

UNIVERSIDADE FEEVALE

MESTRADO ACADÊMICO EM TOXICOLOGIA E ANÁLISES TOXICOLÓGICAS

Determinação de drogas de abuso em matriz capilar por LC-MS/MS e avaliação do perfil de consumo de drogas e álcool em motoristas envolvidos em acidentes de trânsito.

Victória Vendramini Müller

Linha de Pesquisa: Toxicologia Humana e Análises Toxicológicas

Orientador: Prof^a. Dr^a. Marina Venzon Antunes

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Linden

Novo Hamburgo, janeiro de 2020

VICTÓRIA VENDRAMINI MÜLLER

Determinação de drogas de abuso em matriz capilar por LC-MS/MS e avaliação do perfil de consumo de drogas e álcool em motoristas envolvidos em acidentes de trânsito.

Dissertação apresentada para
obtenção do GRAU DE
MESTRE em Toxicologia e
Análises Toxicológicas pela
Universidade Feevale.

Orientadora: Dr^a. Marina Venzon Antunes

Novo Hamburgo, janeiro de 2020

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Müller, Victória Vendramini.

Determinação de drogas de abuso em matriz capilar por LC-MS/MS e avaliação do perfil de consumo de drogas e álcool em motoristas envolvidos em acidentes de trânsito / Victória Vendramini Müller. – 2020. 84 f. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) – Universidade Feevale, Novo Hamburgo-RS, 2020.

Inclui bibliografia.

"Orientador: Profa. Dra. Marina Venzon Antunes ; Coorientador: Prof. Dr. Rafael Linden".

1. Cabelo. 2. Drogas. 3. Álcool. 4. Análise toxicológica. 5. LC-MS/MS. I. Título.

CDU 615.9

Bibliotecária responsável: Janice Moser Corrêa – CRB 10/2315

VICTÓRIA VENDRAMINI MÜLLER

Dissertação intitulada DETERMINAÇÃO DE DROGAS DE ABUSO EM MATRIZ CAPILAR POR LC-MS/MS E AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CONSUMO DE DROGAS E ÁLCOOL EM MOTORISTAS ENVOLVIDOS EM ACIDENTES DE TRÂNSITO apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, da Universidade Feevale, como requisito necessário para obtenção do grau de mestre.

Aprovado por:

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marina Venzon Antunes
Universidade Feevale

Prof^a. Dr^a. Simone Gasparin Verza
Banca Examinadora – Universidade Feevale.

Prof^a. Dr^a. Maíra Kerpel dos Santos
Banca Examinadora – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.

Novo Hamburgo, janeiro de 2020.

AGRADECIMENTO

*À Universidade Feevale e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Forense
(INCT – Forense) pelo apoio financeiro.*

*Ao Hospital Municipal de Novo Hamburgo por abrir as portas ao projeto e
reconhecer a importância da produção científica.*

*Ao pessoal do Laboratório de Toxicologia por todo auxílio, especialmente à minha
colega Cristiane Pires que esteve sempre ao meu lado.*

Agradeço por todo apoio da minha família pelo incentivo e amor incondicional.

*Agradecimento especial à minha orientadora Dr^a. Marina Venzon Antunes, pelos
ensinamentos e por acreditar no meu potencial, me guiando para o aperfeiçoamento
pessoal há cerca de quatro anos na área da Toxicologia.*

RESUMO

Análises toxicológicas em matriz capilar permitem uma investigação retrospectiva do consumo de drogas devido a sua ampla janela de detecção, auxiliam na distinção entre história de consumo social ou abuso de substâncias de forma crônica. Entretanto, essa matriz apresenta baixas concentrações de compostos, o que exige uma preparação de amostra otimizada, com métodos de quantificação sensíveis e específicos. Nesta perspectiva, o presente estudo desenvolveu e validou uma metodologia confirmatória de triagem para drogas de abuso requeridas pela resolução brasileira da CONTRAN nº 691 e outra metodologia para a quantificação do metabólito do THC, o THC-COOH, ambas em matriz capilar por UHPLC-MS/MS. Também foi medida a incerteza dos métodos. Além disso, a validação clínica dos ensaios se deu através da aplicação das metodologias na análise de cabelo de motoristas que se acidentaram no trânsito, com verificação complementar do uso de álcool através da detecção do Eitl Glicuronídeo (EtG). A precisão dos métodos foi de 86,63 a 105,87%, a precisão intra-ensaio variou de 3 a 13,5% e a precisão inter-ensaio variou de 1,65 a 12,02%. A estabilidade do extrato no interior do auto-amostrador variou de -14,15 a 16,2% entre o tempo zero e 15 horas, o maior *carry over* observado após a injeção de um controle alto foi de 15,54% em relação à concentração do limite de quantificação. O efeito de matriz variou de -15,38 a 24,56%. Seis pacientes (12%) tiveram resultado positivo no teste de larga janela de detecção para drogas, dentre elas: cocaína, THC e MDMA, 12% dos pacientes foram classificados como consumidores excessivos, 42% moderados e 46% leves de álcool, segundo níveis capilares de EtG. Foi evidenciada associação entre sexo e perfil de consumo ($p < 0,01$) e o autorrelato subnotificou o consumo de álcool em 22% dos pacientes, que reportaram ser abstêmios, mas foram classificados como consumidores moderados ($n=10$) ou excessivos ($n=1$). Este estudo buscou validar métodos para o monitoramento do uso de substâncias psicoativas de forma crônica e gerar dados contribuintes à promoção de ações de saúde visando a prevenção de acidentes de trânsito.

Palavras-chave: Cabelo. Drogas. Álcool. Análise Toxicológica. LC-MS/MS.

ABSTRACT

Capillary matrix toxicological analyzes allow a retrospective investigation of drug use due to its wide detection window, helping to distinguish between history of social consumption or substance abuse in a chronic way. However, this matrix has low concentrations of compounds, which requires an optimized sample preparation, with sensitive and specific quantification methods. In this perspective, the present study developed and validated a confirmatory screening methodology for drugs of abuse required by the Brazilian resolution of CONTRAN No. 691 and another methodology for the quantification of the THC metabolite, THC-COOH, both in capillary matrix by UHPLC-MS/MS. Method uncertainty was also measured. In addition, the clinical validation of the trials took place through the application of methodologies in the analysis of the hair of drivers who had an accident in traffic, with complementary verification of the use of alcohol through the detection of EtG Glycuronide (EtG). The accuracy of the methods ranged from 86.63 to 105.87%, the intra-assay precision varied from 3 to 13.5% and the inter-assay precision varied from 1.65 to 12.02%. The stability of the extract inside the autosampler varied from -14.15 to 16.2% between time zero and 15 hours. The highest carry over observed after the injection of a high control was 15.54% in relation to concentration of the limit of quantification. The matrix effect ranged from -15.38 to 24.56%. Six patients (12%) tested positive for the wide detection window for drugs, including: cocaine, THC and MDMA, 12% of patients were classified as excessive users, 42% moderate and 46% mild alcohol, according to levels capillaries of EtG. There was an association between sex and consumption profile ($p < 0.01$) and self-report underreported alcohol consumption in 22% of patients, who reported being abstainers, but were classified as moderate ($n = 10$) or excessive ($n = 1$). This study sought to validate methods for monitoring the use of psychoactive substances in a chronic way and to generate data that contribute to the promotion of health actions aimed at preventing traffic accidents.

Key words: Hair. Drugs. Alcohol. Toxicological analysis. LC-MS/MS.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
AEME – Anhydroecgonine methyl ester
AMP – Amphetamine
ANFEP – Anfepramone
ANOVA – Analysis of Variance
BZE – Benzoilecgonina (Benzoylecgonine)
CE – Cocaetileno (Cocaethylene)
CEP – Comitê de Ética em Pesquisa
CNH – Carteira Nacional de Habilitação
COC – Cocaína (Cocaine)
COD – Codeína (Codeine)
CONTRAN – Concelho Nacional de Trânsito (National Council of Transit)
CQLLOQ – Lowest limit of quantification
CT – Cocaetileno (Cocaethylene)
CV – Coeficiente de variação
ESI-MS – fonte de ionização do tipo electrospray
EtG – Etil Glicuronídeo
FEMP – Femproporex
Full scan – registo de espectros de massas totais
GC-MS/MS – cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa
IATDMCT – International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology.
LC-MS/MS – Cromatografia líquida associada a detector de massas sequencial (Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry)
LLOQ – Lowest limit of quantification
LOD – Limit of detection ME – Matrix effect
MAMP – Methamphetamine
6-MAM – 6-monoacetylmorphine
MDA: metilenedioxianfetamina

MDMA: metilenodioximetanfetamina

ME – Matrix effect

MP – Morfina (Morphine)

MRM - Multiple reaction monitoring

MZD – Mazindol

NCOC – Norcocaína (Norcocaine)

QC - Quality control

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

QCH - Quality control at high concentration

QCL - Quality control at low concentration

QCLLOQ - Quality control at the lowest limit of quantification

QCM - Quality control at medium concentration

SIM – monitorização seletiva de íons

SoHT – Society of Hair Testing

TCLE – termo de consentimento livre e esclarecido

THC: tetra-hidrocanabinol

THC-COOH – 11-nor-9-carboxi-delta9-tetrahydrocanabinol (11-nor-9-carboxy-delta-9-tetrahydrocannabinol)

UPLC-MS/MS – Ultra performance de cromatografia líquida associada a espectrometria de massas (Ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry)

$\Sigma\%$ RE - Cumulative percentage relative error

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO GERAL	10
2. INTRODUÇÃO GERAL.....	12
3. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo geral	19
3.2 Objetivos específicos	19
4. ARTIGO 1	20
5. ARTIGO 2	47
6. RESULTADOS ADICIONAIS.....	68
6.1 Método para quantificação de THC-COOH em cabelo por UHPLC-MS/MS	68
6.1.1 Preparo das amostras controles, calibradores e padrão interno.....	68
6.1.2 Procedimento de descontaminação e extração capilar.....	68
6.1.3 Extração da amostra de cabelo	69
6.1.4 Condições de análise por LC-MS/MS	69
6.1.5 Resultados da validação.....	70
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
REFERÊNCIAS.....	75
ANEXO I.....	79
ANEXO II.....	81
ANEXO III.....	83
ANEXO IV	84
ANEXO V	86

1. APRESENTAÇÃO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar metodologias analíticas para a detecção de drogas em cabelo tanto relacionado à parte laboratorial, quando a validação clínica do ensaio, aplicado à pacientes traumatizados em decorrência de acidente de trânsito. O referido trabalho tem início com uma breve revisão bibliográfica sobre a pesquisa realizada, seguida da apresentação de dois capítulos compostos por artigos científicos que serão encaminhados para publicação como relatado a seguir:

ARTIGO 1: preparado segundo as normas da revista *Forensic Science International*, intitulado: *Validation of an analytical method for the simultaneous determination of 16 drugs and metabolites in hair in the context of driving license granting*.

ARTIGO 2: preparado segundo as normas da revista brasileira *Cadernos de Saúde Pública (CSP)*, intitulado: *Investigação retrospectiva do consumo de álcool e drogas em motoristas traumatizados com emprego de análises toxicológicas em cabelo*.

Durante o desenvolvimento dessa pesquisa, foram apresentados alguns trabalhos em congressos e eventos científicos, certificados expostos no anexo I, a saber:

- *“Validation process of analytical methodology to quantify drugs of abuse in hair samples by LC-MS/MS”*. Apresentado na forma de resumo/pôster no 17th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology (IATDMCT).
- *“Optimization of hair pulverization conditions using NOVA 2200e to analyse the surface area in the validation of analytical methodology for drugs detection”*. Apresentado na forma de resumo/pôster no 17th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology (IATDMCT).
- *“Estudo preliminar para a otimização das condições de extração do 11-nor-9-carboxi-a-tetrahydrocannabinol (THC-COOH) em amostras de cabelo através do uso de ponteiros de fase reversa”*. Apresentado na forma de resumo/pôster no I Congresso Latinoamericano de Biomedicina e Ciências do Laboratório.
- *“Processo de validação de metodologia analítica para detecção e quantificação de drogas de abuso em amostras cabelo por LC-MS/MS”*. Apresentado na

forma de E-POSTER na 39ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA.

Foram elaborados durante o desenvolvimento dessa pesquisa dois documentos: o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) presente no anexo II e o questionário aplicado aos pacientes que participaram da validação clínica do ensaio, presente no anexo III. Por fim, no anexo IV encontra-se o parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Feevale.

2. INTRODUÇÃO GERAL

A análise de substâncias em cabelo está se tornando uma prática de rotina toxicológica laboratorial no âmbito clínico e forense. Essa matriz alternativa ou complementar oferece várias vantagens, dentre elas destaca-se sua grande janela de detecção (SALOMONE et al., 2017; CAPPELLE et al., 2018). Outra vantagem da análise capilar é uma coleta não invasiva, com condições fáceis de transporte e armazenamento a temperatura ambiente (LENDIRO et al., 2017).

Uma das rotas sugeridas de incorporação de drogas dentro da estrutura capilar é a difusão passiva do sangue para as células do folículo piloso. Uma vez nestas células, o fármaco liga-se ao núcleo da haste do cabelo durante os processos de diferenciação e queratogênese. Outras rotas de incorporação ocorrem nos tecidos adjacentes, através da difusão do suor, sebo e a exposição à contaminação externa (TZATZARAKIS et al., 2017; TSANACLIS; ANDRAUS; WICKS, 2018).

As substâncias podem ligar-se a diferentes componentes intracelulares, tais como lipídeos, e proteínas como a queratina e melanina. A variável que determina a distribuição das substâncias ao longo do comprimento do cabelo é a taxa de crescimento através da sucessão das fases: anágena, catágena e telógena. Presume-se que as drogas sejam transportadas ao longo do fio de cabelo, simultaneamente com o seu crescimento (BARBOSA et al., 2013; VINCENTI; KINTZ, 2015).

Estudos demonstram que a pigmentação capilar é um fator que afeta a incorporação de drogas em cabelo (KIDWELL; SMITH; SHEPHERD, 2015; YU et al., 2017). A pigmentação da haste capilar ocorre pela transferência dos grânulos de melanina dos melanócitos do bulbo capilar para os queratinócitos corticais, o que está relacionado ao ciclo de crescimento do cabelo. A melanina é principalmente transferida durante a fase anágena para o córtex da haste capilar pelas interações de melanócitos e queratinócitos adjacentes. Entretanto, esse processo de incorporação de drogas relacionado às interações melanócito-queratinócito não é completamente elucidado (YU et al., 2017). Como a quantidade de melanina influencia a incorporação de drogas no cabelo, diferenças interindividuais podem determinar a deposição de drogas nessa matriz, uma vez que os maiores teores de melanina são encontrados em cabelos escuros (BARBOSA et al., 2013).

A lipofilicidade e basicidade das drogas também foram sugeridas como influenciadoras na incorporação de substâncias no cabelo (SERGI et al., 2013). Moléculas lipofílicas podem atravessar as membranas celulares do cabelo facilmente, assim como as moléculas básicas (cocaína e anfetaminas) possuem melhor capacidade de incorporação. O gradiente de pH entre o sangue e a matriz capilar ácida favorece a difusão e o acúmulo de drogas básicas no cabelo, no entanto, compostos hidrofílicos ou íons não são permeáveis através dessas membranas (VINCENTI; KINTZ, 2015; YU et al., 2017).

Como os metabólitos das drogas são geralmente mais polares, e, portanto, menos propensos à difusão passiva, são esperadas concentrações mais baixas desses no cabelo, em comparação com compostos mais lipofílicos. Dessa forma, os metabólitos mais polares, como a benzoilecgonina, a morfina e a anfetamina, penetram nos cabelos em menor extensão do que seus precursores mais lipofílicos, cocaína, 6-monoacetilmorfina ou metanfetamina, respectivamente (BARBOSA et al., 2013). É relatado que a deposição de fármacos na matriz capilar pode ser afetada pela cor, viés étnico, taxa de crescimento capilar, pelos de diferentes locais anatômicos e pelo uso de produtos para tratamento capilar (TZATZARAKIS et al., 2017).

Pode haver contaminação externa do cabelo através de grupos de drogas usualmente fumadas ou inaladas, como a cannabis, cocaína e a heroína, quando um indivíduo está na presença de usuários, se expondo à fumaça que pode ser depositada em seus cabelos. Podendo ocorrer absorção através do suor ou através da ingestão acidental de partículas captadas inadvertidamente de superfícies. Há, também, a possibilidade de exposição acidental ou ocupacional a substâncias (BARBOSA et al., 2013; CUYPERS; FLANAGAN, 2018).

Considerando o uso do cabelo nas análises toxicológicas para avaliação do consumo de drogas de abuso, o processo de descontaminação amostral compreende a uma etapa obrigatória em análises de substâncias em cabelo, sendo indispensável para excluir ao máximo a contaminação externa. A descontaminação objetiva remover desde resíduos de produtos capilares (cera, xampu, spray de cabelo), suor, sebo e poeira, até analitos que possam ter sido depositados na superfície do cabelo. A recomendação geral da Society of Hair Testing é uma estratégia de descontaminação que inclui uma lavagem inicial com solvente orgânico para remover óleos, seguida por

lavagens aquosas (SOHT, 2012; TSANACLIS; CUYPERS; FLANAGAN, 2018; ANDRAUS; WICKS, 2018).

Diversos protocolos de lavagem e descontaminação foram publicados ao longo de anos. Os resultados variam entre os vários procedimentos de descontaminação investigados, dentre os quais é difícil a comprovação de que possíveis substâncias depositadas externamente foram totalmente eliminadas. Existe um apelo comum para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes para a descontaminação capilar e um melhor conhecimento sobre as vias de incorporação de drogas em cabelo (KAMATA et al., 2015; TZATZARAKIS et al., 2017).

Nesse viés, o cabelo é uma matriz complexa que apresenta baixas concentrações de compostos, o que exige uma preparação de amostra otimizada, apresentando procedimentos de descontaminação, pulverização e extração, além de um método de quantificação sensível e específico. É necessária a preparação de calibração do ensaio, controle interno de qualidade, garantia externa da qualidade, estabilidade do analito e acreditação laboratorial (CAPPELLE et al., 2018).

Análises em cabelo permitem uma investigação retrospectiva do consumo de drogas após sua eliminação do corpo, auxilia na distinção entre história de consumo social ou abuso de substâncias de forma crônica (SALOMONE et al., 2016; LENDOIRO et al., 2017). Essa modalidade analítica expandiu-se em todo o espectro de investigações toxicológicas. Coletas de cabelo são realizadas rotineiramente durante investigações criminais, em casos de morte relacionada a drogas, proteção infantil, dentre outras (COOPER; KRONSTRAND; KINTZ, 2012).

No Brasil, o Conselho Nacional de Trânsito (CONTRAN) resolução nº 691 (2017), prevê exame toxicológico realizado em cabelo para aferir o consumo de substâncias psicoativas usadas nos últimos 90 dias que, comprovadamente, causem dependência ou comprometam a capacidade de direção. Essa resolução prevê a realização de exame toxicológico de larga escala de detecção para anfetaminas, maconha, cocaína, opiáceos e seus derivados, em motoristas profissionais do transporte rodoviário coletivo de passageiros e do transporte rodoviário de cargas, nas habilitações e renovações das Carteiras Nacionais de Habilitação (CNH) de categoria C, D e E, bem como nas contratações e desligamentos dos motoristas profissionais (DENATRAN, 2017; ABNT, 2019).

São definidos valores de *cut off*, valores de corte pré-estabelecidos para determinar a positividade para determinada substância. O uso do termo valores de corte vem do uso de imunoensaios, embora simples de executar, são naturalmente propensos à interferência, o que pode causar falsos negativos, bem como falsos positivos. Resultados obtidos de testes imunoenzimáticos isoladamente não devem ser usados para relatar quaisquer resultados toxicológicos, podendo ser aplicados somente como teste de triagem toxicológica, seguido por análise confirmatória (CUYPERS; FLANAGAN, 2018).

A confirmação da presença dos analitos de interesse é obtida através de métodos cromatográficos considerados confirmatórios, por meio do uso de cromatografia líquida ou gasosa associada a espectrometria de massa (LC-MS/MS ou GC-MS/MS), as quais possuem sensibilidade suficiente para quantificar os níveis mais baixos das drogas encontradas no cabelo (COOPER; KRONSTRAND; KINTZ, 2012). As diretrizes de validação do método e os procedimentos de acreditação laboratorial concentram-se no limite mínimo de quantificação e não no limite de detecção (CUYPERS; FLANAGAN, 2018).

A Society of Hair Testing produziu valores de *cut off* para uma série de analitos na tentativa de diferenciar ingestão deliberada de drogas da possibilidade de exposição incidental ou produção endógena, a resolução CONTRAN nº 691 (2017) e seus respectivos valores de *cut off* espelharam-se nessa diretriz e seus respectivos valores encontram-se abaixo no Quadro 1.

Quadro 1 – Substâncias psicoativas previstas na resolução CONTRAN nº 691 e seus respectivos valores de *cut off* em cabelo.

Analito a ser testado	Valor de <i>cut off</i> (ng/mg)
Anfetamina	0,2
Metanfetamina	0,2
MDA	0,2
MDMA	0,2
Anfepramona	0,2
Femproporex	0,2
Mazindol	0,5
THC	0,05
THC-COOH	0,0002
Cocaína	0,5
Benzoilecgonina	0,05
Cocaetileno	0,05
Norcocaína	0,05
Morfina	0,2
Codeína	0,2
Heroína	0,2
6-monoacetilmorfina	0,2

Fonte: adaptado de DENATRAN, 2016 e ABNT, 2019.

Quadro 1 - abreviaturas: MDMA: metilenodioximetanfetamina denominada popularmente ecstasy; MDA: metilenedioxianfetamina; THC: tetra-hidrocanabinol; THC-COOH: 11-nor-9-carboxi-delta9-tetrahidrocanabinol.

São necessários métodos analíticos com elevada sensibilidade para a determinação de drogas em cabelo, desenvolvidos e validados seguindo protocolos reconhecidos para a possível utilização na prática clínica rotineira. A análise por LC-MS/MS fornece benefícios sobre uma análise de GC-MS/MS, como uma especificidade aumentada e ampla variedade de colunas disponíveis, bem como o tempo de preparação da amostra que é reduzido pela eliminação da hidrólise e derivatização necessária na análise por GC-MS/MS (ALEKSA et al., 2012; BOUMBA et al., 2017; ORFANIDIS et al., 2017).

Utilizando-se do equipamento de LC-MS/MS, são relatados na literatura científica métodos bastante distintos entre si para a detecção simultânea de diversas drogas em cabelo. O autor CAPPELLE e colaboradores (2018) utilizaram o procedimento de extração líquido-líquido através de uma solução com metanol, acetonitrila e 2mM de formiato de amônia em água ultrapura, já BOUMBA e colaboradores (2017) utilizaram ácido clorídrico 0,1 M em metanol para extração líquido-líquido.

A técnica de extração em fase sólida, foi relatada separadamente ou em conjunto com a extração em fase líquida complementando-a, LENDOIRO e colaboradores (2012) utilizaram um procedimento de extração com essas duas etapas, a primeira extração líquido-líquido com hexano e acetato de etila em pH 9, seguido de extração em fase sólida (cartuchos Strata-X). Na extração em fase sólida, SERGI e colaboradores (2013) obtiveram uma boa recuperação da extração por meio de procedimento de extração líquido-pressurizado com água-metanol como meio de extração.

Comparando-se a extração com uso de SPE e a extração líquido-líquido, a primeira permite uma extração eficiente dos analitos, sua concentração e pré-purificação, no entanto é uma extração mais trabalhosa e cara quando comparada a segunda. A extração líquido-líquido apresenta diversos protocolos distintos para a análise de drogas em cabelo e exige um tempo de extração maior, mas com um equipamento sensível isso pode ser reduzido (LENDOIRO et al., 2017; CAPPELLE et al., 2018).

Estudos brasileiros têm demonstrado, com e sem a análise de matrizes biológicas, o uso de substâncias psicoativas por caminhoneiros para reduzir a sonolência durante as longas viagens e aumentar a disposição para o trabalho. No entanto, o uso dessas substâncias pode causar efeitos nocivos para o indivíduo e para a sociedade (GIROTTTO et al., 2014; BREEN et al., 2018). O uso de álcool e substâncias psicoativas são fatores contribuintes em acidentes de trânsito, capazes de provocar alterações cognitivas não condizentes com o desempenho de uma direção segura (TAKITANE et al., 2013; DE OLIVEIRA et al., 2015).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2019) a cada ano, cerca de 1,35 milhões de pessoas morrem a cada ano em decorrência de acidentes no trânsito, sendo que 93% das mortes no trânsito ocorrem em países de baixa e média renda, embora estes concentrem aproximadamente 60% dos veículos do mundo. Além disso, entre 20 e 50 milhões de pessoas sofrem lesões não fatais, muitas delas resultando em incapacidade e deficiência física (OPAS, 2019).

O consumo abusivo de bebidas alcoólicas é um problema mundial além de seu potencial efeito agressor à saúde, seu uso excessivo têm relação direta com efeitos socioeconômicos negativos, como a ocorrência de delitos, acidentes de trânsito e diminuição da produtividade no trabalho. O Etil Glicuronídeo (EtG) foi proposto como

o biomarcador mais informativo do uso de etanol em matriz capilar. A presença do EtG em cabelo fornece uma forte indicação do consumo de etanol, pois esse é formado pela biotransformação de uma pequena fração de etanol circulante ($<0,1\%$) pela enzima UDP-glucuroniltransferase para formar um conjugado com ácido glucurônico (KINTZ; NICHOLSON, 2014; BASTIANI et al., 2020).

O consumo combinado de diversas drogas de abuso de forma prolongada é um padrão prevalente de uso de substâncias, representa uma preocupação de saúde significativa e um desafio particular que requer métodos analíticos capazes de detectar simultaneamente diversos compostos em uma única corrida. Para tanto, o cabelo se apresenta como matriz ideal na identificação de perfil de uso crônico de substâncias psicoativas e consumo de álcool. Ademais, um método sensível e uma extensa validação metodológica são essenciais para a emissão de resultados confiáveis com uso de cabelo, junto ao embasamento em diretrizes pré-estabelecidas e consolidadas visando qualidade, reafirmada por meio da quantificação da incerteza da medição e uso valores de corte para os analitos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral do estudo é desenvolver e validar uma metodologia analítica para a detecção de drogas de abuso em matriz capilar por UHPLC-MS/MS.

3.2 Objetivos específicos

- Validar a metodologia analítica confirmatória para a detecção de drogas de abuso em cabelo, de acordo com as especificidades requeridas pela resolução CONTRAN nº 691 (2017);
- Desenvolver e validar um método bioanalítico por UHPLC-MS/MS, confirmatório para uso de canabinóides, através da determinação de THC-COOH;
- Realizar testes de controle de qualidade com avaliação de medidas de incerteza na análise de drogas em cabelo;
- Realizar a validação clínica dos ensaios em amostras de cabelo coletadas de motoristas envolvidos em acidentes de trânsito.
- Avaliar a prevalência e perfil sociodemográfico de motoristas traumatizados atendidos no Hospital Geral de Novo Hamburgo, para o consumo de drogas e para o consumo de álcool, por meio da análise do Etil Glicuronídeo em cabelo.

4. ARTIGO 1

Validation of an analytical method for the simultaneous determination of 16 drugs and metabolites in hair in the context of driving license granting

Victoria Vendramini Müller^{1,2,3}, Roberta Zilles Hahn¹, Lilian de Lima Feltraco Lizot¹,
Anelise Schneider¹, Cristiane Pereira da Silva^{1,2,3}, Fernando Engel Gerbase^{3,4},
Danilo Pereira⁵, Rafael Linden^{1,2,3}, Marina Venzon Antunes^{1,3*}

¹ Laboratory of Analytical Toxicology, Feevale University, Novo Hamburgo, Brazil.

² National Institute of Forensic Science and Technology (INCT Forense), Brazil

³ Graduate Program on Toxicology and Analytical Toxicology, Universidade Feevale, Novo Hamburgo, RS, Brazil

⁴ Emergency Department, Public Hospital of Novo Hamburgo, Novo Hamburgo, RS, Brazil.

⁵ Scientific department, Waters Corporation, São Paulo, SP, Brazil.

* Corresponding author:

Marina Venzon Antunes

Toxicological Analysis Laboratory

Instituto de Ciências da Saúde Universidade Feevale

Rodovia ERS 239, n. 2755 CEP 93525-075 Novo Hamburgo-RS, Brazil

e-mail marinaantunes@feevale.br

Tel. +55 51 35868800 (9039)

ABSTRACT

The study aimed to develop and validate a UPLC-MS/MS method for the determination of multiple drugs in hair, to be used for toxicological examination in driving license granting. Sample preparation was a one-step liquid extraction of milled hair with methanol, incubated for 15 h at 50 °C. The chromatographic separation was performed in a reversed phase column, with a run time of 2.2 min, including the analysis of cocaine and metabolites, amphetamine, MDA, MDMA, femproporex, anfepramone, mazindol, codeine, morphine, 6-monoacetylmorphine, and tetrahydrocannabinol. The assay was linear for all substances ($r > 0.99$), accurate 86.63 to 105.87%, and precise, with intra-assay CV 3 to 13.5% and inter-assay CV 1.65 to 12.02%. There was no significant carry over effect and the matrix effect was minimum. The relative uncertainty percentages were below 9% for all the substances at the cut-off values, which ensures a reliable measurement. The method was successfully applied to 50 hair samples from injured drivers, with 12% of positivity, including cocaine, MDMA and THC.

Key-words: Drugs of abuse. Hair. Toxicological analysis. UPLC-MS/MS. driving license.

1. Introduction

Hair testing has become a routine practice in clinical and forensic toxicological laboratories, with a unique perspective in the investigation of drug consumption. The extended diagnostic time-window covered by the keratin matrix allows retrospective investigation of the exposure to substances and assessment of drug abuse [1,2].

Moreover, hair analysis helps in distinguishing between social and chronic substance abuse throughout different periods [3,4]. It has been routinely used during criminal investigations in cases of drug-related death, drug-facilitated crime, child protection, among others. Also, hair testing can be a useful tool for drug testing in the workplace and driving license granting [5].

The use of psychoactive substances has been associated with increased risk for traffic accidents [6]. Traffic trauma is a major cause of death and disability, it has a global distribution and injuries are among the leading causes of death and disability worldwide [7]. Professional drivers, most truck drivers, face excessive working hours, fatigue, and sleepiness, which has been connected to the use of psychoactive substances, particularly stimulants [8–10].

The Brazilian law requires hair toxicological analysis for professional driving license granting. The hair drug testing include drugs that can cause dependence or compromise the capability to drive, like amphetamines, marijuana, cocaine, opiates and their derivatives [11]. The test enables to identify chronic abuse and can provide relevant epidemiologic information, contributing to prevent the occurrence of road traffic accidents [12,13].

Hair is a stable and robust tissue, less affected by adulterants or short-term abstinence than traditional matrices such as blood and urine [5]. However, it is a complex matrix with low parent and metabolite drug concentrations, which requires high sensitive methods, and optimized sample preparation, including decontamination, pulverization, and extraction procedures. Also, multi-analyte methods are often recommended, saving cost, time, and the amount of specimen required for testing [3,4].

Thus, the study aimed to develop and validate a UPLC-MS/MS method for determination of multiple drugs in hair, to be used for toxicological examination in driving license granting. A complete validation was performed, following the

recommendations from the Society of Hair Testing (SoHT) and ISO 17025, in addition to the estimation of the uncertainty in the measurement [14,15].

2. Methods

2.1 Reagents

The analytical standards amphetamine (AMP), methamphetamine (MAMP), methylenedioxyamphetamine (MDA), methylenedioxymethamphetamine (MDMA), anfepramone (ANFEP), femporex (FEMP), mazindol (MZD), tetrahydrocannabinol (THC), cocaine (COC), benzoylecgonine (BZE), cocaethylene (CT), norcocaine (NCOC), morphine (MP), codeine (COD), 6-monoacetylmorphine (6-MAM), anhydroecgonine methyl ester (AEME), and the deuterated standards AMP-D5, MAMP-D5, MDA-D5, MDMA-D5, ANFEP-D5, THC-D3, COC-D3, BZE-D3, CT-D3, NCOC-D3, MP-D3, COD-D10, 6-MAM-D3 were obtained from Cerilliant™ (Round Rock, USA) at concentrations of 1 mg mL⁻¹ or 100 µg mL⁻¹. Formic acid and methanol were purchased from Merck™ (Darmstadt, Germany), and ultra-pure deionized water was supplied by an Elga Purelab Ultra™ system from Veolia Labwater™ (High Wycombe, UK).

2.2 Stock solutions

Three intermediate solutions (IS) were prepared in methanol, each containing a group of compounds with similar target values: IS-1 containing AMP, MAMP, MDA, MDMA, ANFEP, FEMP, MP, COD, and 6-MAM at 2,000 ng mL⁻¹; IS-2 containing MZD, and COC at 5,000 ng mL⁻¹; IS-3 containing BZE, CT, NCOC, AEME, and THC at 500 ng mL⁻¹. Six working solutions (WS) were prepared by mixing and diluting the IS-1, IS-2, and IS-3 solutions with methanol. Final concentrations were 1,200; 800; 600; 400; 200; and 100 ng mL⁻¹ for analytes from IS-1; 3,000; 2,000; 1,500; 1,000; 500; and 250 ng mL⁻¹ for analytes from IS-2, and 300; 200; 150; 100; 50; 25 ng mL⁻¹ for analytes from IS-3. Similarly, quality control working solutions were prepared at concentrations 1,000, 250, and 150 ng mL⁻¹ for analytes from IS-1; 2,500, 625, and 375 ng mL⁻¹ for analytes from IS-2, and 250, 62.5, and 37.5 ng mL⁻¹ for analytes from IS-3. Calibrators and quality control samples in hair were prepared by adding the working solutions to blank hair samples.

The internal standard solution was prepared in methanol with the mixture of the deuterated standards: AMP-D5, MAMP-D5, MDA-D5, MDMA-D5, ANFEP-D10, COD-D10, 6MAM-D3 at 160 ng mL⁻¹; MP-D3 at 320 ng mL⁻¹; COC-D3 at 400 ng mL⁻¹; and BZE-D3, CT-D3, NCOC-D3, and THC-D3 at 40 ng mL⁻¹.

2.3 Blank specimen collection and storage

Drug-free hair (blank hair) was obtained from five volunteers, collected from the head on the posterior vertex as close as possible to the scalp. Each blank sample was cut in small fragments (~1-3 mm) into an aluminum wrapper, using a weaver-type scissor. Samples were stored inside Falcon™ tubes, at room temperature.

2.4 Calibrators and control samples

Six-point calibrating hair samples were prepared by adding 20 µL of the respective working solution to 20 mg of previously decontaminated blank hair. Similarly, quality controls samples were prepared at low (QCL), medium (QCM) and high (QCH) levels. QCL concentrations were 0.15 ng mg⁻¹ for AMP, MAMP, MDA, MDMA, ANFEP, FEMP, MF, COD, and 6-MAM; 0.375 ng mg⁻¹ for MZD, and COC; and 0.0375 ng mg⁻¹ for BZE, CT, NCOC, AEME, and THC. QCM concentrations were 0.25 ng mg⁻¹ for AMP, MAMP, MDA, MDMA, ANFEP, FEMP, MF, COD, and 6-MAM; 0.625 ng mg⁻¹ for MZD, and COC; and 0.0625 ng mg⁻¹ for BZE, CT, NCOC, AEME, and THC. QCH concentrations were 1.0 ng mg⁻¹ for AMP, MAMP, MDA, MDMA, ANFEP, FEMP, MF, COD, and 6-MAM; 2.5 ng mg⁻¹ for MZD, and COC; and 0.25 ng mg⁻¹ for BZE, CT, NCOC, AEME, and THC.

2.5 Hair decontamination, pulverization and extraction

A 20 mg hair portion of (3-4 cm length) was placed into a Sarstedt™ 2.0 mL tube and sequentially washed with 1 mL of ultra-pure water, followed by two washing steps with 1 mL of methanol. The washing steps were performed for 2 min with vortex mixing.

The analytes were extracted from the hair by a one-step liquid extraction. Previously weighted, cut, and decontaminated hair samples were added with 50 µL of the internal standard solution and 500 µL of methanol. After the addition of two 5 mm

diameter steel balls, the samples were pulverized on a mill RETSCH 2000® for 5 minutes at 30 Hz. The pulverized samples were incubated for 15 hours at 50 °C and 1,000 rpm in an Eppendorf ThermoMixer™. Finally, the steel balls were carefully removed using a stick-shaped magnet and the tubes centrifuged at 12,000 g for 10 minutes. The supernatant was transferred to insert vials, and 1.5 µL injected into the UPLC-MS/MS.

2.6 UPLC-MS/MS conditions

The extracts were analyzed employing an Acquity® I-Class UPLC coupled to a Xevo® TQD triple quadrupole mass spectrometer from Waters technologies (Milford, USA). The system was controlled by a MassLynx® software and the data processed by a TargetLynx® software, both from Waters. The chromatographic separation was achieved in an Acquity® UPLC BEH C18 column (2.1 x 50mm, 1.7µm). Column temperature was set at 40 °C and autosampler temperature at 10 °C. The mobile phase A was water with 0.1% formic acid and mobile phase B was acetonitrile with 0.1% formic acid, operated in gradient mode, at the flow rate of 0.5 mL min⁻¹. The mobile phase gradient started with A at 95 with a linear increase of the percentage of mobile phase B until 90% at 1.5 min, maintained for 0.25 min, returning to initial composition at 1.76 min, followed by 0.44 min stabilization to the end of the run. Post-injection wash was 6 seconds. The analyzes were performed in multiple reaction monitoring (MRM) mode with positive electrospray ionization (ESI). The Xevo TQD ion source temperature was 550 °C; capillary energy 3 kV, desolvation and cone gas flows of 1,000 L h⁻¹ and 50 L h⁻¹, respectively. Two MRM transitions were chosen for each substance, one for quantification and other for confirmation of the drugs and metabolites. The ion transitions and optimized cone energy, collision energy and the retention times for all compounds are listed in Table 1.

Table 1. Mass spectrometric detection parameters and retention times for the drugs, metabolites and deuterated standards.

<i>Compound</i>	MRM transitions (m/z)*	Cone energy (V)	Collision energy (V)	Retention time (min)
<i>Amphetamine</i>	136.1 → 91.1 136.1 → 119.1	20	13 7	0.66
<i>Amphetamine D5</i>	141.0 → 124.0	20	7	0.66
<i>Methamphetamine</i>	150.1 → 91.1 150.1 → 119.1	25	16 9	0.68
<i>Methamphetamine D5</i>	155.1 → 121	25	9	0.68
<i>MDA</i>	180.2 → 133.1 180.2 → 163.1	20	16 8	0.66
<i>MDA D5</i>	185.2 → 168.1	23	8	0.66
<i>MDMA</i>	194.1 → 105.1 194.1 → 133.1	20	25 18	0.68
<i>Femproporex</i>	189.1 → 91.1 189.1 → 119.0	20	18 9	0.70
<i>Mazindol</i>	285.3 → 44.1 287.3 → 44.1	20	23	0.89
<i>MDMA D5</i>	199.1 → 165.1	20	10	0.68
<i>Anfepramone</i>	206.2 → 105.1 206.2 → 133.1	30	20 13	0.70
<i>Anfepramone D10</i>	216.2 → 104.9	30	21	0.70
<i>Mazindol</i>	285.3 → 44.1 287.3 → 44.1	20	23	0.89
<i>Morphine</i>	286.2 → 165.1 286.2 → 181.1 286.2 → 201.1	50	35 30 20	0.46
<i>Morphine D3</i>	289.2 → 165.1	50	35	0.46
<i>6-monoacetylmorphine</i>	328.1 → 193.1 328.1 → 211.1	30	26 23	0.65
<i>6-monoacetylmorphine D3</i>	331.25 → 211.1	35	24	0.65
<i>Codeine</i>	300.2 → 152.1 300.2 → 165.1 300.2 → 215.1	35	42 38 23	0.61
<i>Codeine D3</i>	303.2 → 165.1	27	36	0.61
<i>Cocaine</i>	304.2 → 82.1 304.2 → 182.1	30	28 18	0.84
<i>AEME</i>	182.2 → 118 182.2 → 122.1	30	20 19	0.49
<i>Cocaine D3</i>	307.2 → 185.1	30	18	0.84
<i>Benzoylcegonine</i>	290.1 → 105.1	35	30	0.72

	290.1 → 168.1		17	
<i>Benzoylecgonine D3</i>	293.1 → 171.1	35	17	0.72
<i>Norcocaine</i>	290.1 → 105.1	35	30	0.86
	290.1 → 168.1		17	
<i>Norcocaine D3</i>	293.25 → 171.1	35	13	0.86
<i>Cocaethylene</i>	318.2 → 82.0	30	29	0.92
	318.2 → 196.1		17	
<i>Cocaethylene D3</i>	321.2 → 199.2	30	19	0.92
<i>THC</i>	315.2 → 123.0	25	32	1.96
	315.2 → 193.1		23	
<i>THC D3</i>	318.2 → 196.1	25	23	1.96

*quantification transitions are marked in bold. MRM: multiple reaction monitoring; MDMA: methylenedioxymethamphetamine; MDA: methylenedioxyamphetamine; AEME: Anhydroecgonine Methyl Ester; THC: tetrahydrocannabinol.

2.7 Method validation

Method validation followed internationally accepted guidelines for determination of drugs in hair [15–17], and the guidance of the Brazilian General Accreditation Coordination and NBR ISSO/IEC 17025 for forensic accreditation, in compliance with the Brazilian National Traffic Department (DENATRAN) [11,14,18].

2.7.1 Linearity

Linearity was evaluated in quintuplicate at six concentrations. The curves were obtained correlating the peak area ratios from the analytes to their analogous internal standard to nominal concentrations of calibrators. The concentrations interval were 0.10, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, and 1.20 ng mg⁻¹ for AMP, MAMP, ANFEP, FEMP, MDA, MDMA, MF, 6-MAM, and COD; 0.25, 0.50, 1.0, 1.5, 2.0, and 3.0 ng mg⁻¹ for COC and MZD; and finally 0.025, 0.050, 0.10, 0.15, 0.20, and 0.30 ng mg⁻¹ for THC, AEME, NCOC, CT and BZE. Homoscedasticity of calibration data was assessed using the F test (95% confidence level). Weighted regression models were evaluated based on their correlation coefficients (r) and percentual cumulative errors (Σ% RE). The linearity was considered acceptable if the correlation coefficient values were equal to or greater than 0.99 and if the calculated calibrator concentrations were within 15% of their nominal concentrations [14].

2.7.2 Sensitivity

The sensitivity was tested within the precision and accuracy assays, at the lowest concentration of the calibration curve (quality control at the lowest limit of quantification, QCLLOQ). The Society of Hair Testing (SoHT) [15] and CONTRAN [11] proposed cut-off values for a number of analytes in an attempt to differentiate deliberate drug intake from the possibility of incidental exposure or endogenous production. The QCLLOQ were set as 50% of the cut-off values as shown in Table 2. The limit of detection (LOD) was calculated based on the LLOQ, using the formula: $LOD = LLOQ/3.3$ [18].

Table 2. Psychoactive substances provided for in CONTRAN's Resolution nº 691 and their respective cut off values in hair.

Analyte	Cut off value (ng mg ⁻¹)	QCLLOQ (ng mg ⁻¹)
Amphetamine	0.2	0.1
Methamphetamine	0.2	0.1
MDA	0.2	0.1
MDMA	0.2	0.1
Anfepramone	0.2	0.1
Femproporex	0.2	0.1
Mazindol	0.5	0.25
THC	0.05	0.025
THC-COOH	0.0002	-
Cocaine	0.5	0.25
Benzoylecgonine	0.05	0.025
Cocaethylene	0.05	0.025
Norcocaine	0.05	0.025
AEME	-	0.025
Morphine	0.2	0.1
Codeine	0.2	0.1
Heroin	0.2	-
6-monoacetylmorphine	0.2	0.1

Source: adapted from [11,15]

QCLLOQ: quality control at the lower limit of quantification; MDMA: methylenedioxyamphetamine; MDA: methylenedioxyamphetamine; AEME: Anhydroecgonine Methyl Ester; THC: tetrahydrocannabinol; THC-COOH: 11-nor-9-carboxy-delta-9-tetrahydrocannabinol.

2.7.3 Precision and accuracy

Precision and accuracy were tested over five days in triplicate at the concentration levels: low (QCL), medium (QCM), high (QCH), and lowest limit of

quantification (QCLLOQ), along with full calibration curves. Intra and inter-assay precision results were evaluated by Analysis of Variance (ANOVA), expressed in CV (%), and the accuracy assessed as the percentage of the nominal concentration represented by the concentration estimated with the calibration curve. The acceptance criteria for accuracy were mean values within $\pm 15\%$ of the nominal value, and precision a maximum CV of 20% [14,18].

2.7.4 Processed samples stability at the autosampler

The stability of the extracts at the autosampler at 10°C was tested by injecting low and high control extracts (QCL and QCH) at intervals of 1 h for 15 hours. Peak areas ratios of the analytes at the first injection was compared with those from the end of the sequence. The acceptance criteria was a maximum peak area ratio variation at the of 15% [14].

2.7.5 Selectivity and carryover

Selectivity was evaluated through the analysis of five quality control samples added with the following substances: amitriptyline, propranolol, paracetamol, atenolol, carbamazepine, diazepam, flunitrazepam, sulpiride, omeprazole, fluoxetine, and venlafaxine. The test was performed to ensure that these substances did not significantly affected the drugs and metabolites quantification [18]. The carryover effect was evaluated in quintuplicate by sequentially injecting the highest calibrator and a blank hair extract. The carryover test acceptance criterion was the percentage of the areas of blank hair extracts below 20% of those from CQLLOQ samples [14].

2.7.6 Matrix effect

The matrix effect (ME) was tested after the analysis of two sets of quality control samples at low (QCL), medium (QCM) and high (QCH) concentrations. The set A was composed of the analytes and their analogous internal standards prepared in mobile phase at a concentration equivalent to 100% of the extraction yield. The set B was composed of five blank hair extracts for each concentration, resuspended with the

same solutions from set A. The ME was calculated using the following formula: ME % = $[1-(B/A)] \times 100$ [14,18].

2.8 Estimation of the measurement uncertainty

The word “uncertainty” means doubt, following this broadest sense “uncertainty of measurement” means doubt about the validity of the result of a measurement [19]. The measurement uncertainty (MU) of the method was calculated in accordance to the EURACHEM / CITAC Guide (2016) and Guide to Expression of Uncertainty in Measurement (GUM) [17,19], as previously described in forensic settings [20–22]. The expanded measurement uncertainty of each substance was calculated following the steps: specification of the measurand; identification of the sources of uncertainty (sample weight, estimation of the amount of the analyte in the hair sample, and precision of the method); followed by the quantification of the uncertainty components. Finally, the degrees of freedom and expanded uncertainty (U) were calculated.

2.8.1 Specification of the measurand

The specification of the measurand was expressed through the mathematical model shown in [Eq (1)], following the EURACHEM/CITAC Guide [17]. The concentration of the drug in the test sample in ng mg^{-1} (C) is obtained through the ratio between the amount of the drug in the tested sample (C_0), and the weight of the tested sample (W), multiplied by the correction factor of the method precision at the concentration level ($f_{\text{precision}}$).

$$C = \frac{C_0}{W} \times f_{\text{precision}} \text{ (ng mg}^{-1}\text{)} \quad (1)$$

2.8.2 Quantification of the uncertainty contributions

The uncertainty sources used in the model were sample weight, estimated amount of analyte in the sample, and method precision. The relative standard uncertainty associated with the hair mass weighing ($[ir(W)]$) was calculated as the ratio between the weighing uncertainty ($[i(W)]$), provided by the scale calibration certificate, and the mass of the sample to be weighed, both in mg. The resulted $[ir(W)]$ was 0.001.

The uncertainty due to the estimation of the analyte amount in the sample ($[ir(C_0)]$) was evaluated considering the uncertainty of the analytical standard purity and the uncertainties of the micropipettes, obtained from the calibration certificate.

The uncertainty due to the calibration curve ($u(Cur)$) was calculated by the [Eq (2)], where S is the residual standard deviation, B_1 is the slope of the calibration curve, P is the number of replicates of each calibrator, n is the number of replicates multiplied by the total number of calibration levels, C_0 is the drug amount, $\bar{C}$ is the ratio between the sum of the calculated value of each calibrator and the total number of calibrators, S_{xx} corresponds to the sum of the differences between the calculated drug amount and the squared mean.

$$u(Cur) = \frac{s}{B_1} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{n} + \left(\frac{(C_0 - \bar{C})}{S_{xx}} \right)^2} \quad (2)$$

The uncertainty due to the method precision (u) was calculated by the ratio of the pooled standard deviation (S_p) and the square root number of independent measurements (m) by [Eq (3) and (4)], where V_i is the degree of freedom of the ' i 'th sample, and S_i is the standard deviation of the ' i 'th sample obtained from the method precision assay. Finally, the relative uncertainty (u_r) was calculated by the ratio between u and the number of replicates analyzed per analytical batch multiplied by the number of analytical runs from precision assays.

$$S_p = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N V_i \times S_i^2}{\sum_{i=1}^N V_i}} \quad (3)$$

$$u = \frac{S_p}{\sqrt{m}} \quad (4)$$

The combined total method uncertainty (u_c) was calculated by [Eq(5)], where $u_T^2(C_0)$ corresponds to $u(Cur)$, $u_T^2(W)$ corresponds to $[ir(W)]$ and $u_T^2(f \text{ precision})$ corresponds to u_r , and C the drug concentration in the sample, all previously calculated.

$$u_c = C \sqrt{u_T^2(C_0) + u_T^2(W) + u_T^2(f \text{ precision})} \quad (5)$$

The degrees of freedom (V_{eff}) for the drugs were calculated using the Welch Satterthwaite) [Eq (6)] [19], where $u_c(y)$ is the combined total uncertainty, $u_i(y)$ is the individual standard uncertainty, and v_i is the degree of freedom of $u_i(y)$. The coverage factor (k) was determined by t distribution according to the degree of freedom V_{eff} at the 95% significance level, as $k=2$. Weighing and volume measurements have infinite degrees of freedom, thus the calibration curve and precision were the only contributing factors. Finally, the expanded uncertainty (U) for each substance in ng mg^{-1} , was calculated multiplying the u_c and the coverage factor ($k=2$).

$$V_{\text{eff}} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^N u_i^4(y)/v_i} \quad (6)$$

2.9 Proficiency tests and assay application in clinical samples

The validated method was applied to the analysis of three rounds of proficiency tests provided by the Brazilian quality control laboratory Controllab™. These tests are also a required as part of the ISO 17025 accreditation process for the analysis of drugs of abuse in hair [14].

Also, the assay was applied to 50 clinical samples from drivers involved in motor vehicle crashes, admitted to the emergency department of a Brazilian general hospital. Inclusion criteria were age ≥ 18 years and concordance to provide hair samples, expressed by signing a consent term. The Institutional review board of the Universidade Feevale approved the study. Hair samples were collected from the vertex posterior of the head, as close as possible from the scalp, wrapped in aluminum foils indicating with a string the hair root, as recommended by the SoHT [15]. The samples were stored at room temperature before analysis. The toxicological analysis were performed with hair lengths within 3 to 4 cm, corresponding in general to the last 3 months of exposure. Calibrators and control samples were analyzed at each batch of samples, and the results interpreted according to the cut-off values [11].

3 Results and discussion

3.1 Chromatography and preparation of samples

Several methods aiming the analysis of drugs in hair combining gas or liquid chromatography with mass spectrometry have been described, with adequate sensitivity, precision, and accuracy, reproducing reliable results [2,4,22–30]. However, the monitoring of polysubstance abuse represents a challenge that requires multi-analyte method capable of detecting several compounds in a single run [2].

Table 3 present multi-analyte methods for hair testing by LC-MS/MS. In relation to the articles found, the present study showed the most rapid chromatographic run, greater ease in preparing the sample with a single step liquid extraction, wich allowed the detection and quantification of 16 drugs and metabolites in hair, including cocaine and metabolites, amphetamine, MDA, MDMA, femproporex, anfepramone, mazindol, codeine, morphine, 6-monoacetylmorphine, and tetrahydrocannabinol.

The substances listed in the CONTRAN resolution were included in the assay, except for heroin and THC-COOH, since the 6-monoacetylmorphine infers by itself the use of heroin, and due to lack of sensitivity of the method for THC-COOH quantification. Thus, this is a screening method for THC and a confirmatory method for the other evaluated drugs. Figure 1 illustrates chromatograms obtained from hair samples collected from patients positive for COC and MDMA, and THC. The use of UPLC-MS/MS provides benefits over gas chromatography GC-MS/MS systems, such as increased specificity and reduced sample preparation time by eliminating the derivatization step [24]. The sample preparation was optimized to reduce sample handling and turnaround time, increasing productivity. The hair decontamination and extraction were performed in the same tube, the hair was milled with the extraction solvent, and there was no solvent evaporation step.

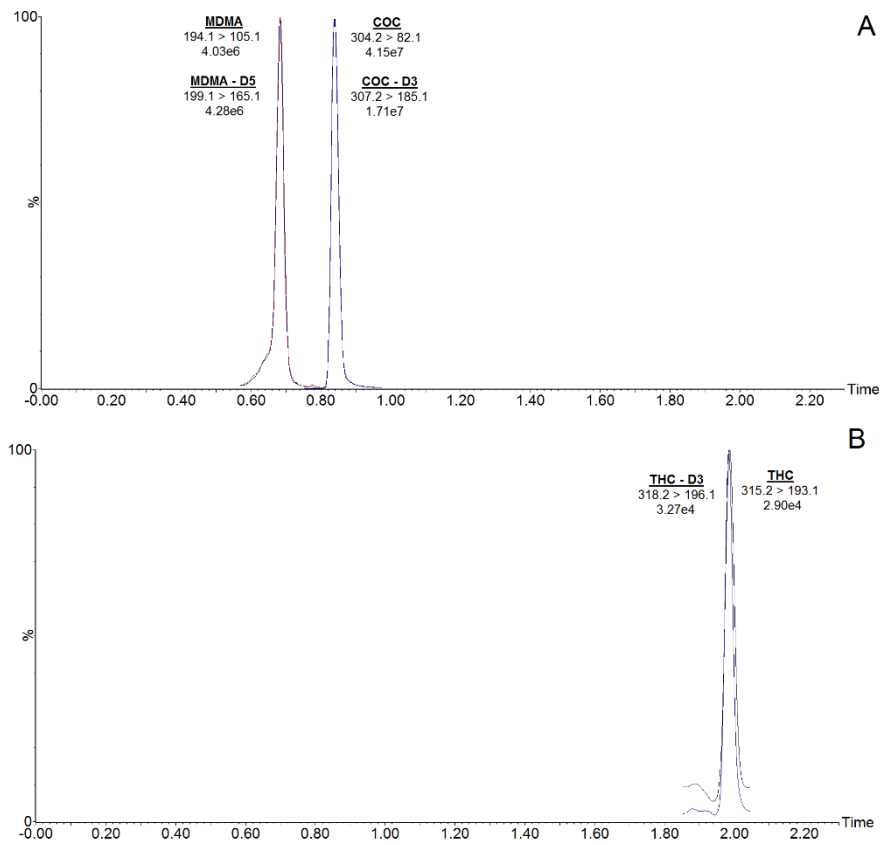


Figure 1. Ion chromatogram obtained from A: patient sample containing COC at 5.39 ng mg⁻¹, and MDMA at 0.53 ng mg⁻¹; B: patient sample containing THC at 0.11 ng mg⁻¹

Table 3. LC-MS/MS methods for detection of multi psychoactive substances in hair.

Hair Amount (mg)	Sample preparation	Incubation time	Run time min	Linearity range ng mg ⁻¹	Detected substances n	Ref.
20	Liquid-extraction	15 h	2.2	0.025-0.25 to 0.3-3.0	16 (cocaine, benzoylecgonine, cocaethylene, norcocaine, AEME, amphetamine, Methamphetamine, MDA, MDMA, femproporex, anfepramone, mazindol, codeine, morphine, 6-monoacetylmorphine, and tetrahydrocannabinol)	Present study
50	Liquid-extraction followed by solid-phase extraction	Overnight	32	0.005-0.10 to 2-20	35 (THC, morphine, 6-acetylmorphine, codeine, methadone, fentanyl, amphetamine, methamphetamine, 3,4-methylenedioxymphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, benzoylecgonine, cocaine, lysergic acid diethylamide, ketamine, scopolamine, alprazolam, bromazepam, clonazepam, diazepam, flunitrazepam, 7-aminoflunitrazepam, lorazepam, lormetazepam, nordiazepam, oxazepam, tetrazepam, triazolam, zolpidem, zopiclone, amitriptyline, citalopram, clomipramine, fluoxetine, paroxetine and venlafaxine)	[23]
10-50 (validation 20 mg)	Liquid-extraction	18 h	9	0.5- 7.5	14 (nicotine, cotinine, morphine, codeine, 6-acetylmorphine, ethylmorphine, amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, benzoylecgonine, cocaine, 7-aminoflunitrazepam and diazepam)	[30]
20	Liquid-extraction with solvent evaporation	3 h	12.4	0.1 – 1.25	132 NPS (cathinones and synthetic cannabinoids, as well as amphetamine-type stimulants, piperazines and other hallucinogenic compounds)	[26]
20	Pressurized-liquid extraction followed by solid-phase extraction	13 min	6	0.0018- 0.016 to 1.25-12.5	14 (amphetamine, methamphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine, 3,4-methylenedioxyethylamphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, cocaine, norcocaine, benzoylecgonine, mescaline, codeine, morphine, 6-acetylmorphine, ketamine, phencyclidine)	[29]
30	Liquid-extraction followed by solid-phase extraction	1 h	13	0.002 to 4.0	14 amphetamine-type stimulant drugs, including synthetic cathinones and piperazines (Amphetamine, 4-FMC, Methylone, Methamphetamine, 4-FMA, Mephedrone, MDA, Methedrone, MDMA, mCPP, MDPV, Phenazone, TFMPP, Trazodone)	[4]

3.2 Method validation

Interfering chromatographic peaks were not observed at the retention times of the analytes in blank samples. The selectivity was not significantly affected by the presence of other analytes of interest, with CV below 20% for all quality control levels.

Calibration samples were prepared at six concentration levels. The linearity range covered the cut-off values for differentiating deliberate drug intake from the possibility of incidental exposure or endogenous production [5]. The slopes (b) and intercepts (a), as well as the coefficients of correlation and cumulative percentage relative error ($\Sigma\%RE$) are listed in table 4. The r values were above 0.99 for all analytical batches and back-calculated concentrations within the acceptance limit of $\pm 15\%$. As calibration data presented significant heteroscedasticity ($F_{\text{tab}} = 4,38$), the inverse of the concentration ($1/x$) was chosen as the weighting factor, with $\Sigma\%RE$ between -7.55×10^{-14} to 9.46×10^{-14} .

Table 4. Summary of evaluation of the calibration models.

Weighted Factor	Unweighted				1/x				F_{exp}
Regression parameters	b	A	r	$\Sigma\%RE$	b	a	r	$\Sigma\%RE$	
AMP	0.00179	0.03796	0.9963	-5.8	0.00183	0.02123	0.9963	1.28×10^{-13}	53.7
MAMP	0.00254	0.02995	0.9977	-10.2	0.0026	-0.0004	0.9977	1.03×10^{-13}	139.7
MDA	0.00199	0.02532	0.9967	-9.07	0.00204	0.00342	0.9967	1.99×10^{-13}	105.7
MDMA	0.00091	0.01211	0.9975	-5.76	0.00093	0.00491	0.9975	2.13×10^{-13}	124.9
FEMP	0.00331	0.04849	0.9961	-7.9	0.00339	0.01465	0.9961	1.39×10^{-13}	95.7
ANFEP	0.00291	0.0428	0.9968	-8.35	0.00298	0.01175	0.9968	-4.62×10^{-14}	107.6
MZD	0.00241	0.11704	0.9957	-6.05	0.00246	0.06122	0.9957	-1.44×10^{-13}	94.8
MP	0.00134	0.01629	0.9977	-8.75	0.00137	0.00209	0.9977	1.19×10^{-13}	105.3
COD	0.0027	0.00585	0.9997	-0.786	0.0027	-	0.9997	1.32×10^{-13}	142.5
6-MAM	0.00222	0.3042	0.9965	-11.2	0.00228	0.00099	0.9965	-5.28×10^{-14}	172.9
COC	0.00113	0.03789	0.9971	-7.61	0.00115	0.01048	0.9971	-1.49×10^{-13}	126.9
BZE	0.01027	0.02885	0.9964	-10.3	0.01052	-	0.9964	-7.55×10^{-14}	224.0
CT	0.01043	0.04199	0.9969	-6.06	0.01065	0.01932	0.9969	9.46×10^{-14}	137.9
NCOC	0.00984	0.04749	0.9974	-1.82	0.00999	0.03481	0.9974	2.04×10^{-13}	126.3
AEME	0.00005	0.00001	0.9988	-1.02	0.00005	-	0.9988	1.47×10^{-14}	107.6
THC	0.00817	0.03476	0.9976	-5.28	0.00833	0.01823	0.9976	4.84×10^{-14}	142.5

b: inclination; a: intercept; r: correlation coefficient; AMP: Amphetamine; MAMP: Methamphetamine; MDA: 3,4-Methylenedioxymphetamine; MDMA: 3,4-Methylenedioxymphetamine, FEMP: Femproporex, ANFEP: Anfepamone; MZD: Mazindol; MP: Morphine; COD: Codeine; 6-MAM: 6-Acetylmorphine; COC: Cocaine; BZE: Benzoylcegonine; CT: Cocaethylene; NCOC: Norcocaine; AEME: Anhydrous Ester Methyl Ecgonine; THC: tetrahydrocannabinol.

The method was highly sensitive with a small amount of hair. The LOD ranged between 0.0076 and 0.076 ng mg⁻¹ and the lowest limit of quantification was 50% of the cut-off concentrations. The precision and accuracy of all compounds were within the limits of acceptance (Table 5), with overall intra-assay imprecision ranging from CV 1.65 to 12.02%, and inter-assay imprecision ranging from CV 1.47 to 13.5%, and accuracy between 86.63 and 101.89 %.

Table 5. Summary of precision and accuracy tests results.

Compound	QC sample	Nominal concentration ng mg ⁻¹	Precision (CV %)		Accuracy (%)
			Intra-assay	Inter-assay	
Amphetamine	QCLLOQ	0.10	8.49	7.61	93.65
	QCL	0.15	3.48	8.14	86.63
	QCM	0.25	5.87	9.92	92.64
	QCH	1.00	7.35	4.15	96.97
Methamphetamine	QCLLOQ	0.10	7.47	5.02	97.34
	QCL	0.15	3.77	2.40	93.39
	QCM	0.25	5.27	5.01	93.94
	QCH	1.00	5.33	2.49	96.29
MDA	QCLLOQ	0.10	6.84	6.77	95.82
	QCL	0.15	6.70	7.83	97.27
	QCM	0.25	4.88	3.87	95.28
	QCH	1.00	1.84	4.70	99.38
MDMA	QCLLOQ	0.10	3.85	6.52	93.47
	QCL	0.15	4.98	5.11	92.92
	QCM	0.25	5.33	3.10	95.30
	QCH	1.00	5.13	3.40	95.30
Femproporex	QCLLOQ	0.10	5.52	3.79	95.22
	QCL	0.15	6.49	3.86	93.43
	QCM	0.25	5.81	6.63	95.40
	QCH	1.00	6.68	3.00	99.02
Anfepramone	QCLLOQ	0.10	3.38	3.23	96.59
	QCL	0.15	1.65	3.43	93.30
	QCM	0.25	4.03	4.57	96.12
	QCH	1.00	2.91	3.86	97.02
Mazindol	QCLLOQ	0.25	6.65	5.97	96.36
	QCL	0.375	5.50	2.80	88.59
	QCM	0.625	8.82	10.18	95.43
	QCH	2.50	5.49	7.61	99.70
Morphine	QCLLOQ	0.10	8.43	7.51	93.18
	QCL	0.15	9.90	5.44	93.79
	QCM	0.25	7.31	8.39	95.80
	QCH	1.00	5.65	6.46	98.18
Codeine	QCLLOQ	0.10	12.02	9.60	102.02
	QCL	0.15	3.04	9.98	98.68
	QCM	0.25	2.72	13.50	96.42
	QCH	1.00	12.00	13.45	101.89
6-MAM	QCLLOQ	0.10	6.14	7.23	99.78
	QCL	0.15	9.55	3.81	91.69
	QCM	0.25	5.16	4.18	92.56
	QCH	1.00	3.96	5.89	95.64

Cocaine	QCLLOQ	0.25	1.92	1.94	95.86
	QCL	0.375	5.32	3.12	93.53
	QCM	0.625	6.11	2.91	95.29
	QCH	2.50	3.71	1.90	97.02
BZE	QCLLOQ	0.025	9.23	10.75	97.06
	QCL	0.0375	8.04	9.22	94.49
	QCM	0.0625	7.37	7.90	94.23
	QCH	0.250	5.35	4.98	97.57
Cocaethylene	QCLLOQ	0.025	3.11	1.47	96.48
	QCL	0.0375	7.00	2.99	93.65
	QCM	0.0625	6.67	4.38	95.38
	QCH	0.250	3.64	2.15	97.07
Norcocaine	QCLLOQ	0.025	4.16	2.07	95.82
	QCL	0.0375	7.01	2.46	93.25
	QCM	0.0625	6.89	3.46	95.40
	QCH	0.250	3.95	2.35	97.64
AEME	QCLLOQ	0.025	10.01	5.94	96.83
	QCL	0.0375	8.27	6.13	95.03
	QCM	0.0625	4.85	8.05	90.75
	QCH	0.250	7.20	2.63	98.11
THC	QCLLOQ	0.025	7.10	6.42	90.57
	QCL	0.0375	6.51	4.14	91.19
	QCM	0.0625	4.83	5.51	94.53
	QCH	0.250	5.67	4.31	98.17

MDA: methylenedioxyamphetamine; MDMA: methylenedioxymethamphetamine; 6-MAM: 6-Acetylmorphine; BZE: Benzoyllecgonine; AEME: Anhydrous Ester Methyl Ecgonine; THC: tetrahydrocannabinol; QCLLOQ: quality control lowest limit of quantification; QCL: quality control low; QCM: quality control medium; QCH: quality control high.

All analytes were stable for up to 15 hours at the autosampler at 10°C, with acceptable differences on concentrations between times (-14.15 to 13.6%). The carryover effect was minimum, with a maximum average blank hair extract area in relation to QCLLOQ of 15.54% for MDA.

The use of LC-MS/MS is considered the method of choice for quantitative analysis of compounds in biological matrices, such as hair, due to their high specificity and sensitivity. Nonetheless, molecules originating from the sample matrix that coelute with compounds of interest may interfere with the ionization process, which may cause suppression or enhancement of ions [31]. The matrix effects were compensated using the deuterated analog internal standards, as shown in table 6. However, femproporex demonstrated to be more affected by co-elution compounds from the matrix, with a maximum ionization enhancement effect of 24.56%.

Table 6. Matrix effect test results at low (QCL), medium (QCM) and high (QCH) levels.

Analytes	Matrix effect (%)		
	QCL	QCM	QCH
Amphetamine	-3.73	-1.17	7.01
Methamphetamine	-4.27	0.89	3.56
MDA	-2.40	-0.11	5.98
MDMA	-2.36	-5.38	3.12
Femproporex	24.56	18.97	23.29
Anfepramone	-0.72	0.17	5.12
Mazindol	-9.78	-15.38	-4.82
Morphine	-4.50	4.72	10.09
Codeine	15.36	13.62	4.54
6-MAM	-6.71	-2.67	0.47
Cocaine	-5.18	-2.92	6.02
BZE	-6.04	1.02	-1.27
Cocaethylene	-6.64	-0.94	4.00
Norcocaine	-4.38	-2.26	4.45
AEME	4.69	6.36	5.83
THC	1.20	7.65	6.45

MDA: methylenedioxyamphetamine; MDMA: methylenedioxymethamphetamine; 6-MAM: 6-Acetylmorphine; BZE: Benzoyllecgonine; AEME: Anhydrous Ester Methyl Ecgonine; THC: tetrahydrocannabinol.

3.3 Estimation of the measurement uncertainty

The values of the expanded uncertainty (U) are shown in table 7. Performing hair drug screening as a requirement for professional driving license granting aims to identify the abuse of psychoactive substances associated with increased risky behaviors in traffic. For this purpose, the laboratories must be accredited and demonstrate the accuracy of the measurements through extensive validation and evaluation of measurement uncertainty [11,14]. Only a few number of studies have reported the evaluation of method uncertainty in hair drug analysis [21,22,32,33]. The relative uncertainty percentages of the validated method were below 9% for all the substances around the cut-off values, which ensures a reliable measurement, in accordance with those previously reported for hair analysis of THC-COOH [21], amphetamines [20], and ethyl glucuronide [33].

Table 7. Expanded uncertainty (U) results for all drugs of abuse and metabolites at lowest quantification limit (CQLLOQ), low (QCL), medium (QCM), and high (QCH) quality controls.

Expanded uncertainty (U)				
	%			
	QCLLOQ	QCL	QCM	QCH
Amphetamine	8.09	8.11	8.29	8.76
Methamphetamine	8.23	8.22	8.27	8.46
MDA	8.24	8.27	8.25	8.25
MDMA	7.95	7.95	7.95	8.4
Femproporex	7.91	7.89	7.98	8.26
Anfepramone	8.24	8.23	8.27	8.81
Mazindol	8.76	8.63	10.03	19.26
Morphine	8.07	8.07	8.22	9.75
Codeine	7.97	8.03	8.4	14.67
6-MAM	8.23	8.22	8.24	9.53
Cocaine	7.85	7.88	7.96	8.76
BZE	8.26	8.25	8.25	8.3
Cocaethylene	7.94	7.93	7.93	7.94
Norcocaine	8.06	8.05	8.05	8.06
AEME	8.61	8.61	8.62	8.63
THC	8.21	8.20	8.20	8.25

MDA: methylenedioxyamphetamine; MDMA: methylenedioxymethamphetamine; 6-MAM: 6-Acetylmorphine; BZE: Benzoyllecgonine; AEME: Anhydrous Ester Methyl Ecgonine; THC: tetrahydrocannabinol.

3.4 Assay application to clinical samples and proficiency test

The method accuracy was also tested by participating in three rounds of a quality proficiency program. Five hair samples were tested at each round, with 100% of agreement of the results, classified as positive or negative for the drugs.

The assay was applied to scalp hair specimens of 50 injured drivers. All results were evaluated according to the cut-off values [11], and drug concentrations adjusted by the measurement uncertainty, resulting in six positive tests (12%), as shown in table 8.

Patients P1, P13, and P28 tested positive for COC. The presence of the metabolite cocaethylene demonstrated the concomitant use of the drug with alcohol,

and the metabolite AEME, a product of COC pyrolysis, indicated crack cocaine smoking by patient P1. Besides cocaine, patient P13 also tested positive for MDMA, as patient P48. Patients P37 and P47 tested positive for THC. Both results were further validated with the quantification of the metabolite THC-COOH by a confirmatory method. In addition, two patients (P11 and P13) reported occasional use of THC but were classified as negative for the drug, considering that the results for THC were below the cut-off values. Overall, 1/3 of the patients positive for COC and 1/2 of positives for MDMA reported the use of the drugs, whereas all patients positive for THC reported the use of cannabis.

Table 8. Substances detected in hair samples from drivers involved in motor vehicle crashes (n=7)

Patient	Detected compounds	Measured drug concentration (final concentration*) ng mg ⁻¹	Positivity **
P1	Cocaine	17.0 (15.51)	Cocaine
	Benzoylecgonine	3.71 (3.40)	
	Cocaethylene	1.28 (1.18)	
	Norcocaine	0.66 (0.61)	
	AEME	0.18 (0.16)	
P11	THC	0.027 (0.025)***	Negative
P13	Cocaine	5.39 (4.9)	Cocaine
	Benzoylecgonine	0.48 (0.44)	
	Norcocaine	0.055 (0.05)	
	MDMA	0.53 (0.48)	MDMA
	THC	0.019 (0.017)***	
P28	Cocaine	0.64 (0.58)	Cocaine
	Benzoylecgonine	0.27 (0.25)	
P37	THC	0.084 (0.077)	THC ⁺
P47	THC	0.11 (0.10)	THC ⁺
P48	MDMA	2.62 (2.4)	MDMA

MDMA: methylenedioxymethamphetamine; AEME: Anhydrous Ester Methyl Ecgonine; THC: tetrahydrocannabinol.

*Measured hair concentration minus measurement uncertainty;

**According to the cut off values by SoHT (SOHT, 2012) and CONTRAN n. 691 (DENATRAN, 2017).

***Concentration below the cut off value.

⁺Confirmed after quantification of THC-COOH by confirmatory method.

4 Conclusion

A simple UHPLC-MS/MS method for the determination of multiple drugs of abuse in hair was developed and validated. Assay validation criteria were fulfilled, and the uncertainty of the measurements demonstrated. Sample preparation was simple with minor matrix effect. The developed assay was successfully applied to 50 injured drivers, with positive results for COC, MDMA and THC. The method fulfilled the validation criteria and can be applied in routine setting for screening of drug abuse in driving license grating.

Acknowledgments

V.V Muller, F. E. Gerbase, L.L.F Lizot, and R.Z. Hahn are recipients of CAPES (Ministry of Education, Brazil) scholarships. R. Linden is recipient of a research scholarship from the National Council for Scientific and Technological Development in Brazil (CNPQ). This research was financial supported by the National Institute of Science and Technology in Forensic Sciences (MCTI/CNPQ/CAPES/FAPS 16/2014 - INCT program, CNPQ 465450/2014-8) and CNPq (process 432940/2018-9).

References

- [1] A. Salomone, J.J. Palamar, E.G. Corcia, D. Di, M. Vincenti, Hair Testing for Drugs of Abuse and New Psychoactive Substances in a High-Risk Population, *Radiat. Prot. Dosimetry*. 174 (2017) 376–381. doi:10.1093/jat/bkx020.
- [2] D. Cappelle, S. De Keukeleire, H. Neels, F. Been, M. De Doncker, G. Dom, C.L. Crunelle, A. Covaci, A.L.N. van Nuijs, Keratinous matrices for the assessment of drugs of abuse consumption: A correlation study between hair and nails, *Drug Test. Anal.* 10 (2018) 1110–1118. doi:10.1002/dta.2356.
- [3] A. Salomone, L. Tsanaclis, R. Agius, P. Kintz, M.R. Baumgartner, European guidelines for workplace drug and alcohol testing in hair, *Drug Test. Anal.* 8 (2016) 996–1004. doi:10.1002/dta.1999.
- [4] E. Lendoiro, C. Jiménez-Morigosa, A. Cruz, M. Páramo, M. López-Rivadulla, A. de Castro, An LC-MS/MS methodological approach to the analysis of hair for amphetamine-type-stimulant (ATS) drugs, including selected synthetic cathinones and piperazines, *Drug Test. Anal.* 9 (2017) 96–105. doi:10.1002/dta.1948.
- [5] G.A.A. Cooper, R. Kronstrand, P. Kintz, Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair, *Forensic Sci. Int.* 218 (2012) 20–24. doi:10.1016/j.forsciint.2011.10.024.
- [6] J. Takitane, L.G. de Oliveira, L.G. Endo, K.C.B.G. de Oliveira, D.R. Muñoz, M. Yonamine, V. Leyton, Amphetamine use by truck drivers on highways of Sao Paulo State: a risk for the occurrence of traffic accidents?, *Cien. Saude Colet.* 18 (2013) 1247–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23670452>.
- [7] S. Ibeanusi, T. Diamond, Traffic related injuries from a trauma registry: Pattern and outcome, *Niger J Orthop Trauma.* 17 (2018) 22–8. doi:10.4103/njot.njot_7_18.
- [8] J.M. Breen, P.A. Naess, H. Gjerde, C. Gaarder, A. Stray-Pedersen, The significance of preexisting medical conditions, alcohol/drug use and suicidal behavior for drivers in fatal motor vehicle crashes: a retrospective autopsy study, *Forensic Sci. Med. Pathol.* 14 (2018) 4–17. doi:10.1007/s12024-017-9934-x.
- [9] L.G. de Oliveira, L.M. de Araújo de Souza, L.P. Barroso, M.J. César Gouvêa, C.V. Dias de Almeida, D.R. Muñoz, V. Leyton, Occupational conditions and the risk of the use of amphetamines by truck drivers, *Rev. Saude Publica.* 49 (2015). doi:10.1590/S0034-8910.2015049005944.
- [10] E. Girotto, A.E. Mesas, S.M. De Andrade, M.M. Birolim, Psychoactive substance use by truck drivers: A systematic review, *Occup. Environ. Med.* 71 (2014) 71–76. doi:10.1136/oemed-2013-101452.
- [11] DENATRAN, RESOLUÇÃO Nº 691 DE SETEMBRO DE 2017, (2017).
- [12] E. Cuypers, R.J. Flanagan, The interpretation of hair analysis for drugs and drug metabolites, *Clin. Toxicol.* 56 (2018) 90–100. doi:10.1080/15563650.2017.1379603.
- [13] M. Vincenti, P. Kintz, *New Challenges and Perspectives in Hair Analysis*, 2015. doi:10.1016/b978-0-12-801700-5.00012-1.
- [14] ABNT, NBR ISO/IEC 17025: Acreditação forense de exames toxicológicos de larga janela de detecção para atendimento ao MTPS e DENATRAN., *Verit. (Porto Alegre)*. 58 (2019) 218. doi:10.15448/1984-6746.2013.2.16646.

- [15] S. of H.T. SoHT, Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair, (2012). http://www.soht.org/pdf/Consensus_on_Hair_Analysis.pdf.
- [16] SWGTOX, Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology., (2018) 452–474.
- [17] EURACHEM, Guide to quality in analytical chemistry: an aid to accreditation. 2016., 2016.
- [18] INMETRO, Doq-Cgcre-008 - Orientação Sobre Validação De Métodos Analíticos, Inst. Nac. Metrol. Qual. e Tecnol. (2016) 31.
- [19] I. IEC, O. BIPM, Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement GUM, Geneva, Switz. 122 (1995). doi:10.1373/clinchem.2003.030528.
- [20] S. Lee, Y. Park, W. Yang, E. Han, S. Choe, M. Lim, H. Chung, Estimation of the measurement uncertainty of methamphetamine and amphetamine in hair analysis, *Forensic Sci. Int.* 185 (2009) 59–66. doi:10.1016/j.forsciint.2008.12.012.
- [21] E. Han, W. Yang, S. Lee, E. Kim, S. In, H. Choi, S. Lee, H. Chung, J. myong Song, Establishment of the measurement uncertainty of 11-nor-D9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in hair, *Forensic Sci. Int.* 206 (2011) e85–e92. doi:10.1016/j.forsciint.2010.11.028.
- [22] S. Lee, H. Choi, E. Kim, H. Choi, H. Chung, K.H. Chung, Estimation of the measurement uncertainty by the bottom-up approach for the determination of methamphetamine and amphetamine in urine, *J. Anal. Toxicol.* 34 (2010) 222–228. doi:10.1093/jat/34.4.222.
- [23] E. Lendoiro, Ó. Quintela, A. de Castro, A. Cruz, M. López-Rivadulla, M. Concheiro, Target screening and confirmation of 35 licit and illicit drugs and metabolites in hair by LC-MSMS, *Forensic Sci. Int.* (2012). doi:10.1016/j.forsciint.2011.11.006.
- [24] K. Aleksa, P. Walasek, N. Fulga, B. Kapur, J. Gareri, G. Koren, Simultaneous detection of seventeen drugs of abuse and metabolites in hair using solid phase micro extraction (SPME) with GC/MS, *Forensic Sci. Int.* 218 (2012) 31–36. doi:10.1016/j.forsciint.2011.10.002.
- [25] M.R. Baumgartner, R. Guglielmello, M. Fanger, T. Kraemer, Analysis of drugs of abuse in hair: Evaluation of the immunochemical method VMA-T vs. LC-MS/MS or GC-MS, *Forensic Sci. Int.* 215 (2012) 56–59. doi:10.1016/j.forsciint.2011.08.025.
- [26] V.A. Boumba, M. Di Rago, M. Peka, O.H. Drummer, D. Gerostamoulos, The analysis of 132 novel psychoactive substances in human hair using a single step extraction by tandem LC/MS, *Forensic Sci. Int.* 279 (2017) 192–202. doi:10.1016/j.forsciint.2017.08.031.
- [27] M. Moller, K. Aleksa, P. Walasek, T. Karaskov, G. Koren, Solid-phase microextraction for the detection of codeine, morphine and 6-monoacetylmorphine in human hair by gas chromatography-mass spectrometry, *Forensic Sci. Int.* 196 (2010) 64–69. doi:10.1016/j.forsciint.2009.12.046.
- [28] A. Orfanidis, O. Mastrogianni, A. Koukou, G. Psarros, H. Gika, G. Theodoridis, N. Raikos, A GC–MS method for the detection and quantitation of ten major drugs of abuse in human hair samples, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1047 (2017) 141–150. doi:10.1016/j.jchromb.2016.11.011.

- [29] M. Sergi, S. Napoletano, C. Montesano, R. Iofrida, R. Curini, D. Compagnone, Pressurized-liquid extraction for determination of illicit drugs in hair by LC-MS-MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 725–735. doi:10.1007/s00216-012-6072-x.
- [30] R. Kronstrand, I. Nyström, J. Strandberg, H. Druid, Screening for drugs of abuse in hair with ion spray LC–MS–MS, *Forensic Sci. Int.* 145 (2004) 183–190. doi:10.1016/J.FORSCIINT.2004.04.034.
- [31] A. Van Eeckhaut, K. Lanckmans, S. Sarre, I. Smolders, Y. Michotte, Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix effects, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877 (2009) 2198–2207. doi:10.1016/j.jchromb.2009.01.003.
- [32] M.K.K. Nielsen, S.S. Johansen, K. Linnet, Pre-analytical and analytical variation of drug determination in segmented hair using ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Forensic Sci. Int.* 234 (2014) 16–21. doi:10.1016/J.FORSCIINT.2013.10.029.
- [33] R. Agius, T. Nadulski, H.-G. Kahl, J. Schröder, B. Dufaux, M. Yegles, F. Pragst, Validation of a headspace solid-phase microextraction–GC–MS/MS for the determination of ethyl glucuronide in hair according to forensic guidelines, *Forensic Sci. Int.* 196 (2010) 3–9. doi:10.1016/J.FORSCIINT.2009.07.023.

5. ARTIGO 2

Investigação retrospectiva do consumo de álcool e drogas em motoristas traumatizados com emprego de análises toxicológicas em cabelo.

Victória Vendramini Müller^{1,2,3}, Roberta Zilles Hahn¹, Lilian de Lima Feltraco Lizot¹, Anelise Schneider¹, Fernando Engel Gerbase^{3,4}, Danilo Pereira⁵, Rafael Linden^{1,2,3}, Marcos Bastiani¹, Jonathan de Andrade Alff¹, Marina Venzon Antunes^{1,3}.

¹ Laboratório de Análises Toxicológicas, Universidade Feevale, Novo Hamburgo, Brasil.

² Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Forense (INCT Forense), Brasil.

³ Programa de Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas, Universidade Feevale, Novo Hamburgo, Brasil.

⁴ Departamento de Emergência, Hospital Público de Novo Hamburgo, Novo Hamburgo, RS, Brasil.

⁵ Departamento Científico, Corporação Waters, São Paulo, SP, Brasil.

RESUMO

Acidentes de trânsito constituem um grave problema de saúde pública e são uma das principais causas de morte e traumatismo em todo o mundo, o uso de álcool e drogas são fatores contribuintes para sua ocorrência. O uso de cabelo como matriz analítica toxicológica permite uma investigação retrospectiva do consumo de substâncias psicoativas, permitindo distinguir o consumo ocasional do uso crônico. Neste estudo foi realizada uma investigação de larga janela de detecção para abuso de álcool e drogas em 50 motoristas traumatizados, atendidos no departamento de emergência de um hospital geral. Para tal, foram realizadas análises em cabelo para drogas de abuso e a quantificação do metabólito do álcool Etil Glicuronídeo (EtG). A mediana de idade dos pacientes foi 33 anos (N=50), com predomínio do sexo masculino (62%) e de motoristas de moto (92%). Seis pacientes (12%) tiveram resultado positivo no teste de larga janela de detecção para drogas, dentre elas: cocaína, THC e MDMA. 12% dos pacientes foram classificados como consumidores excessivos, 42% moderados e 46% leves de álcool, sendo evidenciada associação entre sexo e perfil de consumo ($p<0,01$). O autorrelato subnotificou o consumo de álcool em 22% dos pacientes, que reportaram ser abstêmios, mas foram classificados como consumidores moderados ($n=10$) ou excessivo ($n=1$) segundo o biomarcador EtG. A alta prevalência de uso de drogas e consumo de álcool crônicos nessa população caracteriza um perfil de risco para acidentes de trânsito. Os resultados desta pesquisa contribuem para nortear novos estudos nesta temática, que poderão gerar informações contribuintes a promoção de ações de saúde e prevenção de acidentes de trânsito.

Palavras-chave: Análise toxicológica. Drogas de abuso. Álcool. Cabelo. Motoristas.

1. INTRODUÇÃO

Os acidentes de trânsito constituem um grave problema de saúde pública, uma vez que as lesões corporais provocadas por eles são uma das principais causas de morte e traumatismo em todo o mundo ¹. Segundo a Organização Mundial de Saúde (2019) a cada ano, cerca de 1,35 milhões de pessoas morrem em decorrência de acidentes no trânsito, sendo que 93% das mortes no trânsito ocorrem em países de baixa e média renda, embora estes concentrem aproximadamente 60% dos veículos do mundo. Além disso entre 20 e 50 milhões de pessoas sofrem lesões não fatais, muitas delas resultando em incapacidade e deficiência física ².

Estudos brasileiros têm demonstrado, com e sem a análise de matrizes biológicas, o uso de substâncias psicoativas por caminhoneiros para reduzir a sonolência durante as longas viagens e aumentar a disposição para o trabalho. No entanto, o uso dessas substâncias pode causar efeitos nocivos para o indivíduo e para a sociedade ^{3,4,5}.

Dirigir sob o efeito de álcool é uma das principais causas de acidentes de trânsito, de tal forma que a ingestão de poucas doses alcoólicas já é suficiente para aumentar a predisposição do condutor para emitir algum comportamento de risco ^{4,6}. O uso de substâncias psicoativas é, também, um fator consolidado como contribuinte em acidentes de trânsito, capazes de provocar alterações cognitivas não condizentes com o desempenho de uma direção segura, tanto através de seus efeitos agudos quanto por meio de seus efeitos residuais ou de abstinência ⁷.

O consumo abusivo de bebidas alcoólicas é um problema mundial e está relacionado ao desenvolvimento de diversas patologias, como a cirrose hepática, problemas cardiovasculares, dentre outros. Além de seu potencial efeito agressor à saúde, o uso excessivo de etanol tem relação direta com efeitos socioeconômicos negativos, como a ocorrência de delitos, acidentes de trânsito e diminuição da produtividade no trabalho. O Etil Glicuronídeo (EtG) foi proposto como o biomarcador mais informativo do uso de etanol em matriz capilar. A presença do EtG em cabelo fornece uma forte indicação do consumo de etanol, pois esse é formado pela biotransformação de uma pequena fração de etanol circulante (<0,1%) pela enzima UDP-glucuroniltransferase para formar um conjugado com ácido glucurônico ^{8,9}.

A análise de substâncias em cabelo está se tornando uma prática de rotina toxicológica laboratorial clínica e forense. Esta matriz alternativa ou complementar

oferece várias vantagens, dentre elas destaca-se sua grande janela de detecção. Esta característica, combinada a desempenhos analíticos de última geração como a cromatografia líquida de ultra performance associada à espectrometria de massas (UHPLC-MS/MS), permite aos pesquisadores obter informações significativas sobre exposição e consumo de substâncias, como fármacos e drogas ilícitas no passado recente ^{10,11}.

Outra vantagem da análise de substâncias em cabelo é uma coleta não invasiva, apresentando-se estável, com condições fáceis de transporte e armazenamento a temperatura ambiente ¹². Essa modalidade analítica expandiu-se em todo o espectro de investigações toxicológicas. Atualmente coletas de cabelo são realizadas rotineiramente durante investigações criminais, em casos de morte relacionada a drogas, crime facilitado por drogas, proteção infantil, também, em casos de uso indevido de drogas em programas de reabilitação, testes de drogas no local de trabalho e útil para concessão de licenças de condução ¹³.

No Brasil, o exame toxicológico em cabelo têm tido grande repercussão, devido à resolução nº 691 (2017) do Conselho Nacional de Trânsito CONTRAN, que prevê exame toxicológico em cabelo para aferir o consumo de substâncias psicoativas usadas nos últimos 90 dias, obrigatório para motoristas profissionais do transporte rodoviário coletivo de passageiros e cargas, nas habilitações e renovações das Carteiras Nacionais de Habilitação (CNH) de categoria C, D e E, além de ser exigido nas contratações e desligamentos de motoristas profissionais. Dentre as drogas de abuso pesquisadas estão anfetaminas, maconha, cocaína, opiáceos e seus derivados, conhecidas por causar dependência e comprometerem a capacidade de direção segura, todavia, a detecção de metabólitos que caracterizem o uso crônico de álcool, como o EtG, não estão previstos ¹⁴.

Nesse viés, o presente estudo objetivou caracterizar o perfil de uso crônico de substâncias em uma população de motoristas traumatizados em decorrência de acidente de trânsito, atendidos no departamento de emergência de um hospital geral, através da análise de cabelo desses indivíduos, em busca de substâncias consolidadas como gatilho para a emissão de comportamentos de risco no trânsito, dentre elas drogas de abuso e álcool.

2 MÉTODOS

2.1 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Feevale (CAAE 94092318.3.0000.5348). Sua execução foi autorizada pela Organização Municipal de Gestão da Educação em Saúde Coletiva, vinculado à Secretaria de Município da Saúde (NUMESC) para o uso de dados sociodemográficos, clínicos e laboratoriais dos pacientes. Os pacientes receberam esclarecimentos com relação ao estudo e participaram somente após terem assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

2.2 População

Foram convidados a participar do estudo 50 pacientes maiores de 18 anos de ambos os sexos todos motoristas atendidos por trauma decorrente de acidente de trânsito no departamento de emergência do Hospital Municipal da cidade de Novo Hamburgo, entre setembro de 2018 a dezembro de 2019. Foram considerados critérios de exclusão do estudo: pacientes com menos de três centímetros de cabelo, alopecia, incapacidade para responder à entrevista e óbito.

2.3 Coleta da amostra de cabelo

A coleta do cabelo foi realizada conforme as diretrizes do Society of Hair Testing, coletado da região posterior do vértice da cabeça, o mais próximo possível do couro cabeludo, região associada a uma menor variação na taxa de crescimento capilar (aproximadamente 1 cm/mês) ¹⁵. Foi coletada uma mecha de cabelo com espessura aproximada de um lápis, as seções da raiz e ponta do cabelo foram claramente identificadas após a coleta. As amostras foram armazenadas em envelopes protegidos de luz e mantidas à temperatura ambiente até as análises.

2.4 Coleta de dados

Foi aplicado um questionário para se obter auto relato para o uso de álcool e drogas (foi questionado ao paciente a frequência de uso), bem como o uso de fármacos (especificação dos mesmos), hábito de fumar e realização de procedimento capilar nos últimos três meses, dentre eles: alisamento, descoloração ou tintura. A partir do prontuário eletrônico da instituição foram obtidos dados sociodemográficos e clínicos do paciente, dentre eles sexo e severidade do trauma.

A severidade do trauma, foi classificada de acordo com a pontuação obtida na Escala de Coma de Glasgow (ECG), ferramenta padrão adotada mundialmente para a avaliação do nível de consciência e de classificação do traumatismo crânio-encefálico, considerado um método simples e rápido para avaliar a função cerebral. A ECG leva em consideração a abertura ocular, a melhor resposta verbal e a melhor resposta motora que o paciente apresenta, cujos escores são: a) 13-15: indica uma lesão e gravidade leve; b) 9-12 indica uma lesão e gravidade moderada e c) 3-8 indicando um estado grave ¹⁶.

2.5 Triagem para uso de drogas em amostras de cabelo e valores de corte

A triagem toxicológica e confirmação foi realizada em sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência associada à espectrometria de massas em sequencial (UHPLC-MS/MS) no laboratório de análises toxicológicas da Universidade Feevale, com acreditação ISO 17025, conforme requerido pela resolução CONTRAN nº 691 (2017) ^{14,17}.

Para a análise, se utilizou 3 cm de cabelo partindo da raiz, que foi cortado em pequenos fragmentos, após, 20 mg foram pesadas. Se prossegui com a etapa de descontaminação com água e metanol. Essa etapa objetiva a retirada de contaminantes externos que possam ter sido aderidos a matriz capilar, através de uma lavagem inicial aquosa seguida de uma lavagem com solvente orgânico para remover óleos ¹⁸. Posteriormente, as amostras partiram para o processo de extração, que consistiu na pulverização das amostras junto ao solvente metanol. Após, foram incubadas por 15 horas a uma temperatura de 50 °C sob agitação, por fim, uma alíquota de 1,5 µL foi injetada em UHPLC-MS/MS.

Nas amostras positivas para o tetra-hidrocanabinol (THC), outra alíquota de cabelo foi analisada para verificar a presença do 11-nor-9-carboxi-delta9-tetrahydrocanabinol (THC-COOH), metabólito primário do THC, exigido para confirmar a presença do mesmo, que infere o uso de cannabis. Para isso, 50 mg de cabelo já descontaminado, foi extraído com a mistura de solventes metanol e acetato de etila, seguido de incubação por 4 horas à temperatura ambiente sob agitação. Posteriormente, foi realizada uma segunda extração, com a adição de água ultra-pura e solvente n-hexano, após, o extrato foi evaporado até a secura e retomado com 100 µL da mistura acetonitrila e água em 0,1% de ácido fórmico, por fim, uma alíquota de 10 µL foi injetada em UHPLC-MS/MS.

Os valores de corte utilizados para classificar a amostra como positiva, se basearam na resolução brasileira da CONTRAN nº 691 (2017), seus respectivos valores de *cut off* encontram-se no Quadro 1. Tais valores, espelharam-se nos pré-estabelecidos pela diretriz da SoHT, criados na tentativa de diferenciar a ingestão deliberada de drogas da possibilidade de exposição incidental ou produção endógena

15.

Quadro 1 – Substâncias psicoativas previstas na resolução CONTRAN nº 691 e seus respectivos valores de *cut off* em cabelo.

Fase de Triagem e Confirmação por LC-MS/MS	
Analito testado	Valor de <i>cut off</i> (ng/mg)
Anfetamina	0,2
Metanfetamina	0,2
MDA	0,2
MDMA	0,2
Anfepramona	0,2
Femproporex	0,2
Mazindol	0,5
THC	0,05
THC-COOH	0,0002
Cocaína	0,5
Benzoilecgonina	0,05
Cocaetileno	0,05
Norcocaína	0,05
Morfina	0,2
Codeína	0,2
Heroína	0,2
6-monoacetilmorfina	0,2

Fonte: adaptado de DENATRAN, 2017 e ABNT, 2019.

Quadro 1 - abreviaturas: MDMA: metilenodioximetanfetamina denominada popularmente ecstasy; MDA: metilenedioxianfetamina; THC: tetra-hidrocanabinol; THC-COOH: 11-nor-9-carboxi-delta9-tetrahydrocanabinol.

2.6 Avaliação do perfil de consumo de álcool

A avaliação do perfil de consumo crônico de álcool se deu através da quantificação das concentrações do metabólito do etanol, o Etil Glicuronídeo (EtG) em cabelo por UHPLC-MS/MS, conforme metodologia de Bastiani e colaboradores ⁸.

Para isso, foi utilizada uma alíquota de 50 mg de cabelo pulverizado, previamente descontaminadas com diclorometano e metanol. As amostras foram extraídas com água ultra-purificada por 24 h a temperatura ambiente sob agitação. Após esse processo se seguiu com uma etapa de extração em fase sólida, com um cartucho OASIS MAX de troca iônica, o extrato foi evaporado até a secura e posteriormente recuperado com 100 µL da fase móvel inicial do método de análise. Por fim, uma alíquota de 10 µL foi injetada em UHPLC-MS/MS.

A classificação do perfil de consumo crônico de álcool seguiu as recomendações Society of Hair Testing em: consumo leve EtG <5 pg/mg, consumo moderado $5 < \text{EtG} \leq 30$ pg/mg ou consumo excessivo EtG ≥ 30 pg/mg ¹⁹.

2.7 Análise estatística

Inicialmente foi realizada análise descritiva das variáveis. A associação entre sexo, abuso de álcool e drogas foi avaliada em teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher. As concentrações de EtG entre homens e mulheres foram comparadas em teste Mann-Whitney e entre frequência de consumo em autorrelato em teste Kruskal-wallis. Em todas as análises $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Foi utilizado o software IBM SPSS Statistics 25.0.

3. RESULTADOS

Dentre um total de 50 pacientes traumatizados, 46 eram motoristas de moto e 4 de carro, com idade entre 19 e 84 anos, mediana de 33 anos e predominância do sexo masculino. Durante a aplicação do questionário, 12 pacientes relataram uso de drogas nos últimos seis meses, dentre as elas: maconha, cocaína e ecstasy. Em relação ao uso de fármacos, 10 pacientes relataram uso contínuo, com baixa frequência de antidepressivos e antipsicóticos, apenas dois relatos. Na tabela 1 estão apresentadas características sociodemográficas e clínicas dos pacientes.

Tabela 1. Características sociodemográficas e clínicas dos pacientes (n=50).

	n	(%)
Sexo		
Feminino	19	(38)
Masculino	31	(62)
Raça		
Branco	46	(92)
Negro	4	(8)
Severidade trauma		
Leve	47	(94)
Moderado	1	(2)
Severo	2	(4)
Cor do cabelo		
Castanho	19	(38)
Preto	22	(44)
Loiro	5	(10)
Grisalho	4	(8)
Procedimento capilar		
Tintura	5	(10)
Descoloração	8	(16)
Alisamento	5	(10)
Fumante	9	(18)
Autorrelato abuso de drogas		
Maconha	8	(7)
Maconha e cocaína	1	(0,9)
Maconha e ecstasy	2	(1,7)
Não	38	(33)
Autorrelato consumo de álcool		
Nunca	25	(50)
2 a 4 vezes ao mês	11	(22)
2 a 4 vezes por semana	13	(26)
4 ou mais vezes por semana	1	(2)
Uso de fármacos		
Antidepressivo	1	(2)
Antipsicótico	1	(2)
Outros (antiinflamatório/anticoagulante/anti- hipertensivo/antirretroviral/inibidor bomba próton)	8	(16)

Seis pacientes (12%) tiveram resultado positivo no teste de larga janela de detecção para drogas de abuso segundo valores de corte CONTRAN nº 691 (2017) (tabela 2). Um total de 3 amostras (6%) foram positivas para cocaína, 2 para THC

(4%) e 2 para MDMA (4%), sendo que em 1 dos casos houve detecção simultânea de cocaína e MDMA. O composto THC foi quantificado em três amostras de pacientes com valores abaixo do corte estabelecido pela resolução da CONTRAN nº 691 (2017), portanto foram classificadas como negativas para o composto.

As concentrações capilares do EtG foram quantificáveis em 35 motoristas (70%), variando neste grupo entre 4,3 a 141,4 pg/mg. O perfil de consumo de álcool definido pelos níveis de EtG indicou 46% de consumidores leve, 42% de consumidores moderados e 12% de consumidores excessivos de álcool.

Com relação ao autorrelato, 50% dos pacientes reportaram ser abstêmios, 22% consumirem álcool até quatro vezes o mês, 26% de duas a quatro vezes ao mês e 2% mais do que quatro vezes na semana. Foi encontrada correlação moderada entre as concentrações de EtG em cabelo e a frequência de consumo de bebida, com coeficiente de correlação $r_s = 0,378$ ($p < 0,05$). As medianas das concentrações de EtG foram inferiores no grupo que relatou nunca fazer uso de álcool ($n=25$) em relação aos pacientes que reportaram fazer uso 2 ou mais vezes na semana ($n=14$) (4,86 vs 8,12 pg/mg, respectivamente, $p < 0,01$) (Figura 1). Entretanto, o autorrelato subnotificou o consumo de álcool em 11 pacientes (22%) que reportaram ser abstêmios, mas foram classificados como consumidores moderados ($n=10$) ou consumidor excessivo ($n=1$) segundo níveis capilares de EtG.

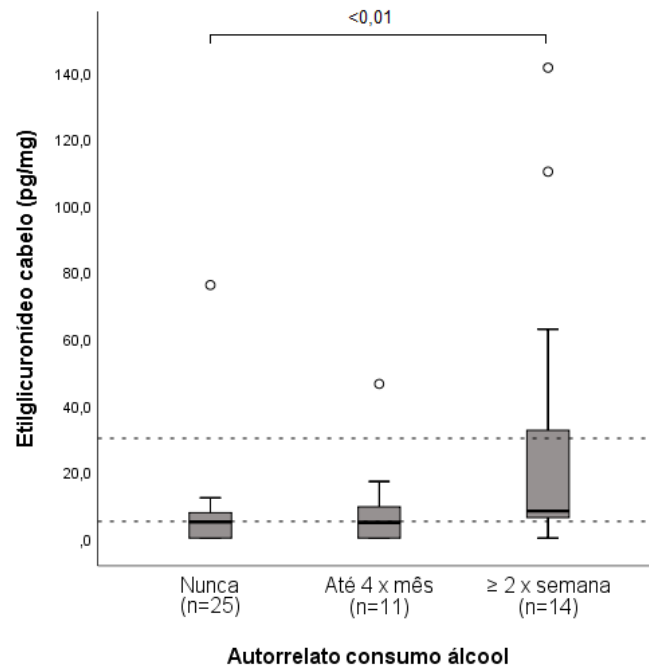


Figura 1. Box plot concentração do etilglicuronídeo em cabelo de acordo com o autorrelato de frequência de consumo de bebida alcoólica ($p < 0,01$ em Kruskal-wallis).

Foi evidenciada associação entre sexo e perfil de consumo de álcool ($p < 0,01$), sendo que 100% dos consumidores excessivos eram homens (Figura 2). Além disso, as medianas dos níveis capilares de EtG foram superiores nos homens em relação às mulheres (8,1 vs 4,4 pg/mg, $p < 0,05$). O número limitado de pacientes com trauma moderado ou severo impossibilitou a avaliação da associação entre severidade do trauma e perfil de consumo de álcool ou drogas.

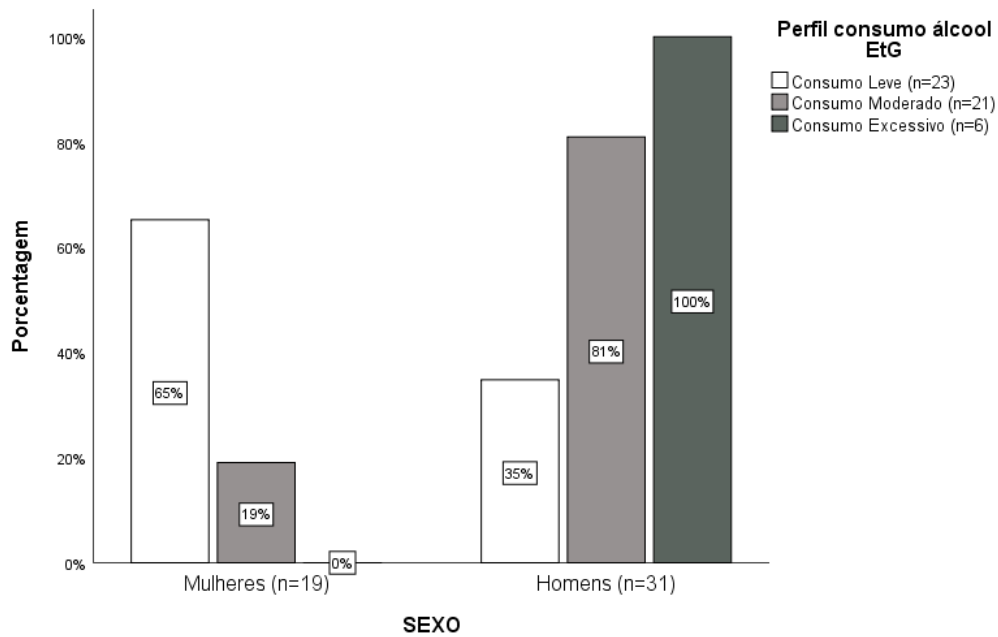


Figura 2. Perfil de consumo de álcool associado ao sexo

Não houve associação significativa com as variáveis positividade para drogas de abuso e sexo ($p=0,802$) e consumo excessivo de álcool e sexo ($p=0,086$). Quando realizado o Teste de Fisher entre consumo excessivo e positividade, também não houve associação ($p=0,588$).

Na tabela 2 encontram-se características clínicas e sócio-demográficas dos pacientes com resultado positivo para drogas e/ou EtG em suas amostras de cabelo ($n=28$). Observa-se que alguns pacientes apesar de relatarem o uso da droga maconha durante a aplicação do questionário, não apresentaram resultado positivo na triagem da amostra capilar, ou devido à ausência do composto THC, ou devido à detecção desse composto em valores abaixo do corte estabelecido pela resolução da CONTRAN n° 691 (2017).

Tabela 2. Características obtidas do prontuário eletrônico e relatadas pelos pacientes que obtiveram resultado positivo para drogas e/ou EtG em cabelo em níveis excessivo ou moderado (n=33).

Sexo	Idade (anos)	Raça	Cor do Cabelo	Fumo	Severidade do trauma	Veículo	Autorrelato uso de drogas	Triagem drogas de abuso	Autorrelato consumo de bebida alcoólica	Perfil de consumo de álcool (EtG em pg/mg)
M	25	Branco	Preto	Não	Leve	Moto	Maconha	COC, MDMA	2 a 4 vezes por semana	Excessivo (141,42)
M	29	Branco	Preto	Não	Leve	Carro	Não	-	2 a 4 vezes por semana	Excessivo (110,15)
M	51	Branco	Grisalho	Não	Grave	Moto	Não	-	2 a 4 vezes por mês	Excessivo (46,34)
M	32	Negro	Preto	Não	Leve	Moto	Não	-	2 a 4 vezes por semana	Excessivo (32,43)
M	56	Branco	Castanho	Sim	Leve	Moto	Maconha e COC	COC	Nunca	Excessivo (76,06)
M	57	Branco	Grisalho	Não	Leve	Moto	Não	-	2 a 4 vezes por semana	Excessivo (62,8)
M	39	Branco	Castanho	Sim	Leve	Moto	Maconha	COC, CT e THC*	2 a 4 vezes por mês	Moderado (9,25)
M	21	Branco	Castanho	Sim	Leve	Moto	Não	-	Nunca	Moderado (12,12)
M	23	Branco	Castanho	Sim	Leve	Moto	Maconha	-	Nunca	Moderado (7,65)
M	33	Negro	Preto	Não	Leve	Moto	Não	-	2 a 4 vezes por semana	Moderado (7,45)
M	45	Branco	Preto	Não	Leve	Moto	Não	-	2 a 4 vezes por mês	Moderado (7,35)
M	51	Branco	Grisalho	Não	Leve	Moto	Não	-	Nunca	Moderado (5,97)
M	20	Branco	Preto	Não	Grave	Moto	Não	-	Nunca	Moderado (5,76)
M	23	Branco	Castanho	Sim	Leve	Moto	Maconha	THC*	2 a 4 vezes por semana	Moderado (14,72)
M	39	Branco	Preto	Não	Leve	Moto	Não	-	Nunca	Moderado (5,54)
F	34	Branco	Preto	Não	Leve	Moto	Não	-	Nunca	Moderado (6,65)

M	25	Branco	Loiro	Não	Leve	Moto	Não	-	2 a 4 vezes por mês	Moderado (17,02)
M	62	Branco	Preto	Não	Leve	Moto	Não	-	Nunca	Moderado (9,49)
F	27	Branco	Preto	Não	Leve	Moto	Não	-	2 a 4 vezes por semana	Moderado (6,41)
M	40	Branco	Preto	Não	Leve	Moto	Não	-	Nunca	Moderado (8,2)
M	30	Branco	Castanho	Não	Leve	Moto	Não	-	Nunca	Moderado (8,11)
M	25	Branco	Loiro	Não	Leve	Moto	Não	-	2 a 4 vezes por mês	Moderado (9,62)
F	84	Branco	Loiro	Não	Leve	Carro	Não	-	2 a 4 vezes por semana	Moderado (6,17)
M	34	Branco	Castanho	Não	Leve	Moto	Não	-	Nunca	Moderado (10,26)
F	24	Branco	Preto	Não	Leve	Carro	Ecstasy	MDMA	4 ou mais vezes por semana	Moderado (8,53)
M	55	Negro	Preto	Não	Leve	Moto	Não	-	2 a 4 vezes por semana	Moderado (25,85)
M	30	Branco	Preto	Sim	Leve	Moto	Não	-	2 a 4 vezes por semana	Moderado (7,71)
M	37	Branco	Castanho	Não	Leve	Moto	Sim	THC	2 a 4 vezes por semana	Leve (<LQ)
F	25	Branco	Castanho	Não	Leve	Moto	Sim	THC	2 a 4 vezes por semana	Leve (<LQ)

Legenda: M: masculino; F: feminino. < LQ: abaixo do limite de quantificação da metodologia analítica. COC: cocaína; CT: cocaetileno; MDMA: metilenodioximetanfetamina; THC: tetraidrocanabinol. THC*: tetraidrocanabinol quantificado em valores abaixo do corte estabelecido pela Resolução da CONTRAN n° 691.

4. DISCUSSÃO

Conforme os dados do Departamento Estadual de Trânsito do Rio Grande do Sul (DETRAN-RS), no município de Novo Hamburgo (NH) existem 166.586 veículos circulantes, o maior número relatado desde o ano de 2007. As principais causas de acidentes com vítimas fatais foram as colisões (371 vítimas - 34,6%), sendo as vítimas fatais em sua maioria condutores (28,6%) e motociclistas (23,8%). Tais desfechos, trazem impactos diretos ao sistema público de saúde brasileiro, em decorrência de gastos com internação hospitalar, sequelas e incapacitação das vítimas, portanto, nota-se a importância da caracterização do perfil dos motoristas da região ²⁰.

A facilidade de aquisição da motocicleta, o baixo custo de manutenção, aliados às conhecidas deficiências do transporte coletivo, criaram um ambiente propício para o aumento do uso desse meio de transporte ²¹. Assim como o presente trabalho evidencia a grande representatividade de motocicletas nos acidentes de trânsito (46%), outros estudos já publicados também relataram essa tendência, e também, apresentaram um maior número de indivíduos do sexo masculino ^{21, 22, 23}.

O relatório das Nações Unidas de 2017 sobre abuso de drogas mostra que mais de 200 milhões de pessoas, ou 4,2% da população mundial, são viciadas em drogas ilícitas, 144 milhões de viciados em cannabis (maconha) ou seus derivados, sendo a droga mais prevalente, seguida das anfetaminas com 29 milhões de usuários, 14 milhões de usuários de cocaína, por fim 13,5 milhões de usuários de opiáceos ²⁴.

No presente estudo, o autorrelato dos pacientes sobre o uso de drogas nos últimos seis meses, evidenciou também, o uso prevalente de maconha nessa população, todos indivíduos que relataram uso de drogas, mencionaram a maconha, isoladamente ou associada a cocaína ou *ecstasy*. Todavia, apenas dois pacientes que relataram uso de maconha apresentaram resultado positivo para THC no teste de larga janela de detecção para drogas de abuso. Tal acontecimento pode ser justificado pelo teor variável da substância psicoativa Δ -9-tetrahidrocannabinol (THC) bem como pela má qualidade da droga produzida e comercializada ilegalmente no Brasil, que é formada das partes aéreas da planta secas e prensadas preparadas como mistura para fumar, podendo ter a adição de diluentes e adulterantes para mimetizar seus efeitos e gerar maior lucro para quem a produz e distribui ²⁵.

A maior positividade encontrada para cocaína pode ser atribuída a sua característica básica, que facilita a sua travessia pela membrana celular capilar, resultando em uma melhor incorporação na matriz, por isso geralmente os valores encontrados dessa substância, quando presente, são elevados ^{26,27}. O paciente 1 além de ter amostra positiva para cocaína, também apresentou o metabólito cocaetileno, que infere o uso da cocaína em conjunto com o álcool, e o metabólito AEME, produto da pirólise da cocaína, que infere o uso dessa droga por vias do pulmonares, através do uso de *crack*. Em relação ao composto MDMA, esse também possui uma característica básica e consequente boa incorporação, dois pacientes apresentaram positividade, sendo que um deles (paciente 13) apresentou também, uso de cocaína ²⁶.

No Brasil, estudos que buscam analisar o perfil de uso de substâncias psicoativas e de álcool por motoristas brasileiros se restringem à aplicação de questionários ou à análise de matrizes biológicas com curta janela de detecção dos compostos, dentre elas urina ou uso do bafômetro ^{4,6,21,23,28,29,30}. São encontrados alguns estudos especificamente conduzidos em grupos de motoristas do transporte rodoviário de cargas, também restritos à análise de matriz urinária ou aplicação de questionários, tendo em vista a crescente demanda brasileira de caracterização dessa população, devido à lei da CONTRAN nº 691 (2017) e às suas condições trabalhistas severas ^{6,7,14}.

Todavia, faltam estudos que avaliem o perfil de consumo crônico dessas substâncias, especialmente através do uso da matriz capilar, tendo em vista que análises em cabelo permitem uma investigação retrospectiva do consumo de drogas após sua eliminação do corpo, auxilia na distinção entre história de consumo social ou abuso de substâncias de forma crônica ^{11,12}.

Nesse viés, a quantificação do biomarcador EtG em cabelo, um metabólito menor do etanol não oxidativo, por períodos variáveis de tempo têm ganhado grande prestígio, estabelecendo-se, nos últimos anos, como um dos biomarcadores mais confiáveis para analisar hábitos de consumo de álcool a longo prazo. Ademais, com a Society of Hair Testing (SoHT) oferecendo valores de corte para avaliação de ambas as abstinências e consumo pesado ^{19,31}. Tal avaliação de perfil crônico de consumo de álcool, realizada no presente estudo, resultou em um total de 54% dos pacientes dentro da faixa de consumo moderado ou excessivo, sabe-se que a combinação de beber e dirigir é um problema social, que aumenta a predisposição do condutor a emitir

comportamentos de risco no trânsito, por isso a alta prevalência encontrada deve ser colocada em debate para colocar em prática ações relativas à prevenção desse tipo de ocorrência ^{4,28}.

Estudos de caso experimentais, epidemiológicos e reais têm vantagens e limitações diferentes quando usados para estudar o efeito do uso de substâncias no risco de envolvimento em um acidente de trânsito ³². No presente estudo, a vantagem de se analisar o cabelo, se baseou na caracterização do perfil crônico de uso de substâncias por motoristas associada à possibilidade de comparar informações pessoais obtidas durante a aplicação do questionário.

Essa questão tornou-se evidente no estudo, quando um número expressivo de pacientes apesar de relatarem não consumir álcool (22%), tiveram resultados da análise da matriz capilar com valores de EtG característicos de consumo moderado, ou ainda excessivo para bebidas alcoólicas. Portanto, também se evidenciou no presente estudo, uma maior facilidade de realizar estudos experimentais bem controlados do que estudos epidemiológicos bem controlados, devido às dificuldades relacionadas ao viés de seleção, informação e confusão no autorrelato ³².

A população masculina se sobressaiu na frequência de acidentes de trânsito atendidos no período estudado, em relação ao consumo prolongado de bebida alcoólica, os níveis de EtG foram, também, aumentados nessa população em relação aos níveis femininos. Além disso, todos os consumidores excessivos eram homens. Tais evidências confirmam a tendência de esses apresentarem um maior comportamento de risco no trânsito.

Tratando-se das amostras que apresentaram valores de THC abaixo do valor de corte utilizado no presente trabalho, recorda-se que os mesmos são estabelecidos na tentativa de eliminar uma possível contaminação externa. Nesse viés, sabe-se que existem outras rotas de incorporação de drogas dentro da estrutura capilar, além da difusão passiva dos compostos do sangue para as células do folículo piloso, como a incorporação que pode ocorrer nos tecidos adjacentes, através da difusão do suor, sebo e exposição à contaminação externa ^{18,33}.

Até nosso conhecimento, este é primeiro relato na literatura do uso de biomarcador para consumo de álcool e análise de drogas em cabelo para avaliar o perfil de uso crônico de substâncias psicoativas em motoristas traumatizados. Tais informações reforçam a importância da realização de investigações e coleta de dados

sobre o perfil comportamental dos motoristas, de forma a se promover ações de prevenção que envolvam o setor de trânsito, saúde e a sociedade.

5. LIMITAÇÕES E CONCLUSÃO

O número limitado de pacientes com trauma moderado ou severo impossibilitou a avaliação da associação entre severidade do trauma e perfil de consumo de álcool ou drogas, o que reforça a importância de serem desenvolvidos novos estudos abrangendo um número maior de pacientes. Também, não foi possível inferir se os pacientes estavam sob efeito de substâncias psicoativas ou álcool no momento em que sofreram o trauma, apenas seu perfil de uso crônico, informações que poderiam ser obtidas por meio de análises de alcoolemia e triagem de drogas no sangue. Todavia, os resultados contribuem para nortear estudos futuros com a temática, que poderão gerar informações contribuintes no aprimoramento de políticas públicas para a prevenção da ocorrência dos acidentes de trânsito.

6. AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Forense – INCT Forense (MCTI/CNPQ/CAPES/FAPS 16/2014 - CNPQ 465450/2014-8), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Edital Universal processo 432940/2018-9) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- 1 LIMA, L. C. DE; JUNIOR, V. DA S. C. Estudo dos acidentes de trânsito no Brasil à luz da Pesquisa Nacional de Saúde 2013. **Anais**, p. 1–7, 2017.
- 2 Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS). Folha informativa - Acidentes de trânsito, *atualizada em fevereiro de 2019. Disponível online em:* https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5147:acidentes-de-transito-folha-informativa&Itemid=779. Acesso em: 20/12/19.
- 3 BREEN, J. M. et al. The significance of preexisting medical conditions, alcohol/drug use and suicidal behavior for drivers in fatal motor vehicle crashes: a retrospective autopsy study. **Forensic Science, Medicine, and Pathology**, v. 14, n. 1, p. 4–17, 2018.
- 4 DE OLIVEIRA, L. G. et al. Occupational conditions and the risk of the use of amphetamines by truck drivers. **Revista de Saude Publica**, v. 49, 2015.
- 5 GIROTTO, E. et al. Psychoactive substance use by truck drivers: A systematic review. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 71, n. 1, p. 71–76, 2014.
- 6 DE OLIVEIRA, L. G. et al. Attention performance among brazilian truck drivers and its association with amphetamine use: Pilot study. **Revista de Saude Publica**, v. 47, n. 5, p. 1001–1005, 2013.
- 7 TAKITANE, J. et al. [Amphetamine use by truck drivers on highways of Sao Paulo State: a risk for the occurrence of traffic accidents?]. **Ciencia & saude coletiva**, v. 18, n. 5, p. 1247–54, 2013.
- 8 BASTIANI, M. F. et al. Improved measurement of ethyl glucuronide concentrations in hair using UPLCMS / MS for the evaluation of chronic ethanol consumption. **Forensic Science International**, v. 306, p. 110071, 2020.
- 9 KINTZ, P.; NICHOLSON, D. Testing for ethanol markers in hair : Discrepancies after simultaneous quantification of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl esters. **Forensic Science International**, v. 243, p. 44–46, 2014.
- 10 CAPPELLE, D. et al. Keratinous matrices for the assessment of drugs of abuse consumption: A correlation study between hair and nails. **Drug Testing and Analysis**, v. 10, n. 7, p. 1110–1118, 2018.
- 11 SALOMONE, A. et al. Hair Testing for Drugs of Abuse and New Psychoactive Substances in a High-Risk Population. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 174, n. 3, p. 376–381, 2017.
- 12 LENDOIRO, E. et al. An LC-MS/MS methodological approach to the analysis of hair for amphetamine-type-stimulant (ATS) drugs, including selected synthetic cathinones and piperazines. **Drug Testing and Analysis**, v. 9, n. 1, p. 96–105, 2017.

2017.

13 COOPER, G. A. A.; KRONSTRAND, R.; KINTZ, P. Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair. **Forensic Science International**, v. 218, n. 1–3, p. 20–24, 2012.

14 DENATRAN. RESOLUÇÃO Nº 691 DE SETEMBRO DE 2017. Disponível em: <<https://infraestrutura.gov.br/resolucoes-contran.html>>.

15 SOCIETY OF HAIR TESTING (SoHT). Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair 2012. Disponível em: <<https://www.sohr.org/index.php/statements/9-nicht-kategorisiert/85-statement-2011>>.

16 NAEMT. PHTLS. Atendimento pré-hospitalar ao traumatizado. Comitê do PHTLS da National Association of Emergency Medical Technicians (NAEMT) em cooperação com o Comitê de Trauma do Colégio Americano de Cirurgiões. **Rio de Janeiro: Elsevier**, v. 7, p. 618, 2011.

17 ABNT. NBR ISO/IEC 17025: Acreditação forense de exames toxicológicos de larga janela de detecção para atendimento ao MTPS e DENATRAN. **Veritas (Porto Alegre)**, v. 58, n. 2, p. 218, 2019.

18 TSANACLIS, L.; ANDRAUS, M.; WICKS, J. Hair analysis when external contamination is in question: A review of practical approach for the interpretation of results. **Forensic Science International**, v. 285, p. 105–110, 2018.

19 SOCIETY OF HAIR TESTING (SoHT). 2019 Consensus for the use of alcohol markers in hair for supporting the assessment of abstinence and chronic alcohol consumption. Disponível em: <https://www.sohr.org/images/pdf/Revision_2019_Alcoholmarkers.pdf>.

20 DENATRAN-RS. Diagnóstico da Acidentalidade Fatal no Trânsito 2019 – até setembro. Disponível em : <<https://detran-admin.rs.gov.br/upload/arquivos/201911/26141515-diagnostico-acidentalidade-set-19-publicacao.pdf>>.

21 ALMEIDA, G. C. M. et al. Prevalência e fatores associados a acidentes de trânsito com mototaxistas. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 69, n. 2, p. 382–388, 2016.

22 BARBOSA, M. Q. et al. Acidente Motociclístico: Caracterização das Vítimas Socorridas pelo Serviço de Atendimento Móvel de Urgência (SAMU). **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 18, p. 3–10, 2014.

23 SOUSA, M. DO S. et al. Perfil das vítimas de acidente motociclístico atendidas pelo serviço de atendimento móvel de urgência. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, n. 37, p. e1560–e1560, 2019.

24 PACURUCU-CASTILLO, S. F. et al. World Opioid and Substance Use Epidemic:

A Latin American Perspective. **Psychiatric Research and Clinical Practice**, v. 1, n. 1, p. 32–38, 2019.

25 MAGALHÃES, E. J. et al. Evaluation of the composition of street cocaine seized in two regions of Brazil. **Science and Justice**, v. 53, n. 4, p. 4425–432, 2013.

26 VINCENTI, M.; KINTZ, P. **New Challenges and Perspectives in Hair Analysis**. [s.l.] Elsevier Inc., 2015.

27 YU, H. et al. Role of hair pigmentation in drug incorporation into hair. **Forensic Science International**, 2017.

28 ANTUNES, Â. T. et al. Perfil dos condutores envolvidos em acidentes de trânsito por ingestão de álcool em um município do sul-catarinense. **Revista da AMRIGS**, v. 63, p. 1–108, 2019.

29 DA SILVA, A. M. A.; SHAMA, S. F. M. S. EPIDEMIOLOGIA DO TRAUMA EM ATENDIMENTOS DO SAMU NOVO HAMBURGO / RS NO PRIMEIRO TRIMESTRE DE 2015 TRAUMA. **Saúde e Pesquisa**, v. 10, p. 539–548, 2015.

30 JOMAR, R. T.; RAMOS, D. DE O.; ABREU, Â. M. M. Teste do bafômetro: resultados e recusas de motoristas interceptados pela Operação Lei Seca no Rio de Janeiro. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 21, n. 12, p. 3787–3792, dez. 2016.

31 BIONDI, A. et al. Ethyl glucuronide hair testing : A review. **Forensic Science International**, v. 300, p. 106–119, 2019.

32 GJERDE, H.; RAMAEKERS, J. G.; MØRLAND, J. G. Methodologies for Establishing the Relationship Between Alcohol / Drug Use and Driving Impairment — Differences Between Epidemiological , Experimental , and Real-Case Studies. **Forensic Science Review**, v. 31, n. 2, p. 141–160, 2019.

33 TZATZARAKIS, M. N. et al. Comparative evaluation of drug deposition in hair samples collected from different anatomical body sites. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 41, n. 3, p. 214–223, 2017.

6. RESULTADOS ADICIONAIS

Neste capítulo adicional, são apresentados os resultados referentes à validação do método bioanalítico por UHPLC-MS/MS, confirmatório para uso de canabinóides, através da determinação do 11-nor-9-carboxi-delta9-tetrahydrocannabinol (THC-COOH).

6.1 Método para quantificação de THC-COOH em cabelo por UHPLC-MS/MS

6.1.1 Preparo das amostras controles, calibradores e padrão interno

Primeiramente foi preparada uma solução de trabalho (ST) contendo THC-COOH a uma concentração de 20 ng/mL em solvente metanol. Prosseguiu-se com o preparo das soluções calibradoras nas concentrações de 8, 4, 3, 2, 1 e 0,75 ng/mL. Para o preparo da curva de calibração em cabelo, com valores de *cut off* estabelecidos na resolução da CONTRAN nº 691 (2017) e preparo das amostras controle de qualidade nos níveis de controle de qualidade alto (CQA 1,2 ng/g), médio (CQM 0,5 ng/g) e baixo (CQB 0,25 ng/g) foram adicionados 20 µL da solução calibradora correspondente à 50 mg de cabelo branco previamente pesado e descontaminado, isento de substâncias, obtido de voluntários. A solução de padrões interno foi preparada em solvente metanol e contemplou o composto deuterado THC-COOH-D3 a uma concentração de 1 ng/mL.

6.1.2 Procedimento de descontaminação e extração capilar

Primeiramente o cabelo foi picotado em pequenos fragmentos, de 3 a 5 mm, com tesoura do tipo tecelão dentro de invólucro de alumínio, moldando-o com o auxílio de um béquer. Foram utilizadas 20 mg de cabelo, diretamente pesadas em tubo de polipropileno de 2,0 mL Sarstedt, que seguiu com o procedimento de descontaminação dentro do tubo. A descontaminação da matriz capilar objetiva a retirada de contaminantes externos que possam ter sido aderidos a matriz capilar, através de uma lavagem inicial aquosa seguida de duas lavagens com solvente orgânico para remover óleos (SOHT, 2012).

A primeira etapa consistiu em adicionar 1 mL de água ultra-pura com posterior agitação em multivórtex por 3 minutos, em seguida as amostras foram centrifugadas, então o resíduo foi retirado e descartado. A segunda etapa consistiu em adicionar 1 mL do solvente metanol, e agitar os tubos em multivórtex por 2 minutos e posterior descarte do resíduo. A terceira e última etapa da descontaminação, consistiu na repetição da segunda etapa.

6.1.3 Extração da amostra de cabelo

As amostras de cabelo já picotadas, pesadas e descontaminadas foram extraídas dentro do tubo Sarstedt. Para tal, foram adicionados nos calibradores e controles 10 μ L da solução metanólica correspondente, juntamente a 50 μ L da solução de padrão interno. Para o procedimento de extração, foram adicionados 400 μ L da mistura de solventes metanol : acetato de etila (1:1) (v/v) de preparo diário, com posterior agitação em vórtex por 5 segundos e incubação em Thermomixer por quatro horas à temperatura ambiente e velocidade de 800 rpm. Após a incubação, foram adicionados 600 μ L de água ultra-pura e 500 μ L de n-hexano, seguido de agitação em multivórtex por 5 minutos e centrifugação à 1400 rpm por 10 minutos. Em seguida 500 μ L do sobrenadante foram retirados e transferidos para novos tubos de polipropileno de 1,5 mL, os quais foram evaporados em concentrador à uma temperatura de 30 °C. O extrato seco foi retomado com 100 μ L da mistura acetonitrila : água em 0,1% de ácido fórmico (1:1) (v,v) de preparo diário, agitados em multivórtex por dois minutos, centrifugados, e, posteriormente, 80 μ L do sobrenadante foram transferidos para vials novos com insert. Por fim, uma alíquota de 10 μ L foi injetada em LC-MS/MS.

6.1.4 Condições de análise por LC-MS/MS

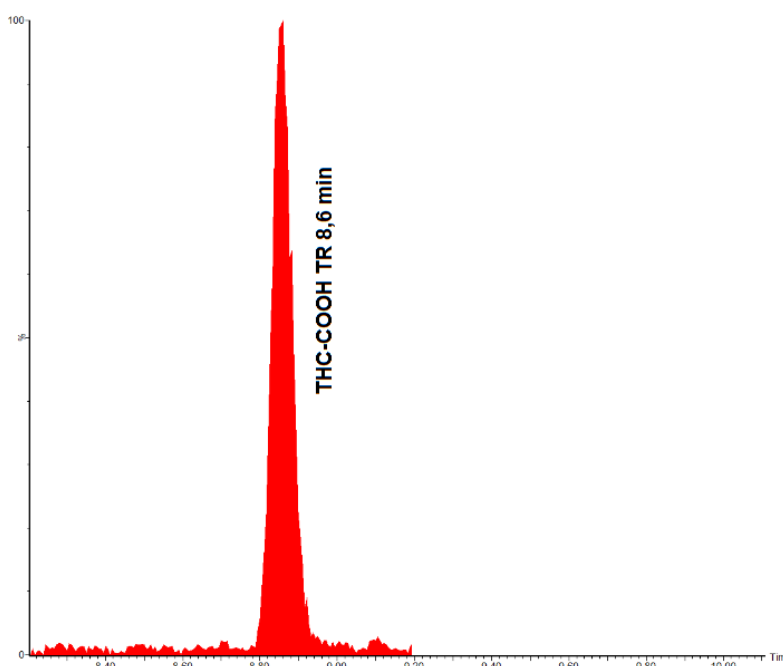
A quantificação foi realizada em sistema de LC-MS/MS de acordo com as normas da NBR ISO/IEC 17025 e valores de corte referidos na resolução n° 691 da CONTRAN (ABNT, 2019; DENATRAN, 2017). A separação cromatográfica foi realizada em coluna de fase reversa: ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μ m 2.1X100mm, com temperatura de forno da coluna a 40 °C e temperatura de auto amostrador de 10°C, lavagem da seringa pós injeção de 6 segundos, e com um volume injeção de 10 μ L. O tempo total da análise cromatográfica foi de 14 minutos. Foram utilizadas

duas fases móveis em programação gradiente, a primeira aquosa: água com 0,1% de ácido fórmico, e a segunda orgânica: acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico. Foram adquiridos espectros de massas totais (full scan) com monitorização seletiva de íons (SIM) e monitorização de reações múltiplas (MRM). As condições de ionização no espectrômetro de massa foram ajustadas e foi utilizada fonte de ionização *electrospray* (ESI-MS) em modo negativo.

6.1.5 Resultados da validação

O tempo de retenção do THC-COOH foi de 8,86 minutos, como mostra a Figura 1, a partir do cromatograma de um calibrador nível 6. Em relação à seletividade, picos cromatográficos interferentes não foram observados nos tempos de retenção do analito.

Figura 1. Visualização cromatográfica do THC-COOH em um calibrador nível 6 e seu respectivo tempo de retenção (TR):



THC-COOH: 11-nor-9-carboxi-delta9-tetrahydrocannabinol. TR: tempo de retenção.

Avaliou-se a linearidade do método e obteve-se coeficientes de correlação (r) e determinação (r^2) maiores ou iguais a 0,99. Todas as concentrações encontradas nas réplicas da curva, respeitam um coeficiente de variação (CV) menor do que 15%,

em relação ao valor nominal. O limite de quantificação (LIQ) do THC-COOH estipulado foi de 0,15 ng/g e o limite de detecção calculado (LD) foi de 0,05 ng/g.

Na faixa de concentração de 0,15, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,6 ng/g a exatidão variou de 97,33 – 105,87%, a precisão intra-ensaio variou de 6,65 – 10,19% e a precisão inter-ensaio variou de 5,27 – 8,14. Na avaliação da estabilidade do auto amostrador a 10 °C, as diferenças encontradas entre o tempo zero e após 15 horas em controle de qualidade (CQA) e controle de qualidade baixo (CQB) foram de 1,87% e 10,86%, respectivamente. O *carry over* se manteve com um coeficiente de variação (CV) abaixo de 20%. O efeito matriz encontrado foi de seus níveis de CQB foi de 16,17%, no controle de qualidade médio (CQM) foi de 1,25% e no CQA foi de 13,59%.

Tratando-se da medida da incerteza do método, a partir do cálculo dos graus de liberdade (V_{eff}), obteve-se o valor do fator de cobertura (k) devido a distribuição t no nível de significância de 95,45%, resultando em duas unidades k . Através do cálculo da incerteza expandida (U), obteve-se um valor de 0,008 ng/mg (5,15%) no limite de quantificação (LQ), 0,01 ng/mg (4,85%) no CQB, 0,02 ng/mg (4,77%) no CQM e 0,06 ng/mg (4,77%) no CQA.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os métodos bioanalíticos desenvolvidos para quantificar amostras capilares para uso crônico de drogas por ultracromatografia líquida associada a espectrofotometria de massas (UHPLC-MS/MS) foram satisfatórios, considerando a necessidade de métodos específicos, eficientes e reprodutíveis, com uma preparação da amostra simples e menor efeito matricial. Ambas metodologias, para triagem das drogas de abuso e THC-COOH, foram desenvolvidas e validadas seguindo protocolos reconhecidos para possível utilização na prática clínica rotineira e atenderam aos critérios de aceitação para métodos bioanalíticos, assim como a incerteza das medidas foi demonstrada (EURACHEM, 2016; ABNT, 2017; SOCIETY OF HAIR TESTING, 2018; SWGTOX, 2018).

O uso do equipamento LC-MS/MS forneceu benefícios sobre uma análise em GC-MS/MS, como uma especificidade aumentada e redução do tempo de preparação da amostra. Com o interesse crescente na análise da matriz capilar para a obtenção de informações sobre o uso de substâncias de forma crônica, diversos métodos têm sido descritos na literatura. Foram validados métodos confirmatórios tanto por LC-MS/MS quanto por GC-MS/MS os quais demonstram uma boa sensibilidade, precisão, exatidão e robustez do método, permitindo a emissão de resultados confiáveis (MOLLER et al., 2010; KIM et al., 2011; ALEKSA et al., 2012; BAUMGARTNER et al., 2012; SERGI et al., 2013; BOUMBA et al., 2017; LENDOIRO et al., 2017; ORFANIDIS et al., 2017; CAPPELLE et al., 2018).

Na literatura são encontradas diferentes quantias da matriz capilar, procedimentos de descontaminação, procedimentos de extração e tempo processual foram verificados. Entretanto esses métodos apresentaram em comum o monitoramento de transições de reação múltipla (MRM) e utilizou-se a fonte de ionização do tipo *electrospray* (ESI-MS), aderidas, também, nas presentes metodologias validadas, para drogas de abuso e THC-COOH (LENDOIRO et al, 2012; SERGI et al; 2013; BOUMBA et al., 2017; CAPELLE et al., 2018). A detecção por espectrometria de massas (MS), combinada com métodos adequados de ionização, contempla técnicas de aquisição como o registo de espectros de massas totais (full scan) com monitorização seletiva de íons (SIM) e ainda técnicas sequenciais MS-MS como a monitorização de reações múltiplas (MRM) (ABNT, 2019).

A associação entre a validação de metodologia para análise de drogas em cabelo e a quantificação da incerteza do método, foi pouco relatada em literatura, especialmente contemplando a detecção simultânea de substâncias como no presente trabalho (HAN et al., 2011; LEE et al., 2009). Tal associação permite uma melhor abordagem na interpretação dos resultados e segurança na emissão de resultados positivos, de forma que amostras com concentrações sob a faixa de *cut off* são frequentemente configuradas como negativas, após agregação do valor da incerteza de medição.

A resolução CONTRAN nº 691 (2017) vem como uma possibilidade de monitorar o possível uso crônico de substâncias psicoativas associadas a comportamentos de risco no trânsito, de forma que cabelo como matriz alternativa ou complementar permite uma larga janela de detecção e apresenta-se uma ferramenta ideal no monitoramento do uso de drogas (ABNT, 2019; DENATRAN, 2017). Nesse viés, os métodos desenvolvidos podem ser aplicados em rotina para a triagem de drogas de abuso, exigida para a renovação da licença de condução de motoristas no Brasil.

No Brasil, estudos que buscam analisar o perfil de uso de substâncias psicoativas e de álcool por motoristas brasileiros se restringem à aplicação de questionários ou à análise de matrizes biológicas com curta janela de detecção dos compostos, dentre elas urina ou uso do bafômetro (ALMEIDA et al., 2016; ANTUNES et al., 2019; DA SILVA; SHAMA, 2015; DE OLIVEIRA et al., 2013, 2015; SOUSA et al., 2019). Todavia, faltam estudos que avaliem o perfil de consumo crônico dessas substâncias, em especial a matriz capilar, como foi realizado na validação clínica do ensaio, que contemplou, em adicional, a detecção do marcador EtG, que permitiu identificar o perfil de consumo crônico de bebida alcoólica na população em questão.

Dados específicos sobre o município de Novo Hamburgo (NH) indicam 166.586 veículos circulantes, o maior número relatado desde o ano de 2007. Sobre os acidentes com vítimas fatais, o Detran-RS aponta que a principal causa foram as colisões (371 vítimas - 34,6%). Quanto à participação, as vítimas fatais eram em sua maioria condutores (28,6%) e motociclistas (23,8%) (DENATRAN-RS, 2019). Até o presente momento não há relato na literatura sobre a prevalência de uso crônico de álcool e drogas em vítimas de trauma nesta região.

Nesse contexto, as informações levantadas sobre a população de motoristas acidentados no Município de NH, evidenciou uma alta prevalência de uso de drogas

e álcool e por meio da análise capilar. Esses dados que reforçam a importância de se realizar maiores investigações e coleta de dados sobre o perfil comportamental dos motoristas da região, pois é de extrema relevância conhecer a realidade local, para que se promovam campanhas de prevenção que envolvam o setor de trânsito, saúde e a sociedade.

O número limitado de pacientes com trauma moderado ou severo na validação clínica, impossibilitou a avaliação da associação entre severidade do trauma e perfil de consumo de álcool ou drogas, o que reforça a importância de serem desenvolvidos novos estudos abrangendo um número maior de pacientes. Ademais, devido ao uso isolado da matriz capilar, não foi possível inferir se os pacientes estavam sob efeito de substâncias psicoativas ou álcool no momento em que sofreram o trauma, apenas seu perfil de uso crônico, informações que poderiam ser obtidas por meio de análises de alcoolemia e *screening* de drogas no sangue. Todavia, os resultados contribuem para nortear estudos futuros com a temática, que poderão gerar informações contribuintes no aprimoramento de políticas públicas para a prevenção da ocorrência dos acidentes de trânsito.

REFERÊNCIAS

- ABNT. NBR ISO/IEC 17025: Acreditação forense de exames toxicológicos de larga janela de detecção para atendimento ao MTPS e DENATRAN. **Veritas (Porto Alegre)**, v. 58, n. 2, p. 218, 2019.
- ALEKSA, K. et al. Simultaneous detection of seventeen drugs of abuse and metabolites in hair using solid phase micro extraction (SPME) with GC/MS. **Forensic Science International**, v. 218, n. 1–3, p. 31–36, 2012.
- ALMEIDA, G. C. M. et al. Prevalência e fatores associados a acidentes de trânsito com mototaxistas. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 69, n. 2, p. 382–388, 2016.
- ANTUNES, Â. T. et al. Perfil dos condutores envolvidos em acidentes de trânsito por ingestão de álcool em um município do sul-catarinense. **Revista da AMRIGS**, v. 63, p. 1–108, 2019.
- BARBOSA, J. et al. Hair as an alternative matrix in bioanalysis. **Bioanalysis**, v. 5, n. 8, p. 895–914, 2013.
- BASTIANI, M. F. et al. Improved measurement of ethyl glucuronide concentrations in hair using UPLCMS / MS for the evaluation of chronic ethanol consumption. **Forensic Science International**, v. 306, p. 110071, 2020.
- BAUMGARTNER, M. R. et al. Analysis of drugs of abuse in hair: Evaluation of the immunochemical method VMA-T vs. LC-MS/MS or GC-MS. **Forensic Science International**, v. 215, n. 1–3, p. 56–59, 2012.
- BOUMBA, V. A. et al. The analysis of 132 novel psychoactive substances in human hair using a single step extraction by tandem LC/MS. **Forensic Science International**, v. 279, p. 192–202, 2017.
- BREEN, J. M. et al. The significance of preexisting medical conditions, alcohol/drug use and suicidal behavior for drivers in fatal motor vehicle crashes: a retrospective autopsy study. **Forensic Science, Medicine, and Pathology**, v. 14, n. 1, p. 4–17, 2018.
- CAPPELLE, D. et al. Keratinous matrices for the assessment of drugs of abuse consumption: A correlation study between hair and nails. **Drug Testing and Analysis**, v. 10, n. 7, p. 1110–1118, 2018.
- COOPER, G. A. A.; KRONSTRAND, R.; KINTZ, P. Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair. **Forensic Science International**, v. 218, n. 1–3, p. 20–24, 2012.
- CUYPERS, E.; FLANAGAN, R. J. The interpretation of hair analysis for drugs and drug metabolites. **Clinical Toxicology**, v. 56, n. 2, p. 90–100, 2018.
- DA SILVA, A. M. A.; SHAMA, S. F. M. S. EPIDEMIOLOGIA DO TRAUMA EM

ATENDIMENTOS DO SAMU NOVO HAMBURGO / RS NO PRIMEIRO TRIMESTRE DE 2015 TRAUMA. **Saúde e Pesquisa**, v. 10, p. 539–548, 2015.

DE OLIVEIRA, L. G. et al. Attention performance among brazilian truck drivers and its association with amphetamine use: Pilot study. **Revista de Saude Publica**, v. 47, n. 5, p. 1001–1005, 2013.

DE OLIVEIRA, L. G. et al. Occupational conditions and the risk of the use of amphetamines by truck drivers. **Revista de Saude Publica**, v. 49, 2015.
DENATRAN-RS. Diagnóstico da Acidentalidade Fatal no Trânsito. 2019.

DENATRAN. RESOLUÇÃO Nº 691 DE SETEMBRO DE 2017. Disponível em: <<https://infraestrutura.gov.br/resolucoes-contran.html>>.

EURACHEM. **Guide to quality in analytical chemistry: an aid to accreditation. 2016.** [s.l: s.n.].

GIROTTI, E. et al. Psychoactive substance use by truck drivers: A systematic review. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 71, n. 1, p. 71–76, 2014.

HAN, E. et al. Establishment of the measurement uncertainty of 11-nor-D9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in hair. **Forensic Science International**, v. 206, n. 1–3, p. e85–e92, 2011.

KAMATA, T. et al. Time-course mass spectrometry imaging for depicting drug incorporation into hair. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 11, p. 5476–5481, 2015.

KIDWELL, D. A.; SMITH, F. P.; SHEPHERD, A. R. Ethnic hair care products may increase false positives in hair drug testing. **Forensic Science International**, 2015.

KIM, J. Y. et al. Improved gas chromatography-negative ion chemical ionization tandem mass spectrometric method for determination of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in hair using mechanical pulverization and bead-assisted liquid-liquid extraction. **Forensic Science International**, v. 206, n. 1–3, p. e99–e102, 2011.

KINTZ, P.; NICHOLSON, D. Testing for ethanol markers in hair : Discrepancies after simultaneous quantification of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl esters. **Forensic Science International**, v. 243, p. 44–46, 2014.

LEE, S. et al. Estimation of the measurement uncertainty of methamphetamine and amphetamine in hair analysis. **Forensic Science International**, v. 185, n. 1–3, p. 59–66, 2009.

LENDIRO, E. et al. Target screening and confirmation of 35 licit and illicit drugs and metabolites in hair by LC-MSMS. **Forensic Science International**, 2012.

LENDIRO, E. et al. An LC-MS/MS methodological approach to the analysis of hair for amphetamine-type-stimulant (ATS) drugs, including selected synthetic cathinones and piperazines. **Drug Testing and Analysis**, v. 9, n. 1, p. 96–105, 2017.

MOLLER, M. et al. Solid-phase microextraction for the detection of codeine, morphine and 6-monoacetylmorphine in human hair by gas chromatography-mass spectrometry. **Forensic Science International**, v. 196, n. 1–3, p. 64–69, 2010.

OPAS, O. P.-A. DE S. Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS). Folha informativa - Acidentes de trânsito, *atualizada em fevereiro de 2019*. Disponível online em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5147:acidentes-de-transito-folha-informativa&Itemid=779.

ORFANIDIS, A. et al. A GC–MS method for the detection and quantitation of ten major drugs of abuse in human hair samples. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1047, p. 141–150, 2017.

SALOMONE, A. et al. European guidelines for workplace drug and alcohol testing in hair. **Drug Testing and Analysis**, v. 8, n. 10, p. 996–1004, 2016.

SALOMONE, A. et al. Hair Testing for Drugs of Abuse and New Psychoactive Substances in a High-Risk Population. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 174, n. 3, p. 376–381, 2017.

SERGI, M. et al. Pressurized-liquid extraction for determination of illicit drugs in hair by LC-MS-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 2–3, p. 725–735, 2013.

SOHT, S. OF H. T. Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair. 2012. Disponível em: <https://www.soht.org/index.php/statements/9-nicht-kategorisiert/85-statement-2011>.

SOUSA, M. DO S. et al. Perfil das vítimas de acidente motociclístico atendidas pelo serviço de atendimento móvel de urgência. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, n. 37, p. e1560–e1560, 2019.

SWGTOX. Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. n. August, p. 452–474, 2018.

TAKITANE, J. et al. Amphetamine use by truck drivers on highways of Sao Paulo State: a risk for the occurrence of traffic accidents? **Ciencia & saude coletiva**, v. 18, n. 5, p. 1247–54, 2013.

TSANACLIS, L.; ANDRAUS, M.; WICKS, J. Hair analysis when external contamination is in question: A review of practical approach for the interpretation of results. **Forensic Science International**, v. 285, p. 105–110, 2018.

TZATZARAKIS, M. N. et al. Comparative evaluation of drug deposition in hair samples collected from different anatomical body sites. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 41, n. 3, p. 214–223, 2017.

VINCENTI, M.; KINTZ, P. **New Challenges and Perspectives in Hair Analysis**. [s.l.: s.n.].

YU, H. et al. Role of hair pigmentation in drug incorporation into hair. **Forensic Science International**, 2017.

ANEXO I



This is to certify that

has presented the poster VALIDATION PROCESS OF ANALYTICAL METHODOLOGY TO QUANTIFY DRUGS OF ABUSE IN HAIR SAMPLES BY LC-MS/MS at the 17 th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology held on September 22nd-26th, 2019.

Foz do Iguaçu / Brazil, September 26th , 2019.


Rafael Linden
 Chair of IATDMCT 2019 Congress


Marina Venzon Antunes
 Chair of IATDMCT 2019 Congress

Realization



Support



This is certify to that the Poster abstract entitled

OPTIMIZATION OF HAIR PULVERIZATION CONDITIONS USING NOVA 2200e TO ANALYSE THE SURFACE AREA IN THE VALIDATION OF ANALYTICAL METHODOLOGY FOR DRUGS DETECTION
 by Victória Vendramini Müller; Fernando Dal Pont Morisso; Bruna Zorzanello; Rafael Linden; Marina Venzon Antunes ; , was presented during 17th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology held on September 22nd-26nd, 2019.

Foz do Iguaçu / Brazil, September 26th, 2019.


Rafael Linden
 Chair of IATDMCT 2019 Congress


Marina Venzon Antunes
 Chair of IATDMCT 2019 Congress

Realization



Support



I Congresso Latinoamericano de Biomedicina e Ciências do Laboratório
XIII Congresso Sulbrasileiro de Biomedicina
IV Congresso Catarinense de Biomedicina

O futuro da Biomedicina, possibilidades e oportunidades!

Certificado

Certificamos que,

O Trabalho Científico intitulado ESTUDO PRELIMINAR PARA A OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DE 11-NOR-9-CARBOXI-A-TETRAHIDROCANABINOL (THC-COOH) EM AMOSTRAS DE CABELO ATRAVÉS DO USO DE PONTEIRAS DE FASE REVERSA, dos autores Victoria Vendramini Muller, Anelise Schneider, Roberta Zilles Hahn, Rafael Linden, Marina Venzon Antunes foi apresentado na modalidade pôster do I Congresso Latinoamericano de Biomedicina e Ciências do Laboratório, juntamente com o XIII Congresso Sulbrasileiro de Biomedicina e IV Congresso Catarinense de Biomedicina, realizado no período de 01 a 04 de maio de 2019, no Centro de Eventos Governador Luiz Henrique da Silveira - Florianópolis – SC.

REALIZAÇÃO



APOIO




Dr. Tiago Santos Carvalho
Presidente do Congresso Latinoamericano de Biomedicina

39ª Semana Científica do HCPA

Gestão da pesquisa aplicada à saúde
De 30 de setembro a 4 de outubro de 2019

Certificamos que o trabalho **PROCESSO DE VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DROGAS DE ABUSO EM AMOSTRAS CABELO POR LC-MS / MS** de autoria de VICTÓRIA VENDRAMINI MÜLLER; ROBERTA ZILLES HAHN; ANELISE SCHNEIDER; CRISTIANE PIRES; LILIAN LIZOT; RAFAEL LINDEN; MARINA VENZON ANTUNES, foi apresentado na modalidade E-POSTER na 39ª Semana Científica do HCPA, realizada no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no período de 30 de setembro a 4 de outubro de 2019.

Profª. Nadine Oliveira Clausell
Diretora-Presidente do Hospital de Clínicas

Profª. Patricia Ashton-Prolla
Coordenadora do GPPG

a autenticidade deste documento pode ser verificada através da URL:
<https://sgce.hcpa.edu.br/sgce/validar/98E528B3>

Promoção



GPPG
Grupo de Pesquisa e Pós-graduação



ANEXO II

Página 1 de 2



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado a participar da dissertação de mestrado intitulada: Desenvolvimento de metodologia analítica para a determinação de drogas de abuso requeridas pela resolução CONTRAN nº 517 em amostras de cabelo por LC-MS/MS. O trabalho será realizado pela acadêmica Victória Vendramini Müller, Biomédica e mestranda no programa de Toxicologia e Análises Toxicológicas da Universidade Feevale, orientada pela pesquisadora responsável, professora Marina Venzon Antunes. Os objetivos deste estudo são o desenvolvimento de um método para detecção de drogas de abuso em cabelo por equipamento de LC-MS/MS, posteriormente esse método será aplicado em amostras de cabelo de pacientes que sofreram trauma decorrente de acidente de trânsito, visando aplicação clínica.

Sua participação nesta pesquisa será voluntária e consistirá em realizar a doação de uma pequena quantia de cabelo (corresponde aproximadamente a espessura de um lápis) da região posterior da cabeça, o qual será coletado pelo acadêmico responsável, a partir do prontuário eletrônico do Hospital Municipal de Novo Hamburgo serão obtidos dados clínicos, sociodemográficos e laboratoriais do participante. Será realizada, também, uma breve entrevista para se obter dados sobre o uso de drogas e/ou álcool pelo indivíduo. A coleta de cabelo não envolve risco à saúde do paciente, entretanto pode causar desagrado estético.

A sua participação nesta pesquisa estará contribuindo para a aplicação da metodologia analítica para a detecção de drogas de abuso em cabelo, que traz como benefício a produção de conhecimento científico sobre o uso de substâncias psicoativas na população que podem ser predisponentes a um comportamento de risco e possivelmente associados a acidentes traumáticos, essa busca de dados atuará como prevenção secundária em saúde pública, diminuindo riscos de futuros acidentes e/ou traumas físicos.

O pesquisador responsável, a universidade Feevale e o Hospital Municipal de Novo Hamburgo envolvidos nas diferentes fases da pesquisa proporcionarão assistência imediata e integral aos participantes da pesquisa no que se refere às possíveis complicações e danos decorrentes. Os participantes da pesquisa que vierem a sofrer qualquer tipo de dano resultante de sua participação na pesquisa, previsto ou não neste documento, têm direito à indenização, por parte do pesquisador, do patrocinador e das instituições envolvidas nas diferentes fases da pesquisa.

Garantimos o sigilo de seus dados de identificação primando pela privacidade e por seu anonimato. Manteremos em arquivo, sob nossa guarda, por 5 anos, todos os dados e documentos da pesquisa. Após transcorrido esse período, os mesmos serão destruídos. Os dados obtidos a partir desta pesquisa não serão usados para outros fins além dos previstos neste documento.



Você tem a liberdade de optar pela participação na pesquisa e retirar o consentimento a qualquer momento, sem a necessidade de comunicar-se com o(s) pesquisador(es).

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será rubricado em todas as folhas e assinado em duas vias, permanecendo uma com você e a outra deverá retornar ao pesquisador. Abaixo, você tem acesso ao telefone e endereço eletrônico institucional do pesquisador responsável, podendo esclarecer suas dúvidas sobre o projeto a qualquer momento no decorrer da pesquisa.

Nome do pesquisador responsável: Marina Venzon Antunes.

Telefone institucional do pesquisador responsável: (51) 3586-8800

E-mail institucional do pesquisador responsável: marinaantunes@feevale.br

Assinatura do pesquisador responsável

Local e data: _____, _____ de _____ 20____.

Declaro que li o TCLE: concordo com o que me foi exposto e aceito participar da pesquisa proposta.

Assinatura do participante da pesquisa

APROVADO PELO CEP/FEEVALE - TELEFONE: (51) 3586-8800 Ramal 9000

E-mail: cep@feevale.br

ANEXO III**1) Informações Gerais**

Código participante.....

Sexo

Idadeanos.

Raça

PesoKg.

Cor do cabelo

Costuma utilizar tintura no cabelo? - () não () sim

Já realizou procedimento de descoloração capilar? - () não () sim

Já realizou procedimento de alisamento capilar? - () não () sim

Fumante: () não () sim - quantos cigarros/dia?

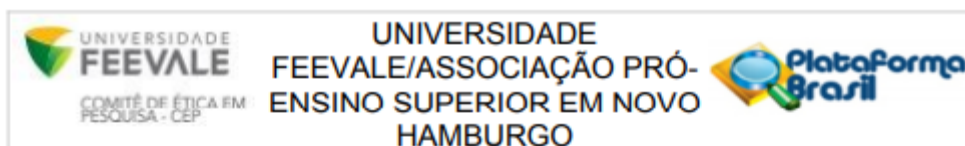
Consome bebida alcoólica: () não () sim - Quantidade e frequência?

É ou já foi usuário de substâncias psicoativas? () não () sim - quais?

.....

Fármacos utilizados:.....

ANEXO IV



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a determinação de drogas de abuso requeridas pela resolução CONTRAN n° 517 em amostras de cabelo por LC-MS/MS

Pesquisador: Marina Venzon Antunes

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 94092318.3.0000.5348

Instituição Proponente: ASSOCIACAO PRO ENSINO SUPERIOR EM NOVO HAMBURGO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Parcial

Detalhe:

Justificativa:

Data do Envio: 26/11/2019

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.750.221

Apresentação da Notificação:

De acordo.

Objetivo da Notificação:

Relatório parcial.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

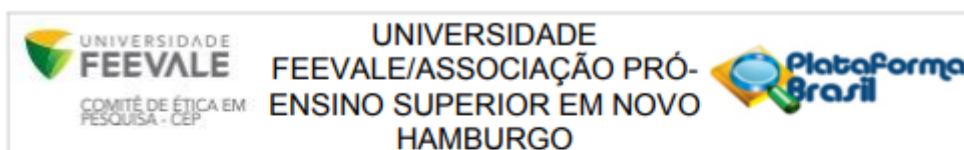
Não se aplica.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

De acordo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

De acordo.



Continuação do Parecer: 3.750.221

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

De acordo.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde, e com as normas internas do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Feevale, aprovamos a notificação solicitada.

Reiteramos que o Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição encontra-se à sua disposição para equacionar eventuais dúvidas e/ou esclarecimentos que se fizerem necessários.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Parcial	RelatorioParcialVM.docx	26/11/2019 12:56:00	VICTORIA VENDRAMINI MULLER	Postado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

NOVO HAMBURGO, 07 de Dezembro de 2019

Assinado por:
Ranieli Gehlen Zapelini
(Coordenador(a))

ANEXO V

Subject: Submission Confirmation

Validation of an analytical method for the simultaneous determination of 16 drugs and metabolites in hair in the context of driving license granting
Original Research Article

Dear Dr Antunes,

Your submission entitled "Validation of an analytical method for the simultaneous determination of 16 drugs and metabolites in hair in the context of driving license granting" has been received by journal Forensic Science International

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Editorial Manager as an author. The URL is <https://www.editorialmanager.com/fsi/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial Office
Forensic Science International

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923> Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EM via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

If you would like help with language editing, please visit our English Language Editing service here for more information:
<http://webshop.elsevier.com/languageservices/languageediting>

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/fsi/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.