

Belo Horizonte, 01 de Junho de 2016

Ao Chefe do Departamento de Química – ICEX – UFMG
Prof. Dr. Dario Windmöller

Assunto: Elaboração de parecer.

Prezado professor,

Solicito a análise e parecer consubstanciado do projeto intitulado "Desenvolvimento de método para determinação de drogas de abuso e seus metabólitos em amostras de cabelo aplicando LC-MS/MS" para a submissão deste projeto no Comitê de Ética.

Certos de poder contar com a vossa colaboração, agradeço antecipadamente.



Prof. Helvécio Costa Menezes



Breno Frederico Pereira Paulo

Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

Instituto de Ciências Exatas – ICEX

Departamento de Química

Desenvolvimento de método para determinação de drogas de abuso e seus metabólitos em amostras de cabelo aplicando LC-MS/MS

Área de Concentração: Química Analítica

Linha de Pesquisa: Espectrometria de massas, Drogas de Abuso.

Nome do Mestrando: Breno Frederico Pereira Paulo

Orientador: Helvécio Costa Menezes

Co-orientadora: Zenilda de Lourdes Cardeal

Laboratório nº: 171

Belo Horizonte – MG

Junho de 2016

Título Público da Pesquisa:

Estudo post-mortem do uso de drogas de abuso em amostras de cabelos de motoristas no estado de Minas Gerais.

Título Principal da Pesquisa:

Desenvolvimento de método para determinação de drogas de abuso e metabólitos em amostras de cabelo aplicando LC-MS/MS.

Desenho:

Pretendemos coletar um número de até 100 amostras no Instituto Médico Legal de Belo Horizonte no segundo semestre de 2016 e início de 2017 para análise toxicológica de drogas de abuso no cabelo. A seleção dos doadores se dará pela disponibilidade de coleta, pela autorização da coleta para pesquisa pela família, para motoristas que tenham vindo ao óbito em decorrência de acidentes de trânsito no estado de Minas Gerais. A coleta será realizada pelo corte de 100 mg de pelos da cabeça, região nugal, do doador e o mais rente possível da pele. Caso haja impossibilidade de coleta neste local, poderá ser coletada amostras de pelos de outras partes do corpo do doador.

Após a coleta, a amostra será envolvida em papel alumínio e guardada em plástico lacrado até o momento da análise. As informações pertinentes do doador e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado por representante da família do doador autorizando a coleta acompanharão a amostra. Todas as informações que dizem respeito à identidade do doador e da família serão mantidas em sigilo absoluto e não serão publicadas, nem fornecidas a terceiros que não tenham nenhuma função na pesquisa.

Em paralelo, o desenvolvimento e validação da metodologia de análise serão realizados. A análise das amostras será feita pela técnica LC-MS/MS.

Resumo:

Nos últimos anos, análises de drogas em cabelo têm ganhado destaque na determinação de substâncias de abuso, com aplicações nas áreas forense e de toxicologia clínica. Ela se destaca das demais por apresentar uma janela de detecção

muito mais ampla do que as matrizes convencionais, sangue e urina, que tem intervalos de detecção de apenas poucos dias, contra semanas e até meses da detecção no cabelo, dependendo do comprimento do mesmo. Por essa razão, é uma valiosa ferramenta na avaliação do histórico recente de uso de drogas de abuso na análise pós morte, casos de violência sexual, teste de drogas no local de trabalho, renovação de Carteira Nacional de Habilitação (CNH) para motoristas profissionais e monitoramento de pacientes em fase de inclusão social de centros de reabilitação.

Introdução:

Drogas de Abuso pode ser qualquer substância cuja posse ou fornecimento é restrita pela lei devido aos seus potenciais efeitos nocivos ao usuário. Tais drogas também são ditas “substâncias controladas”. Estas substâncias são uma preocupação mundial e afetam cada vez mais todos os setores da sociedade. Na maioria das vezes são utilizadas ilicitamente para recreação e são caracterizadas por levarem à dependência química, além gerarem graves problemas sociais. A análise de drogas de abuso em cabelos, dentre muitas aplicações, pode ser usada para provar se motoristas profissionais estão aptos a renovarem sua CNH e até mesmo para confirmar um único uso em casos de crimes facilitados por drogas. Um mecanismo preciso sobre como a incorporação de drogas e seus metabólitos no cabelo ocorre ainda não está claro.

Entretanto, existe um modelo proposto que sugere que a incorporação ocorre principalmente por três vias: por difusão passiva para as células do folículo capilar (melanócitos e queratinócitos) a partir dos vasos sanguíneos que nutrem os folículos capilares durante a formação do pelo; deposição de suor e sebo no pelo com subsequente difusão das drogas através da cutícula capilar (camada mais externa do cabelo); e por contaminação externa. Propriedades químicas das drogas e características físicas e fisiológicas do indivíduo influenciam fortemente em qual mecanismo será predominante. Do ponto de vista estrutural, os três fatores principais que influenciam na incorporação são a quantidade de melanina produzida pelo folículo capilar, a lipofilicidade e o pKa da droga ou do metabólito.

O cabelo é conhecido por ser uma amostra biológica de excelente estabilidade. Em um estudo, Rothe (1997) determinou a concentração em segmentos de cabelos de 82

pacientes que recebiam doses constantes de drogas. Para esse experimento foram recolhidos de 2-5 segmentos de 3 cm de comprimento e analisados para 23 drogas diferentes. Os resultados mostraram que a concentração da droga diminuiu lentamente com a distância do segmento até a raiz e que após um ano no cabelo, cerca de 4% das drogas ainda permaneciam presentes. Um outro fato interessante observado neste estudo é que metabólitos mais polares das drogas observadas são eliminados mais lentamente do que as drogas precursoras fazendo com que a razão da concentração metabólito/droga aumente com a idade do cabelo. Outros estudos detectaram a presença de opiáceos em fios de cabelos de um poeta Vitoriano 167 anos após sua morte.

A análise de drogas em cabelos geralmente consiste em várias etapas: (1) amostragem e armazenamento, (2) segmentação do cabelo, (3) descontaminação por lavagem para eliminar possíveis contaminações externas, (4) pulverização ou o corte em pequenas partes, (5) extração ou digestão do cabelo, (6) clean-up e pré-concentração, (7) identificação e quantificação das drogas e, finalmente, (8) interpretação dos resultados. Para obtenção de resultados confiáveis, todas as etapas do processo devem ser bem organizadas e realizadas corretamente. Algumas etapas são obrigatórias, embora ainda não haja um consenso de como devem ser executadas.

As concentrações das principais drogas de abuso no cabelo, normalmente estão na faixa de concentração de pg/mg a ng/mg. Vários métodos de extrações vêm sendo desenvolvidos ao longo dos últimos anos, como extração com metanol, extração com acetonitrila, extração por soluções aquosas ou tampões, extração com mistura de solventes, digestão do cabelo com solução de NaOH e digestão enzimática são as mais comuns. Com exceção das duas últimas técnicas citadas, todas baseiam-se na incubação da amostra pulverizada ou cortada em pequenas partes, em 1-2 mL de solvente apropriado por um período de algumas horas (1 – 18h). O princípio da extração baseia-se na percolação do solvente nas fibras dos fios da amostra, inchando-o e removendo as substâncias por difusão e dissolução dos compostos. Entretanto, devido às diferentes características dos grupos de drogas de abuso, algumas extrações têm se mostrado mais compatíveis para certas substâncias do que para outras. Por exemplo, extrações ou digestões em meio básico pode levar à hidrólise da

monoacetilmorfina, heroína e cocaína. Entretanto, a digestão com solução de NaOH é vantajosa para anfetaminas e canabinóides.

As extrações por solventes certamente são as mais recorridas por serem mais abrangentes e compatíveis com a maioria das classes de substâncias de abuso. Entretanto, seus extratos contêm alto grau de contaminação pelos constituintes da matriz e necessitam de uma etapa de clean-up e técnicas analíticas muito seletivas. As técnicas de clean-up mais utilizadas são a extração por fase sólida (SPE) e a extração líquido-líquido (LLE). Estas técnicas demandam quantidades de solventes elevadas e/ou são consideradas caras. Favorável a elas, podemos citar que existe grande variedade de fases estacionárias disponíveis, facilidade de operação e automação.

A espectrometria de massas tornou-se nas últimas décadas uma ferramenta chave na análise de drogas de abuso no cabelo. Devido à alta especificidade e sensibilidade necessárias para este tipo de análise, técnicas analíticas como GC-MS/MS e LC-MS/MS irão se tornar ferramentas indispensáveis em laboratórios toxicológicos. Hoje, a principal demanda na análise de cabelo consiste do desenvolvimento de um método multianalítico que permite uma rápida varredura para diferentes classes de substâncias de abuso, preferencialmente a ser feito em um único procedimento e utilizando pequena quantidade de amostra.

Hipótese:

Muitos motoristas profissionais fazem usos de substâncias ilícitas para suportar longas jornadas de viagens no trabalho, tais como rebite e cocaína. Como os prazos de entrega normalmente são apertados, eles recorrem a estas drogas para render mais tempo sem descanso na direção. Com isto, a probabilidade de se envolverem em acidentes é aumentada pois suas habilidades, reflexos e percepções ficam comprometidas.

Objetivo Primário:

Desenvolver um método para determinação das principais drogas de abuso (canabinóides, cocaína, anfetaminas e opiáceos) e dos seus principais metabólitos em amostras de cabelo.

Objetivo Secundário:

Avaliar a ocorrência de drogas de abuso em cabelos ou pelos de motoristas que vieram ao óbito em acidentes de trânsito no estado de Minas Gerais.

Metodologia Proposta:

Após a triagem dos doadores com relação ao motivo do óbito, as famílias serão abordadas e questionadas da disponibilidade de doação de amostras de cabelos ou pelos do familiar. Nesta abordagem, serão explicados os objetivos da pesquisa, informações a respeito da coleta, riscos e benefícios. Caso a família autorize a doação, um responsável assinará um Termo de Consentimento Livre Esclarecido permitindo o uso da amostra em questão do doador para pesquisa. Uma cópia também será disponibilizada à família. Após o TCLE, a coleta ocorrerá no Instituto Médico Legal de Belo Horizonte e informações sobre o doador e sobre o acidente serão coletadas. A seguir, as amostras serão submetidas à extração das drogas de abuso e analisadas por LC-MS/MS. Os dados serão tratados e as concentrações das drogas calculadas (caso positivas). Assim, serão realizadas análises estatísticas da frequência de amostras positivas com relação ao sexo e idade dos doadores.

Critério de Inclusão:

Pessoas que vieram ao óbito em acidentes de trânsito.

Critério de Exclusão:

Pessoas que não vieram ao óbito em acidentes de trânsito.

Riscos:

Não há benefício diretamente ao doador. À sociedade, fica o registro de um estudo que pode relacionar a frequência de óbitos em motoristas com o uso de substâncias psicoativas, e auxiliar no entendimento e combate ao uso de drogas por motoristas.

Metodologia de Análise de dados:

Com as concentrações das drogas de abuso detectadas nas amostras, será avaliada a frequência de amostras positivas com as informações de coleta e do acidente como idade, tempo de serviço, histórico de uso de drogas, sexo, local e turno do acidente.

Desfecho Primário:

Espera-se desenvolver e validar uma metodologia para detecção de drogas de abuso no cabelo. Para complementar a validação da metodologia, analisaremos amostras reais de cabelos de doadores que vieram à óbito em acidentes de trânsito.

Desfecho Secundário:

Espera-se obter padrões de frequência de amostras positivas com as informações do doador e do acidente, que sejam relevantes para avaliação e combate ao uso de drogas de abuso por motoristas.

Tamanho da Amostra:

Até 100 amostras.

Bibliografia:

- [1] A. C. Moffat, M. D. Osselton, and B. Widdop, *Drugs and Poisons*, 4^o Edition. London: Pharmaceutical Press, 2011.
- [2] S. Vogliardi, M. Tucci, G. Stocchero, S. D. Ferrara, and D. Favretto, "Sample preparation methods for determination of drugs of abuse in hair samples: A review," *Anal. Chim. Acta*, vol. 857, pp. 1–27, 2014.
- [3] B. (CONTRAN), "Resolução nº 517 de 29 de Janeiro de 2015," no. Anexo XXII, pp. 1–8, 2015.
- [4] P. Kintz, M. Villain, and V. Cirimele, "Hair analysis for drug detection.," *Ther. Drug Monit.*, vol. 28, no. 3, pp. 442–446, 2006.
- [5] A. M. Baumgartner, P. F. Jones, W. A. Baumgartner, and C. T. Black, "Radioimmunoassay of hair for determining opiate-abuse histories.," *J. Nucl. Med.*, vol. 20, no. 7, pp. 748–52, Jul. 1979.
- [6] T. Baciú, F. Borrull, C. Aguilar, and M. Calull, "Recent trends in analytical methods and separation techniques for drugs of abuse in hair," *Anal. Chim. Acta*, vol. 856, pp. 1–26, 2014.
- [7] G. L. Henderson, "Mechanisms of drug incorporation into hair," *Forensic Sci. Int.*, vol. 63, no. 1–3, pp. 19–29, Dec. 1993.
- [8] A. Dasgupta, "Handbook of drug monitoring methods: Therapeutics and drugs of abuse," in *Handbook of Drug Monitoring Methods: Therapeutics and Drugs of Abuse*, Humana Press, 2008, pp. 1–445.
- [9] I. M. Kempson and E. Lombi, "Hair analysis as a biomonitor for toxicology, disease and health status.," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 40, no. 7, pp. 3915–3940, 2011.
- [10] F. Pragst and M. a. Balikova, "State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse," *Clin. Chim. Acta*, vol. 370, no. 1–2, pp. 17–49, 2006.
- [11] W. et. al. Baumgartner, "Hair analysis for drugs of abuse.," *J. Forensic Sci.*, vol. 34, pp. 1433–1453, 1989.
- [12] G. A. A. Cooper, R. Kronstrand, and P. Kintz, "Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair.," *Forensic Sci. Int.*, vol. 218, no. 1–3, pp. 20–4, May 2012.
- [13] "Recommendations for hair testing in forensic cases.," *Forensic Sci. Int.*, vol. 145, no. 2–3, pp. 83–4, Oct. 2004.

- [14] S. Paterson, N. McLachlan-Troup, R. Cordero, M. Dohnal, and S. Carman, "Qualitative screening for drugs of abuse in hair using GC-MS.," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 25, no. 3, pp. 203–8, Apr. 2001.
- [15] A. Salomone, E. Gerace, D. Di Corcia, G. Martra, M. Petrarulo, and M. Vincenti, "Hair analysis of drugs involved in drug-facilitated sexual assault and detection of zolpidem in a suspected case.," *Int. J. Legal Med.*, vol. 126, no. 3, pp. 451–9, May 2012.
- [16] M.-L. Pujol, V. Cirimele, P. J. Tritsch, M. Villain, and P. Kintz, "Evaluation of the IDS One-Step ELISA kits for the detection of illicit drugs in hair.," *Forensic Sci. Int.*, vol. 170, no. 2–3, pp. 189–92, Aug. 2007.
- [17] L. Skender, V. Karacić, I. Brcić, and A. Bagarić, "Quantitative determination of amphetamines, cocaine, and opiates in human hair by gas chromatography/mass spectrometry.," *Forensic Sci. Int.*, vol. 125, no. 2–3, pp. 120–6, Feb. 2002.
- [18] J. C. Domínguez-Romero, J. F. García-Reyes, and A. Molina-Díaz, "Screening and quantitation of multiclass drugs of abuse and pharmaceuticals in hair by fast liquid chromatography electrospray time-of-flight mass spectrometry.," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 879, no. 22, pp. 2034–2042, 2011.
- [19] M. Kłys, S. Rojek, J. Kulikowska, E. Bozek, and M. Scisłowski, "Usefulness of multi-parameter opiates-amphetamines-cocainics analysis in hair of drug users for the evaluation of an abuse profile by means of LC-APCI-MS-MS.," *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 854, no. 1–2, pp. 299–307, Jul. 2007.
- [20] F. Gosetti, E. Mazzucco, D. Zampieri, and M. C. Gennaro, "Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry.," *J. Chromatogr. A*, vol. 1217, no. 25, pp. 3929–37, Jun. 2010.
- [21] H. Trufelli, P. Palma, G. Famiglini, and A. Cappiello, "An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry.," *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 30, no. 3, pp. 491–509, Jan. .
- [22] E. Stokvis, H. Rosing, and J. H. Beijnen, "Stable isotopically labeled internal standards in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: necessity or not?," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 19, no. 3, pp. 401–7, Jan. 2005.
- [23] M. K. K. Nielsen, S. S. Johansen, and K. Linnet, "Pre-analytical and analytical variation of drug determination in segmented hair using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.," *Forensic Sci. Int.*, vol. 234, no. 1, pp. 16–21, 2014.

- [24] M. D. M. R. Fernández, V. Di Fazio, S. M. R. Wille, N. Kummer, and N. Samyn, "A quantitative, selective and fast ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous analysis of 33 basic drugs in hair (amphetamines, cocaine, opiates, opioids and metabolites)," *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 965, pp. 7–18, Aug. 2014.
- [25] C. Montesano, S. S. Johansen, and M. K. K. Nielsen, "Validation of a method for the targeted analysis of 96 drugs in hair by UPLC-MS/MS," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 88, pp. 295–306, 2014.
- [26] L. Mercolini, R. Mandrioli, M. Protti, M. Conti, G. Serpelloni, and M. A. Raggi, "Monitoring of chronic Cannabis abuse: An LC-MS/MS method for hair analysis," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 76, pp. 119–125, 2013.
- [27] J. Kim, D. Ji, S. Kang, M. Park, W. Yang, E. Kim, H. Choi, and S. Lee, "Simultaneous determination of 18 abused opioids and metabolites in human hair using LC-MS/MS and illegal opioids abuse proven by hair analysis," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 89, pp. 99–105, 2014.
- [28] M. Shen, H. Chen, and P. Xiang, "Determination of opiates in human fingernail--comparison to hair," *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 967, pp. 84–9, Sep. 2014.