

VALIDAÇÃO ANALÍTICA DO MÉTODO DLLME-GC-MS PARA DETERMINAÇÃO DE COCAÍNA E NORCOCAÍNA EM AMOSTRAS DE FLUÍDO ORAL

Ingrid Beatriz Campanha (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Simone Aparecida Galerani Mossini, Deborah Thais Palma Scanferla (Co-orientador), Miguel Machinski Junior (Orientador), e-mail: campanhaingrid48@gmail.com,
mmjunior@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde /
Maringá-PR.

Área e subárea: Ciências da Saúde / Farmácia / Toxicologia

Palavras-chave: cocaína; fluido oral; microextração líquido-líquido dispersiva.

Resumo:

Substâncias psicoativas causam grandes alterações comportamentais em quem faz uso abusivo delas, levando a dependências e grandes problemas de saúde e sociais. Uma substância grandemente utilizada é a cocaína, visto que esta oferece euforia e satisfação a quem faz uso. Entretanto, seus efeitos nocivos vão desde a perda de noções básicas de sentido à dependência severa. Para fins de fiscalização e redução do uso destas drogas, análises toxicológicas em fluido oral têm sido empregadas, por ser uma técnica não invasiva, de difícil adulteração e coleta simples. A técnica de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-EM) precedida da microextração líquido-líquido dispersiva (do inglês, Dispersive Liquid-Liquid Microextraction - DLLME) tem sido aplicada nestes estudos por apresentarem alta eficiência na detecção dos analitos cocaína (COC) e norcocaína (produto de biotransformação de cocaína, NCOC) em amostras biológicas. Desta forma, o presente estudo teve por objetivo o desenvolvimento e posterior validação de um método de extração DLLME para detecção de COC e NCOC, em fluido oral por GC-EM. O desenvolvimento da técnica DLLME, com os solventes extrator (diclorometano) e dispersor (acetonitrila) mostrou-se importante para determinação do tempo de retenção dos analitos (COC e NCOC) no cromatograma gerado, e análise dos íons de identificação e quantificação da substância pelo espectro de massas.

Introdução

Países têm enfrentado cada vez mais problemas financeiros na saúde e segurança pelo aumento do uso de substâncias psicoativas que causam dependência e outras alterações de comportamento (FONTANELLA, 2002).

A cocaína atua impedindo a recaptação de dopamina e assim ela apresenta aos usuários forte sensação de euforia (OSTERNE, 2000). Para detecção da cocaína (COC) no corpo humano se procura pelo seu metabólito principal e biologicamente ativo, a norcocaína (NCOC) (FABRI, 2011).

A análise das drogas de abuso tem sido cada vez mais estudadas para que se haja um melhoramento das técnicas obtendo-se maior acessibilidade e facilidade de execução. O fluido oral (FO) é uma matriz biológica que apresenta essa habilidade de prontidão e simplicidade (BESSONNEAU, et al., 2015).

Para que se obtenha um método de análises sensível e com boa seletividade é essencial que se obtenha um bom preparo da amostra, retirando contaminantes e interferentes, além de poder concentrar o analito em pesquisa. Nesse preparo é ideal que se utilize pouco solvente, pensando em custos de preparo e nas questões ambientais como é realizado nas técnicas de microextração como a microextração líquido-líquido dispersiva (do inglês, Dispersive Liquid-Liquid Microextraction - DLLME) (MARTINS, 2012), seguida pela análise por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas permite um bom resultado com alta sensibilidade (STRELAU, 2006).

Neste contexto, este trabalho teve por objetivo inicial o desenvolvimento e validação da técnica DLLME para extração de COC e seu produto de biotransformação NCOC em FO para detecção por meio da CG/EM. Entretanto, com a paralisação das atividades administrativas e acadêmicas presenciais na UEM, em virtude das medidas de prevenção da COVID-19, o desenvolvimento de todas as atividades previstas para o projeto necessitou de adaptações.

Materiais e métodos

Amostra Biológica

As amostras biológicas de fluido oral negativas (amostra branco) foram coletadas utilizando o método de expectoração obedecendo, para a coleta, o intervalo de 10 minutos após a ingestão de alimentos ou bebidas, obtidas de pessoas que não fizeram a utilização de drogas de abuso. 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)

Primeiramente adicionou-se o 500 µL FO, enriquecidos dos padrões COC e NCOC (ambos 200ng mL⁻¹), em um tubo *Falcon*. Em seguida, um volume de 500 µL de água destilada foi adicionado. E, posteriormente, rapidamente, com auxílio de micropipeta (10mL), uma mistura 800 µL de solvente dispersor (acetonitrila) e 600 µL de solvente extrator (diclorometano) foi dispersada no *Falcon*. 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 μ 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 μ 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, antecedente à injeção de 1 μ L, em CG-EM.

Resultados e Discussão

Neste estudo, as análises de injeção da alíquota final, proveniente da extração de NCOC e COC, por DLLME com os solventes (diclorometano e acetonitrila) em CG-EM resultaram em um tempo de retenção de respectivamente 13,30 minutos e 13,63 minutos, respectivamente, ilustrado na figura 1. Após o resultado, foi analisado o espectro de massas dos analitos e assim se obteve os íons de confirmação e identificação para os mesmos compostos, sendo 182, 272, 303 para COC e 136, 168, 289 para NCOC, ilustrado na figura 2.

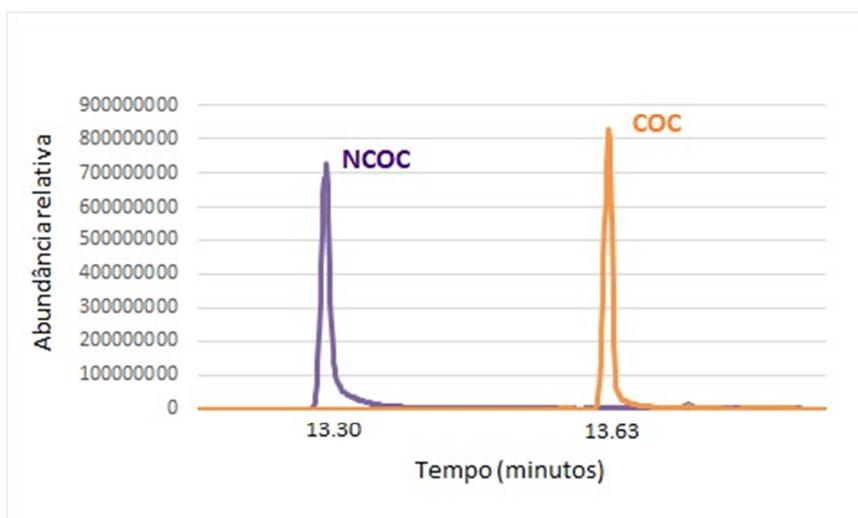


Figura 1 - Cromatograma de norcocaína (NCOC) e cocaína (COC), obtido pela extração DLLME em CG-EM no qual o tempo de retenção da cocaína foi de 13,63 minutos e o tempo de retenção da norcocaína foi de 13,3 minutos.

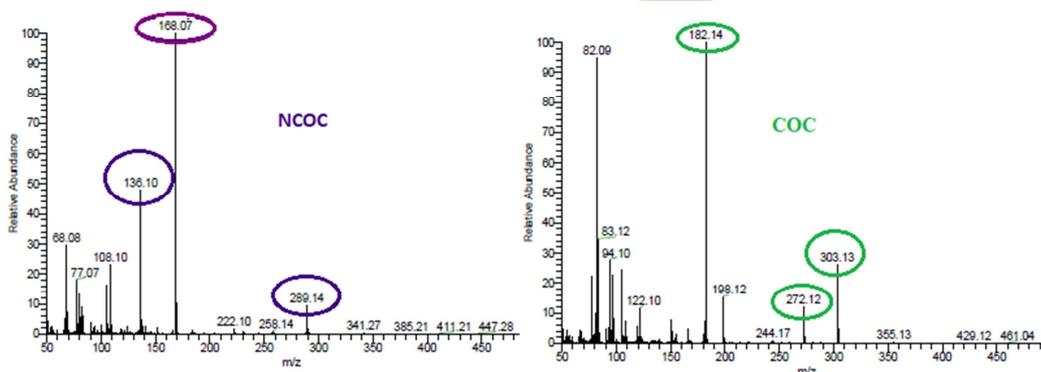


Figura 2 - Espectros de Massas de norcocaina (NCOC) e cocaína (COC) resultados da injeção da alíquota proveniente da DLLME em CG-EM, nos quais foram observados os íons quantificadores e de identificação (m/z) de NCOC (136, 168, 289) e COC (182, 272, 303).

Conclusões

O desenvolvimento da extração denominada DLLME, para determinação de cocaína e norcocaina em fluido oral foi importante para determinação do tempo de retenção dos analitos, além da identificação e quantificação no espectro de massas. Entretanto, é necessário otimizações na técnica para execução da validação analítica da técnica DLLME pelo aparelho CG-EM com a finalidade de aplicação na rotina do laboratório de toxicologia.

Agradecimentos

Agradeço ao PIBIC/CNPq-Fundação Araucária-UEM pelo apoio financeiro concedido pela bolsa, ao Laboratório de Toxicologia da UEM, ao meu orientador, professor Miguel Machinski Junior, a minha co-orientadora Deborah Thais Palma Scanferla pelo auxílio nas metodologias realizadas.

Referências

BESSONNEAU V, BOYACI E, MACIAZEK-JURCZYK M, PAWLISZYN J. **In vivo solid phase microextraction sampling of human saliva for non-invasive and on-site monitoring**. Analytical Chemistry Acta, 856: 35–45, 2015.

FABRI, Rodrigo Luiz; SIQUEIRA, Louise Pinhati; FABRI, Angélica da Conceição Oliveira Coelho. **Aspectos gerais, farmacológicos e toxicológicos da cocaína e seus efeitos na gestação**. Revista Eletrônica de Farmácia, v. 8, n. 2, p. 13-13, 2011.

FONTANELLA, Bruno José Barcellos; TURATO, Egberto Ribeiro. **Barreiras na relação clínico-paciente em dependentes de substâncias psicoativas procurando tratamento**. Revista de Saúde Pública, v. 36, p. 439-447, 2002.

MARTINS, Manoel Leonardo et al. **Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) fundamentos e aplicações.** Repositório institucional da Universidade Federal do Rio Grande. 2012.

OSTERNE, Evandro CV et al. **Infarto do miocárdio associado ao uso de cocaína.** Revista Centro-Oeste de Cardiologia, v. 8, n. 2, p. 19-23, 2000.