

## Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de fentanil e seus análogos em amostras de sangue seco em papel (DBS)

Júlia M. M. Kahl\*, Kelly F. da Cunha, Prof. Dr. José Luiz da Costa

### Resumo

O consumo mundial de opióides sintéticos de forma abusiva tem apresentado um aumento considerável, sendo este grupo o responsável, nos últimos dois anos, por 4 em cada 5 óbitos relacionados ao uso de drogas. Este grupo de drogas contempla (entre outras substâncias) o fentanil e seus análogos estruturais, que foram aplicados a técnica de sangue seco em papel (DBS), analisados e validados em LC-MS/MS e, posteriormente, terão suas estabilidades estudadas por um período de 180 dias.

### Palavras-chave:

Fentanil, DBS, LC-MS/MS.

### Introdução

O fentanil é um analgésico sintético usado para induzir e manter anestésias e sedações, sendo um fármaco de elevada potência, chegando a ser 80 vezes mais potente que a morfina. Diversos casos de intoxicações graves ou mesmo mortes por overdose causadas por estas substâncias têm sido descritos na literatura recente, o que justifica a necessidade do desenvolvimento de estratégias analíticas que permitam a identificação e quantificação deste tipo de substância em exames toxicológicos. Visto isso, o objetivo do trabalho é desenvolver um método baseado em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) para determinação de fentanil, 9 análogos e 2 metabólitos, em amostras de sangue seco em papel (*dried blood spot*, DBS). Objetiva ainda de estudar a estabilidade destas substâncias em DBS, com a hipótese de que esta técnica de armazenamento aumenta a estabilidade das substâncias em análise.

### Resultados e Discussão

Soluções de trabalho dos analitos, em concentrações crescentes, foram preparadas para fortificar amostras de sangue branco. Uma alíquota de 15  $\mu$ L do sangue fortificado foi adicionada em um disco de DBS (Figura 1) previamente perfurado (6 mm) e deixado secar, em temperatura ambiente, por 3 horas. A extração das amostras foi feita com 300  $\mu$ L de metanol contendo padrão interno (fentanil-d5 e norfentanil-d5, 0,25 ng/mL) e agitação em ultrassom por 5 min. Do solvente extrator, 250  $\mu$ L foi evaporado ( $N_2$ ), reconstituído com 100  $\mu$ L de  $H_2O/MeOH$  (80:20) e 2  $\mu$ L foi injetado no sistema LC-MS/MS (LCMS 8060, Shimadzu, Japão). O método está sendo validado seguindo as recomendações da *Scientific Working Group for Forensic Toxicology* (SWGTOX).

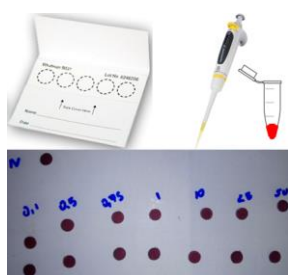


Figura 1. Preparo das amostras de DBS.

Foram realizados 3 dias de validação até o momento. O método se apresentou linear na faixa de concentração entre 0,1 e 50 ng/mL ( $r > 0.992$ ,  $1/x^2$ ), com valores de precisão e exatidão para os controles de qualidade (CQ) baixo (0,3 e 1,5 ng/mL), médio (5 ng/mL) e alto (40 ng/mL) dentro dos  $\pm 20\%$  recomendados. A recuperação apresentou uma média de 52% e o efeito matriz máximo foi de -25%.

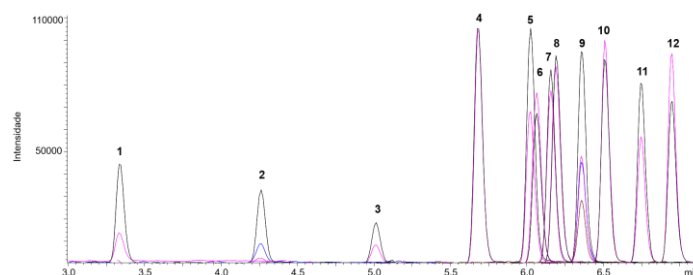


Figura 2. Cromatograma da amostra de DBS a 1,5 ng/mL (CQ baixo). 1 acetil norfentanil; 2 norfentanil; 3 remifentanil; 4 acetilfentanil; 5 thiofentanil; 6 alfentanil; 7 fentanil; 8 carfentanil; 9 furanilfentanil; 10 acrilfentanil; 11 sufentanil; 12 valerilfentanil.

### Conclusões

O método para determinação de fentanil e análogos em DBS tem se apresentado preciso e confiável. A validação será finalizada e os testes de estabilidade para armazenamento dos controles baixo e alto à 25, 4 e -20  $^{\circ}C$  por 180 dias serão realizadas.

### Agradecimentos



<sup>1</sup> SWGTOX Standard practices for method validation in forensic toxicology. *J Anal Toxicol.* 2013;37(7):452-74.

<sup>2</sup> Volkow ND, Collins FS. The Role of Science in Addressing the Opioid Crisis. *New Eng J Med.* 2017;377(4):391-4.