

## MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA DE MORFINA, HEROÍNA E COCAÍNA EM AMOSTRAS DE SALIVA COM ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Fernando de Carvalho Figueiredo (PIC/UEM), Deborah Thais Palma Scanferla (Coorientador), Camila Marchioni, Simone Aparecida Galerani Mossini (Orientador), e-mail: simonegmossini@yahoo.com.br

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

**Área e subárea:** Ciências da Saúde / Farmácia / Toxicologia

**Palavras-chave:** Microextração líquido-líquido dispersiva, heroína, cromatografia em fase gasosa.

### Resumo:

Drogas de abuso são substâncias psicoativas com capacidade de modificar no usuário sua conduta e interação com o mundo real. O uso excessivo de drogas de abuso está relacionado a diversos riscos, tais como, overdoses, contração de doenças infecciosas e outras comorbidades, tornando-se um problema de saúde pública. A detecção dessas substâncias é de suma importância para o aperfeiçoamento do diagnóstico, favorecendo o acompanhamento do tratamento e tornando a prevenção mais eficiente. O atual trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de um método de extração DLLME (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction) e sua posterior avaliação, para detecção de heroína em fluido oral (FO), por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM). O desenvolvimento e início do procedimento de avaliação da técnica DLLME, para determinação de heroína em FO, foi significativo para escolha dos melhores solventes, extrator (diclorometano) e dispersor (acetonitrila), que são essenciais para o seguimento da avaliação das outras variáveis da técnica.

### Introdução

As drogas de abuso mais utilizadas na contemporaneidade são: *Cannabis*, opiáceos, anfetaminas, ecstasy e cocaína (UNODC, 2019). Os opiáceos são substâncias oriundas da papoula de ópio, podendo ser natural ou semissintética. São exemplos de opiáceos: a morfina e a heroína. A heroína (HER), também reconhecida como diacetilmorfina, é um dos opiáceos mais usados e é considerado como uma droga extremamente perigosa. É um composto semissintético, produzido através da acetilação dos grupos hidroxila da morfina (MOR). Após a hidrólise pelas esterases sanguíneas e hepáticas, HER é convertida em 6-monoacetilmorfina (6-MAM), que

subsequentemente por hidrólise origina MOR (NEGRUSZ, A; COOPER. G, 2013; BARROSO, M. *et al.*, 2011).

O desenvolvimento de novos métodos de detecção para drogas de abuso, como por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM), após técnicas de extração miniaturizadas, como a Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME, do inglês Dispersive Liquid-Liquid Microextraction) são essenciais. A matriz biológica fluido oral (FO) é opção de matriz atrativa comparada às outras convencionais (urina e sangue), pois sua coleta é realizada de maneira simples, de modo não invasivo e de difícil adulteração (GRABENAUER, M. *et al.*, 2018).

Neste contexto, este trabalho teve por objetivo inicial o desenvolvimento da técnica DLLME para extração da morfina, heroína, cocaína e seu metabólito (benzoilecgonina) em fluido oral para detecção por meio da CG/EM. Entretanto, em 19 de março de 2020 a Portaria Nº 122/2020-GRE paralisou as atividades administrativas e acadêmicas presenciais na UEM, em virtude das medidas de prevenção da COVID-19 (quarentena), o que dificultou o desenvolvimento de todas as atividades previstas para o projeto. Dessa maneira, optou-se por efetuar as análises a partir dos dados obtidos até a data citada acima, referentes à heroína.

## **Materiais e métodos**

O preparo da amostra e análise cromatográfica são escolhidos para cada tipo de substância psicoativa, uma vez que deverá envolver processos de desenvolvimento e avaliação, para posterior validação, que corresponde à garantia da eficiência e segurança, na rotina do laboratório, visando resultados confiáveis e satisfatórios.

A fim de obter uma adequada extração da heroína (6-MAM), pela técnica DLLME, foi avaliado de forma univariada diferentes tipos de solventes dispersores e extratores. Os solventes extratores avaliados foram: diclorometano, acetato de etila e tolueno. Os solventes dispersores foram: metanol, acetona, isopropanol e acetonitrila.

Para execução do estudo as amostras de FO negativas (amostra branco) foram obtidas de pessoas que não fizeram a utilização de drogas de abuso. Essas amostras foram enriquecidas com padrão de 6-MAM para avaliação da DLLME. O estudo encontra-se aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá (COPEP/UEM), CAAE nº 56482016.1.0000.0104, sob o parecer nº 2.155.847.

### *Microextração Líquido Líquido Dispersiva (DLLME)*

Inicialmente, utilizou-se tubos de centrífuga 15 mL, ao qual foram adicionados 500 µL de amostras de FO enriquecidas com padrão, e 500 µL de água destilada. Em seguida, adicionou-se, rapidamente, com auxílio de micropipeta (10mL), uma mistura 800 µL de solvente dispersor e 600 µL de

solvente extrator. Os tubos foram agitados por 1 minuto em vórtex. Em seguida, foram centrifugados (1000rpm/10 minutos). Terminado esse tempo, com auxílio da micropipeta, transferiu-se um volume de 400  $\mu\text{L}$  de fase extratora (sedimentada ao fundo) para um *vial*. A solução retida no *vial* foi levado à evaporação em banho de água, à 40°C por aproximadamente 30 minutos. Aos *vials*, quando secos, foi adicionado 50 $\mu\text{L}$  de BSTFA (bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida) com 1% TCMS (triclorometilssilano), agitados em vórtex por 1 minuto e levados à estufa em 50°C, por 10 minutos, para derivatização do analito 6-MAM, antecedente à injeção de 1 $\mu\text{L}$ , em CG-EM.

## Resultados e Discussão

O processo de avaliação da técnica DLLME foi iniciado avaliando a espécie dos solventes (extrator e dispersor). A definição dos parâmetros se deu pela melhor taxa de recuperação do analito 6-MAM. Sendo assim, no primeiro experimento a concentração do padrão 6-MAM foi de 10ng mL<sup>-1</sup>.

Inicialmente, preservamos o solvente extrator constante (diclorometano) avaliando a eficiência da técnica DLLME para determinação do analito 6-MAM, com os demais solventes dispersores. Como resultado, a melhor taxa de recuperação do analito foi pelo solvente dispersor metanol, seguido de acetona. O solvente dispersor isopropanol não foi capaz de separar adequadamente as fases, conseqüentemente não houve boa extração ao analisar a amostra no CG-EM.

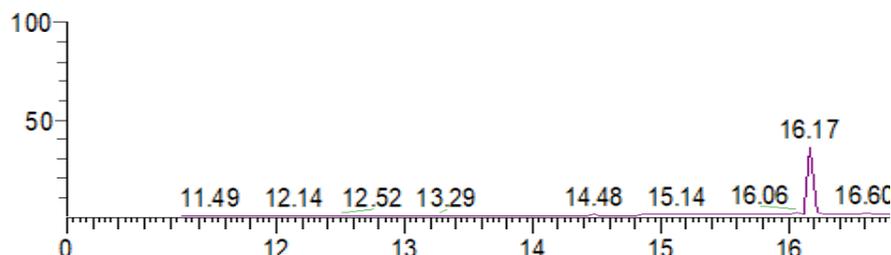
Posteriormente, a eficiência foi avaliada mantendo o solvente dispersor constante (metanol), com os demais solventes extratores. Como resultado, a melhor taxa de recuperação do analito foi com o solvente extrator diclorometano. Entretanto, devido à baixa concentração da amostra enriquecida utilizada, observou-se pouca recuperação do padrão 6-MAM por CG-EM.

Considerando que o isopropanol apresentou-se ruim para separação das fases extratora e dispersora e aos baixos valores de recuperação obtidos com os testes mencionados anteriormente, optou-se por aumentar a concentração do padrão 6-MAM para 200ng mL<sup>-1</sup> e substituímos o solvente dispersor denominado isopropanol pela acetonitrila.

Os testes até então efetuados foram repetidos, usando padrão 6-MAM na concentração de 200ng mL<sup>-1</sup>. Como resultado, o teste por solvente extrator constante (diclorometano) com os outros solvente dispersores (metanol, acetona e acetonitrila), resultaram em maior recuperação para acetonitrila, seguida do metanol e acetona.

Na seqüência, o segundo teste foi feito - dispersor acetonitrila mantido constante com os demais solventes extratores, e a mistura entre os solventes acetonitrila (dispersor) e diclorometano (extrator) resultaram em maior taxa de recuperação do analito. A Figura 1 ilustra o cromatograma obtido pela extração por DLLME com esses solventes.

**Figura 1.** Cromatograma CG-EM obtido pelo método DLLME em amostras de fluido oral, na concentração de  $200\text{ng ml}^{-1}$  do padrão 6-MAM.



\*Amostra de fluido oral negativa adicionada de padrão 6-MAM (16,17min, m/z:399).

## Conclusões

O desenvolvimento e início do processo de avaliação da técnica DLLME, para determinação de heroína em fluido oral, foi significativo para seleção dos melhores solventes extratores e dispersores, que são essenciais para continuidade da avaliação das outras variáveis da técnica, tais como, ajuste dos volumes dos solventes (extrator e dispersor), volume da amostra de fluido oral, pH da amostra e força iônica. Pretende-se dar sequência aos experimentos, visando término da avaliação para posterior validação analítica da técnica DLLME pelo aparelho CG-EM com a finalidade de aplicação na rotina do laboratório de toxicologia.

## Agradecimentos

A Fundação Araucária, CNPq e CAPES pelo apoio e financiamento.

## Referências

NEGRUSZ, A.; COOPER, G., **Clarke's Analytical Forensic Toxicology**, 2<sup>nd</sup>, Pharmaceutical Press, 2013.

GRABENAUER, M.; MOORE, K.; BYNUM, N.; WHITE, R.; MITCHELL, J.; HAYES, E. *et al.*, **Development of a Quantitative LC-MS-MS Assay for Codeine, Morphine, 6-Acetylmorphine, Hydrocodone, Hydromorphone, Oxycodone and Oxymorphone in Neat Oral Fluid**. Journal of Analytical Toxicology, v. 42, n. 6, p. 392-399, 1 jul. 2018

BARROSO, M.; GALLARDO, E.; VIEIRA, D. N.; QUEIROZ, J. A.; LÓPEZ-RIVADULLA, M., **Bioanalytical procedures and recent developments in the determination of opiates/opioids in human biological samples**, Anal. Bioanal. Chem. 400 (2011)

UNODC, United Nations Office on Drugs and Crime. **World Drug Report 2019**. Vienna: United Nations publications, 2019.