0,2908 \times \underline{\hspace{1cm}})$$

ESCALA COMA GLASGOW	v	Pressão Arterial Sistólica (mm hg)	v	Freq Resp. (min)	v
13-15	4	>89	4	10-29	4
9-12	3	76-89	3	>29	3
6-8	2	50-75	2	6-9	2
4-5	1	1-49	1	1-5	1
3	0	0	0	0	0

Variáveis de 0 a 4

(Observação – coletar informações prontuário)

COLETA MATERIAL

Número Coleta Sangue: _____

DIAGNÓSTICO: () Politrauma () Fratura MMII () Fratura MMSS () TCE () TRM
() Lesão pélvica

DESFECHO: () Internação () Óbito na sala de emergência

DATA ACIDENTE: _____ / _____ /201.. HORÁRIO ACIDENTE: _____ : _____

DIA SEMANA: () Domingo () 2º feira () 3º feira () 4º feira () 5º feira
() 6º feira () Sábado

ENDEREÇO ACIDENTE: _____

CLIMA HORÁRIO ACIDENTE: () Bom () Chuva () Neblina

LUMINOSIDADE: () Dia () Noite () Fausa-fausa

ACIDENTE COM MOTOCICLETA

MOTOFRETISTA: () Sim () Não

CARREGAVA PASSAGEIRO: () Sim () Não

OUTRO VEÍCULO ENVOLVIDO: () Sim () Não

ACIDENTE CORREDOR DE MOTOCICLETA: () Sim () Não (*motocicleta*)

DESCRIÇÃO LOCAL ACIDENTE: () Cruzamento () Via Expressa (*sem farol*) () Via velocidade média
() Via velocidade baixa

FOI FECHADO POR OUTRO VEÍCULO: () Sim () Não

CARACTERÍSTICAS DO LOCAL: () Buraco () Óleo pista () Areia () Água () Valeta
() Lombada () Outra (descrever): _____

EQUIPAMENTOS SEGURANÇA MOTOCICLISTA: () Capacete () Bota () Jaqueta

EQUIPAMENTOS SEGURANÇA MOTOCICLETA: () Mata-cachorro () Antena

ESTAVA USANDO CELULAR NO MOMENTO DO ACIDENTE: () Sim () Não

MOTOCICLETA - CILINDRADAS: () Até 125 () 126-250 () 251-400 () Maior 400

MOTOCICLETA PRÓPRIA: () Sim () Não ANO DE FABRICAÇÃO: _____

COMPROU A MOTO USADA: () Sim () Não

FAZ REVISÕES PERIÓDICAS: () Sim () Não DATA ÚLTIMA REVISÃO: _____

QUANTO TEMPO POSSUI MOTO: _____ meses/anos

QUANTAS MOTOS JÁ TEVE: _____ QUANTO TEMPO TEM HABILITAÇÃO: _____ meses/anos

COMO APRENDEU A DIRIGIR MOTOCICLETA: () Sozinho () Parentes/Vizinhos () Motoescola
() Outro

FEZ ALGUM CURSO DE DIREÇÃO DEFENSIVA: () Sim () Não

OPINIÃO ACIDENTADO CULPADO? () Sim () Não () Talvez

CAUSA DO ACIDENTE: () Falha pessoal () Outro veículo () Condição tempo () Condição via
() Falha mecânica

Observações:

ATROPELAMENTO

VEÍCULO ATROPELADOR: () Moto () Carro () Ônibus () Caminhão () Bicicleta () Caminhão

ATROPELAMENTO CORREDOR DE MOTOCICLETA: () Sim () Não

DESCRIÇÃO LOCAL ACIDENTE: () Cruzamento () Via Expressa (sem farol) () Via velocidade média
() Via velocidade baixa

LOCAL DO ATROPELAMENTO: () Cruzamento () Farol () Faixa () Meio quarteirão () Outra

ESTAVA USANDO CELULAR NO MOMENTO DO ACIDENTE: () Sim () Não *(incluir pedestre)*

OPINIÃO ACIDENTADO CULPADO? () Sim () Não () Talvez

CAUSA DO ACIDENTE: () Falha pessoal () Outro veículo () Condição tempo () Condição via
() Falha mecânica

Observações:

ACIDENTE COM VEÍCULOS DE QUATRO RODAS

TIPO ACIDENTE: () Colisão frontal () Colisão lateral () Capotamento

TIPO DE VEÍCULO ENVOLVIDO NO ACIDENTE: () Carro () Ônibus () Caminhão () Outro

TIPO DE VÍTIMA: () Condutor () Passageiro () Passageiro Veículo coletivo

EQUIPAMENTOS SEGURANÇA VEÍCULO QUATRO RODAS: () Cinto de segurança banco da frente
() Cinto de segurança banco de trás

ESTAVA USANDO CELULAR NO MOMENTO DO ACIDENTE: () Sim () Não

ESTAVA USANDO WAZE NO MOMENTO DO ACIDENTE: () Sim () Não

ESTAVA COM PASSAGEIRO NO VEÍCULO: () Sim () Não

VEÍCULO PRÓPRIO: () Sim () Não ANO DE FABRICAÇÃO: _____

COMPROU O VEÍCULO USADO: () Sim () Não

FAZ REVISÕES PERIÓDICAS: () Sim () Não DATA ÚLTIMA REVISÃO: _____

QUANTO TEMPO POSSUI VEÍCULO: _____ meses/anos

QUANTOS VEÍCULOS JÁ TEVE: _____ QUANTO TEMPO TEM HABILITAÇÃO: _____ meses/anos

COMO APRENDEU A DIRIGIR: () Sozinho () Parentes/Vizinhos () Motoescola () Outro

FEZ ALGUM CURSO DE DIREÇÃO DEFENSIVA: () Sim () Não

OPINIÃO ACIDENTADO CULPADO? () Sim () Não () Talvez

CAUSA DO ACIDENTE: () Falha pessoal () Outro veículo () Condição tempo () Condição via () Falha mecânica

Observações:

ACIDENTES COM CICLISTAS:

LOCAL DE OCORRÊNCIA: () Ciclovia () Pista () Calçada () Rodovia () Acostamento rodovia

DESCRIÇÃO LOCAL ACIDENTE: () Cruzamento () Via Expressa (sem farol) () Via velocidade média () Via velocidade baixa

TIPO DE OCORRÊNCIA: () Queda () Atropelamento () Colisão () Outro

USO DE EQUIPAMENTOS DE SEGURANÇA: () Capacete () Luvas

ESTAVA USANDO CELULAR NO MOMENTO DO ACIDENTE: () Sim () Não

HÁ QUANTO TEMPO USA A BICICLETA COMO VEÍCULO: _____ meses/anos

OPINIÃO ACIDENTADO CULPADO? () Sim () Não () Talvez

CAUSA DO ACIDENTE: () Falha pessoal () Outro veículo () Condição tempo () Condição via () Falha mecânica

Observações:



26.04.19

Data e assinatura do aluno(a)



26.04.19

Data e assinatura do orientador(a)