

EXTRAÇÃO DE CANNABINÓIDES EM SALIVA POR MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Mylena Domiciano Martins (PIC/UEM), Nicole Santos Baccule, Paula Pessoa Moreira e Souza, Simone Aparecida Galerani Mossini (Orientador), e-mail: ra112502@uem.br

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

Farmácia, Análise Toxicológica

Palavras-chave: Cannabinóides, CG-EM, técnica miniaturizada.

Resumo:

O objetivo deste trabalho foi otimizar o processo de extração de cannabinóides em saliva utilizando a microextração em fase sólida e análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Foi realizado um estudo de otimização analítica dos parâmetros de massa de sorvente e pH da amostra para uso da técnica miniaturizada DXP - *Disposable Pipette Extraction*, analisados de forma univariada. A quantidade de 60 mg de sorvente foi mais eficiente na extração e o pH neutro revelou uma melhor absorção. O trabalho mostrou que o uso da DPX na extração de cannabinóides em fluido oral é uma alternativa de custo reduzido, permitindo rápida detecção e identificação dos analitos. A otimização dos parâmetros utilizados permite melhor extração e detecção dos analitos, sendo etapa essencial para selecionar os procedimentos adequados anteriores à validação de uma metodologia com resultados satisfatórios e aplicáveis em amostras reais.

Introdução

Segundo o Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crimes, 275 milhões de pessoas usaram drogas em 2021, com crescimento estimado em 11% para 2030 (UNODC, 2021). *Cannabis sativa* é uma planta comumente consumida através do fumo que conta com diversos derivados cannabinóides que podem causar dependência e transtornos (BASTOS *et al.*, 2017; UNODC, 2021). O fluido oral é uma matriz biológica de fácil e rápida coleta, quando utilizado na detecção de drogas, informa o uso recente, com poucas chances de adulteração (BOMBANA, 2016; ZANCANARO, 2012). A extração em fase sólida com ponteiros descartáveis DPX (*Disposable Pipette Extraction*) é uma variável da extração em fase sólida, que substitui cartuchos tradicionais por pipetas descartáveis (BORDIN, 2013; MELO, 2017). A Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) permite a detecção de diversos analitos, nela os compostos são separados e o espectrômetro de massa fornece informações para a identificação (DAWLING; JICKELLS; NEGRUSZ, 2013).

Materiais e Métodos

Reagentes e padrões

Foram utilizados os reagentes Metanol, HCl, NaOH, acetato de etila e acetonitrila (Sigma-Aldrich), agente derivatizante *N, O*- Bis (trimitilsilil) trifluoroacetamida com 1% trimetilclorosilano (BSTFA 1% TMCS-Supelco) e os padrões THC, CBD e THC-COOH (Cerilliant e Sigma-Aldrich Company).

Amostra Biológica

Foram utilizadas amostras de fluido oral livres de drogas, coletadas no mínimo 10 minutos após a ingestão de alimentos ou líquidos, fornecidas por voluntários, coletadas a partir do método de expectoração em frascos de polipropileno estéril e armazenadas em freezer à temperatura de -20 °C até análise. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (COPEP/UEM), CAAE nº 56482016.1.0000.0104, parecer nº 3.466.244

Condições Cromatográficas

Utilizou-se um cromatógrafo a gás ISQ TRACE 1300, acoplado a um espectrômetro de massas quadrupolo Thermo Scientific®, com amostrador automático AI1310 com coluna capilar (30m x 0,25mm x 0,25µm) Thermo Scientific® com 5% de fenilpolisilfenilosiloxano (TR-5MS), modo de injeção *splitless*, tendo o hélio como gás de arraste a um fluxo constante de 0,7 mL/min. A temperatura no injetor foi de 280 °C, 300 °C no detector e 120 °C no forno, durante 1 minuto e 30 °C por minuto até 300 °C (3 min). O tempo de corrida foi de 14 minutos. Utilizou-se o modo de operação SIM (monitoramento de seleção de íons) e modo de ionização EI (ionização eletrônica). A temperatura utilizada na fonte de ionização foi de 230 °C.

Microextração em fase sólida

A extração em ponteira descartável – *Disposable Pipette Extraction (DPX)*, técnica recente, refere-se a uma ponteira de pipeta, modificada, contando com as etapas: condicionamento, aspiração da amostra, lavagem e eluição. Utilizou-se ponteiras de 1mL acopladas em seringa de polipropileno de 10mL. Realizou-se o condicionamento do sorvente Aminopropil com 200µL de água ultrapura. Foi feita a pipetagem e o descarte, seguido da aspiração de 40 µL de amostra negativa e 40 µL dos padrões na concentração de 200 ng/mL⁻¹. Ao aspirar, os analitos foram mantidos dentro da ponteira por 1 minuto dando leves batidas com a mão para misturá-los com o sorvente e ter melhor aderência; depois foi desprezado. O solvente de lavagem 90:10 v/v (água ultrapura:acetonitrila) foi aspirado e desprezado. Realizou-se a eluição da amostra com 200 µL de acetonitrila, posteriormente evaporada em um vial em banho à 40 °C em capela coberta com papel Kraft®. O eluato foi reconstituído com 50 µL de agente derivatizante BSTFA+1% de TMCS, agitando por

1 minuto no vórtex e levando à estufa por 30 minutos a 90 °C para derivatização e posterior injeção no CG-EM, modo SIM. Para o THC, as massas de 303, 371 e 386 foram analisadas, para o CBD 301, 337 e 390 e para o THC-COOH 371, 473 e 488. Foi feita uma otimização analítica dos parâmetros da DPX de forma univariada e Microsoft Office Excel 2013® para média, desvio padrão e coeficiente de variação das áreas dos analitos.

Otimização da massa de sorvente e pH da amostra

Para encontrar a massa de sorvente em que os analitos seriam melhor absorvidos, durante a preparação das ponteiras, adicionou-se em triplicata, 20, 40 60 mg de aminopropil como fase extratora ligado à sílica. Utilizou-se HCl (6 mol.L⁻¹) para acidificar a amostra em pH 5,0; NaOH (8 mol.L⁻¹) para alcalinizar a amostra em pH 8,0 e fluído oral inalterado para o pH neutro. Para o condicionamento realizado em triplicata, foi usado solução tampão acetato pH 5,0, solução tampão fosfato pH 8,0 e água ultrapura no pH neutro.

Resultados e Discussão

O ajuste do pH da amostra e do solvente de condicionamento da fase extratora é importante para garantir interações compatíveis entre os analitos e sorvente. Na otimização da massa de sorvente, à medida que a quantidade aumentou, a extração dos analitos se tornou mais eficiente. Por isso, usou-se 60 mg de sorvente aminopropil para a extração. O pH neutro revelou melhor absorção. Ficou definido o uso da amostra “*in natura*” e água ultrapura como solução tampão.

Na figura 1, é possível observar a presença dos analitos de interesse (THC, CBD e THC-COOH). Na parte superior encontram-se os picos e tempos de retenção e na inferior o espectrômetro de massas com as massas dos analitos.

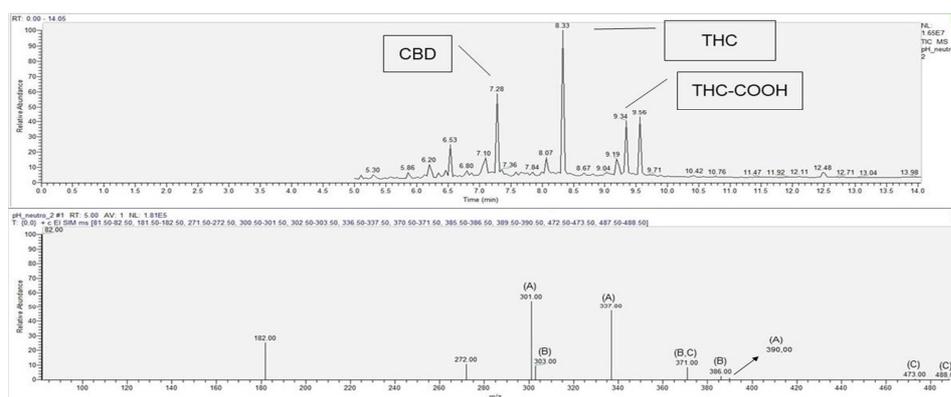


Figura 1 – Cromatograma obtido pela extração dos analitos no fluído oral por DPX/CG-EM com adição de padrões na concentração de 200 ng/mL.

Conclusões

O uso da DPX na extração de canabinóides em fluido oral é uma alternativa de custo reduzido, permitindo rápida detecção e identificação dos analitos. A otimização dos parâmetros utilizados permite melhor extração e detecção dos analitos, sendo etapa essencial para selecionar os procedimentos adequados anteriores à validação de uma metodologia com resultados satisfatórios e aplicáveis em amostras reais.

Agradecimentos

CNPq, CAPES e Universidade Estadual de Maringá.

Referências

BASTOS, F. I. P. M. *et al.* **III Levantamento Nacional sobre o Uso de Drogas pela População Brasileira. Ministério da Saúde.** Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, 2017.

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 Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2016.

BORDIN D. C. M. **Exposição fetal: determinação de drogas de abuso em mecônio empregando a técnica de extração em fase sólida modificada e cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas.** Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2013.

DAWLING, S.; JICKELLS, S.; NEGRUSZ, A. **Gas chromatography.** In: **Negrusz A, Cooper GAA.** Clarke's Analytical Forensic Toxicology 4th edition. London: Pharmaceutical Press, 485-527, 2013.

MELO, M. A. L. P. D. **Desenvolvimento de fases extratoras seletivas para técnicas de microextração para a determinação de fármacos e endocannabinóide em amostras de plasma por LC-MS/MS.** Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2017.

UNODC. United Nations Office on Drugs and Crime: **World Drug Report.** United Nations Publication, Vienna, 2021.

ZANCANARO, I. **Análise de substâncias psicoativas em fluido oral de condutores brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas.** Brasília: Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília; 2012.