

EXTRAÇÃO MINIATURIZADA DE OPIOIDES EM FLUIDO ORAL E ANÁLISE POR CGEM: OTIMIZAÇÃO POR PLANEJAMENTO FATORIAL

Ingrid Beatriz Campanha (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Simone Aparecida Galerani Mossini, Deborah Thais Palma Scanferla (Coorientador), Miguel Machinski Junior (Orientador), e-mail: ra108562@uem.br

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

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

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

Resumo:

Substâncias psicoativas (SPA) causam alterações comportamentais e síndromes de dependência que podem acarretar graves problemas de saúde e social. SPA como a heroína (HER) e a morfina (MOR) apresentam alto poder de dependência, pois o uso eleva à sensação de euforia e bem-estar. A detecção de SPAs, com propósito de fiscalização e/ou aperfeiçoamento no atendimento ao intoxicado, está relacionado diretamente com a demanda de testes toxicológicos cada vez mais sensíveis e seletivos para identificação e quantificação em amostras biológicas, como o fluido oral (FO) que apresenta facilidade de coleta e difícil adulteração, além da janela de detecção para uso recente. A técnica de microextração líquido-líquido dispersiva (do inglês, *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction* - DLLME) é uma técnica de extração que associada a Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) apresenta-se como um método para detecção de analitos de interesse. O presente estudo teve por objetivo a otimização da técnica DLLME/CG-EM, para detecção de morfina e heroína em FO. A otimização foi importante para identificar as principais variáveis significativas, volume do solvente extrator e da amostra e para detecção de MOR e HER, respectivamente. Ademais, os melhores volumes foram identificados para posterior validação do método.

Introdução

Substâncias que alteram o Sistema Nervoso Central (SNC) são definidas como Substâncias Psicoativas (SPAs). Estas drogas causam síndromes de dependência e problemas sociais, impactando na saúde do usuário e em gastos públicos (MINAYO, 1998). A morfina, um opiáceo, é um produto de biotransformação da heroína (HER). A absorção da heroína ocorre por diferentes vias como de forma intravenosa e por meio da inalação e sua metabolização ocorre de forma rápida sendo convertida em 6-monoacetilmorfina (6-MAM) e tem como subproduto a morfina-3-glicuronídeo (M3G), ambos produtos de biotransformação utilizados para detecção de heroína e morfina, respectivamente (PACHECO, 2013).

Um ponto essencial para uma boa detecção de SPA é a realização do preparo da amostra. A técnica de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) apresenta vantagens como baixo custo e rapidez, além da utilização de pequenos volumes de dois solventes orgânicos (MOREIRA *et al.*, 2014). Após este processo, é necessário a separação e identificação dos analitos de interesse, e isto pode ser realizado pela injeção em equipamento padrão-ouro para detecção de SPAs, como o Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas (CG-EM) (SANTOS *et al.*, 2017).

A detecção de drogas de abuso por métodos analíticos pode ser otimizada, com propósito de melhorar a rapidez, custos, aumentar sensibilidade e seletividade, facilitando sua execução e finalidade. Como matriz biológica para detecção das SPAs o fluido oral (FO) é a que apresenta maior facilidade de coleta, além de difícil adulteração, sendo matriz de escolha para identificação de uso recente.

A otimização da DLLME pode ser realizada por metodologia multivariada, a qual, através do uso de programas estatísticos pode executar delineamentos fatoriais que acarretarão figuras que podem ser interpretáveis, auxiliando a identificar quais variáveis são significativas e podem influenciar a técnica de extração (RODRIGUES, 2014). Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo a otimização da técnica DLLME utilizando metodologia multivariada, para posterior detecção de M3G e 6-MAM em FO, por CG-EM.

Materiais e Métodos

Amostra biológica

As amostras de fluido oral foram coletadas pelo método de expectoração de voluntários que não fizeram uso de qualquer tipo de droga e/ou medicamento que possa interferir nos resultados dos testes. 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, parecer nº 2.025.144.

Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

Adicionou-se amostras de FO, em tubos Falcon de 15 mL, cada experimento com quantidades diferentes codificadas, enriquecidas com M3G e 6-MAM, ambos 200 ng mL^{-1} , juntamente $500 \mu\text{L}$ de água destilada, acetonitrila como solvente dispersor e diclorometano como solvente extrator. Após, levou-se os tubos para agitação em vórtex, por 1 minuto, seguido de centrifugação por 10 minutos a 1000 rpm. Com a sedimentação da fase extratora, esta foi levada a evaporação em banho de água a 40°C . Finalmente adicionou-se a solução derivatizadora composta de BSTFA + 1% TMCS (bistrimetilsilil-trifluoroacetamida + triclorometilssilano) e aquecimento em estufa a 50°C por 10 minutos. Uma alíquota de $1 \mu\text{L}$ foi injetada no CG-EM.

Análise multivariada

Foi realizado dois planejamentos, planejamento fatorial fracionado e planejamento fatorial completo, para obtenção do diagrama de pareto e superfície de respostas, respectivamente. As variáveis que poderiam interferir da DLLME e que foram

avaliadas foram: volume do solvente extrator, volume da amostra, força iônica, pH da amostra e volume do solvente dispersor.

Para obtenção do diagrama de pareto foi realizado um delineamento (2^{k-1}) de cinco variáveis que podiam influenciar na DLLME de M3G e 6-MAM em FO. A DLLME foi otimizada por planejamento 2^{5-1} , avaliando 5 variáveis em 3 níveis. Foram realizados 16 experimentos em duplicata e 3 pontos centrais, totalizando 19 experimentos.

Para localizar/certificar a sub-região ótima das variáveis que foram significativas com propósito de modelagem, refinamento e finalização da otimização da técnica DLLME/CG-EM para extração de M3G e 6-MAM em fluido oral foi realizado um delineamento fatorial central completo, avaliando as 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

Neste estudo, observou-se que a adição de água na DLLME dificultava o processo de evaporação da fase extratora e por conta disso essa adição foi cessada sem que houvesse dificuldades posteriores.

O diagrama de pareto, gerado pela execução do primeiro planejamento, pode ser interpretado. As variáveis significativas para o experimento de acordo com aquelas que apresentaram valor de $p > 0,05$ foram: volume de solvente extrator (M3G) e para o 6-MAM, o volume da amostra. Ademais, ambas as variáveis apresentaram valor positivo (+), indicando que quanto maior a quantidade adicionada, melhor seria o resultado obtido, conforme pode ser observado na figura 1.

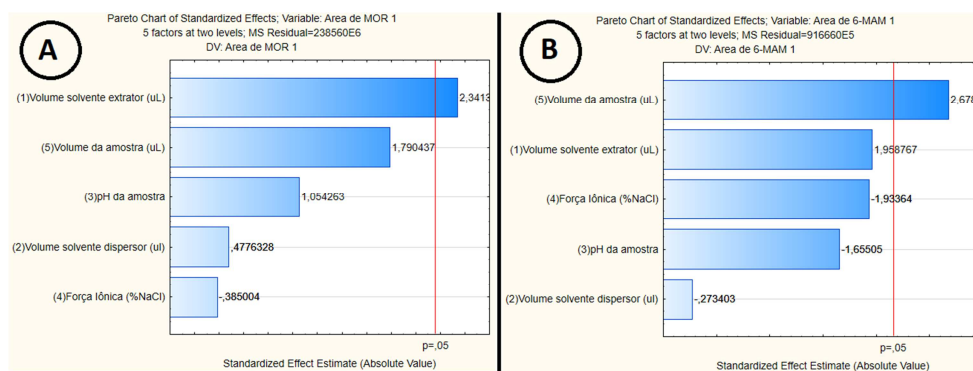


Figura1 – Diagrama de Pareto para os analito (A) M3G e (B) 6-MAM.

A partir do delineamento fatorial completo, para obtenção da superfície de respostas, foi realizada a análise ANOVA. Entretanto, apesar de significativo, não foi preditivo para os analitos de interesse, sendo assim inviável gerar o gráfico de superfície de respostas. Por fim, pode-se considerar, teoricamente que, quanto maior o volume de amostra, melhor seria a recuperação dos analitos de interesse e, assim, também melhores os resultados. Em contrapartida, na prática notou-se que, com um volume de amostra superior a 1000 μL ocorreu dificuldade na retirada da fase extratora (baixo volume) e assim, uma problemática para finalização do preparo da amostra

(DLLME), e conseqüentemente, na injeção da alíquota em CG-EM, para identificação dos analitos.

Conclusões

O presente trabalho demonstrou que, a utilização da análise multivariada para execução da técnica DLLME associada a CG-EM, é importante para avaliar simultaneamente, em menor período e custos, as variáveis que poderiam interferir na técnica. Conseqüentemente, o diagrama de pareto permitiu a interpretação de que as variáveis significativas para detecção dos analitos M3G e 6-MAM de morfina e heroína em amostras de fluido oral, foram, respectivamente, volume do solvente extrator e volume da amostra, e que, quanto maiores os volumes adicionados dos mesmos, melhores seriam os resultados obtidos. Apesar da superfície de respostas não poder ser analisada, pois análise ANOVA não foi preditiva, os resultados até aqui encontrados são efetivos para posterior validação do método DLLME/CG-EM.

Agradecimentos

Ao PIBIC/CNPq-Fundação Araucária-UEM e CAPES pelo apoio e financiamento.

Referências

MINAYO, M. C. S., DESLANDES, S. F. **A complexidade das relações entre drogas, álcool e violência.** Cadernos de Saúde Pública, v. 14, p. 35-42, 1998.

MOREIRA, B. J., YOKOYA, J. M. C., GAITANI, C. M. **Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME): fundamentos, inovações e aplicações biológicas.** Scientia Chromatographica, v. 6, n. 3, p. 186-204, 2014.

PACHECO, A. F. A. **Método de confirmação de análise qualitativa de um metabolito específico da heroína por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrofotometria de Massa.** Trabalho de Conclusão de Curso, 2013.

RODRIGUES, M. I. **Planejamento de experimentos e otimização de processos.** 3º Ed. São Paulo, 2014.

SANTOS, M. T., PONTES, M. A. N., MORAIS, M. F. S. et al. **Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de massas (CG-EM) e suas diversas aplicações,** 2017.