

OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS EM MATERIAL BIOLÓGICO

Deborah Thais Palma Scanferla¹ (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Gabriela Felber Fratucci², Kleber Ota de Oliveira³, Vinicius Stela Menotti³, Simone Aparecida Galerani Mossini^{2,3} (Orientador), e-mail: sagmossini@uem.br

¹Curso de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR

²Laboratório de Toxicologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR

³Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR

Área e subárea: Ciências da Saúde / Farmácia / Toxicologia

Palavras-chave: Substâncias psicoativas; extração; cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.

Resumo

O uso de substâncias psicoativas (SPA) está possivelmente envolvido com ocorrências de lesões corporais e mortes súbitas ou violentas, muitas vezes relacionadas à acidentes de trânsito, tornando-se um problema de Saúde Pública. A detecção de SPA é então de fundamental importância para o aprimoramento do diagnóstico, auxiliando o acompanhamento de tratamento e tornando a prevenção mais eficaz. É muito utilizada na rotina em toxicologia clínica, forense, no controle de dopagem nos esportes e em teste de drogas no ambiente de trabalho. A técnica de detecção consiste na extração que é realizada inicialmente com a preparação de amostras biológicas, chamada etapa pré-analítica, ou de pré-tratamento, as quais devem ser analisadas visando a garantia, segurança e exatidão na quantificação e identificação dos compostos em estudo. O presente trabalho teve por objetivo a otimização de técnicas de extração de substâncias psicoativas, para posterior análise por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM), visando à confirmação de positividade de amostras, após triagem toxicológica. A substância psicoativa denominada cocaína e seu produto de biotransformação, benzolilecgonina, foram extraídas após a otimização da técnica de extração em fase sólida e a sua presença foi confirmada pelo cromatograma e também pelo espectro de massas com a presença de íons confirmatórios. A matriz biológica utilizada no presente trabalho foi a urina, devido a sua simplicidade de coleta, pela obtenção de grandes volumes e ainda, pela ampla janela de detecção em intervalos de tempo maior entre exposição e análise laboratorial.

Introdução

Substâncias psicoativas (SPA) são drogas que provocam alteração do estado mental, e referem-se às substâncias de abuso ou produtos capazes de causar dependência (OGA *et al.*, 2014). Entre as principais drogas de uso abusivo estão a cocaína, maconha e o álcool, sendo consideradas responsáveis por grandes problemas mundiais de saúde pública (UNODC, 2009). As análises toxicológicas para a identificação da presença de SPA, em amostras biológicas, incluem os procedimentos de triagem para identificar as amostras positivas, e posteriormente a confirmação por técnica específica como a Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) (ELLER, 2014).

Devido à necessidade de se analisar esses compostos em baixas concentrações, os mesmos devem ser isolados da matriz onde se encontram e analisados por técnica confirmatória, como a CG-EM, porém, os métodos analíticos mais sensíveis recorrem a processos pré-analíticos e de pré-concentração. Inicialmente ocorrerá a preparação das amostras biológicas, a qual exige técnicas de extração, que devem ser realizadas visando a garantia, segurança e exatidão na quantificação e identificação dos compostos em estudo.

Dentro desse contexto, foi objetivo desse trabalho a otimização da etapa pré-analítica de preparo de amostras para determinação de substâncias psicoativas em material biológico, para posterior análise por CG-EM.

Materiais e métodos

O método de preparo e análise é escolhido para cada tipo de substância psicoativa, uma vez que deverá envolver processos que avaliem e garantam a eficiência e segurança, na rotina do laboratório, visando resultados confiáveis e satisfatórios.

Desta forma, no presente trabalho foram avaliadas metodologias de extração para substâncias psicoativas em matriz biológica urina. De acordo com características, dados relatados em artigos científicos, e procedimentos utilizados em outros laboratórios e os resultados obtidos, as técnicas escolhidas foram: extração em fase sólida (EFS) e a extração líquido-líquido (ELL). Assim, a partir delas, seguiu-se para otimização da etapa pré-analítica de preparo de amostras para posterior confirmação por CG-EM. Para determinação da presença de cocaína e produtos de biotransformação, foi padronizada a extração em fase sólida (SPE), a qual é atualmente uma das técnicas mais utilizadas para extração e/ou concentração de amostras complexas, permitindo que analitos em concentrações muito baixas sejam detectados através de métodos confirmatórios, como a cromatografia gasosa (JARDIM, 2010).

Extração SPE

O processo de extração em fase sólida (EFS) selecionado para esse estudo, consistiu em um método proposto por Yonamine e colaboradores (2004), em que foram utilizados cartuchos de extração de fase mista, *Bond Elut Certify®* - Agilent. No início do processo foram utilizados tubos de centrífuga de 15 ml, aos quais foram adicionados 2,5 mL de amostra de urina, 37,5 µL do padrão interno (Benzoilecgonina-d3 (BE-d3), cocaetileno (CE-d3) ou cocaína (COC-d3) em concentração 10 µg/ml), realizando tal processo em seis replicadas para seis diferentes concentrações. Após foram adicionados 2,0 mL de água destilada. O pH das amostras foi ajustado entre 6,0 e 7,0. Em seguida foram adicionados 2,0 mL de tampão fostato de sódio 0,1 mol.L⁻¹ pH 6,0. Para o condicionamento dos cartuchos foram adicionados 2,0 mL de metanol até que todo o volume fluísse pelo cartucho, em seguida foram adicionados 2,0 mL de tampão fostato de sódio 0,1% pH 6,0. Um fluxo de aproximadamente uma gota por segundo foi estabelecido e com o auxílio de uma pipeta Pasteur, foi adicionada a amostra de urina. Para lavagem foi utilizado 6,0 mL de água destilada seguida de 3,0 mL de HCl 0,1 mol.L⁻¹, e por fim foi adicionado 3,0 mL de metanol. A eluição foi realizada com 3,0 mL de solução dediclorometano/isopropanol/hidróxido de amônio (12:3:0,3 mL), recém-preparado. A alíquota foi evaporada a 40 °C em banho-maria e armazenada em freezer. Para o processo de derivatização foram adicionados 25,0 µL do reagente BSTFA (bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida), 1% TCMS e 25 µL de acetato de etila.

O processo de padronização da técnica foi realizado utilizando amostras negativas obtidas de voluntários que não fizeram o uso de cocaína, ou qualquer outra droga ilícita e/ou fármaco que pudesse interferir nas análises. As amostras positivas foram obtidas a partir de testagem positiva em análise de triagem toxicológica, por meio de teste de imunocromatografia (teste rápido) e armazenadas à -20°C, as mesmas foram obtidas de pacientes com diagnóstico de trauma por acidentes de trânsito ou agressões e suspeitos de intoxicação por drogas de abuso. Os pacientes foram identificados pelo projeto “Vigilância epidemiológica das intoxicações por drogas de abuso: investigação de evento sentinela por critérios epidemiológicos, clínicos e laboratoriais”, Programa de Pesquisa para o Sistema Único de Saúde: Gestão Compartilhada em Saúde PPSUS, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá (COPEP/ UEM) sob o CAAE nº 06218713.0.0000.0104.

Resultados e Discussão

A partir da otimização da técnica de EFS, extraiu-se a cocaína, e também o seu principal produto de biotransformação, benzoilecgonina, da matriz urina. Para confirmação da presença dos compostos no extrato, procedeu-se a análise confirmatória por CG-EM.

As técnicas de identificação de cocaína e produtos de biotransformação foram validadas de acordo com as normas da ANVISA, avaliando os

parâmetros de precisão, exatidão, recuperação, limite de quantificação (LQ) e detecção (LD), que resultaram satisfatórios. Foram obtidos cromatogramas e o espectro de massas com a presença de íons confirmatórios, como evidencia o espectro de massas da benzoilecgonina e cocaína (figura 1).

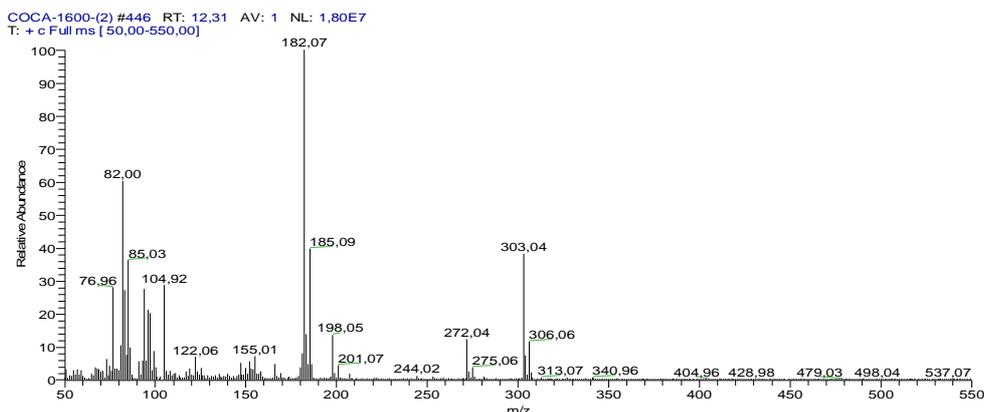


Figura 1. Espectro de massas contendo os íons confirmatórios de benzoilecgonina (82, 240 e 361) e cocaína (182,272,303).

Conclusões

A técnica de extração em fase sólida mostrou-se eficiente e segura para uso em etapa pré-analítica de preparo da matriz urina, para identificação de cocaína e benzoilecgonina por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas.

Agradecimentos

À Fundação Araucária, CNPq e Universidade Estadual de Maringá pela bolsa concedida ao primeiro autor e ao Decit/SCTIE/MS, CNPq, Fundação Araucária e SESA-PR pelo suporte financeiro.

Referências

ANVISA, **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL)**. Resolução RE n°899, 29 de maio de 2003. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis>> Acesso em 3 junho de 2016.

UNODC – **United Nations Office on Drugs and Crime**. World Drug Report 2014. New York: United Nations Publication Sales. 38p, 2009.

OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. Atheneu Editora Ltda, São Paulo, 4 edição, 365-375, 2014.

YONAMINE, M. **Derivação de benzoilecgonina urinária com diazometano para verificação da exposição à cocaína por técnicas cromatográficas**. Tese (Farmácia-Toxicologia e Análises Toxicológicas). Faculdade de ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, 2004.