

PLANEJAMENTO POR ANÁLISE MULTIVARIADA: MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA-CG-EM PARA IDENTIFICAÇÃO DE COCAÍNA E METABÓLITOS EM SALIVA

Nicole Santos Baccule (PIBIC/CNPq), Deborah Thais Palma Scanferla (Coorientador), Simone Aparecida Galerani Mossini (Orientador),
e-mail: nicolesantosbaccule@gmail.com.

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

Área e sub-área: Ciências da Saúde / Farmácia / Análises Toxicológicas

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

Resumo:

O uso de drogas de abuso é um preocupante problema de saúde pública e um obstáculo social. Essas substâncias alteram o comportamento do usuário, juntamente com modificações cognitivas e fisiológicas, comprometendo a vida familiar e o convívio em sociedade. Além disso, o uso excessivo de drogas, afeta diretamente o sistema de saúde, visto que há relação com a crescente criminalidade no país e no mundo, como por exemplo, acidentes, agressões físicas, homicídios entre outras. Dessa forma para detectar as drogas de abuso, é necessário que haja um aprimoramento em técnicas para identificação e quantificação dessas substâncias, com o desenvolvimento de metodologias mais eficazes e rápidas, para um diagnóstico mais preciso e efetivo. O presente trabalho teve por finalidade a otimização da técnica DLLME (do inglês, *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*) por análise multivariada de cinco variáveis que poderiam influenciar na técnica, para detectar cocaína e benzoilecgonina, em fluido oral, por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas. A otimização forneceu resultados significativos para as variáveis: volume do solvente extrator e volume da amostra definindo assim os melhores volumes para a posterior validação da técnica.

Introdução

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), droga é qualquer substância capaz de modificar uma ou mais funções dos organismos vivos, sendo ela natural ou sintética (FERNANDES, *et al.*, 2015). A cocaína (COC) é um dos alcaloides presentes na folha de *Erythroxylum coca*, sendo uma substância psicoativa (SPA), ou seja, atua no Sistema Nervoso Central (SNC), alterando a função cerebral, levando a um estado de bem-estar e podendo causar dependência. No organismo a COC é biotransformada, o que depende de fatores genéticos e adquiridos e entre os seus produtos de biotransformação está a benzoilecgonina (BZE), que prolonga o efeito da droga (BATISTUZZO, *et al.*, 2021). Para a detecção de SPAs em amostras

biológicas de usuários é necessário metodologias analíticas sensíveis e seletivas. A escolha da matriz biológica é feita de acordo com a finalidade do procedimento e com a viabilidade da coleta, sendo o fluído oral (FO) uma matriz de fácil obtenção, não invasiva, de difícil adulteração e que possui uma janela de detecção para o uso recente da droga - cerca de 12 a 24 horas (BOMBANA, 2016). As técnicas de preparo de amostra podem ser otimizadas a fim de melhorar a eficiência na extração, além de ter menor tempo de execução, possuir baixo custo e precisar de menores volumes de solventes orgânicos (redução de resíduos), uma vez que as variáveis são avaliadas simultaneamente, necessitando de menor número de experimentos. Dessa maneira, a técnica nomeada Microextração Líquido-Líquido Dispersiva, a qual é baseada na partição dos analitos entre duas fases líquidas imiscíveis, com uma fase aquosa (amostra) e outra fase orgânica (solvente orgânico), pode ser otimizada utilizando um planejamento multivariado, que além de diminuir o número de experimentos necessários, possibilita avaliar as interações entre as variáveis (MARTINS, *et al.*, 2012). Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo a otimização da técnica DLLME utilizando metodologia multivariada, para posterior detecção de COC e BZE em Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).

Materiais e Métodos

Coleta e extração de analitos em fluído oral por DLLME

A coleta de amostras branco (negativas) de fluído oral (FO) foi realizada em voluntários que não fizeram o uso de COC e/ou qualquer substância que pudesse interferir nas análises, sendo por método de expectoração, respeitando um intervalo de 10 minutos após a ingestão de alimentos ou bebidas. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da universidade estadual de Maringá (COPEP/UEM), CAAE n° 56482016.1.0000.0104, sob o parecer n° 2.025.144.

Para extração dos analitos foram utilizados tubos *Falcon* de 15 ml, com a adição de FO (100µL, 300µL ou 500µL), enriquecido com padrão de COC e BZE, ambos na concentração 200ng mL⁻¹, além da adição de 500µL de água destilada e NaCl (0%, 1% ou 2%). Em seguida, adicionou-se uma mistura de solvente dispersor (400µL, 600µL ou 800µL) e extrator (200µL, 400µL ou 600µL), acetonitrila e diclorometano, respectivamente. Os tubos foram agitados por 1 minuto em vórtex e posteriormente centrifugados (1000 rpm/10 minutos). Após a centrifugação, foi transferido 200 µL da fase extratora para um *vial*, a fim de ser evaporado em banho de água a 40 °C. Posteriormente, foi realizado a derivatização com BSTFA + 1%TMCS e o *vial* foi levado para a estufa a 50 °C por 10min, assim a alíquota final de 1 µL foi injetada no CG-EM.

Análise multivariada

A análise multivariada foi realizada em dois planejamentos, o primeiro, delineamento fatorial fracionado (2^{k-1}), de cinco variáveis que podiam influenciar na DLLME de

COC e BZE em FO, foi realizado para a obtenção do diagrama de Pareto. As variáveis foram: o volume da amostra, volume do solvente extrator, volume do solvente dispersor, força iônica e o pH da amostra. Dessa maneira, foi realizado um cálculo fatorial, utilizando o programa estatístico – Statistica® software, para determinar a quantidade de experimentos a serem realizados e os valores de cada variável foram definidos por codificações menor (-1) e maior (+1), posteriormente introduzidos no programa estatístico, gerando uma planilha com os valores de análise para todas as variáveis.

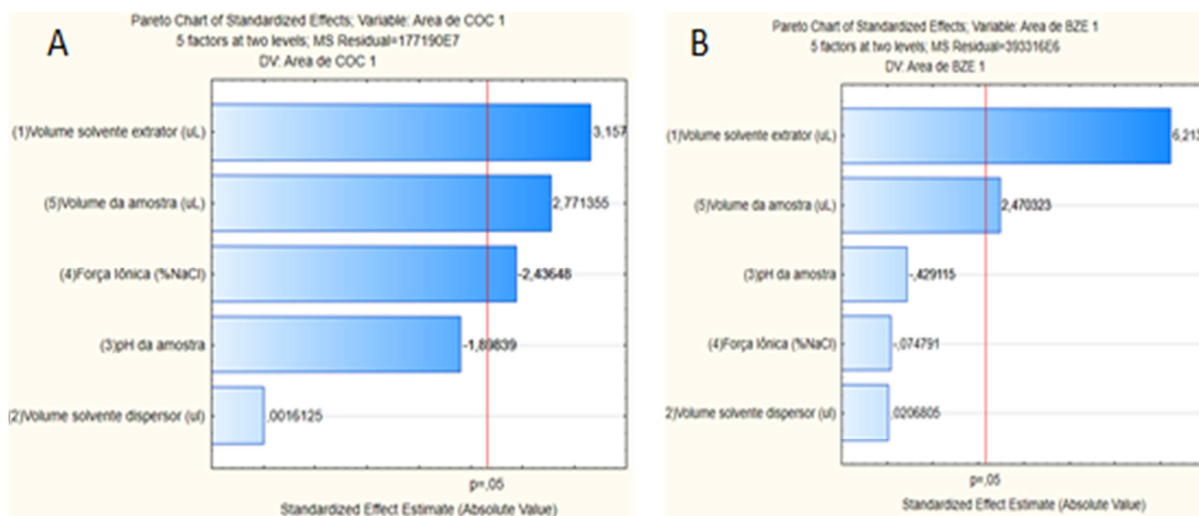
O segundo planejamento foi elaborado para obtenção da superfície de resposta, sendo realizado um delineamento fatorial central completo, a fim de localizar a sub-região ótima das variáveis significativas do diagrama de Pareto, para o refinamento da técnica DLLME/CG-EM.

Resultados e Discussão

O processo de otimização da técnica DLLME teve início com o planejamento fatorial fracionado, para assim identificar quais as variáveis eram significativas, em maiores proporções, na análise. Observou-se ao decorrer das extrações que em alguns experimentos, principalmente no nível de codificação maior (+) para a variável NaCl (% de cloreto de sódio), algumas amostras ficaram com um precipitado (cristais) após a evaporação, tendo sua origem, provavelmente, da solução salina (NaCl), assim, visivelmente, pode-se constatar que seria necessário diminuir a porcentagem da força iônica, o que posteriormente corroborou com a interpretação do Diagrama de Pareto.

O diagrama de Pareto foi gerado pelo software Statistica, com os resultados das áreas absolutas dos analitos, COC e BZE, decorrentes do cromatograma obtido com a injeção de cada alíquota no CG-EM. O diagrama de Pareto para a COC, ilustrado na figura 1(A), evidencia que as três variáveis significativas (com $p > 0,05$) foram: volume do solvente extrator, volume da amostra e a força iônica.

Figura 1 – Diagrama de Pareto dos analitos COC e BZE.



Onde: A) Diagrama de Pareto obtido para analito COC; B) Diagrama de Pareto obtido para analito BZE.

O direcionamento obtido para o solvente extrator e o volume da amostra foi para aumentar seu volume, para a força iônica o direcionamento foi para diminuir sua porcentagem. Já a figura 1(B) ilustra o diagrama de Pareto para a BZE, que evidenciou duas variáveis significativas, o solvente extrator e o volume da amostra, ambas com direcionamento para aumentar seu volume.

A análise da superfície de resposta resultou em um modelo significativo, porém, não preditivo, dessa maneira não foi possível gerar o gráfico de superfície de resposta, a fim de prever os valores fora dos valores experimentais, pois o erro seria muito grande.

Conclusões

A otimização da DLLME, utilizando uma análise multivariada, para a detecção de COC e BZE em FO, foi relevante para determinar as variáveis significativas na análise, ou seja, variáveis que influenciam na eficiência da extração, em maior proporção. Apesar de não ser possível a utilização do gráfico de superfície de respostas, o processo de otimização foi concluído, pois foi possível a interpretação de que, quanto maior o volume de amostra, maior seria a recuperação dos analitos, no requisito de disponibilidade desses em FO, consequentemente melhor seria a extração e maior abundância para análise por CG-EM. A técnica será validada com 900µL de FO, 600µL de solvente dispersor e 800µL de solvente extrator, na ausência de NaCl.

Agradecimentos

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

Referências

BATISTUZZO J. A. de O.; CAMARGO M. M. de A.; OGA S.; **Fundamentos de Toxicologia**. 5. ed. Grupo Zanini: São Paulo, 2021.

BOMBANA, H. S. **Análise de anfetamina, cocaína e tetrahydrocannabinol em fluido oral de motoristas de caminhão que trafegam em rodovias do estado de São Paulo**. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, FMUSP, 2016.

FERNANDES, M. A. *et al.* **O Significado do uso e Abuso de Drogas Ilícitas para Presidiárias**. Revista de enfermagem UFPE, 2015.

MARTINS, M. L., *et al.* **Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações**, 2012.