

Marina Isabel da Silva Domingues

Análise de cabelo – procedimentos e aplicações

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2015

Marina Isabel Silva Domingues

Análise de cabelo – procedimentos e aplicações

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2015

Marina Isabel Silva Domingues

Análise de cabelo – procedimentos e aplicações

Atesto a originalidade do trabalho:

(Marina Isabel Silva Domingues)

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para
obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas

Sumário

A utilização do cabelo como amostra biológica para a determinação de vários compostos tem vindo a aumentar. Este tipo de amostra pode constituir uma mais valia face a outras matrizes tradicionalmente escolhidas (sangue e urina), uma vez que tem capacidade de retenção e armazenamento por um período de tempo relativamente longo, desde meses a anos, de várias substâncias.

As análises de cabelo podem ser aplicadas em várias áreas que são referidas ao longo deste trabalho, nomeadamente no controlo de doping, na exposição ocupacional ou accidental a determinados xenobióticos, como auxiliar na avaliação do estado nutricional e no auxílio do diagnóstico de doenças, na avaliação quanto à aptidão para a condução de veículos sob efeito de drogas ou álcool, na toxicologia *post mortem* e na medicina do trabalho com forma de julgar quanto ao consumo de drogas, como por exemplo, cocaína, heroína, anfetaminas ou álcool pelos trabalhadores.

Ao longo do trabalho são descritas de forma sucinta algumas das características anatómicas e fisiológicas do cabelo que permitem compreender de que forma se processa a integração de substâncias nesta matriz. São abordadas as vantagens e desvantagens da sua utilização face a outras matrizes e a forma como se procede à sua colheita, armazenamento e preparação para posterior análise.

Alguns possíveis interferentes como, por exemplo, os tratamentos cosméticos, a cor de cabelo e a possível contaminação externa são também alvo de apreciação. Por último consideram-se as técnicas analíticas mais utilizadas na determinação de xenobióticos em amostras de cabelo, a cromatografia líquida de elevada resolução acoplada à espectrometria de massa (HPLC-MS) e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS).

Palavras-chave: análise ao cabelo, cabelo como amostra biológica, testes de drogas de abuso, *post mortem*, morfologia do cabelo, cromatografia gasosa, cromatografia líquida, opióides.

Abstract

The use of hair as a biological sample has been increasing with the years. This sample can provide an added value compared with other matrices traditionally chosen (blood and urine), since it has retention capacity and storage for a relatively period of time from months to years of many substances.

The hair analysis can be applied in several areas that will be referred to throughout this work, particularly in doping control, occupational or accidental exposure to certain metabolites, nutritional status and diagnosis of diseases, driving under the influence of drugs or alcohol, toxicology post-mortem and substance abuse workers.

Throughout the work will be described briefly some of the anatomical and physiological characteristics of hair that allow understand how to handle the integration and elimination of substances in this matrix, The advantages and disadvantages are discussed their use against other matrices and how it undertakes the harvesting, storage and preparation for further analysis.

Some possible interferences, such as cosmetic treatments, hair color and possible external contamination are also under consideration. Finally the most frequently used analytical techniques for the determination of chemical species in hair samples are considered, high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (HPLC-MS) and gas chromatography coupled with mass spectroscopy (GC-MS).

Keywords: analysis of hair, hair as a biological sample, drug testing, hair analysis the post mortem, hair morphology, gas chromatography, liquid chromatography, opioids

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu pai, que não estando presente fisicamente nos últimos dois anos deste meu percurso, sempre foi para mim um exemplo de coragem, luta e determinação.

Agradecimentos

Ao longo desta jornada tenho o direito e o dever de agradecer a todos quantos me apoiaram, valorizaram e estiveram presentes quer nos momentos de sucesso, quer nos de fracasso, o que me permitiu concretizar mais um objetivo.

Começo por agradecer à minha orientadora Prof. Doutora Renata Souto e à co-orientadora Prof. Doutora Rita Catarino, pela disponibilidade, orientação, dedicação e por serem um exemplo de trabalho e empenho.

Um agradecimento à minha família, em especial à minha mãe e irmão pela força, apoio, carinho e todo o amor incondicional prestado.

Agradeço a todos os meus amigos pelo incentivo em momentos de desânimo.

Índice

Índice de figuras	3
Índice de tabelas	4
Lista de abreviaturas e acrónimos	5
Introdução	6
I. Perspetiva histórica	8
II. Anatomofisiologia do cabelo e sua composição química	9
III. Incorporação de xenobióticos no cabelo	12
IV. Procedimento analítico para a análise de cabelo	14
4.1.Amostragem e armazenamento	15
4.2.Preparação da amostra	17
4.2. i) Descontaminação	18
4.2. ii) Extração/digestão	19
4.2. iii) Limpeza e preconcentração	21
4.3.Técnicas analíticas mais comuns	24
4.3. i) Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa	24
4.3.ii) Cromatografia líquida de elevada resolução acoplada à espectrometria de massa	26
4.3. iii) Valores de <i>cut-off</i>	27
4.4.Interpretação dos resultados	28
4.4. i) Contaminação externa	29
4.4. ii) Influência dos tratamentos cosméticos	29
4.4. iii) Influência da cor do cabelo	30
4.4. iv) Relação dose-concentração presente no cabelo	31
V. Aplicações práticas	32
5.1. Estado nutricional	32

5.2. Auxílio no diagnóstico de patologias	32
5.3. Desempenho humano	35
5.3. i) Medicina no trabalho	36
5.3. ii) Condução de veículos	37
5.3. iii) Controlo de doping	38
5.4. Responsabilidade penal e toxicodependência	38
5.5. Diagnóstico de consumo e intoxicação crónica	39
5.6. Toxicologia <i>postmortem</i>	39
VI. Conclusões e perspectivas futuras	41
VII. Referências bibliográficas	43

Índice de figuras

Figura 1. Estrutura da haste da fibra capilar	9
Figura 2. Formação do cabelo a partir das células matriz presentes na membrana basal até à haste permanente do cabelo	10
Figura 3. Incorporação de substâncias no cabelo (adaptado de Pragst e Balikova, 2006).	13
Figura 4. Etapas do procedimento seguido para colheita das amostras (adaptado de Baciú <i>et al</i> , 2015).	16
Figura 5. Uso de SPME para o processo de extração e o de dessorção do material extraído para análise cromatográfica (adaptado de Valente e Augusto, 2000).	23
Figura 6. Frequência de resultados positivos para o consumo de opióides, cocaína, cannabis e seus metabolitos ao longo dos anos nos condutores italianos (adaptado de Tassoni <i>et al</i> , 2014).	37

Índice de tabelas

Tabela 1. Tipo de fibras de microextração em fase sólida de acordo com a lipofilicidade dos extratos (adaptado de Valente e Augusto, 2000).	22
Tabela 2. Valores de <i>cut-off</i> para drogas e metabolitos mais comumente analisados (adaptado de Tsanaclis <i>et alii</i> , 2011).	28
Tabela 3. Concentrações de vários oligoelementos no cabelo (ng/g) e na urina (µg/ml) (adaptado de Chen <i>et ali</i> , 2014).	35

Lista de abreviaturas e acrónimos

CI – Ionização química, do inglês *Chemistry Ionazation*

EI – Impacto electrónico, do inglês *Electronic Impact*

ELISA – teste imunoenzimático, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FAB - Bombardeamento com átomos rápidos, do inglês *Fast atomic bombardment*

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, do inglês *Gas Chromatography - Mass Spectrometry*

HPLC-MS – Cromatografia líquida de elevada resolução acoplada à espectrometria de massa, do inglês *High Performance Liquid chromatography – Mass Spectrometry*

HS – SPDE – Extração dinâmica em fase sólida, do inglês *Headspace Solid Dynamic Extraction*

RIA – Radioimunoensaio, do inglês *Radioimmunoassay*

SPE – Extração em fase sólida, do inglês *Solid phase extraction*

SPME - microextração em fase sólida, do inglês *Solid phase microextraction*

Introdução

O cabelo difere de outras amostras biológicas utilizadas para análise (tais como sangue, urina, suor ou saliva) pela sua capacidade de retenção e armazenamento por um período de tempo relativamente longo de várias substâncias. Esta particularidade é bastante útil na avaliação do consumo de drogas rapidamente metabolizadas e excretadas como é o caso da cocaína, opiáceos e anfetaminas. De facto, o sangue e a urina são as matrizes mais usadas e permitem a pesquisa de uma grande quantidade de substâncias quando há uma exposição recente ou crónica (Kempson e Lombi, 2011). No entanto, a sua janela de deteção varia das 36 às 72 horas, no sangue e na urina respetivamente, e as concentrações dos compostos estão sujeitas a alguns condicionalismos que incluem entre outros, mecanismos homeostáticos na amostra de sangue e o grau de hidratação do indivíduo na amostra de urina (Kempson e Lombi, 2011). No caso da fibra capilar, a janela de deteção é substancialmente mais longa (meses a anos) o que permite uma investigação retrospectiva de abuso crónico de drogas e a possibilidade de identificar se se está perante uma exposição ocasional ou crónica. Adicionalmente, o cabelo é uma matriz bastante estável, fácil de recolher, transportar e armazenar e pode ainda apresentar a vantagem de a concentração de compostos ser 50 a 100 vezes superior nesta matriz às concentrações encontradas no sangue ou na urina (Kempson e Lombi, 2011).

Materiais e métodos

A fim de realizar este trabalho de revisão bibliográfica e de facilitar a pesquisa foram utilizadas bases de dados eletrónicas como o PubMed, o ScienceDirect, e o Google académico, no período de Fevereiro a Setembro de 2015. Foram efetuadas pesquisas em Inglês e Português.

Para o efeito utilizaram-se as palavras-chave: cabelo como amostra biológica, estrutura do cabelo e a sua formação, drogas de abuso, análise de drogas em cabelo, análises

toxicológicas, análise forense e clínica, preparação de amostras de cabelo, procedimentos para a análise de cabelo, drogas de abuso e análise capilar.

O critério de seleção foi limitado a publicações com foco em diferentes aspetos relacionados com a análise do cabelo humano no período de 2005 até o presente. Alguns estudos publicados antes de 2005 também foram selecionados e discutidos, uma vez que foram considerados relevantes para uma melhor compreensão e interpretação dos resultados da análise do cabelo.

O cabelo utilizado como amostra biológica é menos comum, mas, no entanto, possui algumas vantagens face às amostras mais usais, nomeadamente, o sangue e a urina.

I. Perspetiva histórica

Os metais tóxicos tais como o tálio, arsénio, chumbo e mercúrio foram os primeiros elementos a ser analisados em amostras de cabelo (Pragst e Balikova, 2006). A primeira análise de cabelo foi efetuada em 1858, por Hoppe que conseguiu detetar níveis de arsénio em cadáveres exumados, sepultados há 11 anos (*Cit in* Lima e Silva, 2007).

Flesh, no ano de 1945, propôs que o cabelo fosse utilizado como amostra biológica para a determinação de elementos que poderiam ser relevantes na causa da morte, tendo em conta que este é um órgão excretor (*Cit in* Lima e Silva, 2007).

O desenvolvimento gradual das tecnologias analíticas permitiu que substâncias orgânicas fossem também analisadas e, em 1979, foi determinada por radioimunoensaio a concentração de heroína presente no cabelo de consumidores deste opiáceo. Em 1980, foi realizada a primeira deteção cromatográfica de opióides e observada a correlação entre a concentração desta substância ao longo da fibra capilar e o tempo de ingestão da substância (Lima e Silva, 2007).

Ao longo dos últimos 50 anos a análise de cabelo tem sido importante para avaliar a exposição ocupacional e ambiental a compostos tóxicos, bem como do estado nutricional das pessoas (Wolowiec *et alii*, 2013). Também a existência de desequilíbrio mineral no cabelo pode ser indicador de algumas doenças, comprovando que este é uma importante ferramenta no auxílio ao seu diagnóstico precoce (Wolowiec *et alii*, 2013).

II. Anatomofisiologia do cabelo e sua composição química

O cabelo é uma fibra heterogênea, com 15 a 120 µm de diâmetro, que consiste num conjunto de células queratinizadas aglomeradas em três estruturas concêntricas: a cutícula, o córtex e a medula (Figura 1) (Pragst e Balikova, 2006).

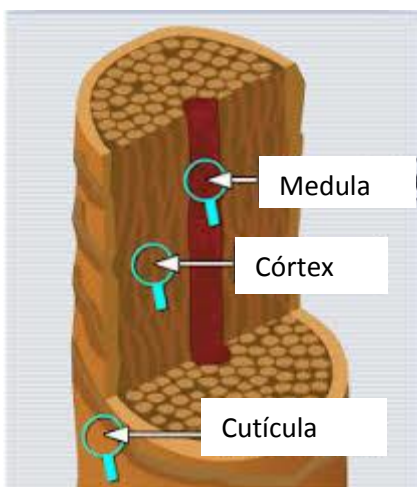


Figura 1. Estrutura da haste da fibra capilar.

A cutícula é a camada externa da fibra do cabelo sendo, por isso, a parte do cabelo sujeita às agressões externas (sol, chuva, poluição, etc.), ações mecânicas (escovar, pentear, etc.) e transformações químicas (permanente, colorações, reflexos, etc.). É constituída por várias camadas sobrepostas (5 a 10 camadas), compostas por células extremamente pequenas e incolores que estão unidas umas às outras por compostos lipídicos oferecendo uma excelente proteção ao córtex (Pragst e Balikova, 2006).

O córtex é a parte principal da fibra capilar e da sua estrutura depende o grau de resistência e a elasticidade do cabelo. Representa 65 a 95% do peso da fibra capilar e é formado por células cilíndricas preenchidas por queratina. É também no córtex que os grãos de melanina, que dão cor ao cabelo, se encontram (Pragst e Balikova, 2006).

A medula, ou canal medular, é a parte central da fibra e pode estar ausente, ou ter uma presença descontínua ao longo do cabelo, o que não leva a modificações na sua estrutura (Pragst e Balikova, 2006).

O cabelo tem origem nos folículos pilosos situados 3 a 5 mm abaixo da superfície da pele (Figura 2) (Pragst e Balikova, 2006; Pozebon *et alii*, 1999). A parte da fibra que sai da pele é designada de haste e a porção interna, de raiz. A raiz irrompe a partir de uma expansão arredondada do folículo (o bulbo piloso) tendo na sua base uma concavidade chamada papila dérmica rodeada por um sistema capilar sanguíneo que fornece o material metabólico necessário para o crescimento do cabelo. Na parte mais profunda do folículo piloso estão as células germinativas, responsáveis pela formação de queratina, melanina e outras estruturas necessárias à formação do cabelo (Pragst e Balikova, 2006).

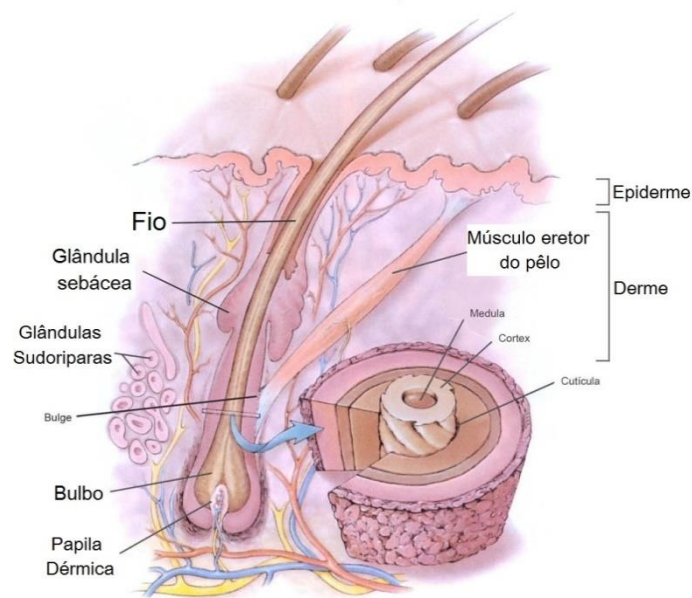


Figura 2. Formação do cabelo a partir das células matriz presentes na membrana basal até à haste permanente do cabelo.

O ciclo celular das células germinativas da matriz (queratinócitos e melanócitos) é um dos ciclos mais rápido dos tecidos do corpo humano. Durante a fase de crescimento do cabelo, as células da matriz vão proliferar e diferenciar-se para formar as três camadas internas acima referidas, que são empurradas a partir do bulbo piloso para a superfície da pele, devido às rápidas divisões mitóticas (Pragst e Balikova, 2006).

Acima do bulbo piloso surge a zona queratogénica onde os genes para a formação da queratina são expressos, sintetizando os longos filamentos proteicos e também ocorre a incorporação de pigmentos de melanina (Kempson e Lombi, 2011; Pragst e Balikova, 2006).

As células da cutícula têm origem nas células da matriz da zona mais externa da papila. São constituídas por proteínas e por um complexo proteína-lípido sendo a via de difusão primária para a incorporação e eliminação de drogas e fármacos lipofílicos (Pragst e Balikova, 2006).

Associado a cada fibra capilar há uma glândula sebácea, que produz o sebo, responsável pela lubrificação dos fios e couro cabeludo, e que também pode contribuir para a incorporação de drogas e fármacos lipofílicos (Pragst e Balikova, 2006). Na superfície do couro cabeludo há ainda glândulas sudoríparas cujo fluído secretor molha a haste do cabelo, podendo contribuir para a incorporação de xenobióticos (Pragst e Balikova, 2006).

Cada fio de cabelo tem um ciclo de crescimento que consiste em três fases sucessivas. A fase de desenvolvimento e crescimento (fase anágena que dura entre 4-8 anos) em que o metabolismo da raiz é bastante ativo, garantindo a rápida divisão das células capilares para a formação e crescimento do novo cabelo. Como a papila dérmica está em contato com os vasos sanguíneos, substâncias presentes no sangue podem ser incorporadas no cabelo. Segue-se a fase de transição (fase catágena que dura apenas algumas semanas) em que a divisão celular declina, a raiz reduz-se a cerca de um terço do seu tamanho original, o cabelo solta-se (pelo que deixa de haver irrigação sanguínea e morre) e sobe para o couro cabeludo. Por último, existe a fase de repouso (fase telógena que dura de 4-6 meses) que é o período no qual o cabelo cai, empurrado por um novo fio que nasce no mesmo local (Pragst e Balikova, 2006).

Em média, o cabelo cresce 0,6-1,4 cm por mês havendo, no entanto, diferenças significativas de acordo com a raça, género, idade e estado de saúde. Em qualquer momento, aproximadamente 85% do cabelo no couro cabeludo de um adulto está na

fase de crescimento (anágena) com os restantes 15% na fase de repouso (Pragst e Balikova, 2006).

Quanto à composição química, o cabelo humano é composto por proteínas (65% a 95%), lípidos, água, oligoelementos e pigmentos. O componente primário é a queratina uma proteína fibrosa, constituída pela combinação de cerca de 20 aminoácidos, cuja estrutura tridimensional confere ao cabelo características de resistência, elasticidade e impermeabilidade à água (Kempson e Lombi, 2011).

A água constitui, em condições normais, 12 a 15% da composição do cabelo e os lípidos (estruturais e livres) representam cerca de 3% (Kempson e Lombi, 2011). Uma parte deles é produzida no bolbo capilar (a partir de esteróides, ácidos gordos e ceramida) e estão presentes no córtex e na cutícula, garantindo a coesão da fibra capilar e conferindo ao cabelo uma certa impermeabilidade. A restante mistura de lípidos é produzida pela glândula sebácea e forma um filme na superfície que lubrifica o fio de cabelo, preservando a sua flexibilidade e brilho. A melanina, pigmento responsável pela cor natural do cabelo, representa apenas 1% da composição total do cabelo e alguns outros elementos (provenientes do ambiente ou trazidos pelo sangue) estão geralmente combinados com as cadeias laterais de grupos proteicos ou com grupos de ácidos gordos e existem em pequenas quantidades (Kempson e Lombi, 2011).

III. Incorporação de xenobióticos no cabelo

Apesar de os mecanismos precisos envolvidos na incorporação de drogas no cabelo ainda não estarem completamente esclarecidos, a maioria dos modelos assume que os xenobióticos entram no cabelo, por difusão passiva, a partir dos capilares sanguíneos para as células em crescimento na zona de queratinização na base do folículo piloso. Além deste mecanismo de transporte endógeno a partir do sangue, as substâncias podem também ser incorporadas a partir de uma exposição crónica, através de compartimentos profundos da pele durante a formação do cabelo, como é o caso da deposição por difusão a partir do suor e secreções sebáceas (Figura 3) (Pragst e Balikova, 2006).

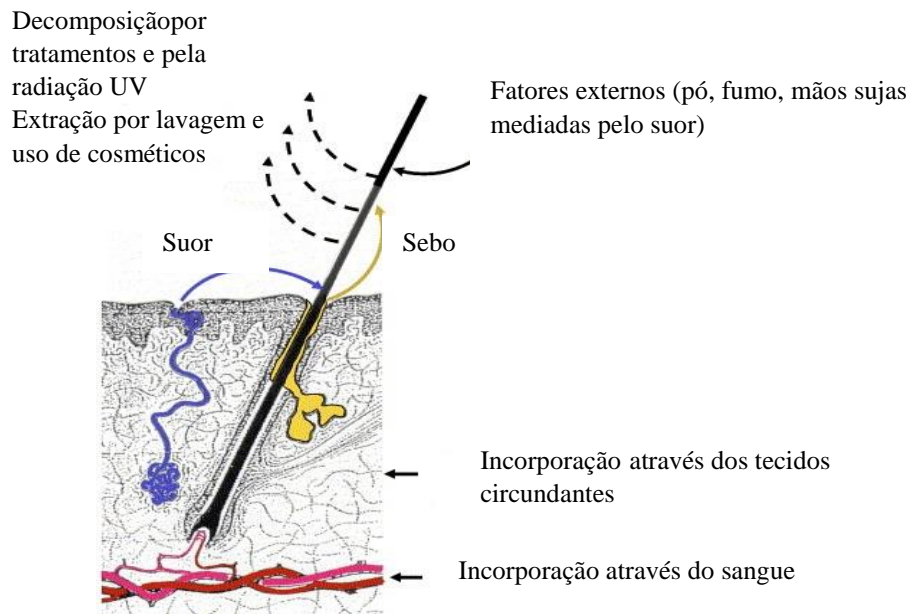


Figura 3. Incorporação de xenobióticos no cabelo (adaptado de Pragst e Balikova, 2006).

De notar que a natureza da substância incorporada (estrutura, propriedades químicas), bem como as características físicas / fisiológicas do indivíduo influenciam fortemente o mecanismo que irá dominar (Pragst e Balikova, 2006).

Os três principais fatores que influenciam a incorporação de uma droga são o conteúdo em melanina do cabelo e a lipofilicidade e a basicidade da substância propriamente dita (Pragst e Balikova, 2006).

Sabe-se que os melanócitos e a pigmentação desempenham um papel importante na incorporação de drogas básicas no cabelo. Vários estudos demonstraram que após a exposição da raiz capilar à mesma dosagem de substâncias básicas no sangue, a concentração de drogas no cabelo pigmentado (isto é, com melanina e por isso não-branco) era bastante superior (cerca de 10 vezes maior) à encontrada em cabelos não

pigmentado (brancos), não se observando, no entanto, diferenças para a incorporação de compostos neutros nos 2 tipos de cabelos (pigmentados e não pigmentados) (Pragst e Balikova, 2006).

De um modo geral, a incorporação de xenobióticos no cabelo a partir do sangue é controlada pelos mesmos princípios farmacológicos da distribuição de substâncias. As moléculas orgânicas lipofílicas (não carregadas) podem facilmente penetrar membranas e difundir-se de acordo com o gradiente de concentração nas células matriciais. Já para as moléculas hidrófilas ou iões orgânicos de massa molecular média, as membranas formam uma barreira impermeável. As drogas básicas ou ácidas ionizam-se em grande extensão ao valor de pH fisiológico podendo atingir as células responsáveis pela formação da fibra capilar, em diferentes estados de protonação. Assim sendo, o pKa do composto e o pH das células da matriz são importantes no que dita a possibilidade da sua incorporação no cabelo. O pH intracelular dos queratinócitos é mais ácido do que o plasma e o pH de melanócitos varia entre 3 e 5. Este efeito do pH associado, à afinidade da melanina para drogas básicas, leva à acumulação de fármacos lipofílicos e básicos em células da matriz com clara preferência por cabelos pigmentados. Para drogas ácidas ou metabolitos, o equilíbrio de distribuição é claramente desfavorável para as células matriciais pelo que estes compostos são encontrados apenas em concentrações muito reduzidas no cabelo (Pragst e Balikova, 2006).

IV. Procedimento analítico para análise de cabelo

Num procedimento analítico para determinação de uma substância em cabelo, todo o processo desde a amostragem até à interpretação dos resultados deve ser bem organizado e realizado de forma correta de modo a evitar potenciais erros (Pragst e Balikova, 2006).

O historial deve ser devidamente registado e deve ser apresentado um resumo do caso, bem como o objetivo da investigação, juntamente com o xenobiótico e período em que o indivíduo esteve exposto (Pragst e Balikova, 2006).

Embora a determinação da concentração de muitas drogas ilícitas e terapêuticas no cabelo tenha sido descrita em numerosos estudos, apenas uma pequena fração delas foi efetuada em condições devidamente controladas, ou seja, em que a dose diária e a duração da ingestão da droga eram conhecidas. Exemplos incluem testes para a heroína, fármacos antiepiléticos, benzodiazepinas e fármacos neurolépticos (Pragst e Balikova, 2006).

4.1. Amostragem e armazenamento

O primeiro passo para a análise inicia-se com a colheita da amostra. A recolha deve ser efetuada no vértice posterior da cabeça que é a zona onde o cabelo apresenta menor variabilidade, pois existe menor influência do crescimento, da idade ou do sexo (Baciu *et alii*, 2015). Antes de ser cortada, a amostra de cabelo deve ser amarrada para garantir que é cortada o mais próxima possível do couro cabeludo. O tamanho da amostra depende do objetivo da análise mas normalmente deve ser uma quantidade de cabelo equivalente à espessura de um lápis. Para fins forenses, é necessário a recolha de duas amostras: a primeira para que sejam efetuadas as análises de rotina e a segunda que é armazenada para possibilitar uma eventual repetição para confirmação dos resultados em casos onde se verifica a objeção do resultado final (Baciu *et ali*, 2015; Cooper *et ali*, 2012; Pragst e Balikova, 2006).

Após a recolha das amostras, estas devem ser enroladas em folhas de alumínio separadas e colocadas com a extremidade da raiz além da extremidade da folha (Figura 4), de forma a evitar o desalinhamento da amostra de cabelo e a facilitar a sua identificação (Baciu *et alii*, 2015). Cada folha de alumínio é dobrada longitudinalmente uma ou duas vezes de forma a segurar o cabelo alinhado e colocada dentro de um envelope de papel selado, rubricado e datado (Baciu *et alii*, 2015; Cooper, 2011; Cooper *et alii*, 2012).

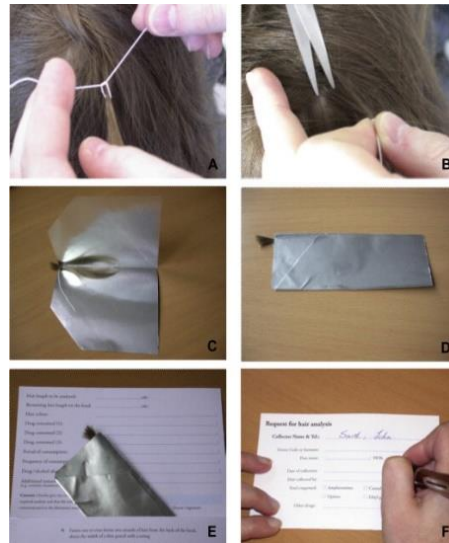


Figura 4. Etapas do procedimento seguido para colheita das amostras (adaptado de Baciú *et alii*, 2015)

As amostras devem ser armazenadas à temperatura ambiente, em locais secos e escuros (Baciú *et alii*, 2015).

Os procedimentos descritos permitem que grande parte dos xenobióticos e dos seus metabolitos permaneçam estáveis ao longo do tempo, o que torna possível a sua detecção anos após o seu armazenamento (Pragst e Balikova, 2006).

O armazenamento em frigoríficos ou congeladores, bem como em sacos plásticos não é aconselhável devido à ocorrência de turgescência, libertação de conteúdo, ou, no caso de sacos plásticos, devido à sua capacidade para extrair substâncias lipofílicas que possam estar presentes no cabelo (Pragst e Balikova, 2006).

As amostras que sejam colhidas húmidas deverão ser obrigatoriamente secas antes de armazenadas e analisadas (Pragst e Balikova, 2006).

Frequentemente em acidentes rodoviários ou em cadáveres em decomposição, o cabelo encontra-se embebido em sangue ou fluidos corporais. Nestas situações a técnica descrita pode não ser a mais adequada, sendo necessário recorrer ao uso de frascos para a colheita da amostra. Os frascos devem estar devidamente lavados, isentos de interferentes, contendo anticoagulante e/ou conservante apropriado e, devem estar bem tapados e fixos, para que não quebrem ao longo do transporte (Cooper, 2011; Junior, 2012).

Nos casos de colheita *post mortem*, esta deverá ocorrer antes da autópsia (Cooper, 2011). Quando são necessárias informações adicionais sobre o consumo recente de drogas, além do procedimento de colheita referido, ainda se deverá obter uma amostra por ação mecânica de forma a deixar as raízes intactas (Cooper *et alii*, 2012).

Em crimes sob efeito de drogas a colheita da amostra deverá ocorrer num período entre as quatro e as seis semanas após a ocorrência. E, se o resultado for positivo dever-se-á proceder a uma segunda colheita para verificação de resultados, sendo que o indivíduo não poderá efetuar tratamentos cosméticos ou cortar o cabelo entre as colheitas (Cooper *et alii*, 2012).

4.2. Preparação da amostra

A preparação da amostra é uma das etapas fundamentais de qualquer método analítico, tendo uma influência relevante nos passos subsequentes da análise e na qualidade dos resultados (Baciu *et alii*, 2015).

Devido ao facto de ser uma matriz complexa, o cabelo requer uma preparação longa e detalhada que envolve a descontaminação da amostra, para eliminar possíveis contaminações externas, a extração de xenobióticos e os seus metabolitos, e, ainda uma etapa de lavagem adicional para eliminar substâncias interferentes. O desempenho correto de todas estas fases é essencial para a obtenção de resultados fiáveis (Baciu *et alii*, 2015).

A concentração dos xenobióticos ao longo do fio de cabelo não é uniforme tornando-se necessário efetuar uma análise segmentar do cabelo (Baysal e Akman, 2010).

A análise segmentar do cabelo assenta em dois pressupostos: o crescimento de forma linear para a zona do vértice posterior (cerca de um centímetro por mês) e a sua colheita efetuada o mais próximo possível da porção proximal do cabelo que emerge à superfície da pele (LeBeau *et alli*, 2011).

Diferentes estratégias na análise segmentar podem ser adotadas tendo em conta que, geralmente, a concentração do xenobiótico diminui com o aumento da distância à raiz do cabelo e por isso é recomendada uma análise de segmentos de tamanho cada vez maior à medida que se distanciam desta (Pragst e Balikova, 2006).

4.2.i) Descontaminação

A descontaminação da amostra de cabelo deve fazer-se por dois motivos, o primeiro dos quais é eliminar os resíduos de produtos utilizados para o cabelo (como champô, ceras, lacas) e remover suor, sebo ou poeiras. O segundo motivo é o facto de a droga poder aderir à matriz a partir do ambiente externo, o que pode contribuir para resultados não fidedignos (Baciu *et alii*, 2015; Pragst e Balikova, 2006). Para excluir um resultado analítico positivo originado a partir deste tipo de contaminação do meio ambiente, a primeira solução de lavagem deve ser analisada ou armazenada para posterior análise (Baciu *et alii*, 2015).

Os solventes utilizados para a descontaminação do cabelo devem, tanto quanto possível, remover as impurezas externas sem remover as drogas presentes na matriz do cabelo (Pragst e Balikova, 2006).

Diferentes estratégias são relatadas na literatura, no entanto todas elas incluem solventes orgânicos, tampões aquosos, água, sabões ou uma combinação destas várias estratégias. Podem demorar desde minutos a horas, a serem executadas e, o número de vezes que têm de ser repetidas depende do grau de contaminação do cabelo (Baciu *et alii*, 2015).

Não existe por isso, um procedimento consensual relativamente à lavagem das amostras de cabelo. No entanto, no caso de a lavagem ser *post-mortem* é geralmente utilizada uma solução de 0,1% de laurilsulfato de sódio, água destilada e acetona (Pragst e

Balikova, 2006). Outros procedimentos incluem, por exemplo, uma ou duas lavagens com diclorometano, uma sequência de solventes orgânicos, ou ainda, algumas lavagens com metanol (Pragst e Balikova, 2006).

Solventes, tais como o diclorometano ou a acetona, são mais vantajosos do que o metanol ou o tampão fosfato, uma vez que não provocam o intumescimento do cabelo (Pragst e Balikova, 2006).

No caso concreto dos recém-nascidos os procedimentos de descontaminação são muito importantes, já que o líquido amniótico tem capacidade de excretar xenobióticos maternos que são depositados no cabelo (Lozano *et alii*, 2007).

4.2.ii) Extração/digestão

Os analitos que se encontram no interior da matriz capilar podem ser obtidos por diversas técnicas, tais como digestão ácida ou alcalina, por extração com solvente, hidrólise enzimática, ou incubação com vários sistemas tampão (Baciu *et alii*, 2015). O tratamento com ureia e tioglicolato, bem como o uso de fluidos supercríticos, encontram-se igualmente mencionados na literatura (Pragst e Balikova, 2006).

Estas práticas envolvem por norma temperaturas elevadas e períodos de incubação que se situam entre as 16 e as 20 horas (Baciu *et alii*, 2015).

A escolha da técnica normalmente depende das propriedades químicas do xenobiótico, bem como da sua estabilidade nas diferentes soluções de extração. Uma escolha incorreta da técnica pode resultar na degradação do analito de interesse (Baciu *et alii*, 2015; Pragst e Balikova, 2006).

A extração com metanol por um período de 5 a 18 h no banho de ultrassons é uma das técnicas mais utilizadas, uma vez que é um procedimento compatível com quase todas as substâncias (Pragst e Balikova, 2006). O metanol é um composto hidrofílico que ao penetrar na matriz do cabelo leva a que esta se dilate e liberte os compostos por um processo de difusão. Este, como solvente orgânico, tem a capacidade para dissolver

compostos neutros e lipofílicos, sendo o processo facilitado com o auxílio do ultrassons que degrada a estrutura do cabelo (Pragst e Balikova, 2006).

Drogas como, por exemplo a heroína, e fármacos lipofílicos que são sensíveis à hidrólise podem ser determinados a partir do mesmo extrato metanólico, no entanto compostos que se encontrem em elevadas concentrações, o extrato de metanol deverá ser diretamente injetado em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS), não sendo, por isso necessário efetuar uma pré concentração (Pragst e Balikova, 2006).

Apesar de esta técnica poder ser aplicada a uma grande quantidade de compostos possui, no entanto, as desvantagens de possuir uma baixa e incompleta capacidade de recuperação de compostos, quando comparada a outras técnicas, e de o extrato metanólico possuir baixo grau de pureza, devido à formação de ésteres de metilo de alguns compostos. Por conseguinte, é necessário um procedimento de limpeza secundária envolvendo a extração líquido / líquido ou extração em fase sólida (Pragst e Balikova, 2006).

Relativamente à extração efetuada através de soluções de tampão fosfato ou por solução aquosa 0,01 M de HCl, têm a principal vantagem de possuir uma elevada capacidade de extração de compostos de natureza básica, como por exemplo, opiáceos, cocaína e os seus metabolitos, as anfetaminas, metadona (Pragst e Balikova, 2006).

Os extratos aquosos obtidos por este método apresentam menos impurezas quando comparados aos extratos metanólicos (Pragst e Balikova, 2006).

Agentes desnaturantes, tais como a ureia e o tioglicolato em meio ácido (pH 3,2), facilitam a extração de compostos no cabelo pela quebra das pontes de hidrogénio e dissulfureto presentes no cabelo. Esta abordagem é particularmente bem sucedida quando aplicada à extração de benzodiazepinas (Pragst e Balikova, 2006).

A utilização de fluídos supercríticos, que consistem em substâncias que estão a um temperatura e pressão acima do seu ponto crítico, não existindo distinção entre as fases

líquida e gasosa é também uma técnica de extração, que apesar de ser rápida, e de elevado rendimento é pouco utilizada devido aos custos a ela associados (Pragst e Balikova, 2006).

Os extratos obtidos através desta técnica são de elevada pureza, daí que não seja necessário proceder a posteriores técnicas de limpeza, podendo ser inseridos directamente no GC-MS (Pragst e Balikova, 2006).

A estrutura do cabelo pode também ser desintegrada por um processo de digestão enzimática (Pragst e Balikova, 2006). As enzimas mais utilizadas são a pronase e a proteinase K que possuem a capacidade de hidrolisar a proteína do cabelo através da quebra das ligações dissulfureto (Pragst e Balikova, 2006). Esta técnica pode ser substancialmente melhorada pela presença de ditiotreitól durante ou antes do procedimento enzimático (Pragst e Balikova, 2006). Também o processo de sonicação favorece a digestão enzimática (Bermejo *et alii*, 2004).

Um método de extração para drogas que sejam estáveis em soluções alcalinas é a digestão com solução aquosa de hidróxido de sódio. Este tipo de extração é vantajosa no caso da extração de nicotina, anfetaminas, antidepressivos e neurolépticos, devido a uma recuperação quantitativa deste tipo de drogas e fármacos a partir da matriz do cabelo (Pragst e Balikova, 2006).

4.2.iii) Limpeza e pré-concentração

Os extratos resultantes de todas as técnicas mencionadas à exceção dos extratos metanólicos e dos extratos obtidos dos fluidos supercríticos, que são analisados por injeção direta de GC-MS, necessitam de ser separados dos interferentes (compostos endógenos ou outras substâncias administradas concomitantemente com os xenobióticos alvo) através de técnicas que são também usadas em amostras de sangue e urina (Cooper, 2011).

As técnicas utilizadas para a limpeza dos extratos são a extração líquido-líquido ou extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*). Este último é atualmente

o mais usado devido à disponibilidade de sistemas automatizados de materiais melhorados para a extração (Baciu *et alii*, 2015).

Nesta técnica, os xenobióticos contidos na matriz aquosa são extraídos, juntamente com os compostos interferentes, após passarem por um cartucho que contém um solvente orgânico seletivo geralmente utilizado para remover os interferentes (Baciu *et alii*, 2015).

A microextração em fase sólida (SPME do inglês *solid phase microextraction*) permite uma eliminação de interferentes e preparação da amostra para as técnicas usadas na confirmação de resultados, devido à elevada sensibilidade do método e à possibilidade de automatização (Pragst e Balikova, 2006). Consiste num tubo de fibra ótica, de sílica fundida de 100 mm de diâmetro, com 10 mm de uma extremidade recoberta com um filme fino de um polímero ou de um sólido adsorvente (Valente e Augusto, 2000). A fibra de SPME tem capacidade de captar substâncias lipofílicas, mesmo as de baixa volatilidade, como por exemplo antidepressivos tricíclicos, fenotiazinas, lidocaína ou metadona e os seus metabolitos (Pragst e Balikova, 2006).

As fibras possuem um revestimento de acordo com a lipofilicidade e volatilidade da substância a extrair (Tabela 1).

Tabela 1. Tipo de fibras de microextração em fase sólida de acordo com a lipofilicidade dos extratos (adaptado de Valente e Augusto, 2000).

Tipo ^a	Composição Química	L _f / μm	ΔT°C ^b	Aplicação sugerida
Não-polares	Polidimetilsiloxano (PDMS)	100;	200-270°C	Basicamente para compostos apolares. É possível usar com polares.
		30; 7	220-320°C	
Polares	Poliacrilato (PA)	85	220-310°C	Medianamente a altamente polares, como fenóis, pesticidas orgafoforados. Cetonas, álcoois. Voláteis de média a alta polaridade.
	Carbowax/divinilbenzeno (CW-DVB)	65	200-260°C	
Bi-polares	PDMS-DVB	65	200-270°C	Voláteis e não voláteis de baixa a alta polaridade. Voláteis.
	Carboxen-PDMS	75	—	

a. Não estão relacionadas fibras para cromatografia líquida b. ΔT°C – faixa de temperatura para a dessorção L_f. Espessura de recobrimento

Na SPME efetuada a temperaturas elevadas os analitos são transportados para a fibra através de pequenas gotas de água, até que seja estabelecido um equilíbrio entre a solução de extração, a fibra e a fase de vapor (Pragst e Balikova, 2006).

Este método possui a vantagem de poder ser realizada sem o uso de solventes orgânicos, ter grande poder de concentração dos xenobióticos e adequar-se à sensibilidade dos detetores de GC-MS, sendo por isso aplicável a diversos tipos de analitos (Valente e Augusto, 2000). Além disso, a sua fibra é regenerada durante o processo de dessorção da amostra no orifício de injeção por GC-MS (Pragst e Balikova, 2006) (figura 5).

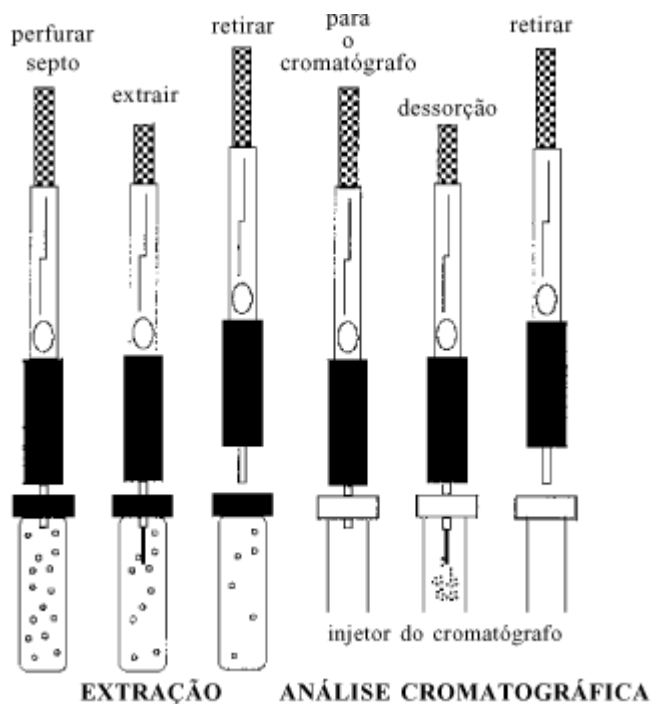


Figura 5. Uso de SPME para o processo de extração e dessorção do material extraído para análise cromatográfica (adaptado de Valente e Augusto, 2000).

Existe, contudo, uma variante desta técnica, a extração dinâmica em fase sólida no modo headspace (HS-SPDE) (Pragst e Balikova, 2006). Nesta técnica a fase gasosa é aspirada através de um capilar de aço revestido com um composto adsorvente. É uma

alternativa mais resistente comparativamente com a fibra de SPME e com maior rendimento de extração (Pragst e Balikova, 2006).

4.3. Técnicas analíticas mais comuns

A primeira análise ao cabelo para detecção de fármacos foi efetuada por radioimunoensaio (RIA) (Pragst e Balikova, 2006).

No entanto, os RIA não foram bem aceites pelo facto de só serem sensíveis a um número limitado de xenobióticos, de não possuírem especificidade relativamente ao analito que está a analisar e de terem sensibilidade insuficiente para o uso de extratos de cabelo (Pragst e Balikova, 2006).

Ao longo dos últimos anos foram desenvolvidos testes ELISA, (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para opiáceos, canabinóides, cocaína, benzodiazepinas e metadona que provaram ser suficientemente sensíveis para uso em análise do cabelo (Pragst e Balikova, 2006).

Apesar disso, as técnicas de cromatografia líquida de elevada eficiência acoplada à espectrometria de massa (HPLC-MS) e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) são, hoje em dia, as metodologias de eleição para a confirmação devido à sua elevada especificidade (Lima e Silva, 2007), uma vez que mesmo no caso dos testes de ELISA, os resultados quando positivos têm sempre de ser confirmados, pois normalmente são colocados em causa pelo indivíduo cuja análise a substâncias ilícitas foi efetuada (Pragst e Balikova, 2006).

4.3. i) Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)

A GC-MS é o método mais utilizado para a análise de metabolitos no cabelo (Pragst e Balikova, 2006).

As características de funcionamento do cromatógrafo gasoso são compatíveis com a necessidade de uma velocidade reduzida da admissão do gás no espectrómetro de modo a manter um vácuo suficientemente elevado no seu interior tornando a associação dos dois equipamentos possível. No entanto, para a realização de GC-MS é necessário que a substância seja volátil e estável a elevadas temperaturas (Baciu *et alii*, 2015). Compostos que contenham grupos amina livres, grupos hidroxilo ou grupos carboxilo não possuem estas características, logo para que possam ser analisados por este método torna-se necessário proceder a uma derivatização prévia dos mesmos por exemplo por reações com compostos de anidrido pentafluoropropiónico e pentafluoropropanol (Pragst e Balikova, 2006).

A amostra é injetada no capilar do cromatógrafo, os seus componentes são separados na coluna, e entram no espectrómetro de massa através da interface existente entre os dois equipamentos (Qui *et alii*, 2007). A espectrometria de massa permite identificar quantidades de amostra muito reduzidas, o que a torna num detetor ideal para a técnica cromatográfica. Os problemas de incompatibilidade de acoplamento no que diz respeito às diferenças de pressão entre as duas técnicas (a cromatografia gasosa opera à pressão atmosférica enquanto a espectrometria de massa funciona em condições de alto vácuo necessárias para a conversão da maior parte das moléculas em iões, com um tempo de retenção suficientemente longo para ser analisado) são ultrapassados através de uma interface adequada que permita a associação destas duas técnicas (Qui *et alii*, 2007). Os analitos introduzidos no MS têm depois de ser ionizados. Posteriormente os iões formados fragmentam-se e após separação no analisador de massas interatuam com um detetor multiplicador de eletrões dando origem a uma corrente elétrica. A magnitude do sinal elétrico em função da razão m/z é convertida por um processador de dados que gera os espectros de massa correspondentes ao composto que se está a ser detetado (Pragst e Balikova, 2006).

Existem diversos métodos de ionização, tais como, ionização química (CI), ionização por bombardeamento com átomos rápidos (FAB), ionização por impacto eletrónico (EI) que são escolhidos de acordo com o tipo de espécie (s) química (s) que se pretende analisar (Qui *et alii*, 2007). O método de ionização por impacto electrónico é atualmente o método mais empregue na GC-MS devido à possibilidade de obtenção de uma informação mais detalhada sobre cada molécula (Pragst e Balikova, 2006). Na EI, as

moléculas são bombardeadas com elétrons de elevada energia, sofrem ionização, resultando na formação de iões moleculares que se fragmentam total ou parcialmente e são separados pelo analisador de massas do espectrómetro de acordo com a relação massa/carga (m/z). Tal como acontece nas cromatografias com os tempos de retenção, em MS os fragmentos resultantes são característicos de cada composto sendo assim possível a sua identificação e quantificação (Pragst e Balikova, 2006).

Estes recursos permitem o desenvolvimento de procedimentos específicos e sensíveis para uma grande variedade de drogas ou metabolitos com precisão suficiente mesmo em reduzidas concentrações. Além disso, várias substâncias podem ser medidas na mesma corrida cromatográfica, desde que o cromatograma seja dividido em várias janelas de tempo com diferentes massas (Pragst e Balikova, 2006).

A CI surge como alternativa à EI quando se pretende obter apenas um espectro simples do ião molecular. Este processo implica a presença de um reagente gasoso em excesso que promove uma fragmentação suave da molécula em análise sendo usada, por exemplo, na análise de benzodiazepinas mas, devido a apresentar um menor grau de fragmentação, possui uma menor especificidade quando comparada à IE (Pragst e Balikova, 2006).

4.3. ii) Cromatografia líquida de alta resolução acoplada à espectrometria de massa (HPLC-MS)

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa é uma técnica muito útil na análise do cabelo dado que são contornadas algumas das limitações associadas à GC, nomeadamente no que diz respeito à volatilidade e estabilidade das moléculas (Pragst e Balikova, 2006).

No entanto, a HPLC-MS apresenta também algumas restrições designadamente as que estão associados com o efeito matriz dado que os espectros da matriz também são observados, levando a uma maior complexidade na interpretação e análise dos resultados. Estes efeitos da matriz podem provocar realce ou supressão de iões, o que afeta vários parâmetros de desempenho analítico da metodologia: o limite de deteção, o limite de quantificação, a linearidade, a exatidão e a precisão. Considerando isto, é

necessária a avaliação dessas possíveis interferências para que haja validação dos resultados (Baciu *et alii*, 2015).

A separação da amostra ocorre por distribuição diferencial entre os diversos componentes da amostra e as duas fases imiscíveis (a fase móvel e a fase estacionária). A eluição/separação dos solutos tem por base a diferença de solubilidade relativa destas espécies nas fases móvel e estacionária que possuem polaridades distintas. Após esta separação os compostos seguem para o espectrómetro de massa onde são ionizados e separados de acordo com a razão massa/carga (Jickells e Negrusz, 2008).

4.3. iii) Valores *Cut-off*

A designação de “*cut-off*” vem do inglês e é traduzido como “valor de corte”. Estes valores de *cut-off* são valores numéricos determinados durante o processo de validação dos métodos analíticos ou que podem ser sugeridos por sociedades científicas (por exemplo, *Substance Abuse & Mental Health Services Administration* ou a *Society of Hair Testing*) às quais resultados analíticos são comparados para interpretação dos resultados finais (Tsanaclis *et alii*, 2011).

Sempre que os resultados da análise se encontram abaixo dos valores estabelecidos como os valores de *cut-off*, os resultados são considerados como “Não Detectados” ou “Negativos”, sempre que valores se encontram acima dos valores de *cut-off* são considerados “Detectados” ou “Positivos” (Tsanaclis *et alii*, 2011).

Os valores de *cut-off* na análise do cabelo não estão estabelecidos, tendo por base a literatura disponível. No entanto, a *Society of Hair Testing* recomenda determinados valores *cut-off* para os xenobióticos mais comumente encontrados no cabelo, permitindo por sua vez a identificação do seu uso crónico (Tabela 2) (Cooper *et alii*, 2012).

Tabela 2. Valores de cut-off para drogas e metabolitos mais comumente analisados (adaptado de Tsanaclis *et alii*, 2011).

Grupo	Xenobióticos e metabolitos	Cut-off (ng/mg)
Anfetaminas	Anfetamina	0,2
	Metanfetaminas	0,2
Canabinóides	MDA	0,2
	MDMA	0,2
	THC	0,5
	THC-COOH	0,0002
Cocaína	Cocaína	0,5
	BZE, EME, CE, NOC	0,5
Opióides	Morfina	0,2
	Codeína	0,2
	6-acetilmorfina	0,2
	Heroína	0,2
Metadona	Metadona	0,2
	EDDP	0,05
Buprenorfina	Buprenorfina	0,01
	Norbuprenorfina	0,01
Etanol	Etil glucuronido	0,03
	FAEEs	0,5
Benzodiazepinas	Diazepam	0,05
	Lorazepam	0,05
	Nordiazepam	0,05
	Oxazepam	0,05

BZE: Benzoilecgonina; CE: Cocaetileno; EDDP: 2-etilideno-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolideno; EME: Éster metílico de ecgonina; FAEE's: Ésteres etílicos de ácidos gordos; MDA: Metildioxianfetamina; MDMA: Metilendioxi-metanfetamina; NOC: Norcocaína; THC: Delta 9 – tetrahydrocannabinol; THCCOOH: Ácido-11-nor-delta-9-tetrahydrocannabinol-9-carboxílico

4.4. Interpretação dos resultados

Como referido anteriormente, o cabelo permite a avaliação de drogas, etanol, fármacos em diversas situações. Contudo, aquando da interpretação dos resultados é necessário ter em conta diversos fatores que podem interferir na análise dos xenobióticos ou metabolitos encontrados.

4.4. i) Contaminação externa

A análise de cabelo pode ter a desvantagem de fornecer falsos positivos quando o indivíduo apesar de não consumir as substâncias é de alguma forma a elas exposto. É o caso de drogas que possam ser fumadas (nomeadamente a cannabis, a cocaína e a heroína) ou da manipulação das drogas (em que os resíduos que ficam nas mãos podem passar para o cabelo) que surgem como fontes de contaminação passiva (Baciu *et alii*, 2015).

No sentido de minimizar o risco de resultados falso-positivos, os laboratórios utilizam dois procedimentos distintos: a descontaminação da amostra e a deteção dos metabolitos das drogas ou dos fármacos (Baciu *et alii*, 2015). Apesar de, na literatura existirem vários procedimentos descritos, não há consenso acerca de qual é mais preciso uma vez que se presume nenhum deles remove a droga ou fármaco depositado na sua totalidade.

4.4. ii) Influência dos tratamentos cosméticos

Na análise ao cabelo é necessário ter em consideração a possível interferência dos vários produtos e tratamentos capilares a que este está sujeito, nomeadamente o uso de cosméticos, tintas, permanentes, etc.

A lavagem do cabelo tem relativamente pouca influência sobre a remoção das drogas ou fármacos já incorporados, mas pode remover fármacos que sejam adsorvidos devido à contaminação ambiental (Baciu *et alii*, 2015).

Adicionalmente, os tratamentos cosméticos podem danificar a porosidade do cabelo, levando a uma contaminação externa facilitada, pois quanto maior a porosidade do cabelo, maior a sua capacidade de reter drogas ou fármacos presentes no ambiente (Baciu *et alii*, 2015).

É também necessário ter em conta que a porosidade pode ser influenciada por diferenças raciais ou ainda pelo descuido do cabelo (Baciu *et alii*, 2015).

Num dos estudos levados a cabo sobre a influência dos tratamentos de descoloração, verificou que as concentrações de todos os analitos neste tipo de cabelos eram inferiores às presentes em cabelos não submetidos a este tratamento (Baciu *et alii*, 2015).

Desta forma, o consumo pouco frequente de drogas ou fármacos pode não permitir a sua deteção em cabelo com este tipo de tratamento, devido às baixas concentrações de analito, no entanto, se o consumo de drogas for recorrente, mesmo após este tratamento de descoloração elas serão detetadas, ainda que as concentrações de metabolitos estejam diminuídas (Baciu *et alii*, 2015).

4.4. iii) Influência da cor do cabelo

A cor natural do cabelo tem também influência na avaliação da concentração de metabolitos presentes no cabelo, uma vez que as drogas ou fármacos têm capacidade de se ligar à melanina (Baciu *et alii*, 2015).

A concentração de metabolitos presente no cabelo é diretamente proporcional ao teor de melanina presente no cabelo, ou seja, quanto mais escuro o cabelo, maior o teor em melanina e por conseguinte, maior a concentração de drogas ou fármacos incorporados (Baciu *et alii*, 2015).

Kronstrand *et alii* realizaram um estudo com nove indivíduos aos quais foi administrada uma dose de codeína diária por via oral e, em seguida, as amostras de cabelo foram recolhidas uma vez por semana durante um mês (Baciu *et alii*, 2015).

Os autores verificaram que existia uma correlação entre a concentração de codeína e de melanina, pois a codeína estava aumentada sempre que a quantidade de melanina era maior (Baciu *et alii*, 2015).

Na tentativa de eliminar o enviesamento de resultados, os autores sugerem que as concentrações de fármaco no cabelo devem ser expressas em função da concentração de melanina, reduzindo assim a influência da cor do cabelo (Baciu *et alii*, 2015).

4.4. iv) Relação dose-concentração

A principal questão que se coloca é se após a análise quantitativa de cabelo este pode fornecer informação quanto à quantidade de droga ou fármaco consumida (Baciu *et alii*, 2015).

Os estudos realizados mostram uma fraca correlação entre a concentração existente no cabelo e a dose consumida (Baciu *et alii*, 2015).

Num estudo realizado por Kintz *et alii*, demonstrou não existir correlação entre as doses de heroína e a concentração de opióides totais medidos em amostras de cabelo de indivíduos expostos (Baciu *et alii*, 2015). O estudo consistiu na administração de várias doses diárias de heroína, compreendidas entre 30 e 800 mg, a indivíduos com características diferentes no que concerne ao cabelo, tais como a coloração, ou descoloração. Verificou-se que não existia uma correlação entre as doses administradas de heroína e as concentrações totais de opióides no cabelo (Baciu *et alii*, 2015). Os resultados deste estudo sugerem que a determinação quantitativa de drogas ou fármacos no cabelo para a determinação da concentração que foi ingerida não é aplicável, pois diversos são os fatores que se devem ter em conta tais como, a pureza da droga, o mecanismo de incorporação do fármaco no cabelo, o metabolismo de um fármaco, a frequência de abuso, a cor do cabelo e os tratamentos cosméticos a que este é submetido (Baciu *et alii*, 2015).

Como não é possível determinar a quantidade exata de medicamento ou droga que foi utilizada, alguns laboratórios têm proposto uma classificação qualitativa para as concentrações da droga (baixa, média e altas concentrações) como um guia geral para indicar o nível de uso de drogas, por exemplo, baixas concentrações correspondem a um uso ocasional ou baixo (por exemplo, uma ou duas vezes por semana), altas concentrações correspondem a um consumo diário (Baciu *et alii*, 2015).

V. Aplicações práticas

5.1. Estado nutricional

Os elementos presentes no corpo humano desempenham um papel importante em processos vitais tais como nas reações enzimáticas, na condução do impulso nervoso e na contração muscular (Wolowiec *et alii*, 2013).

A análise destes elementos em amostras de cabelo é bastante utilizada pelo facto de fornecer a concentração em que estão presentes no organismo. Desta forma, são recomendadas dietas para aumentar a concentração dos elementos em falta ou presentes em baixas concentrações ou são eliminados os metais tóxicos ao organismo através de reações de complexação (Pozebon *et alii*, 1999).

De facto, a análise de cabelo tem sido também solicitada como indicador do estado nutricional de indivíduos e de possíveis contaminações por metais pesados tais como, crómio (Cr), cobre (Cu), cobalto (Co), manganês (Mn), molibdénio (Mo), selénio (Se), zinco (Zn), estanho (Sn), níquel (Ni) e vanádio (V). Apesar de serem elementos essenciais ao organismo, a sua presença em quantidades excessivas pode provocar doenças ou até mesmo morte (Pozebon *et alii*, 1999).

Existem ainda outros elementos, tais como o arsénio (As), o mercúrio (Hg) e o bismuto (Bi) cuja presença em qualquer concentração é indesejável (Pozebon *et alii*, 1999).

É necessário ter em conta que poderão estar presentes quantidades vestigiais deste tipo de metais no organismo devido à alimentação e à poluição (Pozebon *et alii*, 1999).

5.2. Auxílio ao diagnóstico de patologias

Na literatura verifica-se que existe uma correlação entre o estado mineral do corpo e a presença de doenças físicas ou mentais (por exemplo, autismo, cancro, hipertensão, enfarte do miocárdio, doença renal e diabetes mellitus). A análise mineral ao cabelo é escolhida como uma ferramenta que reflete o panorama mineral do organismo dos

indivíduos, sendo que níveis mais elevados ou mais baixos de determinado mineral no cabelo são indicadores da presença ou ausência de doenças. Desta forma o perfil mineral do cabelo é uma ferramenta útil para o diagnóstico de muitas doenças (Wolowiec *et alii*, 2013).

Uma das doenças crônicas mais frequentes no mundo é a diabetes mellitus que se caracteriza por uma hiperglicemia resultante de deficiência absoluta ou relativa de insulina. A diabetes mellitus está intimamente associada ao desequilíbrio de oligoelementos, que é frequentemente o resultado de ingestão indevida, da exposição excessiva e de defeitos genéticos (Tsanaclis e Wicks, 2007).

Chen *et alii* (2014), efetuaram uma análise entre a relação da diabetes mellitus e os níveis de diversos elementos presentes no cabelo e na urina. Foram utilizadas 66 amostras de cabelo e 82 amostras de urina de indivíduos clinicamente saudáveis como controlo e 30 amostras de cabelo e 33 amostras de urina de doentes com diabetes mellitus tipo II, mas sem complicações. As idades variaram de 28-76, para o grupo controlo, quer na amostra de urina ou de cabelo e, no grupo de diabéticos a idade pode variar entre os 41-79 anos, também em ambas as amostras. Foram analisadas concentrações de oito elementos: lítio (Li), crómio (Cr), ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu), manganês (Mg), níquel (Ni) e vanádio (V). A fim de investigar qual a influência da idade sobre o nível de elementos, foram consideradas três faixas etárias diferentes dos grupos de controlo, para ambas as amostras, sendo considerados os intervalos: 28-39, 40-49 e 50-79 (Chen *et alii*, 2014).

De um modo geral, para as amostras de cabelo os elementos no grupo de controlo apresentaram uma concentração mais elevada do que no grupo de doentes diabéticos, no entanto, verificou-se que os níveis médios de lítio, zinco, cobre, ferro e manganês foram maiores nos grupos de diabéticos do que no grupo controlo nas amostras de urina (Tabela 2) (Chen *et alii*, 2014).

A idade é um fator importante na concentração destes elementos, uma vez que tanto na amostra de cabelo como na de urina, as concentrações de zinco e ferro têm tendência a diminuir com o aumento da idade. No caso específico do ferro, a sua concentração

diminui com a idade, principalmente por causa da ingestão de alimentos com reduzida concentração deste elemento e, além disso, também pelo aparecimento de doenças com o avanço da idade que prejudicam a absorção de ferro e / ou aumentam a sua excreção (Chen *et alii*, 2014).

Não foi possível quantificar os níveis de Cr nestas amostras por estarem abaixo do limite de quantificação. Quanto às amostras de urina, as concentrações da maioria dos elementos foram mais baixas no grupo controlo do que no grupo de doentes diabéticos (Tabela 3). Isto deve-se ao facto de alguns elementos serem excretados na urina a taxas mais elevadas em pacientes com diabetes do que os indivíduos normais (Chen *et alii*, 2014).

Em geral, concentrações mais elevadas de um elemento na urina implicam a sua deficiência no corpo, pois está a ser excretada. No caso do Zn, isto é um fator indicador no diagnóstico de diabetes (Chen *et alii*, 2014) dado que a sua deficiência e desequilíbrio pode desempenhar um papel importante na patogénese da diabetes tipo II. Concentrações baixas deste elemento podem afetar a capacidade das células dos ilhéus pancreáticos responsáveis pela produção e secreção de insulina, especialmente nas fases progressivas posteriores da diabetes tipo II (Tabela 3) (Chen *et alii*, 2014).

Tabela 3. Concentrações de vários oligoelementos no cabelo (ng/g) e na urina (µg/ml) (adaptado de Chen *et ali*, 2014).

	Grupo controlo	Grupo diabéticos
	Concentração (ng/g)	Concentração (µg/ml)
Cabelo		
Li	0,38 ± 0,340	0,112 ± 0,0514
Zn	146,23 ± 85,793	51,621 ± 6,9746
Cu	10,324 ± 4,886	0,5773 ± 0,0056
Fe	33,548 ± 33,913	15,653 ± 1,3841
Mn	9,2323 ± 12,500	2,4806 ± 0,2938
Ni	0,6457 ± 1,8804	0,0988 ± 0,0206
V	0,1375 ± 0,1282	0,1342 ± 0,0174
Urina		
Li	0,0097 ± 0,0070	0,0130 ± 0,0122
Zn	0,1289 ± 0,0847	0,3279 ± 0,2141
Cr	0,0077 ± 0,0070	0,0068 ± 0,0042
Cu	0,0783 ± 0,0210	0,0854 ± 0,0147
Fe	0,7147 ± 0,1539	0,8406 ± 0,2030
Mn	0,0167 ± 0,0100	0,0389 ± 0,0035
Ni	0,0081 ± 0,0015	0,0077 ± 0,0015
V	0,0077 ± 0,0049	0,0077 ± 0,0046

5.3. Desempenho humano

A análise do cabelo na investigação de fármacos e de drogas de abuso é atualmente aplicada em vários cenários como, por exemplo, na protecção de menores, em programas de controlo de abstinência de drogas e álcool em trabalhadores e/ou condutores, doping em desportistas e em toxicologia *post mortem* (Allibe *et alii*, 2015).

Como já foi mencionado, esta matriz oferece várias vantagens, dando especial realce ao facto da sua janela de detecção ser elevada (meses) e à colheita não ser invasiva (Allibe *et alii*, 2015).

5.3. i) Medicina no trabalho

Muitos empregadores exigem que os funcionários se submetam periodicamente a testes de drogas para verificar o uso de drogas ilícitas ou o excesso de consumo de álcool como forma de garantir a segurança corporativa, segurança pública e minimizar imensas perdas de produtividade. Até à data, o teste de drogas na urina tem sido a técnica mais comum para detecção do uso de drogas no local de trabalho. A partir do início da década de 1980, amostras alternativas, tais como o fluido bucal ou suor tem sido testados (Pragst e Balikova, 2006).

5.3. ii) Condução de veículos

A dependência de drogas e abuso regular de drogas são geralmente incompatíveis com a capacidade de condução. Na Alemanha e Itália, a análise do cabelo faz parte do processo de concessão ou re-concessão da carta de motorista. No caso da Alemanha, é analisado um segmento da amostra de cabelo que abrange um período 12 meses. Em Itália, a análise ao cabelo está incluída num conjunto de testes clínicos e laboratoriais para investigar o comportamento toxicológico do requerente à carta de motorista e como forma de verificar a aptidão física e mental dos ex-utilizadores. De acordo com a legislação italiana, após cessação de consumo de drogas é necessário a recolha e análise de 8 amostras de urina e cabelo recolhidas ao longo de 40 dias. As amostras de cabelo (4-5 cm de comprimento) são rastreadas para os opiáceos, cocaína e ecstasy por radioimunoensaios (nível de cut-off de 0,1 ng/mg). Os resultados positivos são depois alvo de confirmação por HPLC, CE ou GC-MS (Pragst e Balikova, 2006).

Em Itália, a maioria dos acidentes e mortes nas estradas são causadas por condutores que estão sob o efeito de substâncias psicoativas, nomeadamente opiáceos, cocaína, cannabis e seus metabolitos. Estas são, as substâncias ilícitas mais consumidas em Itália (Tassoni *et alii*, 2014).

Durante o período de 2004 a 2013, em Itália foram analisadas cerca de 8612 amostras de cabelo o que demonstra que este tipo de análise tem sido utilizada com maior relevância ao longo dos anos. Isto deve-se ao facto de a condução sob efeito de drogas ser considerado um problema de saúde pública significativo. Devido à lei italiana permitir a proibição ou revogação da licença de condução do motorista infrator, o consumo destas substâncias tem vindo a diminuir desde 2004 até 2013, como se verifica na figura 6 (Tassoni *et alii*, 2014).

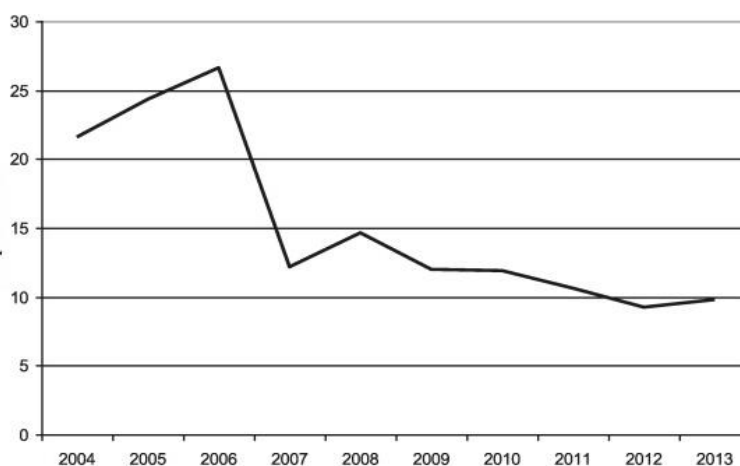


Figura 6. Frequência de resultados positivos para o consumo de opiáceos, cocaína, cannabis e seus metabolitos ao longo dos anos nos condutores italianos (adaptado de Tassoni *et ali*, 2014).

5.3. iii) Controlo de doping

Para várias modalidades desportivas, as regras oficiais indicam que um resultado de doping positivo é estabelecido pela deteção química inequívoca de uma substância proibida na urina. A análise de cabelo pode complementar estes testes, mas não os substitui. Assim, um resultado positivo numa amostra urina não pode ser anulado por um resultado negativo da mesma substância numa amostra de cabelo. No entanto, o resultado positivo da droga do cabelo pode demonstrar exposição durante o período anterior à recolha da amostra de urina. A análise do cabelo é importante para testar substâncias permanentemente proibidas, tais como os esteróides anabolizantes. Em contraste, as substâncias proibidas apenas temporariamente (durante o período de

competição, por uma determinada via, ou acima de uma certa dose) geralmente não podem ser controladas desta forma (Pragst e Balikova, 2006).

5.4. Responsabilidade penal e toxicodependência

A análise do cabelo pode ser usada em casos criminais, a fim de averiguar se foram efetuados consumos regulares de drogas no período de tempo a que se reporta o crime. Nestas situações, o diagnóstico de dependência é geralmente tido como atenuante na sentença. Esse diagnóstico pode ser apoiado pelos resultados obtidos em amostras de cabelo pelo que seria útil e aconselhável efetuar a recolha da amostra logo após a detenção (Pragst e Balikova, 2006).

No caso dos presos, os testemunhos de autoconsumo de drogas nem sempre são verdadeiros, uma vez que é possível obter atenuantes à pena como por exemplo, internamentos em centros de recuperação, se forem considerados viciados no consumo de drogas de abuso (Vignali *et alii*, 2012). Assim, este tipo de relatos de consumo excessivo de drogas necessitam de determinação quantitativa das mesmas para validação (Vignali *et alii*, 2012).

5.5. Diagnóstico de consumo e intoxicação crónica

As amostras de cabelo podem ser utilizadas como uma ferramenta de diagnóstico para a deteção de abuso de drogas e elucidação de outras intoxicações crónicas (por poluição ambiental de longo prazo, adulteração de alimentos ou atividade criminal) (Pragst e Balikova, 2006). De facto, na presença de sintomas clínicos patológicos (hepatotoxicidade, neurotoxicidade) sem explicação lógica a hipótese de intoxicação por uma substância desconhecida deve ser considerada no diagnóstico diferencial.

Vários estudos analisaram amostras de cabelo de indivíduos em abstinência, a fim de determinar a identidade de drogas de abuso antes do tratamento e controlar as mudanças no comportamento de consumo após o seu início. A análise segmentar do cabelo pode fornecer um histórico do consumo (incluindo mudanças de uma droga para outra ou mistura entre drogas ilícitas e terapêuticas) e dos períodos de abstinência. Apesar das

vantagens, a utilização desta técnica não tem aplicação generalizada devido ao aumento do custo e maior tempo de análise em comparação com a urina (Pragst e Balikova, 2006).

5.6. Toxicologia *post mortem*

É comum a recolha de amostras de cabelo durante a autópsia. Apesar de vários estudos demonstrarem que em casos de intoxicação aguda o exame à raiz do cabelo pode ser bastante útil (por ser encontrarem elevadas concentrações de algumas drogas), o principal uso da análise de cabelo nestes casos é auxiliar a causa da morte quanto ao consumo crónico (ou não) de drogas (Pragst e Balikova, 2006).

O consumo a longo prazo ou a intoxicação crónica pode induzir vários efeitos nocivos ou agravar doenças preexistentes. Por exemplo, o abuso crónico de metanfetaminas e cocaína está associado com o aparecimento de doenças cardiovasculares e, por isso, consumidores desta substância têm geralmente alterações morfológicas no coração. Assim, a deteção de drogas em segmentos de cabelo pode ser útil na avaliação da causa de morte (Pragst e Balikova, 2006).

Também a análise da presença de esteróides anabolizantes pode ser útil para explicar a morte inesperada de jovens atletas como consequência do seu abuso crónico (Pragst e Balikova, 2006).

Existem drogas cuja concentração aumenta após a morte em consequência da sua distribuição de tecidos e órgãos para a corrente sanguínea, portanto é necessário ter em conta que ocorre uma serie de processos no cadáver capazes de influenciar o resultado toxicológico (Kintz, 2004).

A análise de xenobióticos usando o cabelo como matriz tem vantagens nos casos em que o cadáver se encontra em avançado estado de decomposição, uma vez que esta matriz permite uma análise retrospectiva, pois o cabelo não cresce continuamente mas sim em ciclos. Permite deste modo, avaliar a presença ou ausência dos xenobióticos em

momentos anteriores à morte, o que é importante em situações em que seja desconhecido o historial clínico do indivíduo (Balikova, 2005).

Este tipo de análise retrospectiva pode indicar se o indivíduo estava exposto de forma crónica ou ocasional ao xenobiótico (Kintz, 2004).

VII. Conclusões

O cabelo como matriz biológica tornou-se fundamental com o decorrer dos anos em alternativa às matrizes mais comumente utilizadas, o sangue e a urina (Baciu et alii, 2015). Tem recebido especial importância devido à sua capacidade de retenção e armazenamento por um período de tempo relativamente longo de várias substâncias, à sua janela de deteção ser substancialmente mais longa (meses a anos) o que permite uma investigação retrospectiva de abuso crónico de drogas e a possibilidade de identificar se se está perante uma exposição de curto ou longo prazo e, ainda, devido ao facto de ser uma matriz bastante estável, fácil de recolher, transportar e armazenar (Kempson e Lombi, 2011).

Em comparação com outras matrizes, como por exemplo o caso da urina possui também a vantagem de existir maior dificuldade em adulterar resultados (Kempson e Lombi, 2011).

Por seu lado, o cabelo é uma matriz bastante complexa o que exige que sejam aplicados métodos de deteção bastante sensíveis e seletivos de análise (Baciu et alii, 2015).

Os avanços tecnológicos levaram ao uso do cabelo como uma ferramenta útil e objetiva, proporcionando o desenvolvimento de novas gerações GC-MS e HPLC-MS que passaram a ser tecnologias normais em laboratórios toxicológicos (Pragst e Balikova, 2006).

Esta matriz é obrigatória em muitas áreas da investigação toxicológica como por exemplo no controlo de doping, na monitorização clínica de fármacos, nas mortes relacionadas com o consumo de drogas, nos casos de criminalidade associadas ao consumo de drogas de abuso ou álcool, ou ainda, em casos de exposição ocupacional (Pragst e Balikova, 2006).

Existe algum progresso no que toca à análise de cabelo, no entanto existem pontos que podem ser melhorados como por exemplo a preparação de padrões de referência confiáveis para a calibração e controlo de qualidade, a padronização dos processos de

descontaminação e de extração de procedimentos, o estabelecimento de padrões de desempenho para a droga, fármacos e identificação de metabolito, o uso de valores cut-off cientificamente fundados, a fim de facilitar a interpretação consistente e abordagem de consensual deste tipo de análise (Pragst e Balikova, 2006).

VIII. Referências bibliográficas

- Allibe, N., et alii (2015). Aminotriptyline poisoning of a baby: How informative can hair analysis be? *Forensic Science International*, 249, pp. 53-58.
- Baciu, T., et alii (2015). Recent trends in analytical methods and separation techniques for drugs of abuse in hair. *Analytica Chimica Acta*, 856, pp. 1-26.
- Balikova, M. (2005). Hair analysis for drugs of abuse. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 149, pp. 199-207.
- Bermejo, P., et alii (2004). Enzymatic digestion and ultrasonication: a powerful combination in analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23, pp. 654-663.
- Chen, H., et alii (2014). The diagnostics of diabetes mellitus based on ensemble modeling and hair/urine element level analysis. *Computer in biology and medicine*, 50, pp. 70-75.
- Cooper, G., Moeller, M. e Kronstrand, R. (2008). Current status of accreditation for drug testing in hair. *Forensic Science International*, 176, pp. 9-12.
- Cooper, G. a. A. (2011). Hair testing is taking root. *Annals Of Clinical Biochemistry*, 48, pp. 516-530.
- Junior, E. (2012). Investigação policial: toxicologia postmortem. *Jus Navigandi*, 29, pp.
- Kempson, I., Lombi, E. (2011). Hair analysis as biomotor for toxicology, disease and health status. *The Royal Society of Chemistry*, 40, pp. 3915-3940.
- Kintz, P. (2004). Value of hair analysis in postmortem toxicology. *Forensic Science International*, 142, pp. 127-134.

Lima, E. e Silva, C. (2007). Cabelo como Matriz Analítica Alternativa para a determinação de drogas de abuso. *NewsLab*, 82, pp. 156-168.

Lozano, J., et alii (2007). Biological matrices for the evaluation of in utero exposure to drugs of abuse. *Ther Drug Monit*, 29, pp. 711-34.

Pozebon, D. et alii (1999). Análise de cabelo: uma revisão dos procedimentos para a determinação de elementos traço e aplicações. *Química nova*, 22 (6), pp. 838-846.

Pragst, F. e Balikova, M. A. (2006). State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clinica Chimica Acta*, 370, 17-49.

Qiu, W. et alii. (2007) GC-MS Determination of Sucralose in Splenda. *Chromatographia* 66, pp. 935-939

Sue Jickells, S., Negrusz, A. (2008). Analytical Forensic Toxicology. *Pharmaceutical Press* 1, pp.

Tsanaclis, L. et alii (2011). Análise de drogas em cabelos ou pêlos. *Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*, 4, pp. 06-46.

Tassoni, G. et alii (2014). Hair analysis to evaluate drug abuse in driver's license regranting procedures. *Forensic Science International*, 244, pp. 16-19.

Valente, A. e Augusto, F. (2000). Microextração por fase sólida. *Química nova*, 23 (4), pp. 523-530.

Vignali, C. et alii (2012). Hair testing and self-report of cocaine use. *Forensic Science International*, 215, pp. 77-80.

Wolowiec, P. *et al.* (2013). Hair analysis in health assessment. *Clinica Chimica Acta*, 419, 139 – 171.