

VALIDAÇÃO DE TÉCNICA MINIATURIZADA PARA EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE COCAÍNA E BENZOILECGONINA EM AMOSTRAS DE FLUÍDO ORAL COM ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Fernando de Carvalho Figueiredo (PIBIC/FA/Uem), Deborah Thais Palma Scanferla (Co-orientador), Simone Aparecida Galerani Mossini (Orientador),
e-mail: ra110699@uem.br, sagmossini@uem.br

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

Área e subárea: Ciências da Saúde / Farmácia / Toxicologia

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

Resumo:

As drogas de abuso, substâncias psicoativas que agem no Sistema Nervoso Central (SNC), têm se tornado um grande problema de saúde pública, pois causam dependência química e atrapalham o convívio em sociedade. Dentre essas substâncias, a cocaína (COC), em conjunto com seu principal produto de biotransformação denominado benzoilecgonina (BZE), que é um importante biomarcador de exposição da droga, são, em conjunto, produtos alvos para identificação e confirmação do uso e abuso dessa droga. A matriz biológica fluido oral (FO) apresenta vantagens como baixo potencial de adulteração, além de ser uma coleta não invasiva, e indicar exposição recente. Uma técnica de preparo de amostra que pode ser aplicada em FO, para remoção de interferentes e extração dos analitos de interesse é a Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (do inglês, Dispersive Liquid-Liquid Microextraction - DLLME), seguidas de métodos específicos e seletivos, por equipamentos padrão-ouro na análise de drogas de abuso, denominado Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrometria de Massas (CG-EM). Portanto, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e validação da metodologia DLLME/CG-EM. A técnica foi inicialmente desenvolvida garantindo a determinação do tempo de retenção dos analitos (COC e BZE) no cromatograma gerado, e análise dos íons de identificação e quantificação desses analitos pelo espectro de massas.

Introdução

Drogas de abuso são substâncias psicoativas (SPA) que agem no Sistema Nervoso Central (SNC) diminuindo a capacidade de raciocínio e concentração, proporcionando uma sensação de calma, relaxamento, prazer

e principalmente, redução do reflexo. Além disso, tem por função modificar, no usuário, seu comportamento e percepção com a realidade. Sendo assim, as drogas de abuso têm se tornado um grande problema de saúde pública, pois causam dependência química, atrapalham o convívio familiar, em sociedade e também é bastante relacionada com acidentes automobilísticos (SENAD, 2011).

A cocaína (COC), uma SPA, é administrada em diversas formas, como a oral, via nasal, via pulmonar e intravenosa. Sua absorção é rápida, dentre 3 segundos a 5 minutos dependendo da via administrada. Após a absorção, é biotransformada pelas colinesterases hepáticas e plasmáticas, gerando mais de 20 produtos de biotransformação, sendo que grande parte são inativos. Os principais desses produtos gerados são a benzoilecgonina (BZE), metilecgonina, ecgonina e a norcocaína (biologicamente ativo). A meia-vida da cocaína é cerca de 60 minutos sendo eliminada principalmente na urina e em menor quantidade pelos fluídos orais (FO). Já a BZE tem um tempo de meia-vida muito maior em relação à cocaína, tornando-se o melhor biomarcador de exposição (ALVES; CARNEIRO, 2012).

Dentre as amostras biológicas possíveis para determinar a presença de COC, o fluido oral (FO) torna-se bastante atraente devido suas vantagens: coleta não invasiva, pouca interferência externa e baixo potencial de adulteração. Entretanto, no FO, a janela de detecção é curta, ou seja, é determinado a droga apenas em usuários que fez uso recente de COC ou qualquer outra SPA (GOMES, 2013).

A análise toxicológica de drogas de abuso em amostras biológicas acopla um pré-preparo da amostra, com a finalidade de extrair os analitos de interesse, separando-os dos interferentes presentes na matriz. Uma das técnicas vantajosas é a Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (do inglês, Dispersive Liquid-Liquid Microextraction - DLLME) que é uma técnica miniaturizada, onde ocorre a injeção rápida de um sistema ternário de solvente, ocorrendo extração dos analitos por partição (ZANG *et al.*, 2009).

Dentro deste contexto, este trabalho teve por objetivo a validação da técnica miniaturizada para extração e determinação de COC e BZE em amostras de fluido oral com análise por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (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

Amostras negativas (branco) de FO, provenientes de pessoas que não utilizaram SPA, foram coletadas por método de expectoração obedecendo o intervalo de 10 minutos após a ingestão de alimentos ou bebidas. Essas amostras foram enriquecidas com padrão de COC e BZE, para a continuidade do estudo. O estudo foi 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)

A amostra de fluido oral (500 µL) foi transferida para tubo *Falcon*, juntamente com 500 µL de água destilada e padrões dos analitos COC e BZE, ambos na concentração de 200 ng mL⁻¹. Os solventes diclorometano (600µL) e acetonitrila (800µL), foram dispersados no *Falcon* para separação das fases e transferência da extratora para um tubo de vidro. O tubo de vidro foi colocado em banho de água, até que secasse toda a alíquota, obtida pelo preparo de amostra FO por DLLME. Por fim, foi acrescentado ao tubo de vidro o solvente bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida (BSTFA), juntamente com 1% de triclorometilssilano (TCMS), para ressuspensão de COC e principalmente a derivatização do analito benzoilecgonina, tornando-se benzoilecgonina-TMS, possibilitando a sua identificação e quantificação por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas.

Resultados e Discussão

A análise de injeção da alíquota final da extração por DLLME, proveniente de amostra branco de FO acrescida de padrão de COC e BZE, no CG-EM, resultaram em um tempo de retenção de 13,63 min e 14,22 min, para COC e BZE-TMS, como ilustrado na figura 1. O espectro de massas dos analitos foi obtido e representado pelos íons de confirmação e identificação, para COC (182, 272, 303) e BZE-TMS (82, 240, 361), como ilustrado na figura 2 a seguir.

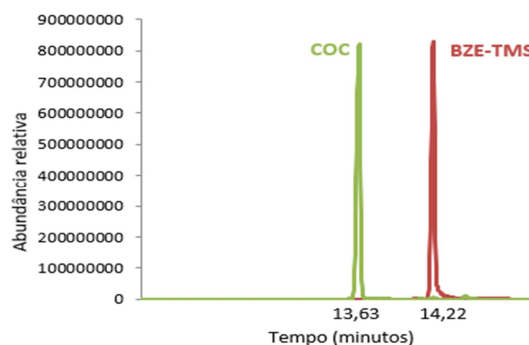


Figura 1. Cromatograma de cocaína (COC) e benzoilecgonina derivatizada (BZE-TMS), obtido pela injeção da alíquota, proveniente da DLLME, em CG-EM
Onde: tempo de retenção, em minutos, de COC (13,63) e BZE-TMS (14,22).

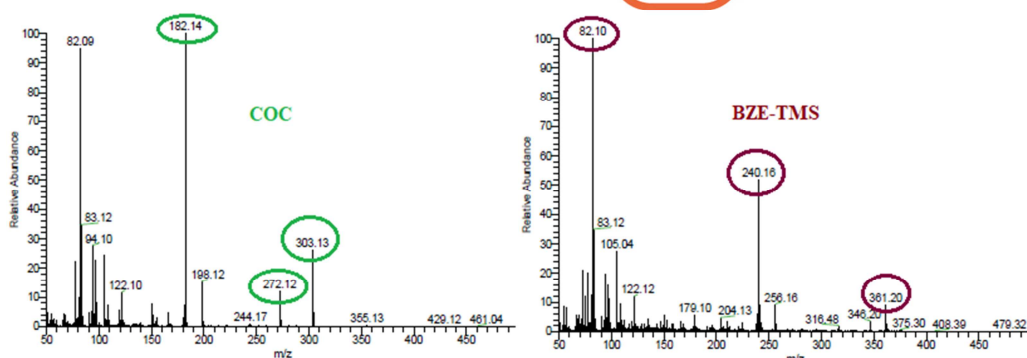


Figura 2. Espectros de Massas de (COC) e benzoilecgonina derivatizada (BZE-TMS), obtidos pela injeção da alíquota, proveniente da DLLME, em CG-EM Onde: Íon Quantificador e de identificação (m/z) de COC (182, 272, 303) e BZE-TMS (82, 240, 361).

Conclusões

O desenvolvimento da DLLME foi iniciado para identificação e confirmação dos analitos COC e BZE em FO, entretanto ainda é necessário otimizações na técnica, para posterior validação da metodologia DLLME/CG-EM, com a finalidade de aplicação na rotina do laboratório de toxicologia.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq e a Fundação Araucária pelo apoio financeiro concedido pela bolsa, ao Laboratório de Toxicologia da UEM e às professoras, Simone e Deborah, pela orientação e suporte para a elaboração desta pesquisa.

Referências

ALVES, B. E. P.; CARNEIRO, E. O. **Drogas psicoestimulantes: uma abordagem toxicológica sobre cocaína e metanfetamina.** Caderno de artigos da 7ª mostra de produção científica da pós-graduação Lato Sensu da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, v. 1, n. 1, p. 1048–68, 2012.

GOMES, M. S. **Contributo da Química Forense na Detecção de Drogas de Abuso.** Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade de Lisboa, p.112, 2013.

SENAD (Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas). **Prevenção ao uso indevido de drogas: Capacitação para Conselheiros e Lideranças Comunitárias.** – 4. ed. – Brasília: Ministério da Justiça. Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas – SENAD, 2011.

ZANG, X.-H., et al. **Developments of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Technique.** Chinese Journal of Analytical Chemistry, v. 37, n. 2, p. 161–168, fev. 2009.