

OTIMIZAÇÃO POR ANÁLISE MULTIVARIADA DA TÉCNICA DE MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA PARA IDENTIFICAÇÃO E CONFIRMAÇÃO DO USO DE COCAÍNA ASSOCIADO AO ÁLCOOL POR CG-EM EM AMOSTRA DE FLUIDO ORAL

Rafaela Yasmin Melo Nascimento (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Deborah Thais Palma Scanferla (Coorientador), Simone Aparecida Galerani Mossini (Orientador),
e-mail: ra109726@uem.br

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

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

Palavras-chave: cocaína, microextração líquido-líquido dispersiva, análise multivariada.

Resumo:

A cocaína é uma substância psicoativa que causa dependência e quando o uso é feito concomitantemente com bebidas alcoólicas ocorre a biotransformação das moléculas no organismo, dando origem ao analito cocaetileno. O cocaetileno formado acarreta potencialização dos transtornos físicos e mentais ao usuário. A identificação e quantificação de drogas de abuso em amostras biológicas são importantes para facilitar o tratamento precoce de pacientes intoxicados, atendidos em serviços de emergência, e para acompanhar o tratamento. O fluido oral é uma amostra vantajosa pela facilidade de coleta e para identificar um consumo recente de substância psicoativa. É de suma importância que sejam desenvolvidas técnicas de análise sensíveis, seletivas e com valores acessíveis. O atual trabalho teve como objetivo primário otimizar, realizando-se análise multifatorial, a técnica de Microextração Líquido-Líquido Dispersiva em fluido oral, para identificação e quantificação dos analitos cocaína e cocaetileno, por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas. O desenvolvimento dos delineamentos multifatoriais, através de ferramentas estatísticas, foi substancial para determinar as variáveis significativas para a técnica e os valores ótimos para posterior realização da validação, evitando desperdícios, como o dos reagentes e de outros materiais, e otimizando o tempo.

Introdução

As drogas de abuso são substâncias psicoativas (SPAs) capazes de induzir dependência química, devido ao pressuposto de proporcionar prazer ao usuário (OGA *et al.*, 2021), em contrapartida, elas acabam fazendo com que este passe a não cumprir suas obrigações cotidianas, desenvolva doenças e muitas vezes cometam crimes para suprir seu vício (SENAD, 2013). Consequentemente, a realidade predominante é a sobrecarga do sistema de saúde pública, tendo um

grande impacto socioeconômico. Para detecção de SPAs é necessário o desenvolvimento de uma metodologia de análise, inicialmente com preparo de amostra e posteriormente por equipamento sensível e seletivo, para identificação e quantificação. O preparo de amostra pode ser otimizado multivariavelmente, com o mínimo de experimentos realizados para encontrar valores ótimos de variáveis significativas no processo de extração, bem como rapidez no processo, colaborando positivamente com a redução de custos (HAN, *et al.*, 2012). Ademais, a identificação e quantificação de drogas de abuso em amostras biológicas é de grande importância para facilitar o diagnóstico prévio do paciente intoxicado, que está sendo atendido em uma unidade de emergência, uma vez que isso direcionaria um melhor tratamento para amenizar sinais/sintomas do usuário de determinada classe de SPAs (CALVACANTE *et al.*, 2008). Em vista disso, o presente estudo teve como principal objetivo a otimização por análise multifatorial da técnica de microextração líquido-líquido dispersiva (do inglês, *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction* - DLLME), para identificar e confirmar o uso de cocaína e a sua associação concomitante com bebida alcóolica, analito cocaetileno, em amostra de fluido oral, por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM).

Materiais e Métodos

Amostra biológica

Para realização do estudo, utilizou-se, através de expectoração, o fluido oral de voluntários que não fizeram o uso de cocaína e/ou qualquer outra droga ilícita, que pudesse interferir nas análises. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (COPEP/UEM), CAAE nº 56482016.1.0000.0104, sob o parecer nº 2.025.144.

Técnica de extração - Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

Inicialmente, utilizou-se tubos de centrífuga 15 mL, ao qual foram adicionados (-1 ou 0 ou -1) de amostras de FO enriquecidas com o padrão de cocaína e cocaetileno, ambos com 200 ng mL⁻¹, e 500 µL de água destilada e NaCl (0, 1% ou 2%). Em seguida, adicionou-se, rapidamente, com auxílio de micropipeta (10mL), uma mistura (-1 ou 0 ou -1) de solvente dispersor (acetonitrila) e (-1 ou 0 ou -1) de solvente extrator (diclorometano). Os tubos foram agitados por 1 minuto em vórtex. Em seguida, foram centrifugados (1000 rpm/10 minutos). Posteriormente, 200 µL da fase extratora (depositada ao fundo do tubo – fase de interesse que contém cocaína e cocaetileno) foi pipetada e transferida ao *vial*, para posterior evaporação em banho de água (40°C). Para finalização do preparo da amostra, foi adicionado 50µL de solução derivatizadora composta por dois reagentes: BSTFA (bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida) + 1%TMCS (triclorometilssilano). Na sequência, os *vials* foram direcionados à estufa (50°C) por 10 minutos e 1µL da alíquota final foi injetada no CG-EM.

Otimização multifatorial

A análise multivariada foi executada a partir de dois planejamentos estatísticos para obtenção do Diagrama de Pareto e Superfície de respostas, para definir as variáveis

significativas e os valores ótimos dessas para execução da técnica DLLME/CG-EM, respectivamente. As variáveis testadas, que possivelmente poderiam interferir na DLLME para extração de cocaína e cocaetileno, foram: volume da amostra, volume do solvente extrator, volume do solvente dispersor, força iônica e pH da amostra. O primeiro planejamento foi o delineamento fatorial fracionado (2^{k-1}), através do software *Statistica*, das cinco variáveis que podiam influenciar na DLLME de cocaína e cocaetileno em fluido oral. Avaliou-se as variáveis em 3 níveis. Foram realizados 16 experimentos em duplicata e 3 pontos centrais, totalizando 19 experimentos. O Segundo planejamento, delineamento fatorial central completo, foi realizado para avaliação das 3 variáveis significativas, em 3 níveis. Foram realizados 14 experimentos, incluindo pontos axiais, em duplicata e 3 pontos centrais, totalizando 17 experimentos.

Resultados e Discussão

Inicialmente, alguns experimentos, após evaporação da alíquota pela DLLME, apresentaram precipitado (cristais) sendo que logo depois da ressuspensão dos analitos com BSTFA, a solução deveria estar límpida para não danificar a coluna do cromatógrafo. Este fato coincidiu com a interpretação do Diagrama de Pareto, gerado após delineamento fatorial, pois direcionou para diminuir a força iônica, com o propósito de otimizar a análise.

O Diagrama de Pareto também evidenciou que para melhorar a eficiência de extração da cocaína, seria importante aumentar o volume do solvente extrator e o volume da amostra e diminuir a força iônica, de acordo com $p > 0,05$, conforme ilustrado na figura 1 (A). Para o analito cocaetileno, a interpretação do diagrama direcionou para o aumento do volume do solvente extrator e da amostra, figura 1 (B). Vale ressaltar que o volume do solvente dispersor não foi significativo, permanecendo constante na execução do segundo planejamento e o pH da amostra também não foi significativo, não sendo avaliado nas análises posteriores.

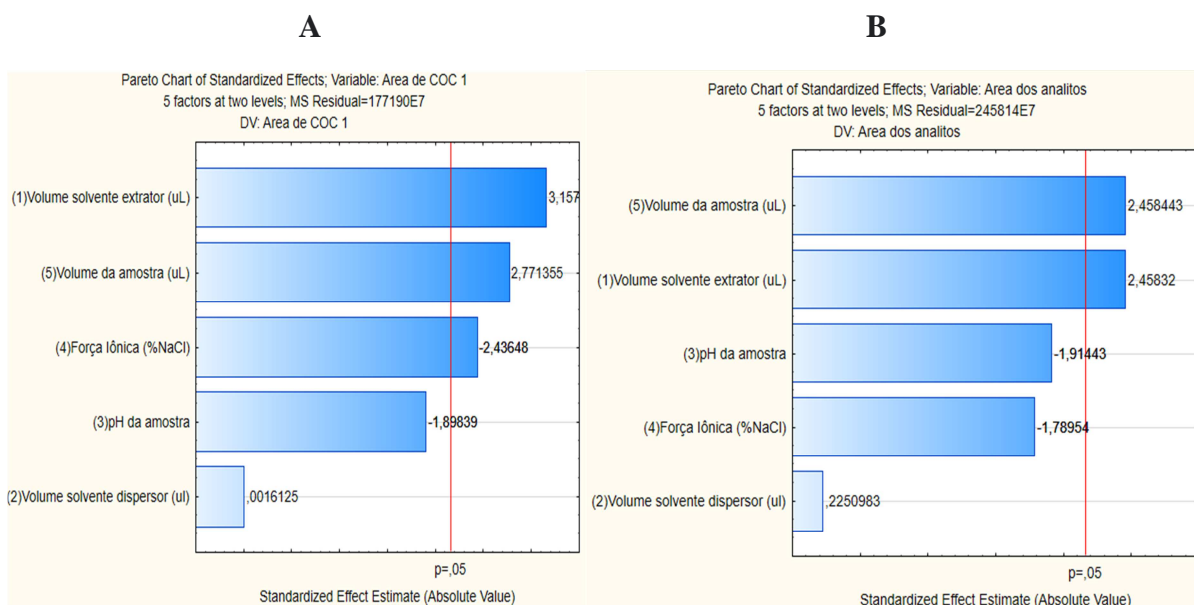


Figura 1. Diagrama de Pareto para análise da cocaína (A) e cocaetileno (B).

A execução do segundo planejamento foi realizada em duas tentativas, na presença e na ausência da variável % de NaCl, resultaram em modelos significativos, porém, não preditivos. Consequentemente, 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

O Diagrama de Pareto evidenciou que, para melhorar a eficiência de extração de cocaína e cocaetileno em fluido oral por DLLME/CG-EM, era importante aumentar o volume do solvente extrator e da amostra e diminuir a força iônica. O delineamento fatorial central completo resultou em modelos significativos, porém não preditivos para os analitos de interesse no estudo. A metodologia DLLME/CG-EM foi otimizada e será executada a validação com a utilização de 900µL de fluido oral, 600µL de solvente dispersor e 800µL de solvente extrator.

Agradecimentos

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

Referências

CAVALCANTE, M. B.; SANTOS, A. M.; BARROSO, M. G. **Adolescência, álcool e drogas: uma revisão na perspectiva da promoção da saúde**. 2008. Rio de Janeiro, v. 12, n.3, p. 555-559. DOI 10.1590/S1414-81452008000300024. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1414-81452008000300024>. Acesso em: 24 ago. 2022.

Han, D.; Row, K.H. Tendências em microextração de fase líquida, e sua aplicação a amostras ambientais e biológicas. *Microchim Acta* 176, 1-22 (2012). DOI 10.1007/s00604-011-0678-0

OGA, S.; CAMARGO, M.M.; BATISTUZZO, J.A. **Fundamentos de Toxicologia**, 5a ed. São Paulo: Atheneu Editora Ltda, 2021.

SENAD, Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas. **Prevenção ao uso indevido de drogas: Capacitação para Conselheiros e Lideranças Comunitárias**. 5ed. Brasília, Ministério da Justiça, 2013.