

IDENTIFICAÇÃO DE CLORIDRATO DE METADONA EM LARVAS DE *Lucilia cuprina* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) POR GC-MS

THALIA C. L. SOARES¹; KATHLEEN T. WINKEL²; LETÍCIA B. FERREIRA²;
JANDER L. F. MONKS³; PEDRO J. S. FILHO³; CLARISSA M. DOS SANTOS⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – csoaresthalia@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas

³Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sul-Rio-Grandense Campus Pelotas

⁴Universidade Federal de Pelotas – clafarm_mm@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Entomologia Forense é a “ciência que aplica os conhecimentos relativos à biologia e à ecologia de insetos para auxílio na elucidação de determinados aspectos de um crime” (VELHO, et al. 2017), fornecendo um conjunto adicional de informações para compor uma prova criminal, especialmente no que diz respeito à determinação do intervalo *post mortem* (IPM). Uma vez que a estimativa do IPM baseia-se no desenvolvimento do inseto, é importante ressaltar que, as substâncias tóxicas às quais os insetos necrófagos são expostos enquanto se alimentam de restos cadavéricos contaminados, podem ser absorvidas, fixadas no metabolismo e excretadas, podendo assim alterar padrões de oviposição e desenvolvimento a inseto adulto (PARRY, et al. 2011). Nesse sentido, além de interferir na determinação do IPM, xenobióticos podem ser analisados em vestígios entomológicos de forma alternativa, quando não há disponibilidade de tecidos e fluídos corporais, como em casos de avançado estágio de decomposição (INTRONA, et al. 2001; KHARBOUCHE, et al. 2008; THYSSEN, GRELLA, 2011). Essa área da entomologia é conhecida como entomotoxicologia forense e tem como objetivo estudar substâncias tóxicas em insetos que colonizaram cadáveres, com a finalidade de avaliar a presença destas no organismo da vítima ou, ainda, como podem interferir no ciclo de vida dos insetos (PASSAGLI, 2013).

A metadona, devido sua ação no sistema nervoso central, é utilizada no tratamento de dor aguda e crônica, no entanto, estudos indicam que cerca de 3% dos pacientes com dor crônica não oncológica e que administram opióides regularmente, tornaram-se dependentes (UNODC, 2017). Pesquisas mostram uma crescente incidência de mortes nas quais se verificou a presença de metadona pós-morte associada a outras drogas como benzodiazepínicos e cocaína (WOLF, et al. 2004). Tais fatos demonstram a importância do estudo dos métodos disponíveis para identificação dessas substâncias como causa da morte. Assim, este estudo tem por objetivo identificar Cloridrato de Metadona em larvas de *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae), mosca varejeira, utilizando a cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

2. METODOLOGIA

O estudo foi desenvolvido utilizando colônias de espécimes adultos da mosca varejeira, *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae), mantidos no Laboratório de Biologia de Insetos do Instituto de Biologia (IB) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), em gaiolas plásticas transparentes, com aberturas laterais vedadas com telas e em ambiente com temperatura e umidade controladas (25 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$). Os espécimes foram alimentados com dieta à base de açúcar e proteína (ESTRADA, et al. 2009).

Para estimular a oviposição, carne bovina foi mantida em um recipiente na gaiola por 2 h. Após a eclosão das larvas, estas foram transferidas para uma dieta artificial (ESTRADA, et al. 2009). Para cada grupo experimental foram transferidas 200 larvas recém eclodidas, as quais foram submetidas a três tratamentos de concentrações 400 µg/L (Tratamento 1), 800 µg/L Tratamento 2), 1200 µg/L (Tratamento 3) de cloridrato de metadona e grupo controle (Tratamento 4). No grupo controle não houve a adição da droga e foi mantido sob as mesmas condições a fim de observar o desenvolvimento dos tratamentos analisados. De cada grupo analisado foram retirados 10 espécimes (a partir de 24 h de desenvolvimento até enquanto era possível encontrar imaturos vivos na dieta) aleatoriamente, a cada 12 h. As larvas foram lavadas 3x em água destilada e secas em papel filtro, posteriormente sacrificadas e armazenadas em ultrafreezer a -80°C.

Ampola de cloridrato de metadona 10000 mg/L foi utilizada para o preparo de uma solução estoque na concentração de 100 mg/L em hexano e essa foi diluída na concentração de 10 mg/L. Após, foi avaliada a metodologia utilizando uma sequência de soluções de cloridrato de metadona, nas concentrações de 200 µg/L, 400 µg/L, 800 µg/L, 1200 µg/L e 2400 µg/L com a finalidade de avaliar a menor concentração detectável nesta metodologia.

Foram preparadas quatro amostras contendo larvas alimentadas em dieta sem cloridrato de metadona, para avaliar o efeito da matriz na determinação do medicamento. Para isso, foi pesado, aproximadamente, 0,1 g de larva para cada uma das quatro amostras, à qual foi adicionado 1 mL de solução 400 µg/L (F1), 800 µg/L (F2) e 1200 µg/L (F3) e, por fim, a mesma massa de larvas, no entanto, sem adição de metadona (F4), com a finalidade de avaliar a presença de outras substâncias no mesmo tempo de retenção da metadona. Dessa forma, foi realizado o procedimento de extração, adicionando-se 1 mL de NaOH 0,05 mol/L e 1 mL de hexano. Logo após, as amostras foram submetidas a banho de ultrassom por 30 min. A extração com hexano e ultrassom foi repetida três vezes para cada amostra e, por fim, o hexano foi evaporado até obter 1 mL de solução. Posteriormente, foram preparadas amostras de larvas provenientes dos Tratamentos 1, 2 e 3, cada amostra contendo aproximadamente 0,1 g de larvas, com exceção das larvas com 60 h que, em função da pequena quantidade, foi usado cerca de 0,02 g de larvas. Assim, foram preparadas em duplicatas, amostras de larvas com tempos de vida de 60 h, 72 h e 84 h, totalizando seis amostras por concentração, e mais duplicata do Tratamento 4, com tempo de vida de 84 h.

As amostras foram analisadas por cromatografia à gás acoplada a espectrometria de massas (GC-MS), modelo GCMS-QP2010/Shimadzu, equipado com injetor automático AOC-20i, equipamento localizado no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sul-Rio-Grandense Campus Pelotas. As condições operacionais do GC-MS são descritas a seguir: coluna OV-5MS 30 m x 0,25 mm, x 0,25 µm; temperatura do injetor 260 °C; temperatura da interface 280 °C; volume injetado 1 µL; programa de temperatura de eluição 80 °C a 280 °C (20°C/min) - 15 min; vazão do gás (He) 1,20 mL /min; modo SIM (m/z 72, 91 e 309); faixa de massa 43 a 500 m/z; voltagem do filamento 70 eV.

Os métodos de extração e determinação da metadona foram baseados nas metodologias descritas por BERMEJO et al. (2000) com ajustes pertinentes ao estudo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos mostraram que em uma mesma concentração de cloridrato de metadona, as amostras que continham o medicamento na presença da matriz biológica (larva), apresentaram área da base menor que as amostras que continham apenas o medicamento. Também foi observada a eluição de uma substância com tempo de retenção próximo ao da metadona, sendo identificada, de acordo com a biblioteca de espectros do GC-MS como sendo, possivelmente, o feniletanoato de dodec-9-inila. Além disso, foi avaliada a linearidade das concentrações relacionando com as respectivas áreas de base, apresentando coeficiente de correlação linear de 0,9942. Esse resultado mostra-se favorável frente às variáveis as quais o estudo é suscetível, tais como, tempo de exposição das larvas ao alimento, metabolismo e desenvolvimento dos insetos, preparo de amostra e condições cromatográficas.

De acordo com os resultados das áreas para as respectivas concentrações foram obtidos os limite de detecção ($LD=0,09486 \mu\text{g/L}$) e quantificação ($LQ=0,3159 \mu\text{g/L}$) para avaliar a possibilidade de quantificar o medicamento. A quantificação de drogas em larvas poderia fornecer informações quanto à dose administrada antes da morte, no entanto, essa correlação não é bem estabelecida devido às variações nas concentrações, observadas por alguns autores (GOSELIN, et al. 2011; SADLER, et al. 1995). De forma similar, no presente estudo foi observada variação entre as amostras de larvas alimentadas em um mesmo substrato e com mesmo tempo de vida, com suas respectivas áreas de bases. Ainda assim, CAMPOBASSO et al. (2004) citam que as larvas, mesmo que apenas para análises qualitativas, podem ser consideradas como amostras confiáveis para detecção de drogas, colaborando para o diagnóstico final de intoxicação por narcóticos, o que é particularmente relevante para corpos em estágios avançados de decomposição onde há suspeita de intoxicação.

De acordo com o espectro de massas da metadona, foi observado que o fragmento 72 é o de maior abundância relativa (pico base) e no espectro de massas do feniletanoato de dodec-9-inila, foi observado que o fragmento 91 apresentou a maior abundância relativa (pico base), diferenciando-o da metadona. Nesse sentido, a diferença na abundância relativa dos íons 72 e 91 permitiu a diferenciação da metadona nas amostras de larvas que foram alimentadas em dieta contendo cloridrato de metadona.

Nas amostras de larvas alimentadas com dieta contendo cloridrato de metadona, o método de extração pode não ter sido eficiente para a determinação do medicamento. De acordo com o estudo utilizado como referência (BERMEJO, et al. 2000), os autores obtiveram resultados satisfatórios, no entanto, embora o analito seja o mesmo, há diferença entre a matriz biológica referida e a matriz utilizada nesse estudo. GOSELIN, et al. (2010) citam que o uso de ácidos fortes ou digestão enzimática para amostras quitinizadas é recomendado para decompor a matriz quitina / proteína, permitindo a liberação dos fármacos de interesse. Essa poderia ser uma alternativa para continuação do estudo proposto, para aumentar a eficiência do método e obter melhores resultados na extração do cloridrato de metadona.

4. CONCLUSÕES

Foi possível identificar cloridrato de metadona em larvas de *L. cuprina* através da técnica de GC-MS. É importante ressaltar que se trata de uma pesquisa inédita, considerando a técnica analítica utilizada, o medicamento e a matriz biológica. Assim, esse estudo pode fornecer informações complementares para elucidar casos de morte relacionados a intoxicações, onde as matrizes

toxicológicas usuais são inviáveis, contribuindo de forma inovadora em investigações criminais. Ainda assim, estudos complementares devem ser realizados com a finalidade de tornar a metodologia avaliada mais eficiente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERMEJO, A. M.; SEARA, R.; DOS SANTOS LUCAS, A. C.; TABERNERO, M. J.; FERNÁNDEZ, P.; MARSILI, R. Use of Solid-Phase Microextraction (SPME) for the Determination of Methadone and Its Main Metabolite, EDDP, in Plasma by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 24, 66-60, 2000.
- CAMPOBASSO, C. P.; GHERARDI, M.; CALIGARA, M.; SIRONI, L.; INTRONA, F. Drug analysis in blowfly larvae and in human tissues: a comparative study. **Int. J. Legal Med.** v. 118, 210–214, 2004.
- ESTRADA, D.A.; GRELLA, M.D.; THYSSEN, P.J.; LINHARES, A.X. Taxa de Desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) em Dieta Artificial Acrescida de Tecido Animal para Uso Forense. **Neotrop. Entomol.**, v. 38, 203-207, 2009.
- INTRONA, F.; CAMPOBASSO, C.P.; GOFF, M.L. Entomotoxicology. **Forensic Sci. Int.**, v. 120, 42-47, 2001.
- GOSSELIN, M.; FERNANDEZ, M.M.R.; WILLE, S.S.R.; SAMUN, N.; DE BOECK, G.; BOUREL, B. Quantification of methadone and its metabolite 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine in third instar larvae of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J. Anal Toxicol.**, v.7, 374-380, 2010.
- GOSSELIN, M.; DI FAZIO, V.; WILLE, S.M.R.; FERNANDEZ, M.M.R.; SAMYN, N.; DE BOECK, G.; BOUREL, B.; RASMONT, P. Methadone determination in puparia and its effect on the development of *Lucilia sericata* (Diptera, Calliphoridae). **Forensic Sci. Int.** v. 209, 154-159, 2011.
- KHARBOUCHE, H.; AUGSBURGER, M.; CHERIX, D.; SPORKERT, F.; GIROUD, C.; WYSS, C.; CHAMPOD, C.; MANGIN, P. Codeine accumulation and elimination in larvae, pupae and imago of the blowfly *Lucilia sericata* and effects on its development. **Int. J. Legal Med.**, v. 122, 205–211, 2008.
- PASSAGLI, M. F. **Ciências Forenses: Toxicologia Forense: Teoria e Prática**. Campinas: Millennium Editora, 2013.
- PARRY, S.; LINTON, S.M.; FRANCIS, P.S.; O'DONNELL, M.J.; TOOP, T. Accumulation and excretion of morphine by *Calliphora stygia*, an Australian blow fly species of forensic importance. **J. Insect. Physiol.**, v. 57, 62-73, 2011.
- THYSSEN, P.; GRELLA, M.D. Efeito da escopolamina sobre o desenvolvimento de *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) e sua importância para a estimativa de intervalo pós-morte. **RBC**, v. 1, 39-42, 2011.
- SADLER, D. W.; FUKE, C.; COURT, F.; POUNDER, D. J. Drug accumulation and elimination in *Calliphora vicina* larvae. **Forensic Science International**, v. 71, 191-197, 1995.
- VELHO, J. A. GEISER, G. C.; ESPINDULA, A. **Ciências Forenses: Uma Introdução às Principais Áreas da Criminalística Moderna**. Campinas: Millennium Editora, 2017.
- United Nations Office on Drugs and Crime, World Drug Report 2017 (ISBN: 978-92-1-148291-1, eISBN: 978-92-1-060623-3, United Nations publication, Sales No. E.17.XI.6).
- WOLF, B.C.; LAVEZZI, W.A.; SULLIVAN, L.M.; FLANNAGAN, L.M. Methadone-Related Deaths in Palm Beach County. **J. Forensic Sci.**, v. 49, 1-4, 2004.