

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**BRENO FREDERICO PEREIRA PAULO**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE ANFETAMINAS**

**E BENZOILECGONINA EM AMOSTRAS DE CABELO POR LC-MS/MS**

**BELO HORIZONTE**

**2017**

UFMG / ICEx / DQ. 1216<sup>a</sup>  
D. 670<sup>a</sup>

**BRENO FREDERICO PEREIRA PAULO**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE  
ANFETAMINAS E BENZOILECGONINA EM AMOSTRAS DE CABELO  
POR LC-MS/MS**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química – Química Analítica.

Helvécio Costa Menezes (orientador - UFMG)

Zenilda de Lourdes Cardeal (co-orientadora - UFMG)

**BELO HORIZONTE**

**2017**

P331d Paulo, Breno Frederico Pereira  
2017 Desenvolvimento de método para determinação de  
D anfetaminas e benzoilecgonina em amostras de cabelo  
por LC-MSIMS [manuscrito] / Breno Frederico Pereira  
Paulo. 2017.  
[xi], 79 f. : il.

Orientador: Helvécio Costa Menezes.  
Coorientadora: Zenilda de Lourdes Cardeal.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Minas Gerais - Departamento de Química.  
Inclui bibliografia e anexos.

1. Química analítica - Teses 2. Anfetaminas -  
Abuso - Teses 3. Cocaína - Teses 4. Drogas - Testes -  
Teses 5. Droga - Toxicologia - Teses 6. Cromatografia  
líquida de alta eficiência - Teses 7. Espectrometria  
de massa - Teses I. Menezes, Helvécio Costa,  
Orientador II. Cardeal, Zenilda de Lourdes,  
Coorientadora III. Título.

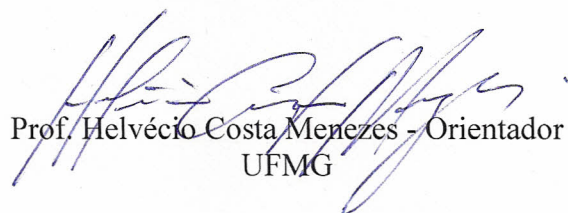
CDU 043




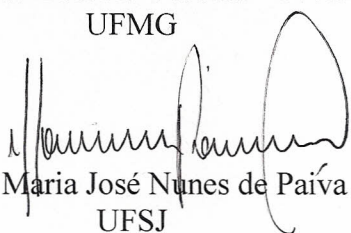
**"Desenvolvimento de Método para Determinação de Anfetaminas e Benzoilecgonina em Amostras de Cabelo por LC-MS/MS"**


**Breno Frederico Pereira Paulo**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

  
Prof. Helvécio Costa Menezes - Orientador  
UFMG

  
Profa. Zenilda de Lourdes Cardeal - Coorientadora  
UFMG

  
Profa. Maria José Nunes de Paiva  
UFSJ

  
Prof. Rodinei Augusti  
UFMG

Belo Horizonte, 31 de maio de 2017.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pelas oportunidades concedidas que me propiciaram realizar este trabalho.

À minha família pelo apoio, suporte e incentivo constante. E por compreenderem as minhas ausências nestes dois anos.

À minha companheira Maíra Freire, que sempre acreditou em mim, me apoiando e dando força nos momentos de dificuldade.

Ao meu orientador Helvécio, e minha co-orientadora Zenilda, que me apoiaram, incentivaram e me transmitiram muitos ensinamentos.

Aos gestores do Grupo Hermes Pardini que acreditaram em mim e me apoiaram no desenvolvimento do projeto. Com disponibilização da estrutura física e técnica para a realização do projeto.

Aos membros desta banca que disponibilizaram parte do seu tempo avaliando esta dissertação e contribuindo para a melhoria desta.

Aos professores de todas as disciplinas que cursei durante o curso que me proporcionaram um ambiente de aprendizado e desenvolvimento.

Aos colegas dos setores de Pesquisa e Desenvolvimento e de Toxicologia do Grupo Hermes Pardini, pelo convívio e troca de experiências.

Aos colegas do laboratório 171 do Departamento de Química da UFMG pela ajuda.

Aos meus amigos que ainda levo da época da faculdade: Ivan, Rodrigo Munaier, Carla, Leandro, Rodrigo Toscano, Thales, Thais, Janaína e muitos outros.

À Valéria Rosalina, Petrônio e Aldeir pelo apoio no IML-BH.

À Terra da Sobriedade pelo crédito e apoio na coleta das amostras.

## RESUMO

Nos últimos anos, análises de drogas em cabelo têm ganhado destaque na determinação de substâncias de abuso. Esse tipo de análise se destaca por apresentar uma janela de detecção muito mais ampla do que a urina e, por essa razão, é uma valiosa ferramenta na avaliação do histórico recente de uso de drogas de abuso em análises pós morte, teste de drogas no local de trabalho, renovação da permissão para dirigir no caso de motoristas profissionais e monitoramento de pacientes em fase de reinserção social em centros de reabilitação. Portanto, é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos capazes de detectar estas substâncias no cabelo para atender à atual demanda para este tipo de análise. Neste trabalho foi desenvolvido um método simples e rápido para detectar benzoilecgonina, anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA e MDEA por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial em amostras de cabelo. O método foi otimizado e utilizou a micropulverização das amostras de cabelo, seguido de extração com metanol em meio ácido, para favorecer a extração das drogas de forma mais rápida. Em seguida, o método foi validado para: linearidade de  $0,020 \text{ ng mL}^{-1}$  a  $4,000,0 \text{ ng mL}^{-1}$ ; e obteve precisão intra e inter-ensaios menores do que 8,1% e 11,4%, respectivamente. Os limites de detecção e quantificação alcançados foram de  $0,012$  e  $0,02 \text{ ng mg}^{-1}$  respectivamente, para todas os analitos. Após a validação, o método foi aplicado em 14 amostras reais provenientes de clínicas de reabilitação, de voluntários e do Instituto Médico Legal de Belo Horizonte/MG.

Palavras-chave: Teste toxicológico, análise de drogas de abuso nos cabelos, cocaína, anfetamina, metanfetamina, espectrometria de massas, LC-MS/MS, Efeito Matriz.

## ABSTRACT

In recent years, hair drug testing has gained importance in determination of substances of abuse. This type of analysis stands out because has a wider detection window than urine and, therefore, is a valuable appliance in the evaluation of the recent history of drugs of abuse in post-mortem analysis, workplace drug test, renewal of license to drive in case of professional drivers and for monitoring patients in phase of social reinsertion. Therefore, it is necessary to develop analytical methods able to detect these substances in hair to meet the current demand for this type of analysis. In this work a simple and fast method was developed to detect benzoylecgonine, amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA and MDEA by liquid chromatography tandem mass spectrometry in hair samples. The method was optimized and used the micropulverization of the hair samples, followed by extraction with acidified methanol, to favor the extraction of the drugs more quickly. Then the method was validated for: linearity from 0.020 ng mL<sup>-1</sup> to 4,000.0 ng mL<sup>-1</sup>; and obtained intra and inter-assay accuracy lower than 8.1% and 11.4%, respectively. The limits of detection and quantification obtained were 0.012 ng mg<sup>-1</sup> and 0.020 ng mg<sup>-1</sup>, respectively, for all analytes. After validation, the methods was applied to 14 real samples from rehabilitation center, volunteers and the Legal Medical Institute of Belo Horizonte / MG.

Keywords: Toxicological test, hair testing of drugs of abuse, cocaine, amphetamine, methamphetamine, mass spectrometry, LC-MS/MS, Matrix Effect.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Rota metabólica da cocaína (COC): anidroecgonina metil éster (AEME); benzoilecgonina (BE); ecgonina metil éster (EME); norcocaína (NCOCE); cocaetileno (COCE). Adaptado de Narkowicz et al. (2013).<sup>30</sup> .....9
- Figura 2. Lag Time e Janela de Detecção para detecção de canabinóides em diversas matrizes biológicas para o consumo de maconha. Adaptado de Moffat et. al. (2011).<sup>3</sup> ..... 15
- Figura 3. Esquema representativo das camadas e estruturas que compõem os fios do cabelo. (A) Secção transversal de um fio de cabelo revelando sua composição: cutícula, composta de exocutícula e endocutícula; e o córtex, dividido em orto-córtex e para-cortex e composto de células corticais. (B) Secção transversal de um fio de cabelo com ênfase na medula e seus componentes: células medulares e espaço intercelular..... 16
- Figura 4. Estrutura representativa da eumelanina (A) e da feomelanina (B). As setas indicam locais de ligação de outras unidades. Pode-se perceber que a eumelanina possui maior quantidade de grupos -COOH expostos para interagir com outras moléculas. Adaptado de Suzukawa (2012).<sup>45</sup> ..... 17
- Figura 5. Esquema representativo do folículo capilar. (A) Estrutura e componentes que formam o folículo capilar: músculo eretor do pelo; glândula sebácea; raiz do cabelo; e bulbo capilar. (B) Ampliação representativa do bulbo capilar, com ênfase nas camadas de células que formarão a estrutura do fio.<sup>49</sup> ..... 19
- Figura 6. Esquema ilustrando as diferentes vias de incorporação de drogas no cabelo, e os fatores que contribuem para a decomposição delas. ....21
- Figura 7. Efeito da acidez e da basicidade das drogas na incorporação pelo cabelo. A = drogas ácidas; B = drogas básicas; e = extracelular; i = intracelular. Adaptado de Pragst e Balikova (2006).<sup>47</sup> .....25
- Figura 8. Esquema representativo do preparo das soluções utilizadas. ....33
- Figura 9. Esquema representativo do procedimento de extração das amostras de cabelo.....41
- Figura 10. Ilustração do procedimento de coleta. (A) Corte da mecha de cabelo rente a pele. (B) Imagem do armazenamento da amostra após a coleta. (Adaptado de Salomone et. al., (2016)).<sup>94</sup> .....45
- Figura 11. Cromatogramas de uma solução contaminada com concentração de 10,0 ng mL<sup>-1</sup> de cada analito. Estão representados os cromatogramas de todas as transições de massa monitoradas pelo método. O primeiro gráfico é referente ao cromatograma de íons totais (TIC). .....47
- Figura 12. Evolução do processo de lavagem da amostra contaminada. A partir da 14<sup>a</sup> lavagem houve uma queda significativa das áreas. ....49



Figura 13. Imagem de amostra de cabelo após moagem. Ao lado estão as duas esferas de aço inox e o microtubo de 2,0 mL de polipropileno utilizados.....	50
Figura 14. Gráfico de Pareto obtido por meio do planejamento fatorial $2^3$ utilizando as variáveis Tempo de sonicação, Temperatura de sonicação e Porcentagem de Ácido Tricloroacético na solução de extração. ....	53
Figura 15. Respostas médias da otimização da variável tempo de extração com sonicação. Para este experimento, a extração foi mantida sob presença de temperatura de aproximadamente 40 °C, sonicação e 0,10% de Ácido Tricloroacético no solvente extrator. ....	54
Figura 16. Cromatogramas das transições de massa de uma amostra de pool branco. ....	56
Figura 17. Cromatogramas de íons total da infusão pós-coluna sobre uma amostra branca. A região próxima de 1,1 minuto apresentou intensa supressão de sinal.....	58
Figura 18. Representação gráfica dos resíduos das curvas de calibração da benzoilecgonina e MDMA, utilizando ponderação $1/x$ . ....	60
Figura 19. Gráfico representativo das 14 amostras coletadas com a correlação entre os resultados das análises e o perfil de cada doador. A) Amostras com resultados negativos para BE. B) Amostras com resultados positivos para BE. ....	64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Taxa de crescimento de cabelos e porção catágena + telógena em diferentes regiões do corpo humano. Adaptado de Pragst e Balikova (2006). <sup>47</sup> .....	20
Tabela 2. Concentrações das soluções intermediárias utilizadas no desenvolvimento e validação da metodologia.....	34
Tabela 3. Concentração dos analitos deuterados na solução de trabalho. ....	35
Tabela 4. Parâmetros do método de aquisição do espectrômetro de massas para todos os analitos e respectivos padrões internos.....	37
Tabela 5. Fatores avaliados para a seleção de variáveis no planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> com triplicata do ponto central.....	40
Tabela 6. Parâmetros de identificação dos analitos. O tempo de retenção e a proporção entre os íons de quantificação e de qualificação foram os critérios de identificação considerados neste trabalho. ....	46
Tabela 7. Concentração em ng mg <sup>-1</sup> das alíquotas retiradas para monitorar a incorporação das drogas no cabelo. ....	48
Tabela 8. Concentrações em ng mg <sup>-1</sup> das cinco alíquotas utilizadas para avaliar os parâmetros de moagem. ....	51
Tabela 9. Delineamento experimental do planejamento fatorial para a extração de drogas de abuso em cabelo. ....	52
Tabela 10. Resultados dos experimentos para verificação do efeito de matriz, com e sem correção pelo PI. ....	57
Tabela 11. Parâmetros da curva analítica e de sensibilidade do método proposto...	59
Tabela 12. Resultados em CV dos ensaios de imprecisão e exatidão da metodologia em amostras contaminadas e fortificadas. ....	62
Tabela 13. Dados e resultados para interpretação das amostras analisadas. Os dados sobre a contaminação externa e os resultados das amostras se referem somente à benzoilecgonina. ....	65

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	v
RESUMO.....	
vi	
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
SUMÁRIO.....	xi
1.    Introdução.....	1
2.    Objetivos.....	4
2.1.    Objetivo geral.....	4
2.2.    Objetivos específicos.....	4
3.    revisão da literatura.....	5
3.1.    Aspectos gerais das drogas de abuso.....	5
3.2.    Cocaína.....	5
3.2.1.    Mecanismo de ação.....	6
3.2.2.    Tipos de preparação e Toxicocinética.....	7
3.3.    Anfetaminas.....	10
3.4.    Métodos de análise de drogas de abuso.....	12
3.5.    Análise de drogas de abuso no cabelo.....	13
3.6.    Anatomia e fisiologia do cabelo.....	15
3.7.    Teoria de incorporação de drogas no cabelo.....	20
3.7.1.    Fatores que afetam a incorporação de drogas no cabelo.....	23
3.7.1.1.    Basicidade e acidez das drogas versus pH fisiológico das células do fóliculo.....	24
3.7.1.2.    Interação droga-melanina.....	26
3.8.    Métodos de extração de drogas de abuso no cabelo.....	27
4.    materiais e métodos.....	30
4.1.    Materiais.....	30
4.2.    Equipamentos.....	30
4.3.    Reagentes.....	31
4.4.    Preparo das soluções.....	33

4.5.	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.....	35
4.6.	Preparo de amostra fortificada .....	37
4.7.	Seleção das condições do preparo de amostra .....	38
4.7.1.	Micropulverização da amostra .....	38
4.7.2.	Otimização da extração com metanol .....	39
4.8.	Preparo de amostra.....	40
4.9.	Validação da metodologia .....	41
4.10.	Análise de amostras reais .....	43
5.	Resultados e Discussão.....	46
5.1.	Condições do sistema LC-MS/MS.....	46
5.2.	Preparo da amostra fortificada .....	48
5.3.	Seleção das condições do preparo de amostras .....	49
5.3.1.	Micropulverização da amostra .....	49
5.4.	Otimização da extração.....	51
5.5.	Validação da metodologia .....	54
5.6.	Amostras de cabelo.....	60
6.	Conclusões .....	67
7.	Referências bibliográficas .....	68
8.	Anexos .....	78
8.1.	Anexo I.....	78
8.2.	Anexo II.....	79

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, análises de drogas em cabelo têm ganhado destaque na determinação de substâncias de abuso, com aplicações principalmente nas áreas forense e de toxicologia clínica.<sup>1</sup> Esse tipo de análise se destaca por apresentar uma janela de detecção muito mais ampla do que as matrizes convencionais, sangue e urina. Por essa razão, a análise de drogas em cabelo é uma valiosa ferramenta na avaliação do histórico recente de uso de drogas de abuso em análises pós morte, casos de violência sexual, teste de drogas no local de trabalho, renovação da permissão para dirigir no caso de motoristas profissionais<sup>2</sup> e monitoramento de pacientes em fase de reinserção social em centros de reabilitação.<sup>1</sup>

Como definição, droga de abuso pode ser qualquer substância cuja posse ou fornecimento é restrita pela lei devido aos seus potenciais efeitos nocivos aos usuários. Essas drogas também são conhecidas como “substâncias controladas”.<sup>3</sup> A utilização abusiva destas substâncias é uma preocupação mundial e afeta cada vez mais diferentes setores da sociedade. Na maioria das vezes, essas drogas são utilizadas ilicitamente para recreação e são caracterizadas pelo potencial de levar à dependência química, além de gerarem graves problemas sociais.

O uso abusivo de drogas também possui impacto na saúde pública, aumentando os riscos de acidentes rodoviários (condução sob influência de drogas) e acidentes no local de trabalho causando uma sobrecarga no sistema de saúde, uma vez que a maioria das pessoas estão adoentadas e com problemas médicos ou psicológicos graves; causando impacto importante para os familiares, pois, em última instância, é a família que segura a carga desse problema, ou ainda, pode provocar reações de rejeição e exclusão do usuário, levando, muitas vezes, ao aumento do consumo; e por último, um impacto político e econômico, uma vez que um volume de dinheiro precisa ser movimentado para dentro desse sistema.<sup>4</sup> Segundo um relatório recente da ONG *Harm Reduction International*, anualmente, em todo o mundo, são investidos 100 bilhões de dólares no combate repressivo às drogas.<sup>5</sup>

O Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (UNODC) revelou no seu último relatório, em junho de 2016, que cerca de 250 milhões de pessoas com idades entre 15 e 64 anos fizeram o uso de pelo menos uma droga em todo o mundo no ano de 2014, e que o número de pessoas descritas como “dependente de drogas” em todo o mundo aumentou de 27 milhões (2013) para 29 milhões (2014).<sup>4</sup> Segundo o diretor executivo do UNODC, Yuri Fedotov, quase 200 mil pessoas morrem anualmente devido ao consumo de narcóticos ilegais, entre overdoses e outros problemas associados.

No Brasil, a Pesquisa Nacional de Saúde do Escolar (PeNSE), divulgada pelo IBGE, revelou que entre estudantes de escolas públicas de 13 e 15 anos, a taxa dos que usaram drogas ilícitas aumentou de 7,3% (2014) para 9% (2015). Ainda, 4,2% dos entrevistados revelaram ter feito uso nos 30 dias que antecederam a pesquisa, um indício de uso regular das substâncias. De acordo com Marco Andreazzi, gerente da pesquisa, é na adolescência que se estabelecem hábitos que serão levados pela vida adulta, ressaltando a importância de políticas de prevenção para esses adolescentes.<sup>6</sup>

Segundo o Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LeNAD), realizado em 2012 pela Unifesp, o Brasil representa 20% do consumo mundial de crack, e é o maior mercado da droga no mundo.<sup>7</sup> Estes números reforçam a necessidade de políticas e programas que possibilitam um maior controle do uso de drogas no país.

Um dos problemas relacionados ao uso de drogas que está em evidência no Brasil é o consumo de substâncias psicoativas por motoristas profissionais, especialmente aqueles que trabalham com transporte de cargas nas rodovias do país. Já existem na literatura muitos trabalhos que mostram que o uso de álcool e drogas de abuso afetam significativamente as capacidades cognitivas e motoras dos usuários.<sup>8-12</sup> O consumo destas substâncias psicoativas podem interferir no tempo de reação e no processamento de informações; reduzir a percepção e a performance motora, diminuir a atenção, a capacidade de rastreamento da via e o controle do veículo.<sup>9,13</sup> Ainda, segundo Gates e colaboradores (2013),<sup>12</sup> os motoristas que consomem essas substâncias estão mais propensos a assumir comportamento de risco, como dirigir acima de

velocidade permitida ou ultrapassar no sinal vermelho, aumentando a probabilidade de acidentes de trânsito.

Acidentes de trânsito no Brasil são responsáveis pela morte de mais de 40 mil pessoas por ano e deixam aproximadamente 160 mil pessoas com lesões graves.<sup>14</sup> Segundo estimativas divulgadas pela OMS (Organização Mundial de Saúde) em 2016, o país tem o quarto pior desempenho do continente americano atrás de Belize, República Dominicana e Venezuela. Neste cenário, o custo para a sociedade é de mais de R\$ 40 bilhões a cada ano, sendo que o custo devido à perda de produção é o mais significativo, seguido pelos custos veiculares e hospitalares.<sup>14,15</sup> Em 2014, 5.338 pessoas vieram à óbito em acidentes de transporte no qual envolveram veículos de transporte pesado e/ou ônibus. Este número, têm crescido continuamente desde 1996, quando começou a série histórica, acumulando quase 500% de aumento durante este período.<sup>14</sup>

O uso de substâncias psicoativas por motoristas de caminhão que percorrem longas jornadas de trabalho é comum no país, especialmente aquelas substâncias com efeito estimulante. Existem diversos estudos e reportagens publicadas nos meios de comunicação que expõem o hábito do uso de drogas por motoristas de caminhão.<sup>11,16</sup> Entre as principais drogas utilizadas, estão a cocaína e drogas do tipo anfetaminas ou rebite como são mais conhecidas.

As anfetaminas estimulam as funções cognitivas e psicomotoras e podem aumentar perigosamente a autoconfiança do motorista, resultando na maior probabilidade de envolvimento em situações de risco no trânsito.<sup>17</sup> O consumo da cocaína, em contrapartida, pode ocasionar pequena melhora no desempenho do motorista logo após o início da sua ação farmacológica. Entretanto, o condutor poderá apresentar um prejuízo no desempenho em razão da perda de concentração e atenção e maior sensibilidade à luz, em função da dilatação pupilar provocada pela substância, assim como, alterações mentais devidas aos efeitos psicoativos, tais como nervosismo, irritabilidade, agressividade, paranoia e alucinações.<sup>18</sup>

Com base nessas evidências, a implementação de políticas públicas que possam melhorar ou reverter essa situação torna-se essencial. Dentre as possíveis ações, podemos mencionar a regulamentação da jornada de trabalho

da categoria, assim como, a elaboração de estratégias de prevenção que evitem o uso de drogas entre esses profissionais. A legislação e a fiscalização também podem contribuir para a redução da morbimortalidade dos acidentes. Para uma maior eficiência nessa fiscalização, é necessária a padronização de técnicas analíticas que permitam a análise de drogas de abuso no cabelo, uma vez que poucos laboratórios brasileiros estão preparados para fazer esse tipo de análise.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

- ✓ Desenvolver um método para detecção e quantificação de benzoilecgonina (BE) e drogas tipo anfetaminas em amostras de cabelo, com simples preparo, eficiente e aplicável à rotina laboratorial.

### **2.2. Objetivos específicos**

- ✓ Otimizar a extração dos analitos no cabelo;
- ✓ Validar o método otimizado;
- ✓ Aplicar o método desenvolvido em amostras reais de cabelo coletadas em voluntários no Instituto Médico Legal de Belo Horizonte, e em clínica de reabilitação para dependentes químicos de Belo Horizonte.



### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1. Aspectos gerais das drogas de abuso**

O envolvimento humano com substâncias psicotrópicas retorna a um passado longínquo. O homem sempre procurou alternativas para aumentar a sensação de prazer e diminuir o desconforto e o sofrimento. Entretanto, muitas vezes para alcançar essas sensações, o homem utiliza de maneira indiscriminada substâncias capazes de modificar o funcionamento do sistema nervoso, induzindo sensações corporais e estados psicológicos alterados.<sup>19</sup> Nesse contexto, drogas psicotrópicas são aquelas que atuam sobre o cérebro, alterando de alguma forma o nosso psiquismo, e por essa razão, são também conhecidas como substâncias psicoativas.

O consumo abusivo de substâncias psicoativas é uma questão de saúde pública em todo o mundo. O abuso de substâncias psicoativas tem sido alvo de preocupação na sociedade devido a sua íntima relação com o aumento da criminalidade, acidentes automotivos, comportamentos antissociais, evasão escolar, entre outros.<sup>20</sup> As condições socioculturais, a vasta extensão territorial e a localização próximo a países produtores de drogas, são fatores que contribuem para que esse problema seja ainda mais preocupante no Brasil.<sup>21</sup>

De acordo com o mecanismo de ação dessas substâncias no sistema nervoso central (SNC), elas podem ser classificadas como depressoras (opiáceos, etanol, inalantes), estimulantes (cocaína, anfetaminas e derivados) e perturbadoras (LSD, mescalina, canabinóides).<sup>21</sup> Por apresentar efeito estimulante no SNC, caracterizado por euforia, a cocaína e/ou as anfetaminas são geralmente procuradas por estudantes, motoristas de caminhão, pessoas obesas que pretendem emagrecer rapidamente (uma vez que reduzem o apetite) e frequentadores de festas raves. Esse tipo de drogas, psicoestimulantes, são responsáveis por afetar uma imensa parcela da população, pois seus efeitos não atingem apenas o usuário, mas também a sua família e a sociedade como um todo.

#### **3.2. Cocaína**

A cocaína, benzoilmetilecgonina ou éster do ácido benzoico, é o principal alcaloide derivado do arbusto *Erythroxylum*. Essa planta, cultivada em clima tropical e altitudes que variam entre 450 m a 1.800 m acima do nível do mar, cresce na forma de arbusto ou em árvores ao leste dos Andes e acima da Bacia Amazônica.<sup>22</sup>

A cocaína, originalmente extraída para utilização como analgésico, apresenta efeitos anestésicos, uma vez que bloqueia os canais de sódio, estimula o SNC, e leva à inibição neuronal por captação de catecolaminas. Entretanto, seu uso contínuo pode causar outros efeitos indesejados, como dependência, hipertensão arterial, complicações neuropsiquiátricas e cardiocirculatórias, assim como transtornos sócio ocupacionais, econômicos e legais associados ao seu abuso.<sup>22</sup>

### **3.2.1. Mecanismo de ação**

A cocaína é um estimulante poderoso do SNC. Essa substância bloqueia os transportadores de dopamina, noradrenalina e serotonina presentes na membrana plasmática dos neurônios pré-sinápticos, resultando em um aumento significativo dessas monoaminas na fenda sináptica e na superestimulação dessas vias.<sup>23</sup>

Cada um desses neurotransmissores está envolvido em diferentes processos fisiológicos, dessa forma, o bloqueio da função de cada um deles terá efeito em ações específicas. A noradrenalina, por exemplo, o aumento significativo desse neurotransmissor é responsável por efeitos adrenérgicos como a vasoconstrição, hipertensão, taquicardia, midríase e taquipneia. Enquanto o aumento da dopamina resulta em alterações comportamentais como autoconfiança, euforia, aumento da excitação sexual, paranoia e alucinações.<sup>24</sup>

Os efeitos de prazer ocasionados pela cocaína são devidos, principalmente, ao fato de a cocaína bloquear os receptores de dopamina, deixando muita dopamina livre na fenda sináptica. A maior disponibilidade desse neurotransmissor é responsável por desencadear o mecanismo de dependência por meio do sistema de recompensa,<sup>25</sup> o usuário necessita de doses adicionais para continuar experimentando os efeitos compensadores da droga.

### 3.2.2. Tipos de preparação e Toxicocinética

Atualmente, a cocaína pode se apresentar em diversas formas (folha, chá, pasta de coca, cloridrato de cocaína, crack e outros) e, como consequência, seus usuários apresentam perfis toxicocinéticos (velocidade de absorção, pico de concentração plasmática), toxicológicos e grau de dependência distintos.

Uma das formas de consumo da cocaína é por via oral. Folhas de coca podem ser mascadas ou ingeridas como chá de coca. O consumo da cocaína por essa via não é comum, pois apresenta uma absorção lenta e incompleta, sendo que 75% da droga absorvida é rapidamente metabolizada no fígado, enquanto apenas 25% dessa alcança o cérebro, reduzindo os efeitos eufóricos da mesma.<sup>26</sup>

A pasta de coca, outra forma de apresentação, é um produto bruto obtido nas primeiras fases de extração da cocaína a partir das folhas de coca, e constitui a forma para o tráfico. Essa pasta, preparada por meio da maceração das folhas com álcali, solvente orgânico e ácido sulfúrico, contém em média 40 a 85% de sulfato de cocaína além de inúmeras impurezas tóxicas. Essa preparação, também conhecida como basuco, pode ser fumada (inalada), produzindo efeitos quase imediatos. A velocidade de absorção pode ser comparada com a via endovenosa (seis a oito minutos), refletindo a eficiência dessa forma de administração em liberar drogas no cérebro. Essa pasta também é utilizada como precursora na produção do cloridrato de cocaína.<sup>24</sup>

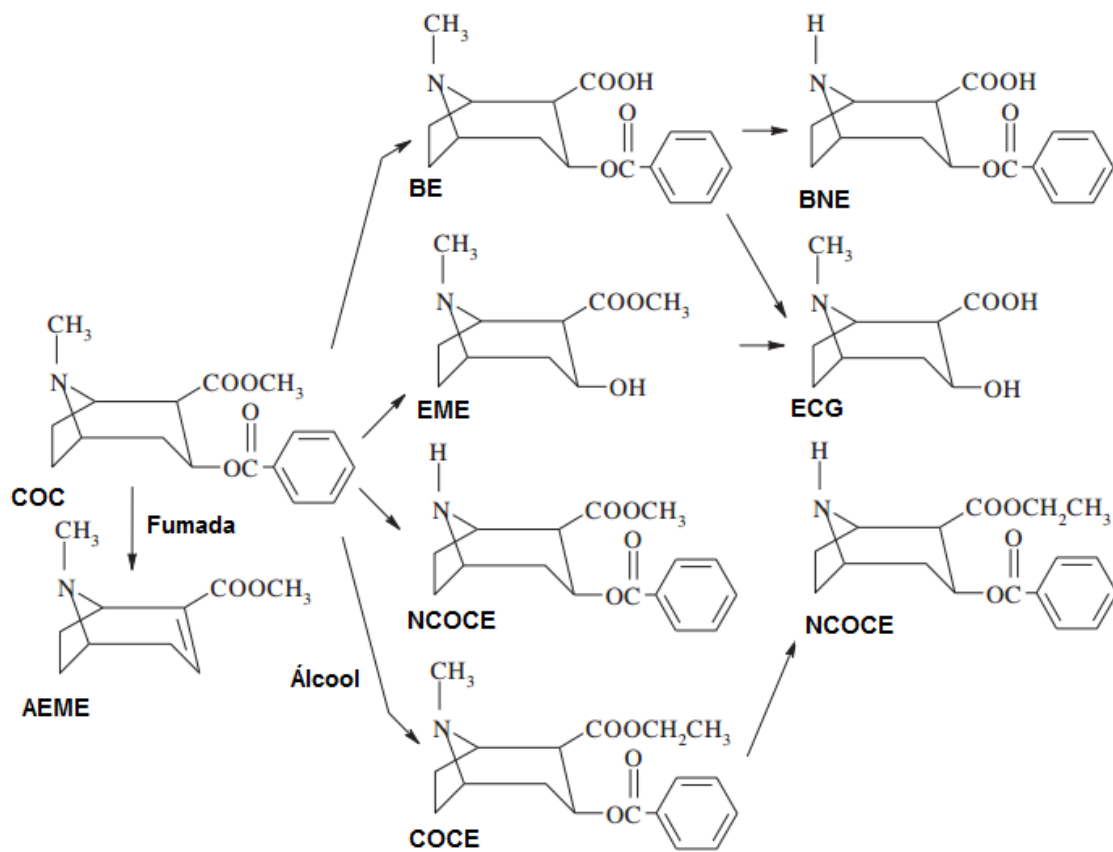
A pasta de coca purificada com o ácido clorídrico forma o cloridrato de cocaína, conhecido como cocaína em pó fino, branco ou cristalino.<sup>26</sup> Esse sal pode ser consumido dissolvido em água e aplicado por via endovenosa ou ainda aspirado e absorvido pelas mucosas. A absorção acontece pelas membranas nasofaríngeas, mas, por se tratar de uma substância vasoconstritora, limita sua própria absorção.<sup>26</sup> Não pode ser fumada, pois não é estável na presença de temperaturas altas.<sup>27</sup>

O crack, subproduto da cocaína em sua forma básica, obtido pelo aquecimento da solução aquosa de cloridrato de cocaína com bicarbonato de sódio ou amônia, é comercializado na forma de pedras. Os consumidores

utilizam recipientes como cachimbos de fabricação caseira, onde aquecem as pedras e inalam o vapor ou, fumam como cigarros associado com tabaco ou maconha.<sup>23</sup> O acesso dos usuários a esse tipo de droga é facilitado em todas as classes sociais, principalmente por apresentar um valor baixo. A rápida sensação de prazer que o crack gera (rápida absorção), e a curta duração deste prazer, faz com que o usuário venha a desenvolver dependência mais rapidamente quando comparado ao uso por outras vias.<sup>28</sup> Essa alta velocidade de penetração do crack pode ser explicada, pelo menos em parte, pela extensa área de superfície dos pulmões e a elevada vascularização dos mesmos.

Após sua administração, a cocaína atravessa as membranas celulares com muita facilidade, podendo ser identificada no SNC em cinco segundos quando fumada, ou alcançar o cérebro em 30 segundos quando aspirada ou administrada via intravenosa. A meia-vida da cocaína varia de acordo com a via de administração, sendo, em média, sessenta minutos, podendo ter um aumento nesse tempo à medida que a dose aumenta. Após alcançar o cérebro, a cocaína é rapidamente distribuída para outros tecidos, concentrando-se, principalmente, no baço e rins.<sup>27</sup>

Essa droga é rapidamente metabolizada no fígado por enzimas plasmáticas e hepáticas, primeiramente em metil éster ecgonina (3 a 4 horas) e, em seguida, em benzoilecgonina (4 a 7 horas), as quais são excretadas por via renal. Pequenas porções desses produtos podem ainda sofrer novo processo de hidrólise formando a ecgonina. A norcocaína, o único metabólito dessa biotransformação que possui atividade biológica, é produzida em pequenas quantidades por meio da desmetilação no fígado através do sistema citocromo P450.<sup>29</sup> Na Figura 1 está representado a rota metabólica da cocaína.



**Figura 1.** Rota metabólica da cocaína (COC): anidroecgonina metil éster (AEME); benzoilecgonina (BE); ecgonina metil éster (EME); norcocaína (NCOCE); cocaetileno (COCE). Adaptado de Narkowicz *et al.* (2013).<sup>30</sup>

A eliminação da cocaína e benzoilecgonina será maior se o pH urinário for ácido, enquanto que para o seu metabólito (norcocaína) a eliminação é preferencial se o pH for alcalino.<sup>26</sup> Sendo, a benzoilecgonina o principal indicador biológico de exposição para monitorar a utilização da droga. Esse metabólito possui tempo de meia vida biológico de 6 a 8 horas, e pode ser detectado na urina de 3 a 14 dias após o consumo, dependendo da quantidade ingerida e da frequência de uso.<sup>3</sup>

A cocaína ainda pode ser utilizada de forma concomitante ao etanol. Essa combinação faz com que a cocaína seja transesterificada por esterases presentes no fígado formando cocaetileno. Esse metabólito, que pode ainda ser biotransformado em benzoilecgonina, possui meia-vida plasmática 3 a 5 vezes maior que a da cocaína e apresenta maior capacidade de se acumular nos tecidos, dificultando, dessa forma, a eliminação e prolongando os efeitos nocivos

do mesmo. Outra consequência desse tipo de combinação é o aumento dos níveis plasmáticos de cocaína, elevando o risco de morte súbita devido aos efeitos tóxicos principalmente no coração e fígado.<sup>31,32</sup>

### **3.3. Anfetaminas**

As anfetaminas são um grupo de compostos sintéticos, simpatomiméticas, fabricada em laboratório. Essas drogas apresentam ação estimulante em nível periférico e central, fazendo com que o cérebro trabalhe muito e mais rápido do que o normal, uma vez que apresenta efeitos semelhantes aos produzidos pela adrenalina no cérebro. Apesar dessas drogas produzirem inicialmente um bem-estar, euforia, e melhora na capacidade física e intelectual, as mesmas também podem provocar irritação, nervosismo, inquietação e apresentam um alto potencial para gerar dependência.

Esse grupo de drogas sintéticas, as quais foram primeiramente utilizadas medicinalmente para aliviar a fadiga, alargar as passagens nasais e bronquiais (em casos de asma) e estimular o sistema nervoso central, atualmente é utilizada por estudantes, que passam noites inteiras estudando (bolinhas); motoristas, com fins de manter o estado de alerta e vigília (rebites); frequentadores de festas raves (êxtase), no intuito de aumentar a energia do organismo; tratamento de crianças com transtorno de déficit de atenção/hiperatividade (TDAH); jovens adolescentes obsessivos por sua forma física; atletas de alto rendimento (doping); profissionais das artes, na busca de ampliação da criatividade; e no tratamento da narcolepsia.<sup>33,3</sup>

Devido à ação estimulante das anfetaminas sobre o SNC, essas substâncias são comumente usadas como drogas de abuso. Dentre esse grupo de compostos que possuem estruturas e propriedades biológicas semelhantes, e que vem sendo cada vez mais utilizados de forma abusiva, podemos citar a anfetamina (ANF); a metanfetamina (MTF), um derivado da anfetamina com efeitos similares a esta, a qual também é conhecida como “ice”; e a 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA). Entre essas anfetaminas, a mais conhecida e utilizada no Brasil é a MDMA, conhecido popularmente como ecstasy. O início da ação dessa droga ocorre aproximadamente em 20 minutos

após a ingestão do comprimido, e seu tempo de duração pode variar de 4 a 8 horas.<sup>3</sup>

Dentre os principais sintomas do uso abusivo de anfetaminas podemos citar: estimulação locomotora, aumento da pressão arterial, taquicardia, dilatação pupilar, sudorese, calafrios, náusea, anorexia, hiperreflexia, agressividade, grandiosidade, agitação, e em poucos casos pode desenvolver delírio a menos de 24 horas da ingestão.<sup>21</sup> O uso crônico pode levar a alterações na personalidade e podem produzir comportamento estereotipado, enquanto, a interrupção após um tempo prologando de ingestão pode resultar em reações de abstinência.

Semelhante ao mecanismo de ação da cocaína, as anfetaminas estimulam a liberação de neurotransmissores como dopamina, serotonina e noradrenalina, e inibem a receptação destes no terminal pré-sináptico. Essas propriedades parecem ser as responsáveis, pelo menos em parte, pelos efeitos alucinógenos, farmacológicos, assim como os efeitos tóxicos.<sup>36</sup> Entretanto, o mecanismo de ação das anfetaminas é ainda mais complexo, envolvendo efeitos adicionais que afetam os níveis extracelulares de catecolaminas, os quais podem ser responsáveis pela ação anorexígena.<sup>33</sup>

Logo após a sua ingestão, as anfetaminas são assimiladas rapidamente pela corrente sanguínea, absorvidas no trato gastrointestinal e penetram livremente pela barreira hematoencefálica. Essas, também são absorvidas pela mucosa nasal, sendo distribuídas na maior parte dos tecidos.<sup>33</sup>

A meia vida plasmática da anfetamina pode variar de cinco até trinta horas, dependendo da quantidade administrada, fluxo urinário e pH (com taxa de excreção de até 75% da dose quando a urina é mais ácida e 2% quando a urina é mais básica). Diferentemente da cocaína, essas substâncias são excretadas principalmente de modo inalterado na urina.<sup>33</sup>

No Brasil, as anfetaminas são substâncias de abuso entre os motoristas de caminhão, que fazem uso dos chamados “rebites” para reduzir o sono e diminuir o cansaço. Os motoristas que fazem uso dessas substâncias, geralmente, percorrem longas distâncias nos períodos diurno e noturno. Essas substâncias não só inibem o sono, mas também aumentam o estado de alerta.<sup>33</sup> Um estudo

realizado por Moreno e colaboradores (2001) revelou que o consumo de anfetaminas entre alguns profissionais chega a 50 comprimidos por mês.<sup>33</sup>

Entretanto, as anfetaminas podem aumentar perigosamente a autoconfiança do motorista, dependendo da quantidade ingerida, resultando na maior probabilidade de envolvimento em acidentes de trânsito.<sup>21</sup> Testes realizados em simuladores revelaram que após o uso de anfetaminas os motoristas apresentam direção veicular insegura, não sinalizam manobras realizadas, e as executam de forma mais lenta, deixam de parar em semáforo vermelho, entre outras ações inseguras.<sup>17</sup> Dessa forma, o risco de um acidente fatal ocorrer entre pessoas que utilizaram anfetaminas é cinco vezes maior que entre pessoas que não usaram.<sup>13</sup>

### **3.4. Métodos de análise de drogas de abuso**

A análise química para a verificação da presença de drogas de abuso vem sendo utilizada em diversos segmentos da sociedade. Dentro das Ciências Forenses, a Química Forense realiza exames laboratoriais em vários tipos de amostras orgânicas e inorgânicas encaminhadas para fins periciais. Essa análise química também tem sido empregada para verificação do uso de drogas no ambiente de trabalho, averiguação do uso de drogas por atletas em campeonatos de alto rendimento, assim como no auxílio e acompanhamento de recuperação de usuários em clínicas de tratamento.

Recentemente, o Conselho Nacional de Trânsito (Contran) brasileiro determinou, por meio da Resolução nº 460 de 12/11/2013, a exigência de exames toxicológicos de larga janela de detecção para substâncias psicoativas, para a obtenção ou renovação da habilitação profissional de categorias C, D e E. De acordo com essa resolução, esses exames toxicológicos devem analisar o consumo de maconha e derivados, cocaína e derivados, opiáceos, êxtase, anfetamina, metanfetamina e derivados.

Exames toxicológicos podem ser realizados em vários tipos de amostras biológicas, sendo as principais, amostras de sangue, urina, saliva, suor ou queratina (cabelos, pelos ou unhas). Cada uma dessas amostras apresenta características distintas, quer bioquímicas, farmacodinâmicas ou



farmacocinéticas, que conferem vantagens e desvantagens na sua análise. Dentre essas características distintas, a janela de detecção, por exemplo, é uma das características que deve ser avaliada para definir o tipo de amostra ideal para a análise a ser feita.

A determinação de drogas de abuso é realizada, tradicionalmente, através da análise de sangue e urina. As análises de amostras de sangue são importantes nas análises toxicológicas, sendo sua principal vantagem, como matriz biológica, é que permite a detecção logo após a ingestão e metabolização. Ainda, esse tipo de amostra, oferece uma boa correlação entre as doses administradas e os níveis detectados. A principal desvantagem da determinação de drogas de abuso no sangue, é a pequena janela de detecção que normalmente é menor do que um dia.

A determinação de drogas de abuso em urina é o exame mais utilizado para verificar se uma pessoa fez uso dessas substâncias. Ele tem sido utilizado no Brasil principalmente para monitoramento de trabalhadores que atuam em funções críticas, como por exemplo, nas empresas do ramo da aviação civil. Os fatores que contribuíram para que a urina se tornasse a principal matriz na detecção de drogas são; a sua janela de detecção, que normalmente inicia em até 12 horas do consumo e segue por até 3 - 4 dias, e a facilidade de coleta. Porém, embora seja embaraçosa, a coleta assistida é necessária para evitar adulteração ou troca da amostra.

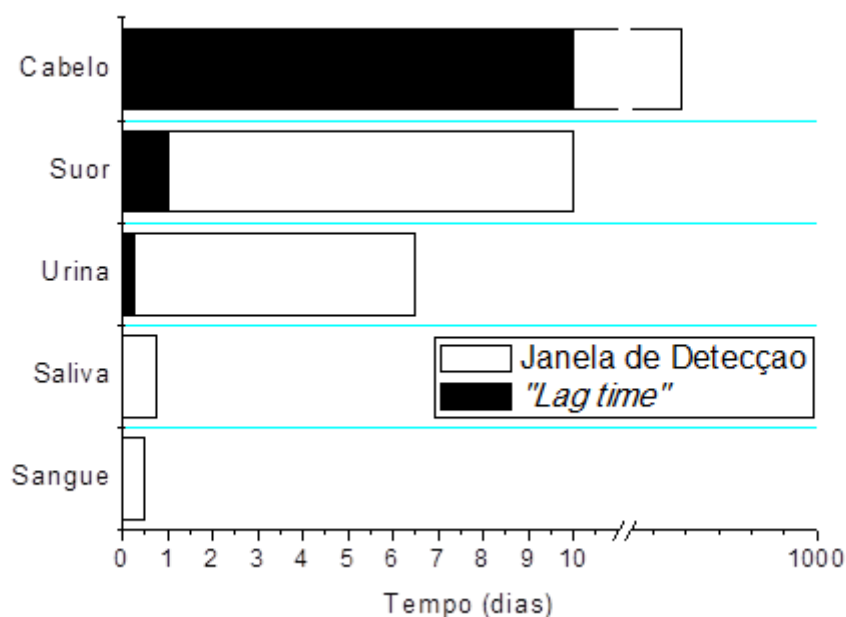
### **3.5. Análise de drogas de abuso no cabelo**

A análise de cabelos para avaliar a exposição a metais pesados como arsênio, chumbo e mercúrio com análise por absorção atômica e ativação neutrônica, foi utilizada inicialmente entre os anos de 1960 e 1970. Nesta época, a análise de compostos orgânicos não era possível, pois as técnicas analíticas não eram suficientemente sensíveis para detecção de tais substâncias. Um estudo realizado em 1974 foi pioneiro na detecção de drogas marcadas com isótopos radioativos em amostras de cabelo. Nesse estudo, foi estabelecido que um isótopo radioativo do fármaco clorpromazina ( $^{35}\text{S}$ -clorpromazina, pka 9,3) poderia ser incorporado através do sangue para diversos tecidos que estavam relacionados com a presença de melanina, inclusive o cabelo. A partir deste

trabalho, Baumgartner e colaboradores (1979) publicaram o primeiro artigo que detectaria morfina no cabelo de usuários de heroína por meio de radioimunoensaio.<sup>3,37,38</sup> A partir de então, diversos trabalhos foram publicados nos 20 anos seguintes, os quais possibilitaram o desenvolvimento de uma teoria amplamente aceita sobre o modelo de incorporação de drogas de abuso em cabelos.

O desenvolvimento das técnicas de espectrometria de massas (*mass spectrometry, MS*), das cromatografias líquida (*Liquid Chromatography, LC*) e gasosa (*Gas Chromatography, GC*) e de técnicas de ionização a pressão atmosférica mais eficientes (como *electrospray, ESI*), também foram importantes no desenvolvimento da análise de drogas em cabelos. O poder de separação da cromatografia aliado à seletividade e sensibilidade da MS fizeram com que a *LC-MS/MS* e *GC-MS/MS* se tornassem atualmente as principais técnicas para a análise de drogas de abuso em cabelos <sup>39</sup>.

Comparado a outras matrizes biológicas, a análise de cabelos possui características unicamente interessantes, as quais possibilitou que o cabelo ganhasse destaque na análise de substâncias de abuso. Devido à sua grande janela de detecção, tempo pelo qual é possível detectar o uso de drogas através da coleta e análise de uma amostra biológica, é possível saber se um indivíduo usou ou foi exposto a uma droga muito tempo após os efeitos dessa droga terem desaparecidos (Figura 2). Neste caso, as limitações são o comprimento da amostra e o grau de preservação da mesma. A facilidade de coleta também é um fator positivo. Diferentemente da urina, onde é necessário a coleta assistida para garantir que não ocorra a adulteração ou troca da amostra, a coleta de cabelo é menos constrangedora. A grande estabilidade das substâncias incorporadas ao cabelo não só permite que a janela de detecção seja extensa, mas também garante que uma alíquota das amostras possa ser guardada por longos períodos para serem analisadas posteriormente.



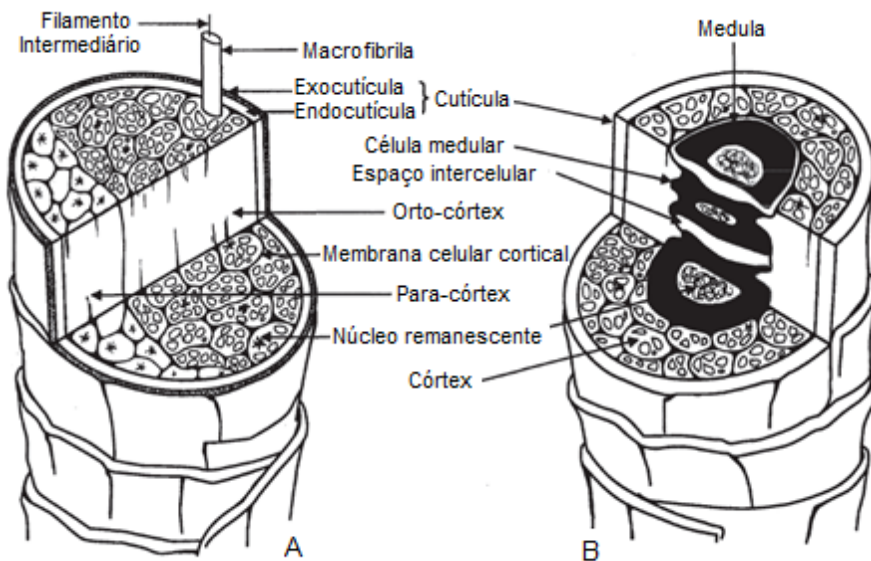
**Figura 2.** *Lag Time* e Janela de Detecção para detecção de canabinóides em diversas matrizes biológicas para o consumo de maconha. Adaptado de Moffat *et. al.* (2011).<sup>3</sup>

### 3.6. Anatomia e fisiologia do cabelo

Os fios de cabelo parecem estruturas simples, entretanto, esses na verdade apresentam uma estrutura complexa composta de várias camadas e estruturas específicas. Para que os testes de análise de drogas de abuso em cabelos sejam corretamente interpretados, um breve conhecimento sobre a anatomia e fisiologia do cabelo é necessário.

Didaticamente, o cabelo pode ser separado em duas estruturas: o folículo capilar e o fio de cabelo, que é a porção visível na superfície do corpo.<sup>40</sup> Tomando uma secção transversal de um fio de cabelo, ele ainda pode ser dividido em três camadas: (I) mais externamente se encontra a cutícula, que atua como camada protetora e, portanto, está mais susceptível a danos provocados por agentes externos; (II) internamente existe o córtex, que corresponde a maior parte da composição do fio, o qual possui importante papel para suas propriedades físicas e mecânicas, além de dar cor ao fio; e (III) a medula, na região central do fio, que pode ou não estar presente, e é completamente envolta

pelo córtex.<sup>40-42</sup> A Figura 3 representa esquematicamente cada uma dessas camadas.



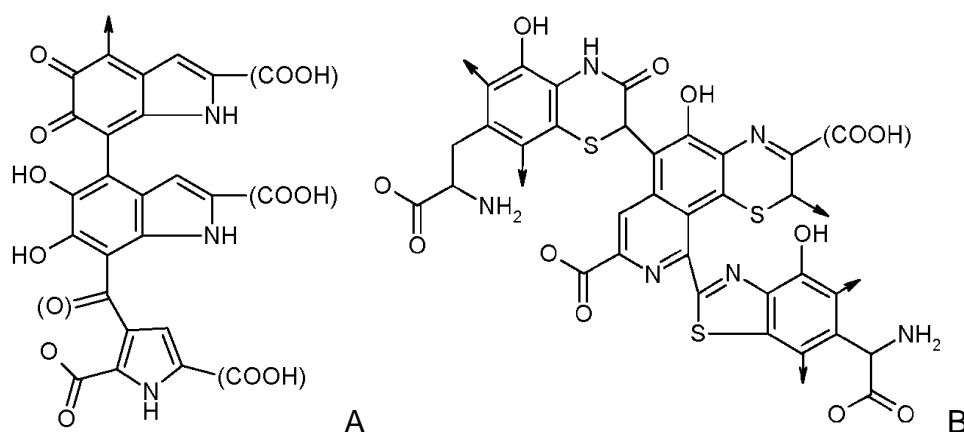
**Figura 3.** Esquema representativo das camadas e estruturas que compõem os fios do cabelo. (A) Secção transversal de um fio de cabelo revelando sua composição: cutícula, composta de exocutícula e endocutícula; e o córtex, dividido em orto-córtex e para-córtex e composto de células corticais. (B) Secção transversal de um fio de cabelo com ênfase na medula e seus componentes: células medulares e espaço intercelular.

A cutícula é formada por uma camada de células alongadas e não pigmentadas que cobrem o fio desde a raiz até a ponta. Por ser mais externa, essa camada sofre danos de várias fontes externas, sendo as mais comuns, agentes químicos (como os usados para clareamento, alisamento e outros tratamentos cosméticos), agentes mecânicos, aquecimento (secadores e pranchas térmicas) e exposição à luz (radiação UV). Como consequência, a cutícula se apresenta menos intacta na extremidade distal do fio, uma vez que essa região já sofreu maior tempo de exposição à esses agentes, que na extremidade proximal, expondo o córtex para o meio ambiente.<sup>42</sup> O córtex, por sua vez, é composto por longas células queratinizadas que compõe 50-60% de sua estrutura.<sup>40</sup> Vesículas com pigmentos são também encontradas no córtex, essas são responsáveis pela cor do fio.<sup>42</sup>

O processo de pigmentação do cabelo ocorre durante a formação do fio, mais especificamente durante a divisão celular. Os melanócitos, localizadas na

base da papila (Figura 5), produzem vesículas, as melanossomas, que contém pigmentos. Estas vesículas se transformam em partículas densas enquanto ocorre a polimerização dos pigmentos que irão compor as partículas de melanina. Essas partículas, por sua vez, são transportadas para as células do córtex na região de queratinização do fio.<sup>43</sup>

Dois tipos de pigmentos estão presentes nas melanossomas: eumelanina, de cor negra e a feomelanina, de cor marrom-avermelhado. No cabelo os dois pigmentos estão presentes, porém a proporção com que os mesmos são encontrados determina a coloração do cabelo. Cabelos negros possuem maiores proporções de eumelanina, enquanto cabelos loiros a ruivos possuem maiores quantidades de feomelanina.<sup>44</sup>



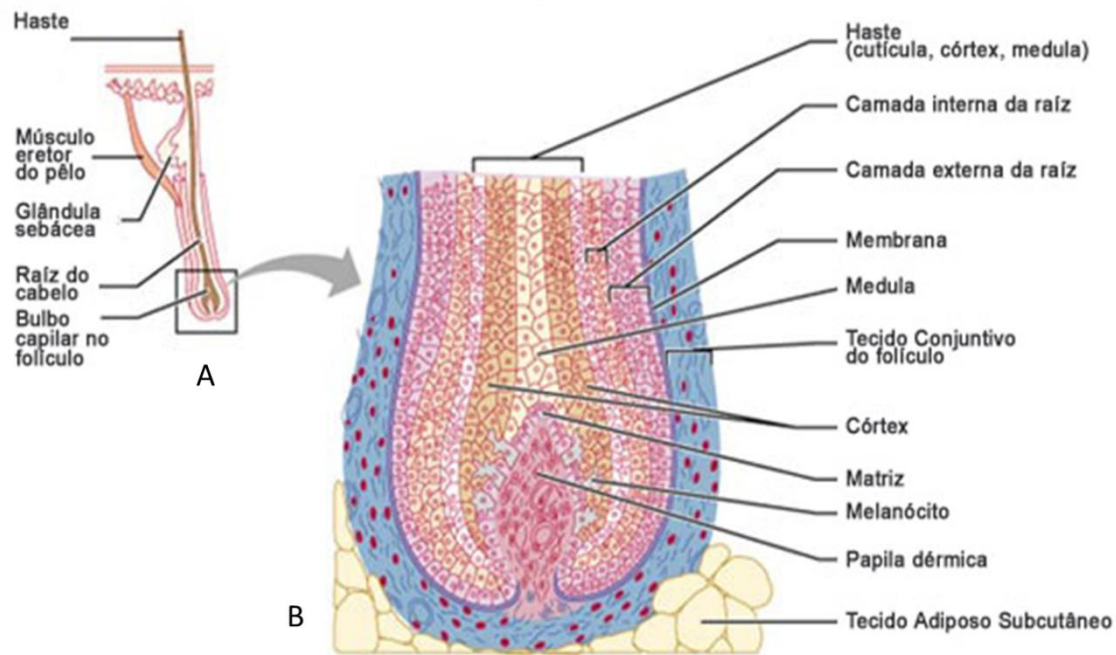
**Figura 4.** Estrutura representativa da eumelanina (A) e da feomelanina (B). As setas indicam locais de ligação de outras unidades. Pode-se perceber que a eumelanina possui maior quantidade de grupos -COOH expostos para interagir com outras moléculas. Adaptado de Suzukawa (2012).<sup>45</sup>

No folículo capilar encontra-se o bulbo capilar, o qual é responsável pelo crescimento do cabelo. Esse bulbo está localizado entre 3-5 mm abaixo da superfície da pele, e pode ser dividido em três partes ao longo do eixo de crescimento do cabelo <sup>46</sup>. Na porção mais profunda, encontra-se a papila dérmica e a matriz, ou centro de germinação do folículo. Nesta área, as células possuem um dos ciclos celulares mais rápidos de todos os tecidos humanos, e são predominantemente do tipo melanócitos e queratinócitos. Essa rápida divisão celular força a migração de células para porções mais superficiais do bulbo, onde aumentam de volume e tornam-se alongadas. As células recém-

formadas entram na chamada zona de queratinização, onde a produção de queratina é ativada. Nesta região, as células da cutícula e do córtex desenvolvem-se de maneira diferente. Mais acima, na zona de endurecimento, ocorre a desidratação das células, com o desaparecimento das organelas citoplasmáticas, a coalescência das células em uma estrutura densa e a formação de ligações dissulfeto. As células da cutícula originam-se das células matriciais de uma região mais externa da papila. Acredita-se que todo este processo descrito acima ocorra em até um terço do comprimento do folículo e dure três dias.<sup>40-42,47</sup>

Na secção intermediária do folículo, acima do bulbo, encontra-se um duto preenchido por sebo (material não-aquoso composto por ésteres de glicerol, colesterol e ácidos graxos).<sup>48</sup> Esse sebo é produzido por uma glândula sebácea existente em cada folículo, sendo responsável por banhar o cabelo recém-formado. Estima-se que o fio fique em contato com o sebo por até três dias, antes de alcançar a superfície.<sup>47</sup>

O suor também é conhecido por ser um veículo de excreção de drogas, especialmente as hidrofílicas. Próximos aos folículos capilares, mas não conectados a eles, encontram-se as glândulas sudoríparas écrinas que estão presentes em toda a superfície do corpo humano. Estas glândulas são conectadas à superfície da derme por ductos de onde secretam o suor, que é composto basicamente por água, sais, ureia, aminoácidos e piruvato.<sup>42</sup> Diferentemente, as glândulas sudoríparas apócrinas secretam o suor diretamente no folículo capilar e são encontradas principalmente nas axilas e na região pubiana.<sup>42,47</sup>



**Figura 5.** Esquema representativo do folículo capilar. (A) Estrutura e componentes que formam o folículo capilar: músculo eretor do pelo; glândula sebácea; raiz do cabelo; e bulbo capilar. (B) Ampliação representativa do bulbo capilar, com ênfase nas camadas de células que formarão a estrutura do fio.<sup>49</sup>

O cabelo cresce em ciclos, alternando entre fases de crescimento e de quiescência. A primeira fase desse ciclo é a anágena, que é caracterizada por intensa atividade celular das células da matriz. Em seguida, inicia-se uma fase de transição, chamada catágena, nessa fase ocorre a interrupção da divisão celular no bulbo, que se torna completamente queratinizado e começa a se degenerar.

Após a fase de transição o folículo entra em um período de quiescência, denominado como fase telógena. Neste período, o cabelo para de crescer completamente, ocorre a deterioração do folículo, e a consequente queda do fio de cabelo. Após um determinado período, o qual varia entre as diferentes regiões do corpo, o bulbo se reestabelece e o ciclo inicia-se novamente. Em humanos adultos, a proporção de folículos nas diferentes fases varia com a região do corpo. Na cabeça, por exemplo, aproximadamente 85% dos folículos estão na fase anágena e os 15% restantes nas fases catágena e telógena.

Como resultado dessa diferença, a taxa de crescimento do cabelo varia consideravelmente de acordo com a região do corpo, e existem vários estudos

que relatam diferentes taxas para regiões similares <sup>41</sup>. A taxa de crescimento do cabelo exata de uma determinada região é difícil de determinar, uma vez que para fazer essa análise deve se considerar a quantidade de fios presentes na fase anágena no momento e no sítio de medição. <sup>42</sup>. Outros fatores também podem interferir na taxa de crescimento do cabelo, como por exemplo, a idade, sexo, raça e saúde do indivíduo.<sup>47</sup> No entanto, a *Society of Hair Testing (SoHT)* recomenda utilizar uma taxa média de crescimento de 1,0 cm mês<sup>-1</sup> para cálculos que envolvam a coleta de cabelo na região da cabeça.<sup>50</sup>

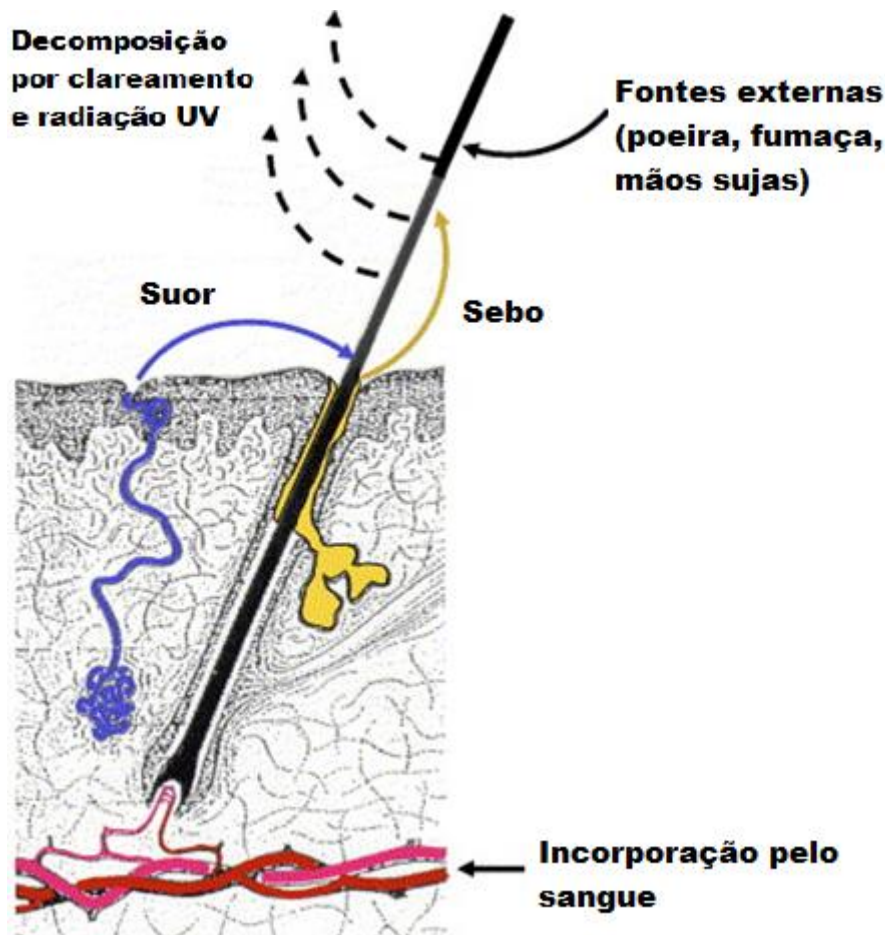
**Tabela 1.** Taxa de crescimento de cabelos e porção catágena + telógena em diferentes regiões do corpo humano. Adaptado de Pragst e Balikova (2006).<sup>47</sup>

Sítio anatômico	Catágena + telógena	Taxa de crescimento
	(%)	cm mês <sup>-1</sup>
<b>Couro cabeludo, não calvo</b>	6 – 18	0,96 – 1,38
<b>Couro cabeludo, alopecia</b>	53 – 84	0,24 – 0,45
<b>Barba</b>	40	0,75 – 0,87
<b>Axila</b>	50	0,87 – 0,99
<b>Pubiana</b>	50	0,90
<b>Coxa</b>	-	0,39 – 0,75
<b>Tronco</b>	-	0,81

### 3.7. Teoria de incorporação de drogas no cabelo

Henderson (1993)<sup>46</sup> propôs um modelo de incorporação de drogas no cabelo, o qual é amplamente aceito no meio científico. De acordo com este modelo, a incorporação de substâncias no cabelo ocorre por três principais vias: [1] difusão passiva das substâncias para as células da matriz do folículo através da rede sanguínea; [2] difusão a partir do suor e do sebo para os fios já formados; [3] por meio de contaminação proveniente do ambiente externo.





**Figura 6.** Esquema ilustrando as diferentes vias de incorporação de drogas no cabelo, e os fatores que contribuem para a decomposição delas.

A incorporação através da corrente sanguínea é a via mais significativa e mais amplamente estudada.<sup>51</sup> Como o folículo capilar tem intensa atividade de divisão celular durante a fase anágena, e esse se encontra próximo a uma rede capilar densa, a hipótese mais bem aceita é que a incorporação das drogas no cabelo seja por meio da corrente sanguínea. Vários estudos comprovaram a existência desta via de incorporação por meio de experimentos com camundongos.<sup>52-57</sup>

Nessa primeira via proposta por Henderson e colaboradores (1996) as drogas e seus metabólitos penetram no cabelo por difusão passiva, através dos capilares sanguíneos, para as células da matriz em crescimento na base do folículo capilar. À medida que as células se alongam e envelhecem, elas morrem e coalescem, formando a fibra capilar com a droga incorporada na matriz<sup>58</sup>. De acordo com essa via, a extensão da incorporação das drogas no cabelo seria

dependente da concentração das drogas na corrente sanguínea, que por sua vez, dependia da dose ingerida da droga. Entretanto, fracas correlações entre a quantidade de drogas ingeridas e a concentração no cabelo foram observadas<sup>59</sup>. Portanto, essa via sozinha falha em explicar todo o processo de incorporação de drogas no cabelo.

A segunda via de incorporação de drogas pelo cabelo proposta por Henderson (1993) está relacionada com a excreção dessas drogas a partir do suor, onde geralmente as concentrações são maiores do que no sangue <sup>60</sup>. Henderson e colaboradores<sup>61</sup> demonstraram em seu trabalho que drogas excretadas pelo suor poderiam ser transportadas ao longo do comprimento do fio, onde seriam incorporadas pelo cabelo. Nesse trabalho, a cocaína isotopicamente marcada, cocaína-d5, foi detectada em diferentes seguimentos de cabelo que não haviam entrado em contato com a droga durante a formação do fio. Os autores sugeriram que o suor contaminado poderia se difundir pelo fio e contribuir para a incorporação da droga em regiões “virgens” por um processo diferente da difusão passiva da droga no bulbo capilar.

A incorporação através do sebo também é considerada, embora, essa seja menos significativa que pelo suor.<sup>62</sup> A contribuição do sebo na incorporação de drogas é mais importante em fios recém-formados e que ainda não alcançaram a superfície da pele. Estudos propostos por Smeal (2007)<sup>59</sup> identificaram que a principal via de incorporação de canabinóides (substâncias e metabólitos biologicamente ativos provenientes da maconha) no cabelo acontece principalmente através do sebo, devido à suas características lipofílicas. Estas vias de incorporação alternativa, pelo sebo e pelo suor, dificulta a determinação da correlação exata entre o tempo de uso e o comprimento do cabelo, pois estes fluidos normalmente se difundem ao longo do fio.

A terceira principal via de incorporação ocorre por meio da contaminação externa. Esta via tem recebido muita atenção recentemente, pois possui um importante papel na interpretação dos resultados das análises de drogas no cabelo. Esta contaminação pode ocorrer por meio da exposição passiva em um ambiente contaminado, por estar próximo de quem está consumindo drogas na forma vaporizada e/ou pela manipulação direta das substâncias. Esta última, pode ocorrer quando o indivíduo manipula as drogas ou toca superfícies

contaminadas e, em seguida, toca no próprio cabelo ou de outra pessoa.<sup>41</sup> Uma possível solução para minimizar a contaminação externa seria submeter as amostras a um processo de lavagem em várias etapas com solventes orgânicos e soluções aquosas, conforme recomendações da *SoHT*.<sup>50</sup> A fração orgânica da lavagem normalmente é analisada para verificar a presença de contaminação externa e auxiliar na interpretação do teste.

Romano e colaboradores (2001)<sup>63</sup> demonstraram que a cocaína e a benzoilecgonina podem ser detectadas em fibras de cabelo após a contaminação com cocaína na forma de pó. Outro estudo<sup>64</sup> também identificou a ocorrência da contaminação externa a partir da fumaça da maconha. Nesse estudo, os autores concluíram que a absorção é maior em cabelos tratados quimicamente, cabelos úmidos, e ainda maior em cabelos lubrificados com sebo e suor. Entretanto, a contaminação externa foi completamente removida após limpeza com metanol e diclorometano, exceto para os cabelos quimicamente tratados, por apresentarem o córtex capilar mais exposto devido aos danos à estrutura da cutícula<sup>64</sup>. Paterson e colaboradores (2010 e 2011)<sup>65,66</sup> também identificaram a incorporação de cocaína, benzoilecgonina, 6-monoacetilmorfina e morfina em amostras de cabelo que ficaram expostas a sangue contaminado com as drogas.

### **3.7.1. Fatores que afetam a incorporação de drogas no cabelo**

Geralmente, a incorporação de drogas em tecidos e órgãos é controlada por princípios farmacológicos de distribuição de drogas. A incorporação no cabelo também segue estes princípios: (1) substâncias lipofílicas não-ionizadas podem penetrar membranas e alcançar o interior de células, enquanto moléculas hidrofílicas ou ionizadas não penetram ou se difundem com a mesma facilidade; (2) o pH das células do bulbo capilar determina juntamente com o pka das drogas qual o tipo de substância será melhor incorporado no cabelo; e (3) a afinidade pela melanina por drogas básicas tem um importante papel na incorporação e aderência no cabelo desta classe de drogas.

Para mensurar a extensão da incorporação de substâncias no cabelo, Nakahara e colaboradores (1992)<sup>67</sup> introduziram o conceito de taxa de incorporação das drogas no cabelo (*ICR*). Essa taxa corresponde à razão entre

a concentração da droga no cabelo e a concentração no plasma em função do tempo (*AUC*), e assim, os autores estimaram a eficiência da incorporação de drogas e metabólitos em fibras capilares. A partir da aplicação deste conceito os autores calcularam a taxa de incorporação no cabelo das 20 drogas mais comuns e alguns de seus metabólitos.<sup>68</sup> Esse estudo foi realizado com ratos de pelos pigmentados e os resultados foram comparados com características das drogas, como a afinidade pela melanina, lipofilicidade e permeabilidade da membrana.

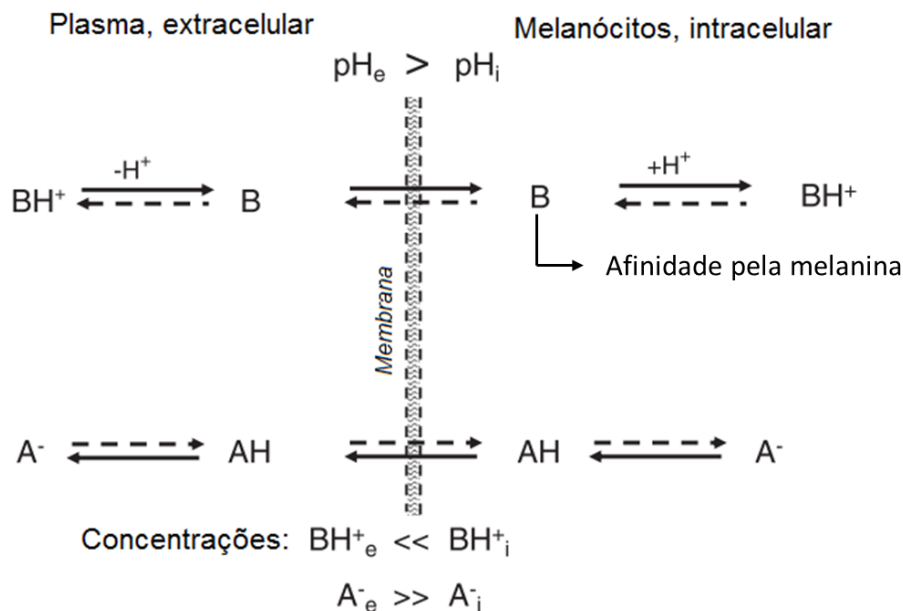
Com base nesse estudo foi possível concluir que a droga ou metabólito que tem maior e menor *ICR* são a cocaína e o THC-COOH (11-nor-9-carboxi-tetraidrocanabinol, que é o principal metabólito do tetraidrocanabinol, ou THC), respectivamente, com uma diferença de 3.600 vezes entre eles. Ainda, com os resultados obtidos neste estudo foi possível verificar que a benzoilecgonina e a metil éster ecgonina estão entre as cinco substâncias estudadas que tem menor *ICR*. Esse resultado justifica a diferença no perfil dos metabólitos entre cabelo e sangue observados por Nakahara e colaboradores (1992).<sup>67</sup> Os autores também obtiveram um alto coeficiente de correlação entre a afinidade pela melanina e a *ICR* (0,947). Entre a lipofilicidade e a *ICR*, o coeficiente de correlação foi de 0,770 para todas as drogas, exceto a THC-COOH, pois esta possui alta lipofilicidade e baixa *ICR*, resultando em um ponto aberrante. Alto coeficiente de correlação (0,976) também foi identificado entre a afinidade pela melanina e lipofilicidade, sugerindo que as propriedades físico-químicas da droga e a incorporação no cabelo estão fortemente relacionadas. Os autores ainda sugeriram que, os *ICRs* mais altos para substâncias básicas do que para as neutras e ácidas estão relacionados à permeabilidade da membrana e do gradiente de pH entre o sangue e as células do bulbo capilar.<sup>68</sup>

### **3.7.1.1. Basicidade e acidez das drogas versus pH fisiológico das células do folículo**

O pH extracelular é levemente básico, aproximadamente 7,3, enquanto que o pH dos melanócitos e queratinócitos é mais ácido, em torno de 3 – 5<sup>69</sup>. Neste cenário, ilustrado na Figura 7, através da protonação e desprotonação das

moléculas de drogas ácidas e básicas para uma espécie neutra, os dois grupos alcançam a matriz celular, porém, em diferentes concentrações. Uma vez que as moléculas estão em um meio ácido dentro das células, a distribuição do equilíbrio desfavorece a manutenção de drogas com caráter ácido e favorece a manutenção de drogas básicas. Adicionalmente, a afinidade da melanina por moléculas básicas atua deslocando ainda mais este equilíbrio e contribuindo para maior acumulação em cabelos pigmentados.<sup>47,68,70-72</sup>

Esse cenário foi demonstrado por Gygi e colaboradores (1997)<sup>73</sup>. Os autores estudaram a incorporação de uma base fraca (codeína) e um ácido fraco (fenobarbital) em pelos pigmentados e não pigmentados. Nesse estudo, os autores foram capazes de verificar que a concentração de codeína no cabelo é 44 vezes maior em pelos pigmentados que em não-pigmentados, enquanto, o fenobarbital não apresentou diferença nos dois tipos de pelos. Esses resultados permitiram sugerir que a melanina tem uma contribuição importante na incorporação de drogas básicas, porém não é substancial em drogas com caráter ácido.



**Figura 7.** Efeito da acidez e da basicidade das drogas na incorporação pelo cabelo. A = drogas ácidas; B = drogas básicas; e = extracelular; i = intracelular. Adaptado de Pragst e Balikova (2006).<sup>47</sup>

Substâncias lipofílicas e sem cargas podem entrar facilmente nas células através da membrana plasmática, enquanto que, para moléculas hidrofílicas ou íons orgânicos de médio peso molecular, a membrana plasmática atua como uma barreira.<sup>47</sup> Ainda, drogas básicas são incorporadas em maior extensão nas amostras de cabelo que drogas neutras ou ácidas. Por exemplo, cocaína, opiáceos e anfetaminas são encontradas em concentrações muito superiores em amostras que os canabinóides. Todas essas diferenças podem ser explicadas com base no pH intra e extracelular e nas constantes de acidez das drogas.

### 3.7.1.2. Interação droga-melanina

A melanina foi extensivamente investigada como possível fonte de sítios para a ligação e interação de drogas. Alguns estudos com animais e testes *in vitro* forneceram informações que ajudaram a entender o papel da melanina na incorporação de drogas como fenciclidina<sup>74</sup>, codeína<sup>75</sup>, anfetamina e metabólito<sup>76</sup>, *designer drugs*<sup>77</sup> e opiáceos<sup>78</sup>. Todos esses trabalhos corroboram para a eficiência da melanina em ligar-se a espécies básicas e neutras. Entretanto, o exato mecanismo *in vivo* dessa interação ainda não está claro.

Devido aos grupos carboxílicos expostos do polímero de melanina, adutos droga-melanina podem ocorrer nestes sítios por meio da interação eletrostática com espécies básicas positivamente carregadas. Entretanto, há indícios que sugerem que outras forças de interação, como exemplo a interação do tipo  $\pi$ - $\pi$  entre os núcleos aromáticos indol da melanina e os anéis aromáticos das drogas, tornam a ligação mais significativa.<sup>51</sup>

Estas interações foram abordadas por Nakahara e Kikura (1996).<sup>79</sup> Nesse estudo os autores avaliaram o efeito de fatores estruturais na incorporação de substâncias análogas à anfetamina e metanfetamina, no cabelo. Foram estudadas 32 substâncias por meio de experimentos com ratos em que cada uma das substâncias era administrada intraperitonealmente. A *ICR* de cada substância foi calculada e correlacionada com a diferença de sua estrutura em comparação com a anfetamina e a metanfetamina. Os autores concluíram que a estrutura de cada uma das substâncias tem grande influência na sua incorporação, e que não somente a basicidade é importante.

Como fatores que tiveram influência positiva na *ICR*, podemos citar: o aumento do tamanho da cadeia carbônica lateral, que leva a um aumento da lipofilicidade da molécula; a presença de anel benzênico ou furano, que favorece a interação  $\pi$ - $\pi$ ; e a presença de grupos metilenodioxi e metóxi no anel benzênico. Como fatores que influenciam negativamente, temos a presença de grupos hidroxila alifático ou aromático, que diminui a lipofilicidade e aumenta a acidez; e a presença de ligação tripla na cadeia carbônica lateral.<sup>79</sup>

### **3.8. Métodos de extração de drogas de abuso no cabelo**

Atualmente, não existem muitos métodos que envolvam diferentes procedimentos para a detecção e quantificação de drogas de abuso em cabelos. Estes métodos atuam extraíndo os analitos da matriz sólida para posterior detecção (com ou sem *clean-up*), sem modificá-los quimicamente. Entretanto, não há um procedimento universal que seja capaz de extrair com ótimos rendimentos, todas as classes de drogas. Na escolha do método mais apropriado, a estrutura química dos analitos deve ser levada em consideração.<sup>1</sup>

Normalmente, antes da extração, a amostra pode ser cortada em pequenas partes (1–3 mm) com o auxílio de uma tesoura ou pulverizada com o auxílio de um moinho de bolas. Podemos agrupar os métodos de extração em cinco grupos: extração com metanol; extração com acetonitrila; extração com soluções aquosas ou tampões; extração com mistura de solventes; digestão com NaOH; e digestão enzimática.

A extração com metanol é considerada de amplo espectro, pois é compatível com a maioria das substâncias. A extração geralmente consiste na incubação da amostra com 1-2,0 mL de metanol por períodos que variam de 4-18 horas.<sup>80</sup> O metanol é capaz de penetrar no interior do cabelo, levando ao inchaço e promovendo a remoção dos analitos via difusão e dissolução.<sup>47</sup> A sonicação também pode ser utilizada na extração com metanol e promove o aumento da velocidade de extração. Uma vantagem da extração com metanol é que ele não promove a hidrólise dos analitos.<sup>80</sup>

Uma vez que a concentração no extrato é suficiente, este pode ser injetado diretamente no equipamento<sup>81,82</sup> ou uma concentração a partir da secagem do

extrato com fluxo de N<sub>2</sub> e ressuspensão com menor volume de solvente pode ser realizada.<sup>83</sup> Como estes extratos exibem um alto grau de contaminação pela matriz, uma etapa de *clean-up* pode ser adicionada após a extração, em que extração líquido-líquido<sup>84</sup> (ELL) ou extração em fase sólida (EFS)<sup>85</sup> são frequentemente utilizadas. A extração com metanol acidificado já mostrou boas eficiências de extração para anfetaminas, benzodiazepínicos e opiáceos.<sup>80</sup>

A extração com acetonitrila já foi testada para opiáceos, anfetaminas, cocaína, THC e benzodiazepínicos.<sup>86</sup> Entretanto, há poucos métodos publicados com este solvente. Lendroiro et al. (2012)<sup>86</sup> reportou que a acetonitrila apresentou bons rendimentos de extração para 35 compostos de diferentes classes, incluindo o THC. Entretanto, foi necessário um tempo de extração de 12h para obter os resultados.

A extração com solução aquosa ou tampão já foi reportada para várias classes de substâncias. Tampões fosfato (pH 5 ou 8) ou solução aquosa com 0,1 M de HCl se mostraram eficientes na extração de drogas básicas.<sup>80</sup> Entretanto, uma desvantagem ocorre quando a cocaína e a 6-monoacetilmorfina são analisadas. Elas sofrem hidrólise parcial para BE e morfina durante o processo e, além delas, a heroína nunca pôde ser detectada por esta técnica.<sup>80</sup>

A extração com mistura de solventes é realizada de forma semelhante às outras extrações, porém o solvente de extração é composto por misturas que variam entre metanol, acetonitrila, formiato de amônia, ácido fórmico e diclorometano. O pH pode ser ácido ou básico, dependendo da classe de substância analisada. Porém, os procedimentos são considerados longos e contendo muitas impurezas como moléculas de baixo peso molecular o que requer etapa adicional de *clean-up*. Ainda, a degradação dos analitos, como a cocaína, heroína e monoacetilmorfina pode ocorrer.<sup>80</sup>

A digestão com solução aquosa de NaOH, é particularmente interessante para substâncias que são estáveis em pH alcalino, como alguns canabinóides e anfetaminas. Entretanto, a cocaína é fortemente hidrolisada em benzoilecgonina sob condições alcalinas. No processo, a amostra é completamente dissolvida, e uma etapa de extração é necessária para separar os analitos do extrato, que contém muitas impurezas. A maioria dos procedimentos trabalham com a



incubação de 1-2 mL de NaOH 1,0 ou 10,0 M, por até 60 minutos a 70-100°C. Extração ELL ou EFS normalmente são empregados como etapas de *clean-up*. Como aspecto positivo, podemos considerar que todos os analitos estarão disponíveis para a extração, uma vez que a fibra capilar é completamente desagregada.<sup>80</sup>

A digestão enzimática também atua com a completa digestão da amostra, porém, em condições de extração mais amenas do que a digestão com NaOH. Normalmente, a amostra é incubada em soluções tampão com um pH ótimo. A temperatura varia entre 40-60 °C e o tempo de digestão é considerado longo: 6-24 h. As enzimas mais utilizadas são a  $\beta$ -glucuronidase/arilsulfatase e pronase. Como vantagem, podemos citar o alto rendimento da extração. Para análises cromatográficas, uma etapa de limpeza da amostra também é necessária.<sup>80</sup>

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Materiais

- ✓ Microtubos de 2,0 mL FastPrep, MP Biomedicals (Santa Ana, CA, Estados Unidos da América);
- ✓ Esferas de aço inox 6,35 mm, MP Biomedicals (Santa Ana, CA, Estados Unidos da América);
- ✓ Microtubo de 1,5 mL âmbar, Brand (Wertheim, Alemanha);
- ✓ Unidade de filtração Whatman® Mini-Uniprep® G2 0,2 µm CR, GE Healthcare Life Sciences (Buckinghamshire, Reino Unido);
- ✓ Tubo para centrífuga de polipropileno de 15,0 mL, Corning Inc. (NY, Estados Unidos da América);
- ✓ Coluna 120 Poroshell EC-C18 (50 mm x 4,6 mm x 2,7 µm), Agilent Technologies (Santa Clara, CA, Estados Unidos da América);
- ✓ Pré-coluna 120 Poroshell EC-C18 (5 mm x 4,6 mm), Agilent Technologies (Santa Clara, CA, Estados Unidos da América);
- ✓ Seringa de vidro Gastight 500 µL, Hamilton Company (Bonaduz, Suíça).

### 4.2. Equipamentos

- ✓ Agitador Benchmixer, Benchmark (Edison, NJ, Estados Unidos da América);
- ✓ Micropipetas de volume variado Eppendorf Research Plus, Eppendorf (Hamburgo, Alemanha);
- ✓ Dispensador eletrônico HandyStep, Brand (Wertheim, Alemanha);
- ✓ Homogeneizador de amostras, modelo Fastprep-24 5G, MP Biomedicals (Santa Ana, CA, Estados Unidos da América);

- ✓ Cuba de ultrassom Cristófoli, Shenzhen Codyson Electrical Co. Ltd. (Shenzhen, China);
- ✓ Microcentrífuga MIKRO 220R, Hettich Lab Technology (Tuttlingen, Alemanha);
- ✓ Cromatógrafo líquido modelo 1290 Infinity UHPLC equipado com espectrômetro de massas do tipo triploquadrupolo modelo 6460C, Agilent Technologies (Santa Clara, CA, Estados Unidos da América);
- ✓ Balança analítica modelo AUW220D, Shimadzu (Quioto, Japão);
- ✓ Purificador de água Elga Purelab Classic, Veolia Water Technologies (Reino Unido);
- ✓ Freezer vertical VF50F, Metalfrio Solutions (São Paulo, SP, Brasil);
- ✓ Bomba de infusão KDS-100-CE, KDScientific (Holliston, MA, Estados Unidos da América).

### 4.3. Reagentes

- ✓ Material de referência certificado de Benzoilecgonina  $1 \times 10^3$  mg L<sup>-1</sup> (Lote: FE012813-01), Cerilliant Corporation (Austin, TX, Estados Unidos da América);
- ✓ Material de referência certificado de Benzoilecgonina-D<sub>3</sub>  $1 \times 10^3$  mg L<sup>-1</sup> (Lote: FE010912-01), Cerilliant Corporation (Austin, TX, Estados Unidos da América);
- ✓ Material de referência certificado de (±)-Anfetamina  $1 \times 10^3$  mg L<sup>-1</sup> (Lote: FE05061406), Cerilliant Corporation (Austin, TX, Estados Unidos da América);
- ✓ Material de referência certificado de (±)-Anfetamina-D<sub>5</sub>  $1 \times 10^2$  mg L<sup>-1</sup> (Lote: FE010912-01), Cerilliant Corporation (Austin, TX, Estados Unidos da América);

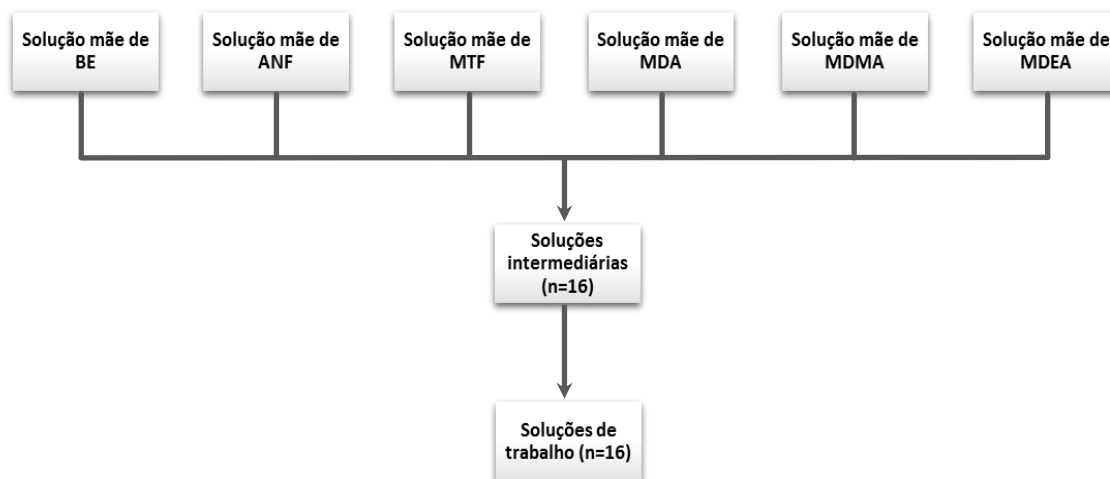
- ✓ Material de referência certificado de (±)-Metanfetamina  $1 \times 10^3$  mg L<sup>-1</sup> (Lote: FE082713-03), Cerilliant Corporation (Austin, TX, Estados Unidos da América);
- ✓ Material de referência certificado de (±)-Metanfetamina-D<sub>5</sub>  $1 \times 10^2$  mg L<sup>-1</sup> (Lote: FE08141403), Cerilliant Corporation (Austin, TX, Estados Unidos da América);
- ✓ Material de referência certificado de (±)-Metilendioxi-anfetamina (MDA)  $1 \times 10^3$  mg L<sup>-1</sup> (Lote: FE071612-02), Cerilliant Corporation (Austin, TX, Estados Unidos da América);
- ✓ Material de referência certificado de (±)-MDA-D<sub>5</sub>  $1 \times 10^2$  mg L<sup>-1</sup> (Lote: FE111111-01), Cerilliant Corporation (Austin, TX, Estados Unidos da América);
- ✓ Material de referência certificado de (±)-MDMA  $1 \times 10^3$  mg L<sup>-1</sup> (Lote: FE043013-02), Cerilliant Corporation (Austin, TX, Estados Unidos da América);
- ✓ Material de referência certificado de (±)-MDMA-D<sub>5</sub>  $1 \times 10^2$  mg L<sup>-1</sup> (Lote: FE04221406), Cerilliant Corporation (Austin, TX, Estados Unidos da América);
- ✓ Material de referência certificado de (±)-3,4-Metilendioxi-etilanfetamina (MDEA)  $1 \times 10^3$  mg L<sup>-1</sup> (Lote: FE091411-02), Cerilliant Corporation (Austin, TX, Estados Unidos da América);
- ✓ Material de referência certificado de (±)-MDEA-D<sub>5</sub>  $1 \times 10^2$  mg L<sup>-1</sup> (Lote: FE04161406), Cerilliant Corporation (Austin, TX, Estados Unidos da América);
- ✓ Metanol Lichrosolv grau HPLC Merck, EMD Millipore Corporation (Darmstadt, Alemanha);
- ✓ Água ultrapura obtida do purificador Elga Purelab Classic;
- ✓ Ácido fórmico ACS, Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, Estados Unidos da América);

- ✓ Ácido tricloroacético P.A. Emsure ACS Merck, EMD Millipore Corporation (Darmstadt, Alemanha);
- ✓ Ácido Clorídrico P.A.  $\geq 37\%$ , Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, Estados Unidos da América);
- ✓ Dimetilsufóxido ACS reagente  $\geq 99,9\%$ , Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, Estados Unidos da América).

#### 4.4. Preparo das soluções

As soluções estoques dos analitos não marcados foram preparadas em metanol na concentração de  $10^5 \text{ ng mL}^{-1}$  através da diluição de todo o conteúdo da ampola de material de referência certificado em balões volumétricos de 10,0 mL. Todas as soluções foram armazenadas a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  em tubos de centrífuga de 15,0 mL e protegidos da luz. As soluções estoques dos analitos deuterados foram preparadas e armazenadas da mesma forma descrita acima, porém, na concentração de  $10.000,0 \text{ ng mL}^{-1}$ .

As soluções intermediárias foram compostas por todos os analitos não marcados contendo as mesmas concentrações, formando um *pool* de substâncias. Essas soluções foram preparadas em balões volumétricos de 10,0 mL nas diferentes concentrações descritas na Tabela 2. Um esquema representativo da disposição das soluções está na Figura 8.



**Figura 8.** Esquema representativo do preparo das soluções utilizadas.

**Tabela 2.** Concentrações das soluções intermediárias utilizadas no desenvolvimento e validação da metodologia.

<b>Código das soluções intermediárias</b>	<b>Concentração Nominal (ng mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Volume de cada analito (mL)</b>	<b>Concentração da solução doadora (ng mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Volume final (mL)</b>
<b>Mm-001</b>	15.000,0	1,500	100.000,0	10,00
<b>Mm-002</b>	1.000,0	0,667	15.000,0	10,00
<b>Mm-003</b>	800,0	0,533	15.000,0	10,00
<b>Mm-004</b>	600,0	0,400	15.000,0	10,00
<b>Mm-005</b>	400,0	0,267	15.000,0	10,00
<b>Mm-006</b>	300,0	0,200	15.000,0	10,00
<b>Mm-007</b>	200,0	0,133	15.000,0	10,00
<b>Mm-008</b>	100,0	1,000	1.000,0	10,00
<b>Mm-009</b>	40,0	0,400	1.000,0	10,00
<b>Mm-010</b>	20,0	0,200	1.000,0	10,00
<b>Mm-011</b>	15,0	0,150	1.000,0	10,00
<b>Mm-012</b>	10,0	0,100	1.000,0	10,00
<b>Mm-013</b>	7,5	0,750	100,0	10,00
<b>Mm-014</b>	5,0	0,500	100,0	10,00
<b>Mm-015</b>	3,0	0,300	100,0	10,00
<b>Mm-016</b>	1,0	1,000	10,0	10,00

As soluções de trabalho, utilizadas para a construção da curva de calibração e dos ensaios de linearidade foram preparadas no mesmo dia de uso a partir da diluição de 10 vezes das soluções intermediárias descritas na Tabela 2. Estas soluções foram preparadas em metanol com 0,10% m/v de ácido tricloroacético (TCA) e abrangem uma faixa de concentração de 0,1 – 1.500,0 ng mL<sup>-1</sup>.

A solução de trabalho dos analitos marcados, utilizada como padrão interno, também foi preparada na forma de *pool* de substâncias, em balão volumétrico de 10,0 mL e metanol como diluente, conforme Tabela 3.

**Tabela 3.** Concentração dos analitos deuterados na solução de trabalho.

Código da solução de trabalho	Concentração Nominal (ng mL <sup>-1</sup> )	Volume de cada analito (mL)	Concentração da solução doadora (ng mL <sup>-1</sup> )	Volume final (mL)
Mm-017	80,0	0,080	10.000,0	10,0

Uma solução aquosa de TCA 50% (m/v) foi preparada pela dissolução de massa apropriada do ácido em água ultrapura. Soluções de TCA 0,05% m/v e 0,10% m/v em metanol foram preparadas diluindo o volume apropriado da solução 50% m/v de TCA no solvente.

#### 4.5. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

As análises cromatográficas de BE, ANF, MTF, MDA, MDMA e MDEA foram realizadas em um cromatógrafo líquido de ultra eficiência (CLUE) 1290 Infinity (Agilent Technologies - Santa Clara, CA, EUA) acoplado a um espectrômetro de massas 6460C, com analisador do tipo triploquadropolo, (Agilent Technologies - Santa Clara, CA, EUA) e fonte de ionização Agilent *Jet Stream* do tipo *electrospray* (ESI). Uma coluna com partículas de núcleo rígido do tipo Poroshell 120 EC-C18 (50 mm x 4,6 mm x 2,7 µm) e uma pré-coluna do tipo Poroshell 120 EC-C18 (5 mm x 4,6 mm) (Agilent Technologies - Santa Clara, CA, EUA) foram utilizadas nas análises.

O espectrômetro de massas operou no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM). Foram selecionadas as espécies [M+H]<sup>+</sup> de todas as drogas como íons precursores. Duas transições, uma de quantificação e outra de identificação (qualificação), para os analitos e uma única transição para os padrões internos isotopicamente marcados foram monitoradas durante as análises.

A otimização dos parâmetros de análise do espectrômetro de massas foi realizada por meio de infusão direta no espectrômetro de massas de solução de 50% metanol (v/v), contendo cada analito na concentração de 30 ng mL<sup>-1</sup>. A Tabela 4 apresenta todas as transições monitoradas, bem como a energia de colisão e o *Dwell time* para cada transição. A fonte de ionização ESI operou no

modo positivo. A seleção dos parâmetros da fonte foi realizada por meio da infusão direta de solução de 30,0 ng mL<sup>-1</sup> dos analitos.

Um método isocrático foi desenvolvido, utilizando um fluxo de 0,5 mL min<sup>-1</sup> em que duas fases móvel A e B, constituídas de água ultrapura com 0,1% de ácido fórmico e metanol com 0,1% de ácido fórmico, respectivamente, foram misturadas na proporção de 65:35% (A:B) no equipamento. Um volume de injeção de 20 µL foi utilizado e uma solução de 50% de metanol em água ultrapura foi utilizada para a limpeza do sistema de injeção.

Após a definição das condições cromatográficas, os parâmetros da fonte de ionização foram ajustados novamente. Os parâmetros otimizados da fonte estão descritos abaixo:

- ✓ *Gas Temp*: 350 °C;
- ✓ *Gas Flow*: 10 L min<sup>-1</sup>;
- ✓ *Nebulizer*: 38 psi;
- ✓ *Sheath Gas Temp*: 400 °C;
- ✓ *Sheath Gas Flow*: 12 L min<sup>-1</sup>;
- ✓ *Capillary (+)*: 2000 V;
- ✓ *Nozzle Voltage (+)*: 0 V.



**Tabela 4.** Parâmetros do método de aquisição do espectrômetro de massas para todos os analitos e respectivos padrões internos.

Analito	Íon Precursor (m/z)	Íon filho Quantificação (m/z)	Íon filho Confirmação (m/z)	EC Quantificação (eV)	EC Confirmação (eV)	Tempo de aquisição (ms)
<b>MDEA</b>	208	163	135	10	18	50
<b>MDMA</b>	194	163	105	10	27	50
<b>MDA</b>	180	105	135	22	18	50
<b>MTF</b>	150	91	119	8	16	50
<b>ANF</b>	136	91	119	5	18	50
<b>BE</b>	290	168	105	18	30	50
<b>MDEA-D5</b>	213	163	-	10	-	40
<b>MDMA-D5</b>	199	165	-	10	-	40
<b>MDA-D5</b>	185	110	-	22	-	40
<b>MTF-D5</b>	155	121	-	8	-	40
<b>ANF-D5</b>	141	93	-	18	-	40
<b>BE-D3</b>	293	171	-	14	-	40

EC, energia de colisão

#### 4.6. Preparo de amostra fortificada

Para auxiliar no desenvolvimento e otimização do procedimento, uma amostra de cabelo foi contaminada com benzoilecgonina, anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA e MDEA, a partir de uma adaptação das metodologias propostas por Welch *et al.* (2003)<sup>87</sup> e Fernandez *et al.* (2014).<sup>88</sup>

Foram selecionados 4,0 g de cabelo livre de drogas e de 4,0 cm de comprimento de um único doador. A amostra foi lavada cinco vezes com água ultrapura para retirar resíduos de cosméticos, e seca a temperatura ambiente por 15 horas. Em seguida, uma solução contendo 25,0 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), 10,0 mL de solução 0,01 mol L<sup>-1</sup> de ácido clorídrico (HCl) e 2,5 mL de cada solução estoque dos seis analitos foi preparada. A concentração final das drogas na solução foi de 5.000,0 ng mL<sup>-1</sup>. Os 4,0 g de cabelo lavados previamente foram adicionados à solução, e foi garantido que todos os fios estivessem submersos na solução.

A amostra foi mantida na solução por 11 dias, até que tivesse incorporado concentrações adequadas de todas as drogas para serem consideradas como amostras positivas. Para monitorar o grau da incorporação, alíquotas de aproximadamente 25,0 mg foram retiradas no 4º, 8º e 11º dia, enxaguadas com 10 frações de 5,0 mL de metanol para retirar a contaminação superficial e, em seguida, analisadas. Esta etapa foi realizada sob banho térmico a 40 °C e 60 segundos de sonicação. Uma vez que uma concentração aceitável foi obtida, toda a amostra foi lavada com frações de 200,0 mL de metanol, também sob regime de sonicação e banho térmico a 40 °C, até que o metanol não apresentasse mais sinais das drogas. Em seguida, a amostra foi seca a temperatura ambiente por 15 horas e armazenada em papel alumínio.

#### **4.7. Seleção das condições do preparo de amostra**

Para a validação de uma metodologia de simples preparo, eficiente e aplicável à rotina laboratorial, a extração de amostra micropulverizada foi a técnica escolhida, uma vez que já existem trabalhos na literatura que utilizam esta técnica para extração de drogas no cabelo.<sup>80,82,88-92</sup> Estes trabalhos indicam uma diminuição do tempo de extração e da quantidade de amostra quando comparada com outras técnicas de extração já descritas.

##### **4.7.1. Micropulverização da amostra**

Para a micropulverização ou moagem do cabelo, foram utilizados um homogeneizador de amostras Fastprep-24 5G, microtubos de polipropileno de 2,0 mL e esferas de aço de 6,35 mm de diâmetro. A definição dos parâmetros do processo de moagem foi feita por observação visual do extrato, sendo que os parâmetros foram alterados visando fornecer uma granulometria mais fina e homogênea da amostra. Os parâmetros do homogeneizador disponíveis são: velocidade de agitação vertical (de 1,0 a 10,0 m s<sup>-1</sup>); número de ciclos de moagem (de 1 a 5 ciclos); tempo de moagem (de 5 a 120 segundos); e tempo de intervalo entre os ciclos (de 1 a 300 segundos).

Para testar cada condição, foram pesadas 20 amostras de pool branco em microtubo de polipropileno de 2,0 mL. Em cada microtubo foi pesado

aproximadamente 25,0 mg de pool branco de cabelo e adicionado duas esferas de aço inox, e então, o microtubo foi vedado. Cada condição foi testada em duplicata, onde buscou-se um extrato mais fino e homogêneo.

Após a escolha dos parâmetros de moagem, a avaliação foi realizada por meio da extração de replicatas ( $n = 5$ ) de aproximadamente 25,0 mg da amostra fortificada. Todas as cinco amostras foram submetidas às condições de moagem definidas e foram extraídas após o processamento. Aos microtubos contendo as amostras após a micropulverização, foi adicionado 1,0 mL de metanol e 30  $\mu\text{L}$  de solução contendo 80,0  $\text{ng mL}^{-1}$  de cada padrão interno deuterado. Em seguida, os microtubos foram fechados e mantidos em banho térmico ( $40 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ ) com sonicação por 60 minutos. Uma alíquota de 300  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi diluída em 700  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, filtrada em unidades de filtração Whatman® Mini-Uniprep® G2 0,2  $\mu\text{m}$  de celulose regenerada e injetadas diretamente no sistema cromatográfico.

#### **4.7.2. Otimização da extração com metanol**

Após a definição dos parâmetros de moagem da amostra, a extração com metanol foi otimizada a partir de estudo multivariado. Para a seleção das variáveis mais significativas, um planejamento fatorial completo  $2^3$  com triplicata de ponto central foi escolhido para definir as principais variáveis de influência do processo de extração. Em seguida, uma otimização univariada foi executada para a principal variável de influência na extração.

Para o planejamento fatorial completo  $2^3$ , as variáveis escolhidas para avaliação foram a temperatura durante a extração, o tempo de sonicação e a concentração de TCA adicionada ao metanol na extração. Todos os ensaios foram executados em banho ultrassônico. Os fatores da seleção de variáveis estão descritos na Tabela 5.

**Tabela 5.** Fatores avaliados para a seleção de variáveis no planejamento fatorial  $2^3$  com triplicata do ponto central.

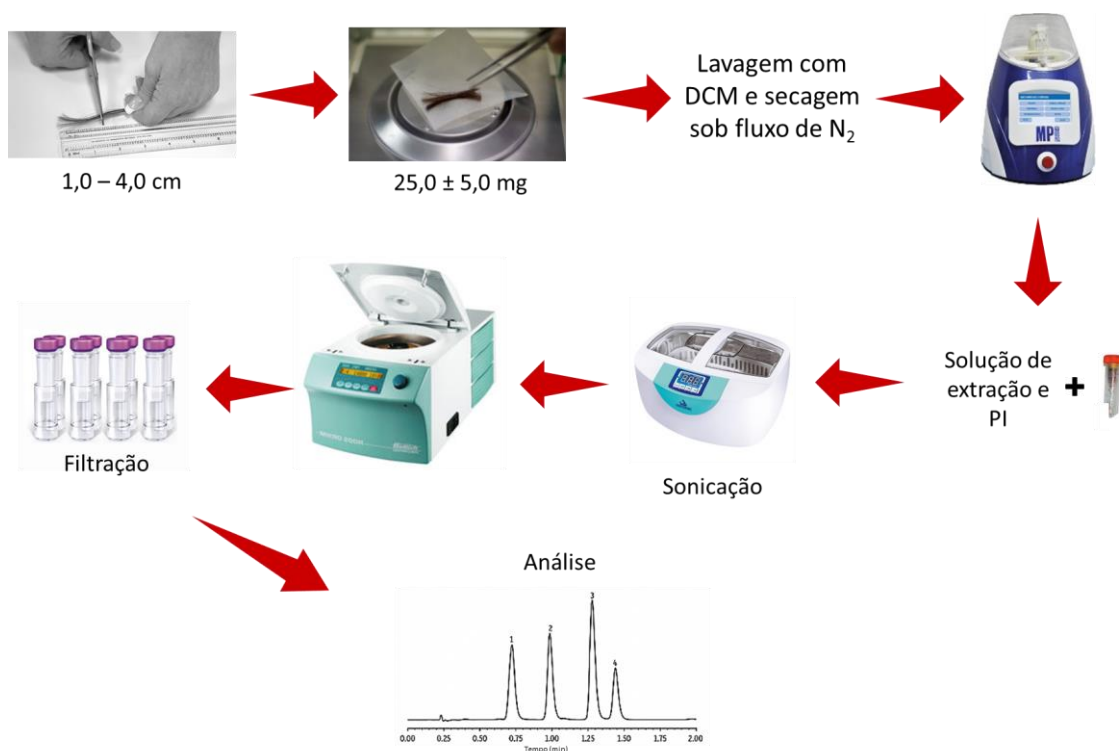
Fatores	-1	0	+1
Tempo de sonicação (min)	8	34	60
Temperatura	Não	Sim	Sim
% de TCA	0	0,05	0,10

A otimização univariada foi executada somente para a variável tempo de sonicação. O experimento foi executado em triplicata de cada condição experimental. Os tempos de extração 30; 60; 90; 120; 150; 180, 210 e 240 minutos foram avaliados. Os experimentos foram realizados com alíquotas de  $25,0 \pm 5,0$  mg da amostra de cabelo fortificada preparada de acordo com o item 4.6. As análises dos dados foram realizadas utilizando o software Statistica 10.0 (Tulsa, OK, Estados Unidos da América).

#### 4.8. Preparo de amostra

Em microtubo de polipropileno de 2,0 mL previamente pesado com uma esfera de aço no interior, foi adicionado  $25,0 \pm 5,0$  mg de amostra de cabelo de comprimento entre 1,0 e 4,0 cm com o auxílio de uma pinça, e em seguida, pesado novamente. Ao microtubo, 2,0 mL de diclorometano (DCM) foi adicionado e, em seguida, foi agitado por 30 segundos em vórtex. O procedimento foi repetido por 3 vezes e a solução da última lavagem foi armazenada para posterior análise. A amostra foi seca sob fluxo de  $N_2$  por 10 minutos. Adicionou-se outra esfera de aço ao microtubo e seguiu-se para o procedimento de moagem no homogeneizador. Em seguida, foi adicionado 1,0 mL de solução de extração (metanol grau HPLC contendo 0,1% de TCA) e 30,0  $\mu$ L de solução de padrão interno contendo 80,0  $ng\ mL^{-1}$  de cada analito deuterado. O microtubo devidamente fechado foi colocado em banho ultrassônico a  $40,0 \pm 5,0$  °C por 240 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 14.000 rpm. Foi retirado 300,0  $\mu$ L do sobrenadante e o mesmo foi transferido para um microtubo de polipropileno de 1,5 mL

contendo 700,0 µL de água ultrapura. O microtubo foi agitado em vórtex vigoroso por 10 segundos, e 500,0 µL da mistura foi transferida para a unidade de filtração Mini-UniPrep®. Após a filtração, 20,0 µL foi diretamente injetado no LC-MS/MS. O extrato da última lavagem foi seco e ressuspendido com 500 µL de fase móvel para ser analisado o LC-MS/MS.



**Figura 9.** Esquema representativo do procedimento de extração das amostras de cabelo.

#### 4.9. Validação da metodologia

Os parâmetros de especificidade e seletividade, efeito de matriz, efeito memória, linearidade, limites de quantificação e detecção, imprecisão e exatidão foram avaliados durante a validação do método. A validação seguiu as diretrizes da C62-A *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Methods; Approved Guideline*.<sup>93</sup>

A especificidade e seletividade do método foram avaliadas pela extração de diferentes pools de cabelos, em branco duplo (sem os analitos e sem os padrões internos). O pool foi extraído em triplicata e a presença de interferentes

com as mesmas transições de massa e mesmos tempos de retenção dos analitos foi avaliada.

A presença de efeito de matriz foi avaliada com a execução de dois experimentos: primeiro, uma infusão pós-coluna de uma solução de concentração 30,0 ng mL<sup>-1</sup> dos analitos foi realizada enquanto um duplo branco era injetado, para verificar regiões de supressão ou aumento de sinal; segundo, pela comparação das respostas entre um pool branco contaminado em três níveis de concentração, e de três soluções nas mesmas concentrações preparadas em fase móvel. As concentrações utilizadas para avaliar o efeito de matriz foram 1,5; 40,0 e 80,0 ng mL<sup>-1</sup>, equivalentes a 0,06; 1,60; e 3,20 ng mg<sup>-1</sup> para 25,0 mg de amostra, analisadas em replicatas (n = 6) de cada concentração. A porcentagem do efeito de matriz (EM) foi calculada de acordo com as fórmulas abaixo:

$$EM (\%) = \frac{\text{área do analito em matriz}}{\text{área do analito em solução}} \times 100 \quad (1)$$

$$EM_{PI} (\%) = \frac{\text{razão entre as áreas do analito e do padrão interno em matriz}}{\text{razão entre as áreas do analito e do padrão interno em solução}} \times 100 \quad (2)$$

A presença de efeito memória foi avaliada pela presença dos analitos em branco duplo, após sucessivas injeções de extrato de amostra contaminada para concentração equivalente ao ponto mais alto da curva (100,0 ng mL<sup>-1</sup> ou 4,0 ng mg<sup>-1</sup>).

A linearidade foi ensaiada a partir do preparo independente de três curvas de calibração. Cada curva de calibração compreendeu 12 níveis de soluções preparadas em metanol, com concentrações: 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 60,0 e 100,0 ng mL<sup>-1</sup>. Esta faixa de concentração é equivalente a uma faixa de 0,004 – 4,0 ng mg<sup>-1</sup> de drogas em amostra, considerando uma massa de 25,0 mg de amostra. Uma alíquota de 300 µL de cada solução, foi diluída para um volume final de 1,0 mL em água ultrapura e injetada no sistema cromatográfico.

A avaliação da linearidade foi realizada por meio dos resíduos (concentração calculada a partir da equação da curva de calibração de cada replicata, subtraída da concentração nominal da solução). Um gráfico Concentração X Resíduos foi plotado para cada droga e a distribuição dos pontos foi avaliada.

O limite de detecção (LD) foi definido como a menor concentração dos analitos que apresentaram relação sinal ruído (S/N) > 3,0. O limite de quantificação (LQ) foi definido como a concentração que apresentou imprecisão e exatidão aceitáveis (coeficiente de variação (CV) < 20% e tendência < 15%). Os limites de quantificação e detecção foram ensaiados em três dias diferentes e em triplicata, nas concentrações: 0,004; 0,012; 0,020; 0,040 e 0,080 ng mg<sup>-1</sup>.

A precisão foi avaliada em três dias diferentes e em três níveis de concentração. Cada nível foi analisado em replicatas (n = 6) e foram preparados a partir de soluções de 1,5; 40,0 e 80,0 ng mL<sup>-1</sup> das drogas em metanol com 0,1% de TCA. Estas soluções foram utilizadas para extrair alíquotas de 25,0 ± 5,0 mg de pool branco de amostras, substituindo a solução de extração. Adicionalmente, seis replicatas da amostra fortificada (descrita no item 4.6) foram extraídas em cada dia (conforme item 4.9) para avaliar a precisão da extração das amostras no cabelo. A avaliação dos resultados foi realizada por meio do coeficiente de variação (%CV), no qual a porcentagem máxima permitida é de 15% para cada nível.

#### **4.10. Análise de amostras reais**

Com o objetivo de avaliar a metodologia, amostras reais de cabelo de voluntários foram coletadas e analisadas. Estas amostras foram provenientes de três fontes: (I) clínica de reabilitação para dependentes químicos em Belo Horizonte; (II) cadáveres do Instituto Médico Legal de Belo Horizonte (IML-BH) e (III) doadores voluntários que aceitaram participar da pesquisa.

Uma rápida entrevista com o doador, foi realizada para colher informações a respeito do histórico e auxiliar na interpretação dos resultados. O tipo de informação coletada variou com a fonte, de modo que puderam ser elaborados dois formulários de coleta diferentes. Um formulário foi preparado para as

amostras do IML-BH (Anexo I), o outro formulário foi direcionado para as amostras da clínica de reabilitação e de voluntários externos (Anexo II).

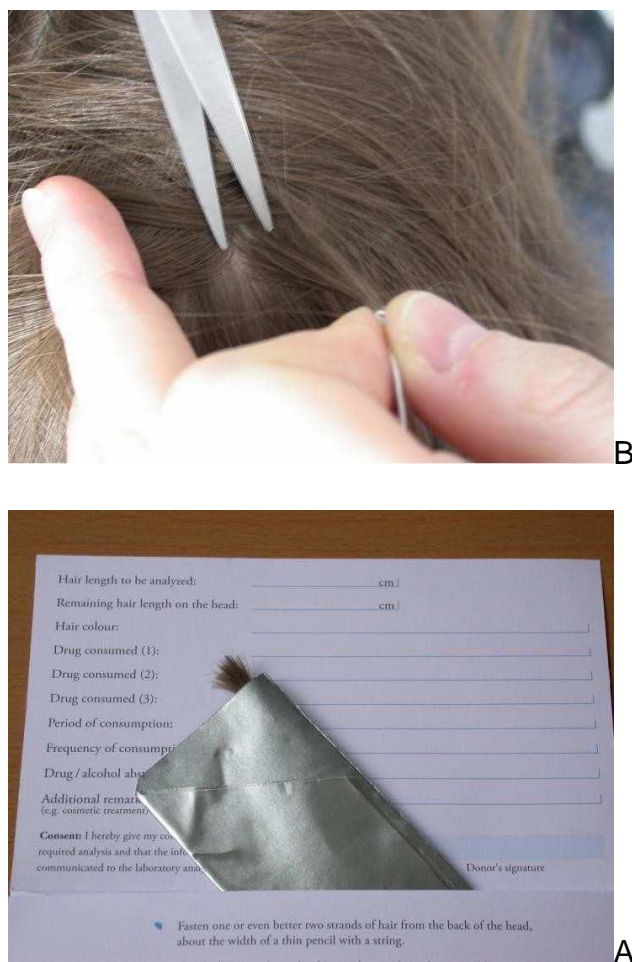
Nas amostras provenientes do IML-BH, pouca ou nenhuma informação sobre o histórico do doador estava disponível, portanto, as informações coletadas foram predominantemente obtidas pela observação das características físicas do doador e da amostra. Foram obtidas informações a respeito da região de coleta da amostra (cabeça, membros, axila e pubiana), cor do cabelo, indícios de tratamento cosmético no cabelo e qual o tratamento. Para preservar o doador e sua família, informações a respeito de sua identidade não foram coletadas. Nas amostras da clínica de reabilitação e dos doadores voluntários, informações sobre as drogas utilizadas, tempo de abstinência, tempo de uso, frequência de uso, tipo de tratamento cosmético e cor natural do cabelo foram coletadas.

No centro de reabilitação, os doadores foram diretamente abordados e esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa. Um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) com informações sobre a pesquisa foi apresentado e assinado para formalizar a doação da amostra. No IML-BH um membro da família responsável pelo doador foi abordado, apresentado aos propósitos da pesquisa e questionado sobre a autorização para a coleta da amostra. Caso positivo, o TCLE foi entregue e assinado em duas vias, sendo que uma ficou em posse do familiar e outra seguiu junto com a amostra. Com base nas informações dos doadores, uma estratificação das amostras pelo perfil e histórico dos doadores foi feita com o objetivo de classificar a amostra em quatro grupos: (I) amostra sabidamente positiva; (II) amostra duvidosa com tendência maior de ser positiva; (III) amostra duvidosa sem perfil do doador; (IV) amostra duvidosa com tendência menor de ser positiva; (VI) e amostra sabidamente negativa.

As coletas seguiram os procedimentos preconizados pela literatura, em que, uma mecha de cabelo, preferencialmente da região da nuca, foi separada e cortada rente à pele com auxílio de uma tesoura. As amostras foram envoltas por papel alumínio com a extremidade da raiz identificada e guardadas juntamente com os respectivos formulários de coleta em envelope de papel.<sup>23,52,5</sup> Na ausência de cabelos na cabeça ou com comprimento menores que 1,0 cm, outra região foi selecionada para coleta. Neste trabalho, pelos dos membros ou



da axila serviram de sítios de coleta alternativo e foram coletados com auxílio de um barbeador descartável. Na Figura 10 está demonstrado algumas etapas do procedimento de coleta.



**Figura 10.** Ilustração do procedimento de coleta. (A) Corte da mecha de cabelo rente a pele. (B) Imagem do armazenamento da amostra após a coleta. (Adaptado de Salomone *et. al.*, (2016)).<sup>94</sup>

Este trabalho foi devidamente submetido à Plataforma Brasil e aprovado de forma integral pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (CoEP - UFMG). Projeto: CAAE – 59125716.1.0000.5149.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Condições do sistema LC-MS/MS

O sistema cromatográfico foi otimizado para trabalhar em modo isocrático. O tempo total da análise foi de 4,0 minutos e os tempos de retenção de cada analito e de seu respectivo padrão interno estão representados na Tabela 6, embora os tempos de retenção de todos os analitos sejam próximos, a especificidade da espectrometria de massas no modo MRM garante que as substâncias sejam devidamente analisadas através de diferentes transições de massa. Na Figura 11, está representado um cromatograma obtido de um nível intermediário da curva de calibração. A identificação das substâncias nos cromatograma foi realizada pelo tempo de retenção e pela razão entre os sinais dos íons de qualificação e de quantificação de cada analito. Esta proporção é fixa para cada substância nas condições de análise e deve ser definida durante a validação. A tolerância permitida da razão entre os íons é padronizada em diretrizes sobre espectrometria de massas.<sup>93</sup> Os parâmetros de identificação dos analitos estão descritos na Tabela 6.

**Tabela 6.** Parâmetros de identificação dos analitos. O tempo de retenção e a proporção entre os íons de quantificação e de qualificação foram os critérios de identificação considerados neste trabalho.

Analito	Tempo de retenção (min)	Razão dos Íon qualificação / Íon quantificação (%)	Tolerância (%)
MDEA	2,88	29	±7,3
MDMA	2,48	44	±11,0
MDA	2,52	57	±11,4
MTF	2,54	37	±9,3
ANF	2,56	55	±11,0
BE	2,99	34	±8,5
MDEA-D5	2,86	-	-
MDMA-D5	2,46	-	-
MDA-D5	2,50	-	-
MTF-D5	2,54	-	-
ANF-D5	2,54	-	-
BE-D3	2,99	-	-



**Figura 11.** Cromatogramas de uma solução contaminada com concentração de  $10,0 \text{ ng mL}^{-1}$  de cada analito. Estão representados os cromatogramas de todas as transições de massa monitoradas pelo método. O primeiro gráfico é referente ao cromatograma de íons totais (TIC).

## 5.2. Preparo da amostra fortificada

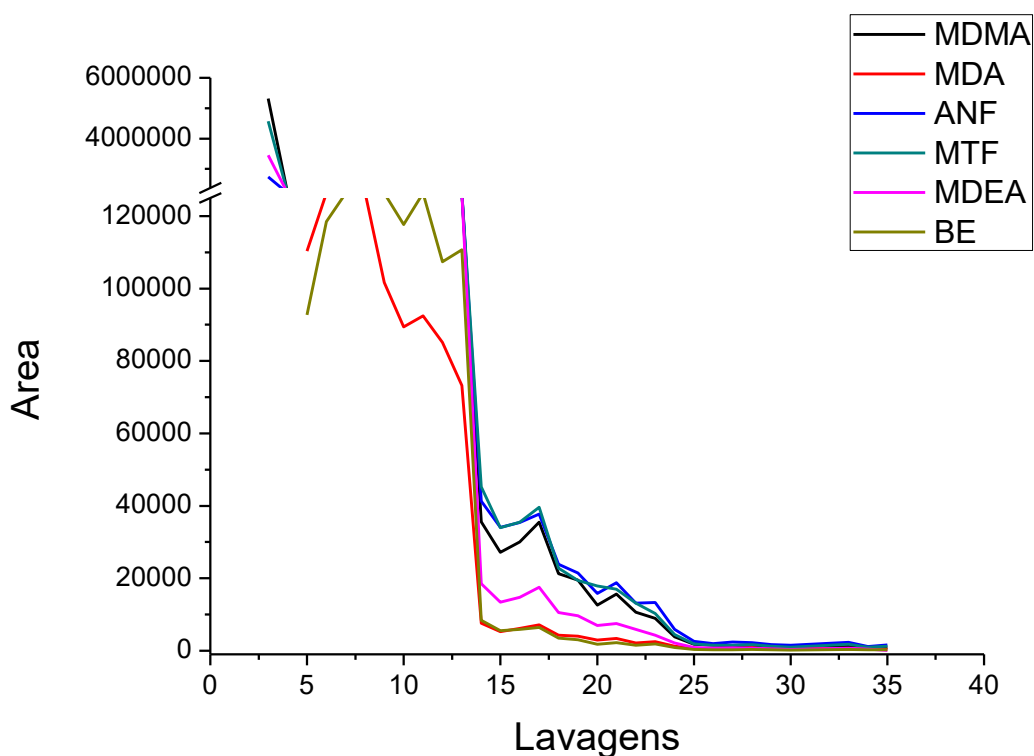
As três alíquotas da amostra fortificada retiradas no 4º, 8º e 11º dia foram analisadas para verificar se a incorporação das drogas no cabelo havia alcançado concentrações adequadas para análise. Os dados de concentração aproximada obtidos destas alíquotas estão representados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Concentração em  $\text{ng mg}^{-1}$  das alíquotas retiradas para monitorar a incorporação das drogas no cabelo.

Substância	Concentração $\text{ng mg}^{-1}$		
	4 dias	8 dias	11 dias
MDMA	2,07	2,95	3,95
MDA	0,45	0,78	1,03
MTF	0,54	0,88	1,11
ANF	0,61	1,12	1,54
MDEA	0,57	0,85	1,14
BE	1,37	2,43	3,04

O processo de lavagem da amostra contaminada compreendeu 35 lavagens com 200,0 mL de metanol cada. A evolução das áreas dos analitos em função do número de lavagens está representado na Figura 12.

O objetivo das etapas de lavagem da amostra foi assegurar que grande parte das moléculas das drogas que estivessem incorporadas mais internamente no fio de cabelo (mais especificamente no córtex, e não na cutícula). Portanto, para acelerar a remoção do excesso de contaminação superficial, sonicação com banho térmico a 40°C foram introduzidos nas 13 primeiras lavagens. Esse procedimento explica a queda repentina das áreas na 14ª lavagem. A partir da 14ª lavagem, essas foram executadas sem banho térmico ou sonicação.



**Figura 12.** Evolução do processo de lavagem da amostra contaminada. A partir da 14ª lavagem houve uma queda significativa das áreas.

A partir da 14ª lavagem, essas foram executadas sem banho térmico ou sonicação. Um extrato de lavagem completamente livre de drogas não pôde ser obtido, pois o metanol é considerado um bom solvente extrator de drogas no cabelo, e é capaz de penetrar facilmente nas fibras do cabelo.<sup>47</sup> Porém, áreas muito baixas dos analitos foram encontradas na 35ª lavagem (menores do que 5% da área do primeiro ponto da curva) e foram consideradas satisfatórias.

### 5.3. Seleção das condições do preparo de amostras

#### 5.3.1. Micropulverização da amostra

As melhores condições de moagem das amostras de cabelo foram alcançadas com 5 ciclos de 30 s de moagem a uma velocidade vertical de 5,0 m/s, e intervalos de 180 s entre cada ciclo. O tempo total de moagem foi de 5,5 minutos.

Durante o desenvolvimento das condições de moagem, o aumento da velocidade vertical no equipamento, promoveu maior número de colisões e colisões com mais energia entre a amostra e as esferas de aço, o que resultou em extratos com granulometria mais fina, além de favorecer um processo mais rápido. Porém, a temperatura da amostra ao final da micropulverização parecia alta e isto poderia interferir na estabilidade dos analitos durante a moagem. Ainda, em algumas amostras os microtubos não suportaram e acabaram se rompendo. Por este motivo foi adotada uma condição de moagem mais branda, porém com um tempo maior. A Figura 13 ilustra o resultado da amostra após processamento.

Durante os testes de padronização da trituração da amostra, um teste foi realizado com a moagem simultânea com a extração com metanol, conforme o que já havia sido reportado por Koster et. al. (2014).<sup>91</sup> Os autores alcançaram tempos de extração de 30 minutos no trabalho. Entretanto, o metanol pareceu diminuir a eficiência da moagem, pois a amostra não foi triturada adequadamente mesmo aumentando o tempo ou a velocidade. Com isto, decidiu-se que a moagem precedendo a extração seria a melhor alternativa para garantir um extrato mais homogêneo.



**Figura 13.** Imagem de amostra de cabelo após moagem. Ao lado estão as duas esferas de aço inox e o microtubo de 2,0 mL de polipropileno utilizados.

Os resultados da extração das amostras fortificadas estão representados na Tabela 8. Os coeficientes de variação de todas as substâncias foram menores do que 10%, indicando que o processo de moagem foi eficiente e forneceu uma amostra homogênea o suficiente, embora o protocolo de extração ainda não havia sido completamente definido.

**Tabela 8.** Concentrações em ng mg<sup>-1</sup> das cinco alíquotas utilizadas para avaliar os parâmetros de moagem.

	<b>MDMA</b>	<b>MDA</b>	<b>ANF</b>	<b>MTF</b>	<b>MDEA</b>	<b>BE</b>
<b>Alíquota 01</b>	2,96	0,77	0,83	1,16	0,86	2,28
<b>Alíquota 02</b>	2,88	0,70	0,78	1,21	0,80	2,35
<b>Alíquota 03</b>	2,98	0,76	0,87	1,15	0,90	2,23
<b>Alíquota 04</b>	3,04	0,83	0,91	1,27	0,89	2,38
<b>Alíquota 05</b>	2,63	0,64	0,74	1,09	0,75	2,10
<b>%CV</b>	5,5%	9,8%	8,2%	5,8%	7,5%	4,9%

#### 5.4. Otimização da extração

A fim de otimizar o procedimento de extração, foi realizada uma seleção das variáveis que poderiam influenciar na extração: tempo de extração; sonicação; e % de ácido. O tempo de extração é importante para garantir que a maior quantidade possível das drogas ou metabólitos sejam extraídos do cabelo, e que o equilíbrio seja atingido. A sonicação já havia sido reportada como um fator positivo na extração durante os testes de lavagem da amostra fortificada. Por último, a extração em meio ácido auxilia na extração de drogas básicas ligadas às partículas de melanina. Um planejamento fatorial 2<sup>3</sup> com triplicata no ponto central foi executado para verificar quais as variáveis que mais influenciam na extração do cabelo utilizando metanol. O TCA foi escolhido por ser um ácido forte, pela disponibilidade no laboratório e compatibilidade com a espectrometria de massas. Na Tabela 9 segue o delineamento experimental e os resultados.

Uma vez que são seis analitos, foi utilizada a média geométrica para agrupar todos os analitos em uma única resposta e facilitar o tratamento dos dados.

**Tabela 9.** Delineamento experimental do planejamento fatorial para a extração de drogas de abuso em cabelo.

Experimento	Tempo (min)	Temperatura (40 °C)	% TCA	Resposta*
1	8	Não	0,00%	0,000
2	60	Não	0,00%	0,356
3	8	Sim	0,00%	0,000
4	60	Sim	0,00%	0,876
5	8	Não	0,10%	0,070
6	60	Não	0,10%	0,719
7	8	Sim	0,10%	0,333
8	60	Sim	0,10%	1,000
9 (C)	34	Sim	0,05%	0,620
10 (C)	34	Sim	0,05%	0,832
11 (C)	34	Sim	0,05%	0,782

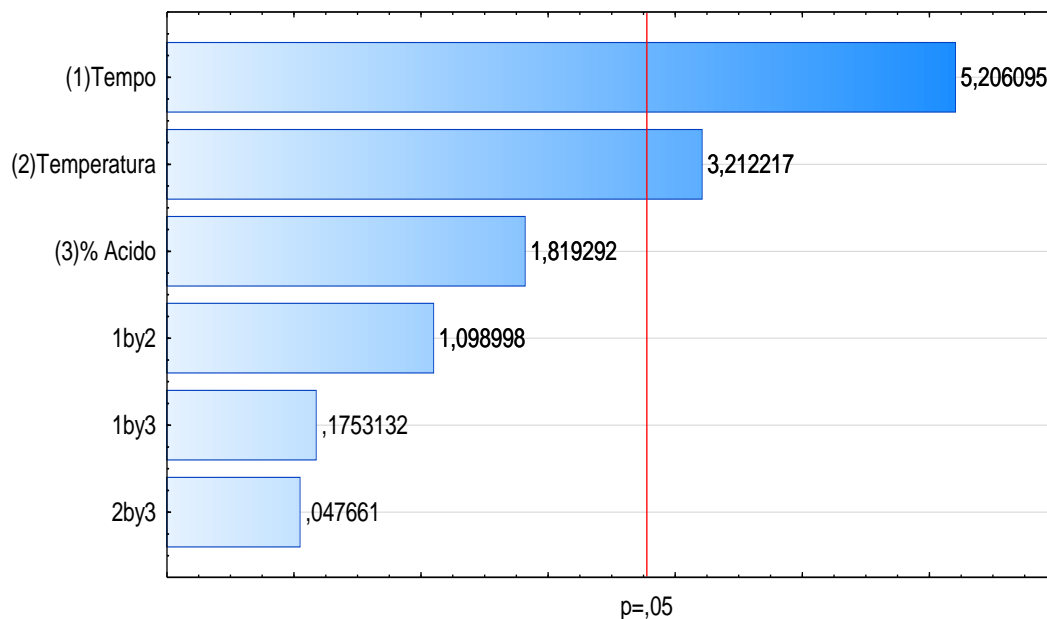
O resultado do planejamento experimental está representado graficamente na Figura 14. Todas as variáveis apresentaram efeito positivo na extração, embora a concentração do ácido fosse não significativa. A mais influente foi o tempo de extração com sonicação.

Uma vez que todas as variáveis apresentaram efeito positivo, elas foram mantidas no maior nível (+1) para facilitar o processo de extração. Portanto, um estudo univariado para a variável tempo de extração com sonicação (com banho térmico a 40 °C e 0,10% de TCA em metanol) foi realizado.

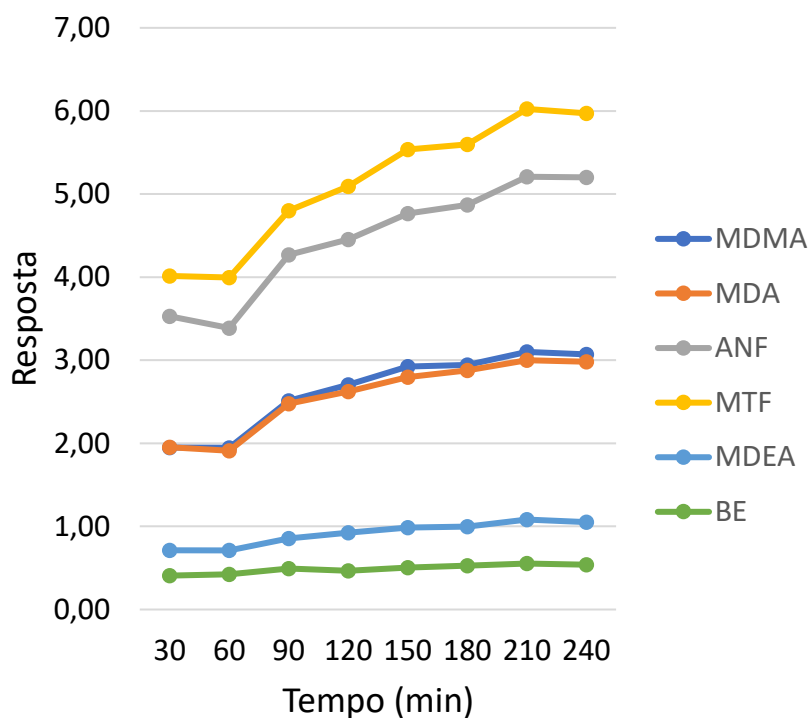
A otimização univariada foi realizada com amostras fortificadas de aproximadamente 25,0 mg previamente trituradas, onde a cada 30 minutos duas amostras eram retiradas e analisadas. O estudo seguiu até as concentrações



das amostras alcançarem o equilíbrio de extração, o que ocorreu quatro horas após o início do experimento (Figura 15).



**Figura 14.** Gráfico de Pareto obtido por meio do planejamento fatorial  $2^3$  utilizando as variáveis Tempo de sonicação, Temperatura de sonicação e Porcentagem de Ácido Tricloroacético na solução de extração.



**Figura 15.** Respostas médias da otimização da variável tempo de extração com sonicação. Para este experimento, a extração foi mantida sob presença de temperatura de aproximadamente 40 °C, sonicação e 0,10% de Ácido Tricloroacético no solvente extrator.

### 5.5. Validação da metodologia

Diferentes pools de amostras foram analisados e não apresentaram nenhum interferente significativo nos tempos de retenção dos analitos ou dos padrões internos, assegurando a seletividade do método, conforme pode ser observado em exemplo na Figura 16.

Não foi observado significativo efeito de supressão ou aumento de sinal nos tempos de retenção dos analitos a partir do experimento de infusão pós-coluna, conforme está representado na Figura 17. Este resultado indica que o método cromatográfico está adequado, e reduz a presença de interferentes nos tempos de retenção dos analitos, o que poderia alterar as respostas dos analitos. Entretanto, no experimento para quantificação do efeito de matriz, a partir das áreas dos analitos em matriz e em solução, foi observada uma supressão de sinal de aproximadamente 22 – 10% para a BE, e um aumento de sinal de aproximadamente 13 – 18% para a MDEA. Isto ocorre quando outras

substâncias que eluem no mesmo tempo de retenção da BE e da MDEA dificultam ou facilitam a ionização no *electrospray*, resultando em uma diminuição ou aumento da quantidade de íons que chegam no espectrômetro de massas. Contudo, quando é levado em consideração o padrão interno de cada analito ( $EM_{PI}$ ), o efeito de matriz é praticamente eliminado, conforme já observado na literatura<sup>91,96</sup>. Os resultados do experimento para o efeito de matriz estão descritos na Tabela 10.

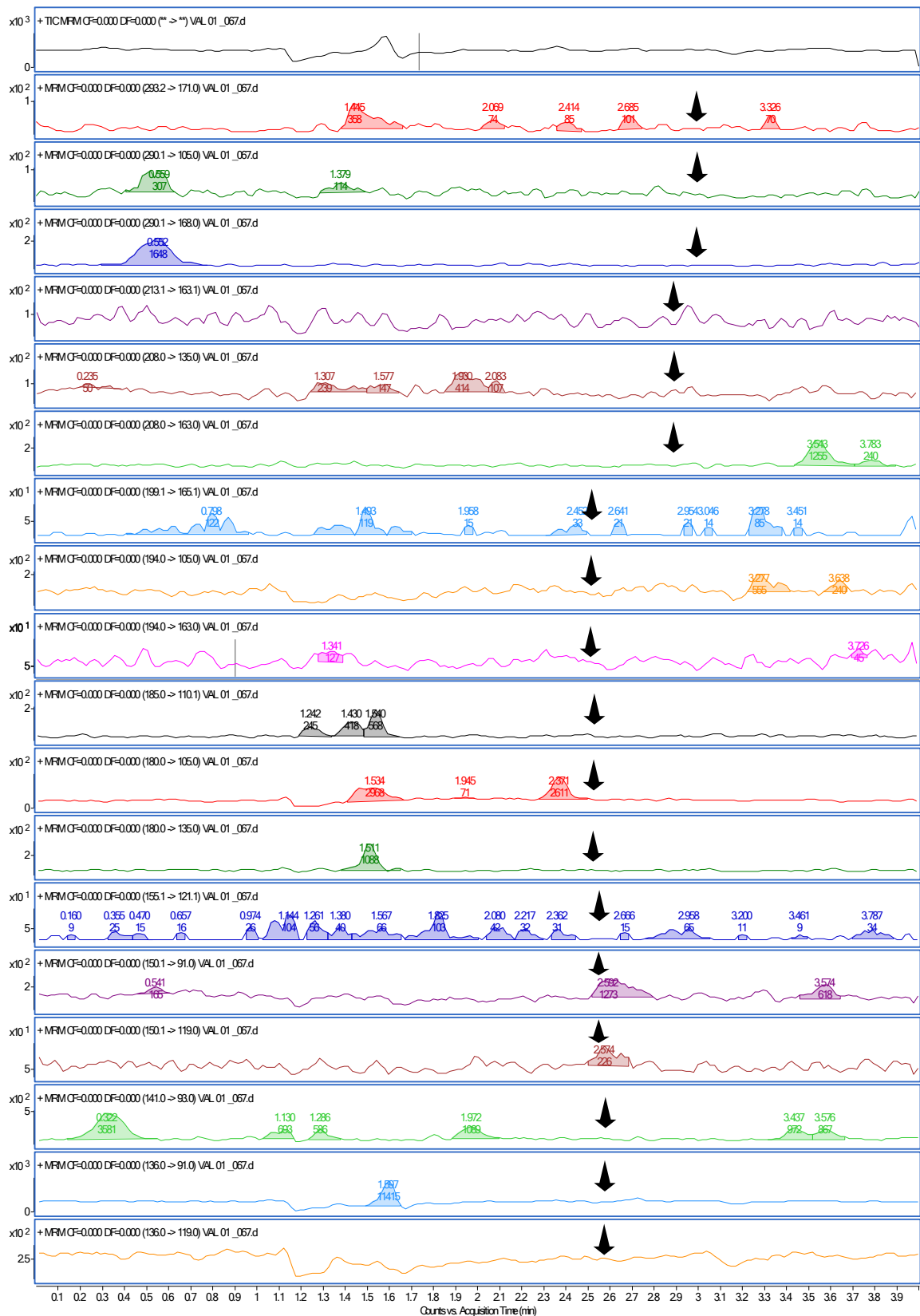


Figura 16. Cromatogramas das transições de massa de uma amostra de pool branco.

Com base nos resultados, foi possível verificar que o efeito de matriz existente é pequeno, e praticamente nulo quando se utiliza os próprios analitos marcados isotopicamente como padrões internos. Este resultado indica que tanto os analitos quanto seus padrões internos deuterados são afetados em igual extensão pela matriz, uma vez que possuem estruturas químicas semelhantes. Resultados semelhantes foram obtidos por Koster *et. al.* (2014)<sup>91</sup> e Fernández *et. al.* (2014).<sup>97</sup> Não foi observado efeito de memória significativo nas análises de amostras branca antecedidas por amostras de concentração alta.

**Tabela 10.** Resultados dos experimentos para verificação do efeito de matriz, com e sem correção pelo PI.

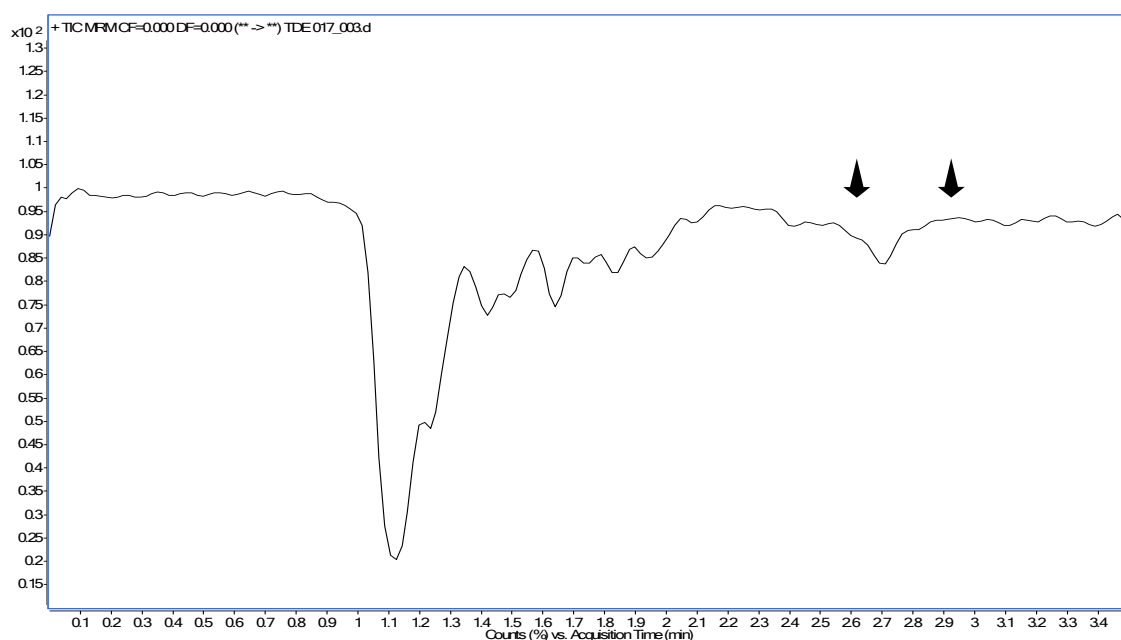
Analito	Concentração (ng mg <sup>-1</sup> )	EM (%)	EM <sub>PI</sub> (%)
MDMA	0,06	108,0	108,3
	1,60	107,8	107,3
	3,20	105,7	108,5
MDA	0,06	89,7	101,7
	1,60	95,3	100,1
	3,20	101,4	102,1
MTF	0,06	102,4	98,4
	1,60	103,0	97,8
	3,20	106,6	99,4
ANF	0,06	95,9	98,0
	1,60	100,2	96,8
	3,20	104,7	96,5
MDEA	0,06	115,0	104,0
	1,60	113,3	103,2
	3,20	118,3	106,3
BE	0,06	90,4	103,8
	1,60	78,4	102,6
	3,20	89,7	101,7

\*EM – Efeito de Matriz: razão entre a área do analito em solução e em matriz.

\*EM<sub>PI</sub> – Efeito de Matriz corrigido pelo padrão interno: razão entre as áreas do analito em solução e em matriz, corrigidos pelo sinal de seu respectivo padrão interno.

Um modelo linear de calibração foi proposto para todas as drogas, e este se mostrou bem ajustado entre concentrações de 0,02 ng mg<sup>-1</sup> até 4,00 ng mg<sup>-1</sup>.

Todos os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) obtidos foram maiores do que 0,99. Em concentrações abaixo de  $0,02 \text{ ng mg}^{-1}$ , um desvio da linearidade foi observado, e está relacionado com concentrações que possuem respostas muito próximas do ruído do equipamento. Os gráficos de resíduos em função da concentração estão representados na Figura 18.



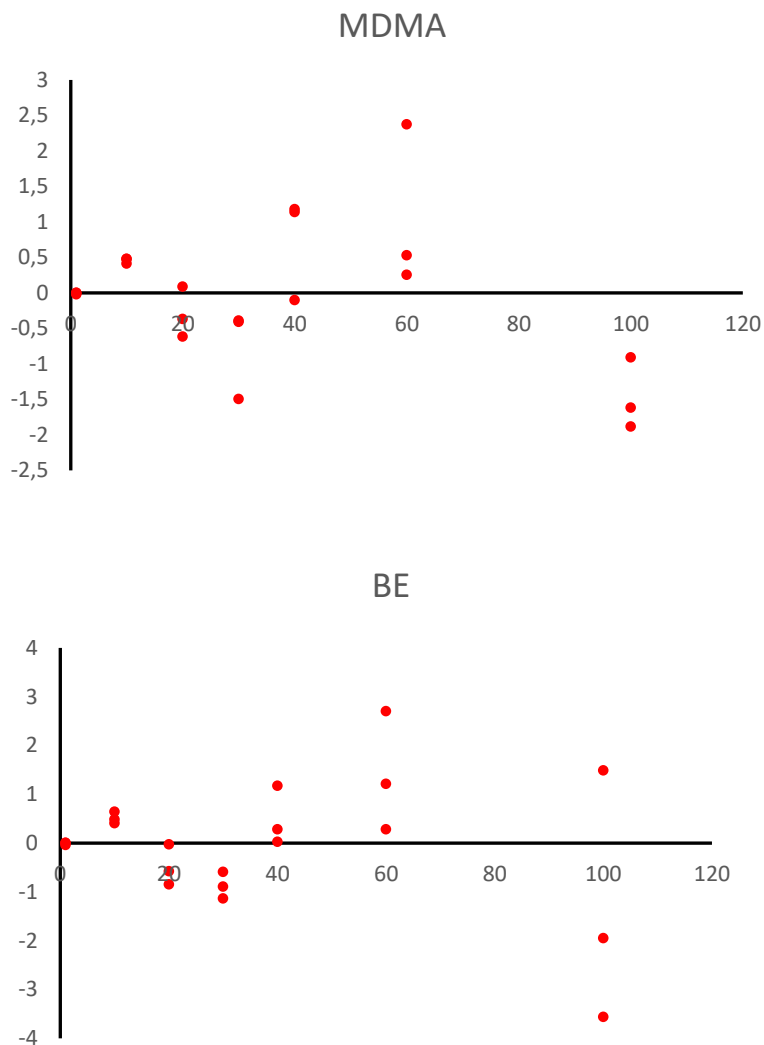
**Figura 17.** Cromatogramas de íons total da infusão pós-coluna sobre uma amostra branca. A região próxima de 1,1 minuto apresentou intensa supressão de sinal.

Com base nos gráficos de resíduos foi possível verificar que as variâncias dos níveis de calibração não são constantes ao longo de toda a curva e para todos os analitos (heterocedasticidade). Dessa forma, utilizar um ajuste pelo método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP) pelo inverso das variâncias ( $1/s^2$ ), seria o modelo matemático mais correto. Entretanto, os softwares dos equipamentos normalmente não têm a opção de trabalhar com este modelo. Eles oferecem ponderações diferentes como alternativas a este modelo:  $1/x$ ;  $1/x^2$ ;  $1/y$  e  $1/y^2$ . Estas ponderações foram testadas e avaliadas pelo gráfico de resíduos. O melhor ajuste, com os resíduos dispersos aleatoriamente em torno do eixo x, foi obtido com a ponderação  $1/x$  para todos os analitos. Os parâmetros das curvas analíticas estão representados na Tabela 11 bem como os limites de detecção e quantificação.

**Tabela 11.** Parâmetros da curva analítica e de sensibilidade do método proposto.

<b>Analito</b>	<b>Coefficiente de Determinação (R<sup>2</sup>)</b>	<b>Equação da reta</b>	<b>LD (ng mg<sup>-1</sup>)</b>	<b>LQ (ng mg<sup>-1</sup>)</b>
Benzoilecgonina	0,99905	$y = 0,431653 x - 0,074183$	0,012	0,020
Anfetamina	0,99878	$y = 0,467614 x - 0,100600$	0,012	0,020
Metanfetamina	0,99901	$y = 0,988126 x - 0,180497$	0,012	0,020
MDA	0,99904	$y = 0,474104 x - 0,080759$	0,012	0,020
MDMA	0,99930	$y = 0,397813 x - 0,060061$	0,012	0,020
MDEA	0,99931	$y = 0,362978 x - 0,061258$	0,012	0,020

Na Tabela 12, são apresentados os dados de precisão obtidos. A imprecisão intra-ensaio das amostras contaminadas antes da extração apresentou coeficientes de variação muito baixos. Com base nisto, podemos inferir que, apesar da extração ser relativamente longa, o processo não afeta significativamente o CV da extração. Ainda, quando a imprecisão da amostra fortificada é avaliada, apesar dos valores estarem abaixo dos 15% permitidos, são bem maiores do que os das amostras contaminadas. Esta diferença de CV entre amostras contaminada e fortificadas provavelmente está relacionado com o processo de extração, sobretudo no processo de moagem que não é absolutamente homogêneo, levando a um aumento da variabilidade dos resultados. Além disso, a heterogeneidade da amostra fortificada também contribui para o aumento da dispersão dos resultados, uma vez que nem todos os fios de cabelos são iguais e podem possuir espessuras diferentes.



**Figura 18.** Representação gráfica dos resíduos das curvas de calibração da benzoilecgonina e MDMA, utilizando ponderação  $1/x$ .

### 5.6. Amostras de cabelo

A maior parte das amostras obtidas (oito) foram coletadas na clínica de reabilitação. Ainda foram coletadas duas amostras no IML-BH e quatro amostras provenientes de voluntários. A estratificação baseada no perfil e histórico do doador está representada na Tabela 13. As amostras provenientes da clínica de reabilitação foram classificadas entre sabidamente positivas, duvidosa com perfil positivo ou duvidosa com perfil negativo, por serem amostras de dependentes em tratamento.

Conforme publicação da *Society of Hair Testing*,<sup>50</sup> para ser feito a análise de cabelos, deve ser considerado uma taxa de crescimento para amostras da



região da cabeça de  $1,0 \text{ cm mês}^{-1}$ . Portanto, amostras com tempo de abstinência menor do que a janela de detecção foram consideradas como sabidamente positivas. Amostras com tempo de abstinência maior ou próximo da janela de detecção foram consideradas como duvidosa com perfil positivo ou negativo, dependendo da proximidade do início da abstinência com o período da janela de detecção.

**Tabela 12.** Resultados em CV dos ensaios de imprecisão e exatidão da metodologia em amostras contaminadas e fortificadas.

<b>Analito</b>	<b>Concentração (ng mg<sup>-1</sup>)</b>	<b>CV intra-ensaio (%)</b>	<b>CV inter-ensaios (%)</b>
MDMA	0,06	0,6	3,9
	1,60	1,4	3,0
	3,20	1,0	3,3
	CQ	6,9	8,4
MDA	0,06	4,1	3,0
	1,60	1,2	3,5
	3,20	3,1	3,6
	CQ	7,6	11,4
MTF	0,06	1,3	3,4
	1,60	1,1	2,5
	3,20	1,0	3,6
	CQ	8,1	8,0
ANF	0,06	1,5	1,8
	1,60	1,9	1,7
	3,20	1,6	1,6
	CQ	7,2	9,8
MDEA	0,06	0,9	3,1
	1,60	0,7	1,4
	3,20	1,1	3,1
	CQ	6,4	8,4
BE	0,06	1,4	2,9
	1,60	1,5	1,6
	3,20	2,1	1,9
	CQ	6,1	8,7

CQ, amostra fortificada.

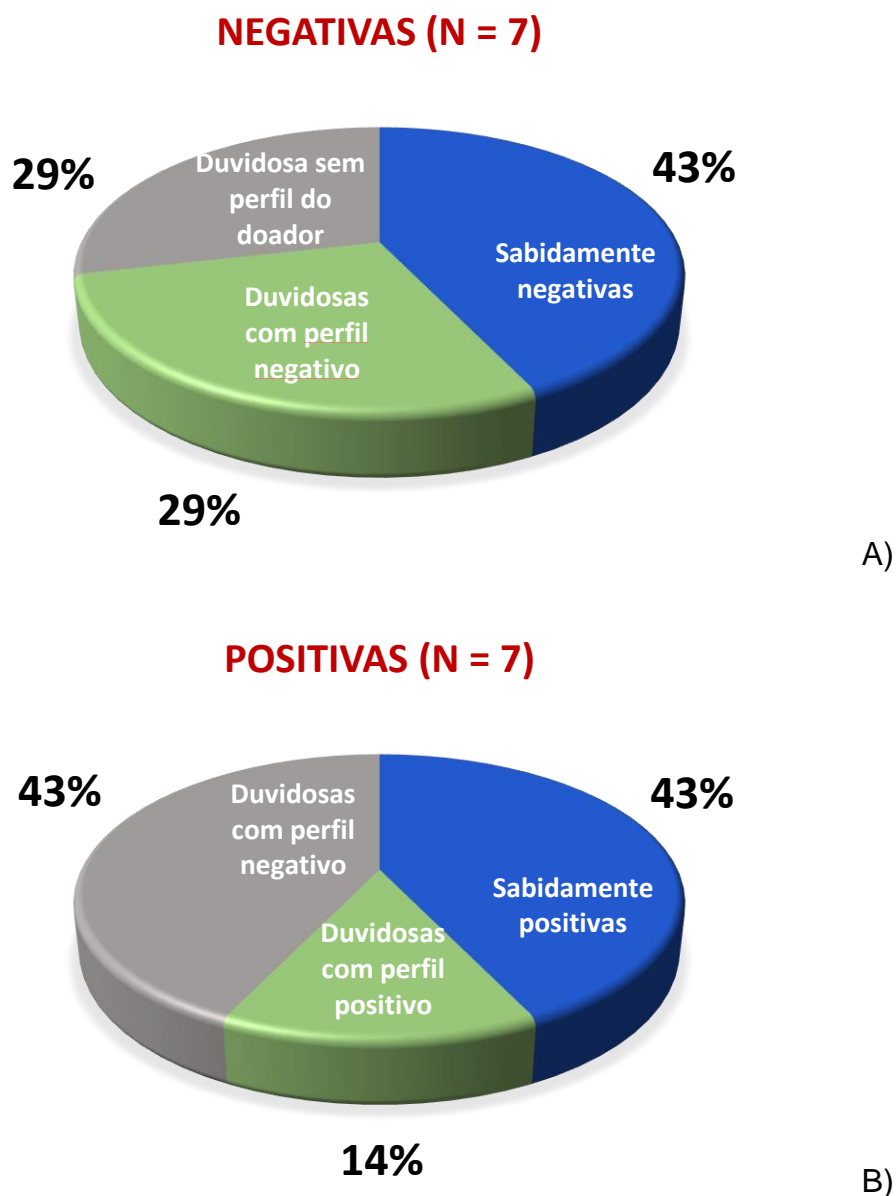
Os voluntários, que não são da clínica de reabilitação, que declararam não fazerem uso de quaisquer drogas de abuso tiveram suas amostras consideradas como sabidamente negativa. O único voluntário que declarou fazer uso de drogas teve sua amostra considerada como sabidamente positiva. As amostras do IML-BH, por falta de informação a respeito do histórico do doador, foram consideradas como duvidosas sem perfil do doador.

As amostras obtidas foram analisadas com a metodologia validada. Na Tabela 13 estão reportados somente os resultados para a benzoilecgonina juntamente com algumas informações dos doadores e das amostras. Os analitos ANF, MTF, MDA, MDMA e MDEA não foram detectadas em nenhuma das amostras deste trabalho embora o doador da amostra 09 tenha declarado já ter feito uso de êxtase antes do tratamento atual. Neste caso, acreditamos que o tempo de abstinência foi suficiente para eliminar vestígios da droga no cabelo e no organismo.

Dentre as 14 amostras coletadas, em sete foram encontradas a benzoilecgonina e em concentração maior que  $0,05 \text{ ng mg}^{-1}$ . Uma vez que a BE é um dos metabólitos da cocaína, presume-se que estes doadores tiveram contato com a cocaína ou outra droga que a tenha em sua composição (como o crack ou merla). A correlação com o perfil do doador foi bem-sucedida, pois em nenhuma amostra classificada como sabidamente negativa foi encontrado o analito. Analogamente, nas amostras com perfil positivo ou sabidamente positiva, em todas foram encontrados vestígios do metabólito.

Cinco amostras foram classificadas como duvidosas com perfil negativo, três delas tiveram o metabólito da cocaína detectado. Os doadores destas três amostras declararam que estavam a pelo menos 2 meses sem o consumo de crack ou cocaína, o que sugere que a droga ainda persistiu no organismo dos usuários. Dentre estas três, na amostra 04 (coleta de pelos do braço) foi encontrado uma concentração expressiva de BE. O pelo do braço apresenta a maior parte do seu ciclo de desenvolvimento nas fases telógena e catágena (8-24 semanas)<sup>47</sup>, dessa forma, é possível que a concentração alta na amostra 04 seja devido aos pelos que se desenvolveram no período em que o doador fazia uso intenso da droga, e que permaneceram até o momento da coleta.

Em nenhum extrato de lavagem das amostras foram encontradas drogas do tipo anfetaminas. Entretanto, nas amostras da clínica de reabilitação e na amostra 12 foram encontrados vestígios do metabólito da cocaína.



**Figura 19.** Gráfico representativo das 14 amostras coletadas com a correlação entre os resultados das análises e o perfil de cada doador. A) Amostras com resultados negativos para BE. B) Amostras com resultados positivos para BE.

**Tabela 13.** Dados e resultados para interpretação das amostras analisadas. Os dados sobre a contaminação externa e os resultados das amostras se referem somente à benzoilecgonina.

Amostra	Fonte da coleta	Local da coleta	Comprimento (cm)	Droga declarada	Tempo de abstinência	Classificação da amostra	Tratamento químico	Resultado para BE (ng mg <sup>-1</sup> )
AM 01	Voluntário	Cabeça	4,0	Não usuário	N.A.	Sabidamente negativa	Sim (clareamento)	-
AM 02	Clínica de reabilitação	Cabeça	1,0	Crack, cocaína	75 dias	Duvidosa c/ perfil negativo	Não	0,21
AM 03	Clínica de reabilitação	Cabeça	2,0	Crack, cocaína	45 dias	Sabidamente positiva	Sim (progressiva)	0,19
AM 04	Clínica de reabilitação	Braço	1,0	Crack	60 dias	Duvidosa c/ perfil negativo	Não	6,65
AM 05	Clínica de reabilitação	Cabeça	3,0	Crack	6 meses	Duvidosa c/ perfil negativo	Não	-
AM 06	Clínica de reabilitação	Braço	1,0	Crack	4,5 meses	Duvidosa c/ perfil negativo	Não	0,09
AM 07	Clínica de reabilitação	Cabeça	2,0	Crack	7 dias	Sabidamente positiva	Não	0,29

AM 08	Clínica de reabilitação	Cabeça	3,0	Crack	90 dias	Duvidosa c/ perfil positivo	Não	0,07
AM 09	Clínica de reabilitação	Cabeça	3,0	Cocaína, LSD, êxtase e maconha	11 meses	Duvidosa c/ perfil negativo	Não	-
AM 10	IML-BH	Cabeça	2,0	N.A.	N.A.	Duvidosa s/ perfil do doador	Não aparentemente	-
AM 11	IML-BH	Axila	2,0	N.A.	N.A.	Duvidosa s/ perfil do doador	Não aparentemente	-
AM 12	Voluntário	Cabeça	3,0	Crack	1 dia	Sabidamente positiva	Não	14,89
AM 13	Voluntário	Cabeça	2,0	Não usuário	N.A.	Sabidamente negativa	Não aparentemente	-
AM 14	Voluntário	Cabeça	2,0	Não usuário	N.A.	Sabidamente negativa	Não aparentemente	-

Continuação

## 6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi desenvolvido e otimizado um método para quantificação de benzoilecgonina, anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA e MDEA em amostras de cabelos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. O método desenvolvido é simples, eficiente e de fácil adaptação à rotina laboratorial.

Uma extração foi otimizada para usar pequenas quantidades de amostra por meio de um planejamento fatorial, que permitiu selecionar os parâmetros de extração mais significativos: a temperatura e o tempo de extração. A otimização destes parâmetros foi realizada por meio de um processo univariado, em que se obteve um tempo de extração comparável aos encontrados na literatura.

O método foi validado com êxito, apresentando boa seletividade, especificidade e imprecisão menor do que 11,4% em todos os níveis de concentração avaliados. Foi observado pequeno efeito de matriz que foi corrigido pelo uso de padrões internos deuterados, permitindo o uso de curvas de calibração preparadas em solvente puro para quantificar amostras consideradas complexas. O método também apresentou boa sensibilidade com limites de detecção e quantificação de 0,012 ng mg<sup>-1</sup> e 0,020 ng mg<sup>-1</sup>, respectivamente, possibilitando sua aplicação para análise confirmatória de drogas do tipo anfetaminas. O método também apresenta sensibilidade para dosagem de benzoilecgonina abaixo do valor de corte da *SoHT*, porém, para atender aos requisitos precisará de passar por uma extensão de escopo para quantificar outras drogas.

O método foi aplicado em amostras reais coletadas de dependentes químicos em tratamento, onde foi possível detectar a presença de benzoilecgonina em 77% das amostras. Nenhum falso positivo foi detectado nas amostras que vieram dos doadores que se declararam não fazerem uso de drogas.

Como perspectivas futuras, sugere-se ampliar o escopo de drogas detectadas pelo método para atender integralmente à legislação brasileira sobre testes toxicológicos de larga janela de detecção.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vogliardi, S., Tucci, M., Stocchero, G., Ferrara, S. D., Favretto, D. Sample preparation methods for determination of drugs of abuse in hair samples: A review. *Anal. Chim. Acta* **857**, 1–27 (2014).
2. BRASIL. CONTRAN. Resolução nº 517 de 29 de Janeiro de 2015. 1–8 (2015).
3. Moffat, A. C., Osselton, M. D., Widdop, B. *Drugs and Poisons*. (Pharmaceutical Press, 2011).
4. World Drug Report 2016. *United Nations publication* (2016).
5. Consumo de drogas mata 200 mil pessoas por ano, diz ONU | Agência Brasil - Últimas notícias do Brasil e do mundo. Disponível em: <http://agenciabrasil.ebc.com.br/internacional/noticia/2016-03/consumo-de-drogas-mata-200-mil-pessoas-por-ano-diz-onu>. (Acessado: 2 abril 2017)
6. Uso de drogas aumenta entre os adolescentes no país - Jornal O Globo. Disponível em: <http://oglobo.globo.com/sociedade/uso-de-drogas-aumenta-entre-os-adolescentes-no-pais-19996988>. (Acessado: 2 abril 2017)
7. Epidemia de crack atinge dois milhões e coloca Brasil no topo do ranking de consumo da droga - Notícias - R7 Saúde. Disponível em: <http://noticias.r7.com/saude/epidemia-de-crack-atinge-dois-milhoes-e-coloca-brasil-no-topo-do-ranking-de-consumo-da-droga-22092015>. (Acessado: 3 abril 2017)
8. Drummer, O. H. *et al.* The incidence of drugs in drivers killed in Australian road traffic crashes. *Forensic Sci. Int.* **134**, 154–62 (2003).
9. Pechansky, F., Duarte, P. do C. A., De Boni, R. B. *USO DE BEBIDAS ALCOÓLICAS E OUTRAS DROGAS NAS RODOVIAS BRASILEIRAS E OUTROS ESTUDOS*. (SENAD - Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas, 2010).
10. Breitenbach, T. C., Pechansky, F., Benzano, D., De Boni, R. High rates of injured motorcycle drivers in emergency rooms and the association with substance use



- in Porto Alegre, Brazil: Table 1. *Emerg. Med. J.* **29**, 205–207 (2012).
11. Takitane, J. *et al.* Uso de anfetaminas por motoristas de caminhão em rodovias do Estado de São Paulo: um risco à ocorrência de acidentes de trânsito? *Ciênc. saúde coletiva* **18**, 1247–1254 (2013).
  12. Gates, J., Dubois, S., Mullen, N., Weaver, B., Bédard, M. The influence of stimulants on truck driver crash responsibility in fatal crashes. *Forensic Sci. Int.* **228**, 15–20 (2013).
  13. World Health Organization. *Drug use and road safety: a policy brief.* (2016).
  14. Datasus. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/evitb10uf.def>. (Acessado: 2 fevereiro 2017)
  15. BRASIL. IPEA - Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. Acidentes de trânsito nas rodovias federais brasileiras. *Relatório de Pesquisa.* 1 - 16 (2015).
  16. Junior, G. A. *et al.* O uso de drogas por motoristas caminhoneiros e o comportamento de risco nas estradas. *Rev. Epidemiol. e Control. Infecção* **6**, (2016).
  17. Silber, B. Y., Croft, R. J., Papafotiou, K., Stough, C. The acute effects of d-amphetamine and methamphetamine on attention and psychomotor performance. *Psychopharmacology (Berl)*. **187**, 154–169 (2006).
  18. *Drugs and Traffic: A Symposium.* (Transportation Research Board, 2006). doi:10.17226/23258
  19. Martins, E. R. C., Corrêa, A. K. Lidar com substâncias psicoativas: o significado para o trabalhador de enfermagem. *Rev. Lat. Am. Enfermagem* **12**, 398–405 (2004).
  20. Laranjeira, R., *et al.* Usuários de substâncias psicoativas: abordagem, diagnóstico e tratamento. 2ª Ed. São Paulo. Conselho Regional de Medicina do Estado de São Paulo - Associação Médica Brasileira, 1-120 (2003).
  21. Sinagawa, D. M. Uso de substâncias psicoativas por motoristas profissionais no Estado de São Paulo. 100 (2015).

22. Ferreira, P. E. M., Martini, R. K. Cocaína: lendas, história e abuso. *Rev. Bras. Psiquiatr.* **23**, 96–99 (2001).
23. Lizasoain, I., Moro, M. A., Lorenzo, P. Cocaína: aspectos farmacológicos. *Adicciones* **14**, 57 (2002).
24. Elisa, B., Alves, P., De, E., Carneiro, O. Drogas psicoestimulantes: uma abordagem toxicológica sobre cocaína e metanfetamina. Disponível em: <http://www.cpgls.pucgoias.edu.br/7mostra/Artigos/SAUDE%20E%20BIOLOGI%20CAS/Drogas%20psicoestimulantes%20-%20uma%20abordagem%20toxicol%C3%B3gica%20sobre%20coca%C3%ADna%20e%20metanfetamina.pdf>
25. Pulcherio, G., Stolf, A. R., Pettenon, M., Fensterseifer, D. P. & Kessler, F. Crack – da pedra ao tratamento Crack – from rock crystal to treatment. **54**, 337–343 (2010).
26. Ferigolo, M., Signor, L. COCAÍNA. UNESP (2007). Disponível em: <http://www.ibb.unesp.br/Home/UnidadesAuxiliares/CentrodeAssistenciaToxicologica-CEATOX/cocaina.pdf>
27. Chasin, A. A. M., Silva, E. S., Carvalho, V. M. in *Fundamentos de toxicologia* (orgs. Oga, S., Camargo, M. M. A. & Batistuzzo, J. A. O.) 365–383 (Atheneu, 2014).
28. Restrepo, C. S. *et al.* Pulmonary Complications from Cocaine and Cocaine-based Substances: Imaging Manifestations. *RadioGraphics* **27**, 941–956 (2007).
29. Yonamine, M. Derivação de benzoilecgonina urinária com diazometano para verificação da exposição à cocaína por técnicas cromatográficas. (Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 2000). doi:10.11606/D.9.2000.tde-10072008-162345
30. Narkowicz, S., Płotka, J., Polkowska, Ż., Biziuk, M., Namieśnik, J. Prenatal exposure to substance of abuse: A worldwide problem. *Environ. Int.* **54**, 141–163 (2013).
31. Treadwell, S. D., Robinson, T. G. Cocaine use and stroke. *Postgrad. Med. J.* **83**, 389–394 (2007).

32. Vasconcelos, S. M. M. *et al.* Cocaetileno um metabolito da associação cocaína e etanol. *Rev. Psiquiatr. clín. (São Paulo)* 207–210 (2001).
33. Marcon, C., Arthur Mendes da Silva, L., Machado Bragança de Moraes, C., Saibt Martins, J. Uso de anfetaminas e substâncias relacionadas na sociedade contemporânea amphetamines use and related substances in contemporary society. **13**, 247–263 (2012).
34. Heal, D. J., Smith, S. L., Gosden, J., Nutt, D. J. Amphetamine, past and present—a pharmacological and clinical perspective. *J. Psychopharmacol.* **27**, 479–96 (2013).
35. Lasmar, M. C., Leite, E. M. A. Desenvolvimento e validação de um método cromatográfico em fase gasosa para análise da 3,4-metilenodioximetanfetamina (ecstasy) e outros derivados anfetamínicos em comprimidos. *Rev. Bras. Ciências Farm.* **43**, 223–230 (2007).
36. Brunton, L. L., Parker, K. L., Blumenthal, D. k., Buxton, I. L. O. *Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (2010).
37. Curry, A. S., Pounds, C. A. Arsenic in Hair. *J. Forensic Sci. Soc.* **17**, 37–44 (1977).
38. Lindquist, N. G., Ullberg, S. Autoradiography of <sup>35</sup>S-chlorpromazine: accumulation and retention in melanin-bearing tissues. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* **9**, 413–23 (1974).
39. Baciú, T., Borrull, F., Aguilar, C., Calull, M. Recent trends in analytical methods and separation techniques for drugs of abuse in hair. *Anal. Chim. Acta* **856**, 1–26 (2014).
40. Buffoli, B. *et al.* The human hair: from anatomy to physiology. *Int. J. Dermatol.* **53**, 331–341 (2014).
41. Kintz, P., Salomone, A., Vincenti, M. *Hair Analysis in Clinical and Forensic Toxicology.* (Academic Press, 2015). doi:10.1016/B978-0-12-801700-5.00013-3
42. Harkey, M. R. Anatomy and physiology of hair. *Forensic Sci. Int.* **63**, 9–18 (1993).

43. Slominski, A. *et al.* Hair follicle pigmentation. *J. Invest. Dermatol.* **124**, 13–21 (2005).
44. Nordlund, J. J. Wiley InterScience. *The pigmentary system: physiology and pathophysiology.* (Blackwell Pub, 2006).
45. Suzukawa, A. A. Papel da Feomelanina na formação de lesões oxidativas pelo oxigênio molecular singlete em DNA em células de melanoma humano. (Universidade Federal do Paraná, 2012).
46. Henderson, G. L. L. Mechanisms of drug incorporation into hair. *Forensic Sci. Int.* **63**, 19–29 (1993).
47. Pragst, F., Balikova, M. a. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clin. Chim. Acta* **370**, 17–49 (2006).
48. Picardo, M., Ottaviani, M., Camera, E., Mastrofrancesco, A. Sebaceous gland lipids. *Dermatoendocrinol.* **1**, 68–71 (2009).
49. Anatomia do cabelo - Dicas Práticas - Visualizando dicas. Disponível em: [http://www.dicaspraticas.com/articles.php?article\\_id=35&rowstart=0](http://www.dicaspraticas.com/articles.php?article_id=35&rowstart=0). (Acessado: 4º abril 2017)
50. Cooper, G. A. A., Kronstrand, R., Kintz, P. Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair. *Forensic Sci. Int.* **218**, 20–4 (2012).
51. Kintz, P. *Analytical and Pratical Aspects of Drug Testing in Hair.* (2006).
52. Nakahara, Y., Kikura, R. Hair analysis for drugs of abuse. VII. The incorporation rates of cocaine, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester into rat hair and hydrolysis of cocaine in rat hair. *Arch. Toxicol.* **68**, 54–9 (1994).
53. Stout, P. R., Ruth, J. A. Comparison of in vivo and in vitro deposition of rhodamine and fluorescein in hair. *Drug Metab. Dispos.* **26**, 943–8 (1998).
54. Nakahara, Y., Takahashi, K., Kikura, R. Hair analysis for drugs of abuse. X. Effect of physicochemical properties of drugs on the incorporation rates into hair. *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 1223–1227 (1995).
55. Kikura, R., Nakahara, Y., Mieczkowski, T., Tagliaro, F. Hair analysis for Drug Abuse XV. Disposition of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and its

- related compounds into rat hair and application to hair analysis for MDMA abuse. *Forensic Sci. Int.* **84**, 165–177 (1997).
56. Nakahara, Y., Hanajiri, R. Hair analysis for drugs of abuse XXI. Effect of para-substituents on benzene ring of methamphetamine on drug incorporation into rat hair. *Life Sci.* **66**, 563–574 (2000).
  57. Nakahara, Y., Takahashi, K., Konuma, K. Hair analysis for drugs of abuse. VI. The excretion of methoxyphenamine and methamphetamine into beards of human subjects. *Forensic Sci. Int.* **63**, 109–119 (1993).
  58. Cone, E. J. Mechanisms of drug incorporation into hair. *Ther. Drug Monit.* **18**, 438–43 (1996).
  59. Smeal, S. J. Mechanism of cannabinoid incorporation in hair; (University of Utah, 2007).
  60. Cone, E. J., Hillsgrove, M. J., Jenkins, A. J., Keenan, R. M., Darwin, W. D. Sweat testing for heroin, cocaine, and metabolites. *J. Anal. Toxicol.* **18**, 298–305 (1994).
  61. Henderson, G. L., Harkey, M. R., Zhou, C., Jones, R. T. & Jacob, P. Incorporation of Isotopically Labeled Cocaine and Metabolites into Human Hair: 1. Dose-Response Relationships. **20**, 1–12 (1996).
  62. Stout, P. R., Ruth, J. A. Deposition of [3H]cocaine, [3H]nicotine, and [3H]flunitrazepam in mouse hair melanosomes after systemic administration. *Drug Metab. Dispos.* **27**, 731–5 (1999).
  63. Romano, G., Barbera, N., Lombardo, I. Hair testing for drugs of abuse: evaluation of external cocaine contamination and risk of false positives. *Forensic Sci. Int.* **123**, 119–129 (2001).
  64. Thorspecken, J., Skopp, G., Pötsch, L. In Vitro Contamination of Hair by Marijuana Smoke. *Clin. Chem.* **50**, 596–602 (2004).
  65. Paterson, S., Lee, S., Cordero, R. Analysis of hair after contamination with blood containing cocaine and blood containing benzoylecgonine. *Forensic Sci. Int.* **194**, 94–96 (2010).

66. Paterson, S., Lee, S., Cordero, R. Analysis of hair after contamination with blood containing 6-acetylmorphine and blood containing morphine. *Forensic Sci. Int.* **210**, 129–132 (2011).
67. Nakahara, Y., Ochiai, T., Kikura, R. Hair analysis for drugs of abuse. V. The facility in incorporation of cocaine into hair over its major metabolites, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester. *Arch. Toxicol.* **66**, 446–9 (1992).
68. Nakahara, Y., Takahashi, K., Kikura, R. Hair analysis for drugs of abuse. X. Effect of physicochemical properties of drugs on the incorporation rates into hair. *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 1223–1227 (1995).
69. Van Erp, P. E. J., Jansen, M. J. J. M., De Jongh, G. J., Boezeman, J. B. M., Schalkwijk, J. Ratiometric measurement of intracellular pH in cultured human keratinocytes using carboxy-SNARF-1 and flow cytometry. *Cytometry* **12**, 127–132 (1991).
70. Rothe, M., Pragst, F., Thor, S., Hunger, J. Effect of pigmentation on the drug deposition in hair of grey-haired subjects. *Forensic Sci. Int.* **84**, 53–60 (1997).
71. Claffey, D. J., Stout, P. R., Ruth, J. A. 3H-nicotine, 3H-flunitrazepam, and 3H-cocaine incorporation into melanin: a model for the examination of drug-melanin interactions. *J. Anal. Toxicol.* **25**, 607–11 (2001).
72. Pötsch, L., Skopp, G., Rippin, G. A comparison of 3H-cocaine binding on melanin granules and human hair in vitro. *Int. J. Legal Med.* **110**, 55–62 (1997).
73. Gygi, S. P., Wilkins, D. G., Rollins, D. E. A Comparison of Phenobarbital and Codeine Incorporation into Pigmented and Nonpigmented Rat Hair. *J. Pharm. Sci.* **86**, 209–214 (1997).
74. Slawson, M. H., Wilkins, D. G., Rollins, D. E. The Incorporation of Drugs into Hair: Relationship of Hair Color and Melanin Concentration to Phencyclidine Incorporation. *J. Anal. Toxicol.* **22**, (1998).
75. Rollins, D. E. *et al.* The effect of hair color on the incorporation of codeine into human hair. *J. Anal. Toxicol.* **27**, 545–51
76. Borges, C. R., Wilkins, D. G., as Rollins, D. E. Amphetamine and N-

- Acetylamphetamine Incorporation into Hair: An Investigation of the Potential Role of Drug Basicity in Hair Color Bias. *J. Anal. Toxicol.* **25**, (2001).
77. Kikura-Hanajiri, R., Kawamura, M., Saisho, K., Kodama, Y., Goda, Y. The disposition into hair of new designer drugs; methylone, MBDB and methcathinone. *J. Chromatogr. B* **855**, 121–126 (2007).
  78. Lee, S. *et al.* Simultaneous quantification of opiates and effect of pigmentation on its deposition in hair. *Arch. Pharm. Res.* **33**, 1805–1811 (2010).
  79. Nakahara, Y., Kikura, R. Hair analysis for drugs of abuse. XIII. Effect of structural factors on incorporation of drugs into hair: the incorporation rates of amphetamine analogs. *Arch. Toxicol.* **70**, 841–9 (1996).
  80. Vogliardi, S., Tucci, M., Stocchero, G., Ferrara, S. D., Favretto, D. Sample preparation methods for determination of drugs of abuse in hair samples: A review. *Anal. Chim. Acta* **857**, 1–27 (2015).
  81. Klys, M., Rojek, S., Kulikowska, J., Bozek, E., Scislowski, M. 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.* **854**, 299–307 (2007).
  82. Miyaguchi, H. *et al.* Development of a micropulverized extraction method for rapid toxicological analysis of methamphetamine in hair. *J. Chromatogr. A* **1163**, 43–48 (2007).
  83. Salomone, A. *et al.* Hair analysis of drugs involved in drug-facilitated sexual assault and detection of zolpidem in a suspected case. *Int. J. Legal Med.* **126**, 451–9 (2012).
  84. Wu, Y.-H., Lin, K.-L., Chen, S.-C., Chang, Y.-Z. Simultaneous quantitative determination of amphetamines, ketamine, opiates and metabolites in human hair by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **22**, 887–897 (2008).
  85. Uhl, M., Sachs, H. Cannabinoids in hair: strategy to prove marijuana/hashish consumption. *Forensic Sci. Int.* **145**, 143–147 (2004).


86. Lendoiro, E. *et al.* Target screening and confirmation of 35 licit and illicit drugs and metabolites in hair by LC–MSMS. *Forensic Sci. Int.* **217**, 207–215 (2012).
87. Welch, M. J., Sniegowski, L. T., Tai, S. Two new standard reference materials for the determination of drugs of abuse in human hair. *Anal. Bioanal. Chem.* **376**, 1205–11 (2003).
88. Del Mar Ramírez Fernández, M., Fazio, V. Di, Wille, S. M. R., Kummer, N., Samyn, N. 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* **965**, 7–18 (2014).
89. Favretto, D. *et al.* High performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry and micropulverized extraction for the quantification of amphetamines, cocaine, opioids, benzodiazepines, antidepressants and hallucinogens in 2.5mg hair samples. *J. Chromatogr. A* **1218**, 6583–6595 (2011).
90. Miyaguchi, H., Inoue, H. Determination of amphetamine-type stimulants, cocaine and ketamine in human hair by liquid chromatography/linear ion trap-Orbitrap hybrid mass spectrometry. *Analyst* (2011). doi:10.1039/c0an00850h
91. Koster, R. A., Alffenaar, J. W. C., Greijdanus, B., VanDernagel, J. E. L., Uges, D. R. A. Fast and highly selective LC-MS/MS screening for THC and 16 other abused drugs and metabolites in human hair to monitor patients for drug abuse. *Ther. Drug Monit.* **36**, (2014).
92. Nielsen, M. K. K., Johansen, S. S., Linnet, K. Pre-analytical and analytical variation of drug determination in segmented hair using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Sci. Int.* **234**, 16–21 (2014).
93. CLSI. C62-A: Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Methods; Approved Guideline. *CLSI - Clin. Lab. Stand. Inst.* (2014).
94. Salomone, A., Tsanaclis, L., Agius, R., Kintz, P., Baumgartner, M. R. European guidelines for workplace drug and alcohol testing in hair. *Drug Test. Anal.* **8**, 996–1004 (2016).




95. Sociedade Brasileira de Toxicologia. *Diretrizes sobre o exame de substâncias psicoativas em cabelos e pelos: coleta e análise*. Versão 2 (2015).
96. Nielsen, M. K. K., Johansen, S. S., Dalsgaard, P. W., Linnet, K. Simultaneous screening and quantification of 52 common pharmaceuticals and drugs of abuse in hair using UPLC-TOF-MS. *Forensic Sci. Int.* **196**, 85–92 (2010).
97. Fernández, M. D. M. R., Di Fazio, V., Wille, S. M. R., Kummer, N., Samyn, N. 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.* **965**, 7–18 (2014).

## 8. ANEXOS

### 8.1. Anexo I

<b>Formulário de Coleta</b>	
Estudo post-mortem da frequência do uso de drogas de abuso em amostras de cabelos de motoristas no estado de Minas Gerais	
ID Amostra:	 97.548.382.118
Coletor: _____	Local da coleta: _____
<b>Informações da Amostra</b>	
Data de nascimento:	____/____/____
Sexo:	<input type="checkbox"/> Masculino <input type="checkbox"/> Feminino
Data da coleta:	____/____/____
Hora da coleta:	_____:
Região da coleta:	<input type="checkbox"/> Cabeça <input type="checkbox"/> Membros <input type="checkbox"/> Axila <input type="checkbox"/> Pubiana
Cor do cabelo:	_____
Sinal de tratamento cosmético:	_____
Qual?	<input type="checkbox"/> Alisamento <input type="checkbox"/> Tintura <input type="checkbox"/> Descoloração
Motorista Profissional:	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
----- Obs.:	

## 8.2. Anexo II

<b>Formulário de Coleta</b>	
Avaliação post-mortem do uso de drogas de abuso em amostras de cabelos de motoristas no estado de Minas Gerais	
ID Amostra:	 52.809.524.482
	Data da coleta: ____/____/____
Coletor: _____	Local da coleta: _____
<b>Informações do Doador:</b>	
Nome:	_____
Data de nascimento:	____/____/____
Sexo:	<input type="checkbox"/> Masculino <input type="checkbox"/> Feminino
Registro Geral:	_____
Dependência em:	_____
Tempo de abstinência:	_____
Tempo de uso:	_____
Frequência de uso:	_____
Tratamento cosmético:	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
Qual?	_____
Cor natural do cabelo:	_____
Obs.: _____	