

VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO DLLME PARA DETERMINAÇÃO DE MORFINA EM AMOSTRAS DE FLUÍDO ORAL COM ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Maria Angélica Polonio (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Deborah Thais Palma Scanferla (Co-orientador), Simone Aparecida Galerani Mossini (Orientador),
e-mail: ra112886@uem.br, sagmossini@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Área e subárea: Ciências da Saúde / Farmácia / Toxicologia

Palavras-chave: morfina; fluído oral; extração.

Resumo:

A morfina (MOR) é o principal composto extraído do ópio, e possui atuação sob o Sistema Nervoso Central, com efeito no controle e percepção da dor. O abuso da morfina pode causar danos à saúde do indivíduo e, problemas sociais devido à alteração neurológica como a diminuição da neurogênese, comprometendo a formação de novos neurônios. Desta forma, é importante a análise toxicológica para detecção e quantificação do uso recente de morfina, estando o fluido oral entre as espécies de amostras requeridas para essa finalidade. Técnica como a Microextração Líquido-líquido Dispersiva (DLLME) possui vantagens como o baixo custo e ser ambientalmente favorável, e quando acoplada à métodos como a Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massas (CG-EM) pode aprimorar a sensibilidade e seletividade. O presente trabalho teve como propósito o desenvolvimento da validação da metodologia DLLME/CG-EM. O desenvolvimento foi importante para determinação do tempo de retenção do analito MOR no cromatograma gerado, e análise dos íons de identificação e quantificação da substância pelo espectro de massas.

Introdução

A morfina (MOR), denominada como uma substância psicoativa (SPA), é o principal composto alcaloide extraído do ópio e age no Sistema Nervoso Central (SNC), imitando a ação dos peptídeos opioides endógenos produzidos pelo nosso próprio corpo, capazes de inibir estímulos dolorosos. Essa substância é utilizada na medicina por via oral ou intravenosa, como analgésico e sedativo, no tratamento de dores intensas e pós operatórios (NOROUZI et al., 2020). No entanto, devido ao uso inadequado e abusivo da substância vinculados à efeitos negativos (ao usuário e população), bem

como acidentes de trânsito, se faz necessário investigações para detecção de uso.

Portanto, a análise toxicológica deve ser validada, por métodos analíticos seletivos e eficientes, para detectar e quantificar, confiavelmente, SPA em amostras biológicas. (NOROUZI et al., 2020; VINDENES, et al., 2011). O fluido oral (FO), por exemplo, é uma matriz conveniente para identificar o uso recente de drogas, e apresenta algumas vantagens como coleta não invasiva, rapidez, segurança, não requer um profissional médico treinado e pode ser coletada sob observação direta, impedindo a adulteração da amostra, quando comparada com a coleta de outras amostras ditas convencionais, como o sangue e a urina (KONIECZNA et al., 2018).

A análise toxicológica acopla um pré-preparo da amostra, com a finalidade de remover interferentes e separar (extrair) o analito de interesse da amostra biológica. Dentre os métodos existentes, a Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (do inglês, Dispersive Liquid-Liquid Microextraction - DLLME) é vantajosa, em virtude da alta eficiência em um curto tempo de extração, baixo custo, rapidez, eficiência de extração e com alto potencial para aplicação direta em campo (NOROUZI et al., 2020; BORDIN, et al., 2015). Após extração, a técnica de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) pode ser aplicada a fim de detectar e quantificar SPA na amostra. Esse aparelho é padrão ouro na análise de drogas de abuso, devido à alta sensibilidade, quando comparada aos detectores convencionais (DAWLING, et al., 2013).

Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi a validação da técnica DLLME em FO, para identificação e quantificação de MOR em CG-EM, com finalidade posterior de aplicação em amostras de fluido oral autênticas, beneficiando a população que necessitar desse diagnóstico.

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 MOR 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)

Inicialmente, utilizou-se tubos de centrífuga 15 mL, ao qual foram adicionados 500 µL de amostras de FO enriquecidas com o padrão de MOR (200 ng mL⁻¹), e 500 µL de água destilada. Em seguida, adicionou-se,

rapidamente, com auxílio de micropipeta (10mL), uma mistura 800 μ L de solvente dispersor (acetonitrila) e 600 μ L de solvente extrator (diclorometano). 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), para derivatização de MOR (MOR-TMS), 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 foi possível iniciar o desenvolvimento da técnica DLLME. Assim, a análise de injeção da alíquota final da extração por DLLME, proveniente de amostra branco (FO) acrescida de padrão de MOR, no CG-EM, resultaram em um tempo de retenção do analito em 16 minutos, como pode ser observado na figura 1 (A). Após, o pico de MOR-TMS no cromatograma foi analisado em conjunto com espectro de massas do analito, ilustrado na figura 1(B), em que são observados os íons **quantificador** e de identificação (m/z) de morphine-TMS (146, 220, 236, 287, 324, 401, 414, **429**).

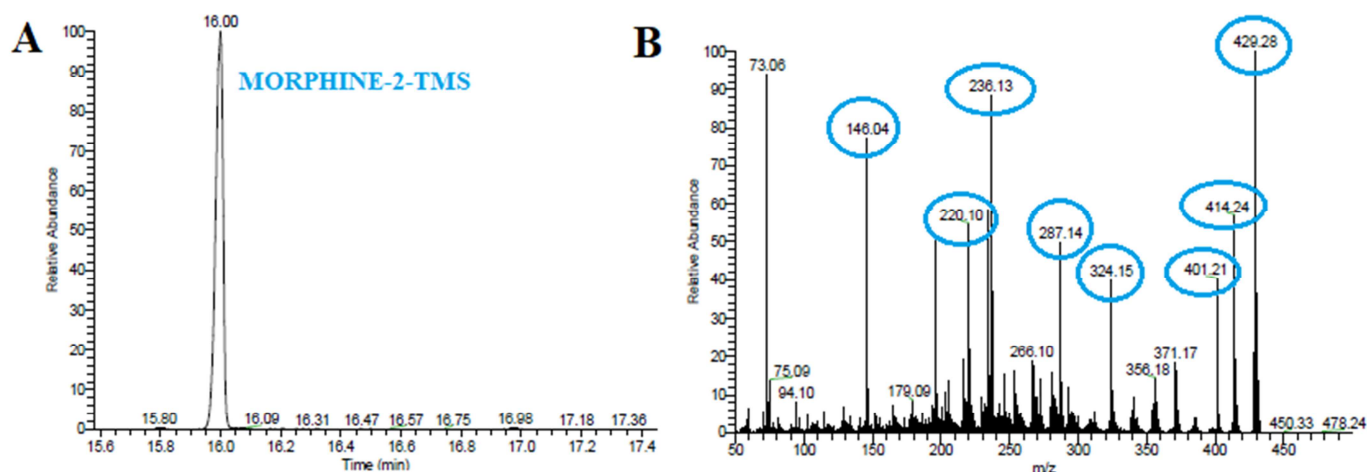


Figura 1. Cromatograma (A) e espectro de massas (B) da morfina derivatizada (morphine-TMS), obtido pela extração DLLME em FO, antecedente a injeção em CG-EM. Onde: tempo de retenção de morphine-TMS (16,0) e íon **quantificador** e de identificação (m/z) de morphine-TMS (146, 220, 236, 287, 324, 401, 414, **429**).

Conclusões

O desenvolvimento da DLLME foi iniciado, 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

BORDIN, D.C.M. et al. **Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense**. Scientia Chromatographica, v. 7, p.125-143, 2015. Disponível em:

<<http://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v7n2a04.pdf>>

Acesso em: 06/08/2021

DAWLING S., JICKELLS S., NEGRUSZ A. **Gas chromatography**. In: **Analytical Forensic Toxicology**. Pharmaceutical Press, ed. 4, p. 485-527, 2013.

KONIECZNA, L. *et al.* **Bioanalysis of underivatized amino acids in non-invasive exhaled breath condensate samples using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry**. J. Chromatogr, v. 1542, p. 72-81, 2018.

NOROUZI, Fatemeh *et al.* **Determination of morphine and oxymorphone in exhaled breath condensate samples: Application of microwave enhanced three-component deep eutectic solvent-based air-assisted liquid-liquid microextraction and derivatization prior to gas chromatography-mass spectrometry**. Journal of Chromatography B, v. 1152, set. 2020.

VINDENES, V. *et al.* **Oral Fluid is a Viable Alternative for Monitoring Drug Abuse: Detection of Drugs in Oral Fluid by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Comparison to the Results from Urine Samples from Patients Treated with Methadone or Buprenorphine**, Journal of Analytical Toxicology, v. 35, ed.1, p. 32-39, 2011.