

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE COCAÍNA E PRODUTOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO EM CABELO HUMANO UTILIZANDO CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Jéssica Yuri Sakurada (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Deborah Thais Palma Scanferla (Coorientadora), Simone Aparecida Galerani Mossini (Orientadora), e-mail: ra102721@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/Departamento de Ciências Básicas da Saúde/Maringá, PR

Área e subárea: Ciências da Saúde/Farmácia/Toxicologia

Palavras-chave: Cocaína, cabelo, validação

Resumo

O número de usuários de cocaína vem crescendo assustadoramente nos últimos anos, aumentando a necessidade de acoplar técnicas de preparo de amostra ecológicas à equipamentos sensíveis como a Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) para sua detecção, assim como de seus produtos de biotransformação em matrizes biológicas. O objetivo do estudo foi validar a técnica de Microextração em Fase Líquida suportada por Fibra Oca (MEFL-FO) para detecção de cocaína (COC), benzoilecgonina (BZE) e cocaetileno (CE), em matriz cabelo por CG-EM. A técnica mostrou-se linear, dentro dos intervalos de calibração, com coeficiente de correlação $(R) > 0,99$. Os limites de detecção (LoD) foram 0,05; 0,03 e 0,03 ng mg^{-1} , os limites de quantificação (LoQ): 0,1; 0,05 e 0,05 ng mg^{-1} para COC; BZE e CE, respectivamente. A exatidão e precisão foram aceitáveis para todos níveis de concentração. O método validado foi específico para todos os analitos, além de nenhum efeito residual.

Introdução

Segundo o Relatório Mundial sobre Drogas de 2019 da UNODC (Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime), em 2017 cerca de 271 milhões de pessoas com idade de 15 a 64 anos utilizaram drogas pelo menos uma vez no ano anterior, sendo que 18,1 milhões de pessoas fizeram o uso de cocaína.

A amostra biológica cabelo possui várias vantagens, dentre elas: grande janela de detecção, fornece evidência de exposição crônica, coleta fácil, não invasiva, pode ser supervisionada sem constrangimentos, menor risco de adulteração, fácil armazenamento e transporte (CARDOSO, 2020).

Entre as técnicas de preparo de amostra, a Microextração em Fase Líquida suportada com Membrana Oca (MEFL-FO) tem se destacado por utilizar

menores quantidades de solventes se comparadas às técnicas de preparo de amostras tradicionais sendo denominada procedimento “verde” e por responder a uma grande demanda, ter baixo custo e alta eficiência (MOREDA-PIÑEIRO, 2015). Para a detecção e quantificação, o acoplamento de um cromatógrafo gasoso com o espectrômetro de massas combina as vantagens como, alta seletividade e eficiência de separação, a obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade, ou seja, torna possível detectar pequenas quantidades de analitos (VÉKEY, 2001).

O método analítico deve gerar informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, assim deve ser validado, definido como “Avaliação sistemática de um procedimento analítico para demonstrar que está sob as condições nas quais deve ser aplicado” (WHO, 1992). O objetivo deste estudo foi validar metodologia de análise para extração e detecção de cocaína e produtos de biotransformação, na matriz biológica cabelo, utilizando MEFL-FO e CG-EM.

Materiais e métodos

Amostras negativas da matriz biológica cabelo (amostra branco) foram obtidas de voluntários que não fizeram o uso de cocaína. Amostras positivas foram obtidas de pacientes internados em clínicas de recuperação no município de Maringá-PR, que aceitem participar do estudo. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá, CAAE nº 56482016.1.0000.0104, parecer nº 2.155.847.

A validação seguiu o guia internacional “Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology”, do Grupo de Trabalho Científico para a Toxicologia Forense (SWGTOX), publicado em maio de 2013. Foram também consultadas as diretrizes da “Society of Hair Testing” para teste de drogas no cabelo (COOPER; KRONSTRAND; KINTZ, 2012) e Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (UNODC, 2009) em sua publicação “Orientação para a Validação da Metodologia Analítica e Calibração de Equipamentos usados para Teste de Drogas ilícitas em materiais apreendidos e espécimes biológicos”. Assim, foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, efeito residual, linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão e precisão.

As soluções de trabalho foram preparadas por diluição adequada das soluções estoque com metanol para concentrações finais de $10\mu\text{g mL}^{-1}$ e $1\mu\text{g mL}^{-1}$, e todas as soluções foram armazenadas em freezer (-20°C).

A coleta foi realizada cortando um segmento de 6cm de cabelo, a amostra foi pesada (100mg), após foi higienizada com detergente neutro e água, seguido de diclorometano (2mL, para cada 50mg de cabelo). Posteriormente, retirou-se o diclorometano e a amostra foi seca em temperatura ambiente. Os fios de cabelo foram cortados e separados em alíquotas de 50mg em tubos Falcon, adicionados de 2mL de metanol juntamente com padrões internos (BZE-d3 e COC-d3). Os tubos foram

incubados a 50°C durante 18 horas. Todo o volume de metanol foi transferido para um frasco de vidro e o conteúdo evaporado a 50 °C, em banho de água. O resíduo obtido foi submetido a derivatização com 100µL de acetonitrila, 2,0µL de piridina e 2,0µL de isobutilclorofornato sob banho ultrassônico por 6 min. Em seguida, adicionou-se 1,5mL de água deionizada ao frasco, agitando-o em vórtex. Todo o volume foi transferido para um Eppendorf contendo 30mg de tampão (NaHCO₃: K₂CO₃), agitando-o em vórtex. Por fim, as soluções foram preparadas pela técnica MEFL-FO e foi transferido para o banho-ultrassônico, por 10 minutos. O extrato foi retirado do interior da fibra e evaporado em banho de água (40°C). Em seguida, adicionou-se 50µL de acetato de etila, sendo 1,0µL injetado no equipamento CG-EM.

Os dados foram extraídos a partir de cromatogramas das análises, através do software do equipamento CG-EM e plotados no Microsoft Excel® 2010 para viabilizar as análises estatísticas de cada parâmetro analisado.

Resultados e Discussão

O presente método MEFL-FO-CG-EM mostrou-se linear para os analitos COC, BZE e CE, dentro de todos os intervalos de calibração adotados, com coeficiente de correlação (R) acima de 0,99. A falta de ajuste (valor de p) foi superior a 0,05. Desta forma, as curvas lineares foram corretamente ajustadas, pela indicação dos modelos matemáticos ao nível de 5%.

Os limites de detecção (LoD) foram 0,05; 0,03 e 0,03 ng mg⁻¹, e os limites de quantificação (LoQ) 0,1; 0,05 e 0,05 ng mg⁻¹ para COC, BZE e CE, respectivamente. O método foi seletivo, pois, não foram observados picos interferentes próximos aos três tempos de retenção dos analitos selecionados e nem no tempo de retenção dos padrões deuterados. Não houve efeito residual, pois logo após injeção de extrato referente ao ponto de calibração mais alto dos analitos (COC, BZE e CE), não se observou picos nos tempos de retenção dos mesmos nas amostras branco, injetadas logo em seguida.

A exatidão e a precisão foram aceitáveis com erro relativo percentual médio (% RE) ≤ 17,7% e coeficiente de variação (CV) ≤ 17,9%, para todos os padrões, exceto para precisão inter-dia do controle de qualidade baixo de COC, cujo valor obtido foi 17,86%, contudo, os guias permitem valores até 20% para esta concentração.

Conclusões

A metodologia MEFL-FO-CG-EM para detecção e quantificação de cocaína e produtos de biotransformação em cabelo mostrou-se linear, com excelentes sensibilidade e níveis de detecção e quantificação, além de valores adequados de precisão, exatidão, nenhum efeito residual e uso de reduzido volume de solventes orgânicos e amostra. Conclui-se pela sua

confiabilidade para aplicação em rotina laboratorial e para fins de monitoramento.

Agradecimentos

Ao CNPq/Fundação Araucária e Universidade Estadual de Maringá pela concessão da bolsa e ao Laboratório de Toxicologia-UEM (LATOX-UEM).

Referências

CARDOSO, M.S. Análise toxicológica de substâncias psicoativas em cabelo: desenvolvimento de método e aplicação na investigação de tentativas de suicídio atendidas em unidade de emergência de hospital universitário. 2020. 114 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Unicamp, Campinas, 2020.

VÉKEY K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. [s.i.]: Elsevier; 2001. 9 p.

World Health Organization. WHO Technical Report Series 823. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations: thirty second report. World Health Organization. 1992. p. 134 p.

COOPER, G.A.A.; KRONSTRAND, R.; KINTZ, P. Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair. Forensic Science International, [S.L.], v. 218, n. 1-3, p. 20-24, maio 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.10.024>.

SWGTOX. Scientific Working Group for Forensic Toxicology. Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. J. Anal. Toxicol.[S.L.], v. 37, n. 7, p. 452-474, 9 ago. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jat/bkt054>

UNODC. World Drug Report 2019 [internet]. [Acesso em: 05 ago. 2020]. Disponível em: <https://wdr.unodc.org/wdr2019/>

MOREDA-PIÑEIRO, J.; MOREDA-PIÑEIRO, A. Recent advances in combining micro-extraction techniques for sample pre-treatment. Trends Anal. Chem. 71 (2015) 265–274, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2015.02.025>.

UNODC. United Nations Office on Drugs and Crime, Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment Used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens, United Nations, New York, 2009. https://www.unodc.org/documents/scientific/validation_E.pdf.