

Validação de Microextração Líquido Líquido Dispersiva e análise cromatográfica para quantificação do uso recente de cocaína em associação com bebidas alcóolicas em amostras de fluido oral

Andressa de Melo Costa (PIC/UEM), Deborah Thais Palma Scanferla (Coorientador), Simone Aparecida Galerani Mossini (Orientador). E-mail: ra114950@uem.br

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

Área e subárea: Ciências da Saúde/Farmácia/Análise Toxicológica

Palavras-chave: cocaína, fluido oral, validação.

RESUMO

A cocaína (COC) é uma substância psicoativa (SPA) frequentemente utilizada como droga recreativa. Para potencialização do seu efeito, a administração é combinada com bebidas alcóolicas, resultando em um produto de biotransformação denominado cocaetileno (CE). As análises toxicológicas são essenciais para identificação de SPA em amostras biológicas, auxiliando no tratamento do intoxicado e direcionamento de estratégias de prevenção para população com maior incidência. Este trabalho objetivou validar a técnica de preparo de amostras denominada Microextração Líquido Líquido Dispersiva (DLLME, do inglês Dispersive Liquid-Liquid Microextraction) e análise por Cromatografia Gasosa (CG) acoplada a Espectrometria de Massas (EM) para identificação e quantificação de COC e CE em amostras de fluido oral (FO) para confirmação do uso recente da SPA. A técnica mostrou-se linear, dentro dos intervalos de calibração, com coeficiente de correlação, $r > 0,98$. Os limites de detecção (LoD) foram 2 ng mL^{-1} (COC) e 4 ng mL^{-1} (CE). O limite de quantificação (LoQ) foi 6 ng mL^{-1} , para ambos analitos. A exatidão e precisão foram aceitáveis para todos níveis de concentração. O método validado foi seletivo para os analitos, além de nenhum efeito residual.

INTRODUÇÃO

O consumo de cocaína (COC) aumenta a cada ano, cerca de 1,46 milhão, ou 0,7% dos cidadãos consomem cocaína. A inserção das drogas ilícitas, como COC, em conjunto com drogas lícitas, como bebidas alcoólicas, na vida cotidiana, desperta interesse em diferentes segmentos sociais, criando-se discussões em outras pautas de políticas públicas de saúde e científicas. A temática do estudo justifica-se pelas consequências que o uso dessas substâncias acarreta à sociedade, ocasionando um sofrimento que interfere, significativamente, na diminuição da qualidade de vida, independentemente da faixa etária, classe socioeconômica, cultura, raça e espaço geográfico (ARAÚJO *et al.*, 2007).

Quando a cocaína é combinada com o uso de bebidas alcoólicas, gera um produto de biotransformação chamado cocaetileno (CE), que possui uma ação tóxica ainda mais grave que o consumo somente de COC, devido ao tempo de meia-vida plasmática até 5x maior (JONES *et al.*, 2019; ALVES & CARNEIRO, 2012). Para aplicação de uma técnica analítica em amostras autênticas, torna-se necessário à validação da metodologia, para atender o quesito confiabilidade. Existem parâmetros de validação que devem ser executados para verificação dos resultados, que se aceitáveis, a metodologia poderá ser aplicável com segurança. A Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME, do inglês Dispersive Liquid-Liquid Microextraction) é uma alternativa para o preparo de amostra e consiste na partição dos analitos de interesse, empregando-se pequenos volumes de uma mistura de solventes (dispersor e extrator). Nessa técnica a mistura obtida pela injeção rápida de um jato de uma mistura de solventes, um solvente miscível na fase aquosa (solvente dispersor) e outro miscível na fase orgânica (solvente extrator) promove a dispersão desta última na forma de microgotas com grande área superficial onde ocorre a partição (MARTINS *et al.*, 2012). O objetivo deste estudo foi validar metodologia de análise para extração e detecção de cocaína e produtos de biotransformação, na matriz biológica FO, utilizando DLLME e CG-EM.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi realizado com um *pool* de 10 amostras biológicas de FO branco (isenta dos analitos) para a validação analítica do método, obtida de 10 voluntários saudáveis que não fizeram uso de drogas de abuso/substâncias psicoativas, enriquecidas com padrões de analitos (CO e CE), em diferentes concentrações. Todos os voluntários que aceitaram participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá (COPEP/ UEM), sob o parecer nº 2.025.144. O método analítico DLLME/CG-EM foi validado com base nas normas da ANVISA (RDC 12/2012 e 166/2017) e nas normas do Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (UNODC, 2009), sendo os seguintes parâmetros analisados: seletividade, limites (detecção e de quantificação), linearidade, precisão, exatidão, efeito matriz e efeito residual.

Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME)

A extração DLLME, iniciou-se com centrifugação (3000 rpm/10 minutos) do *pool* de FO branco. Um volume do sobrenadante, 900 µL FO branco, de cada replicata necessária para execução dos parâmetros de validação, foi transferido e enriquecido com padrão externo analítico de COC e CE, em concentrações decrescentes próximos ao valor de corte (cut-off) dos analitos, e padrão interno deuterado de COC (COC-d3), 60 ng mL⁻¹. Em seguida, foi adicionado uma mistura de solvente extrator (800 µL de diclorometano) e dispersor (600 µL de acetonitrila), utilizando uma pipeta *Pasteur*. Os tubos foram levados a agitação branda em aparelho de ultrassom, por 2

minutos. Após centrifugados (3000 rpm / 10 minutos) 300 μ L (fase de extração – diclorometano) foi transferida para um frasco *vial*, para evaporação do solvente orgânico extrator (diclorometano). A alíquota foi evaporada a 40 °C em banho de água e armazenada no congelador. No dia da análise por CG-EM, foram adicionados 50 μ L do reagente BSTFA (bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida) 1% TMCS (trimetilclorosilano), para ressuspensão dos analitos de interesse (COC e CE). O processo descrito ocorreu por 10 minutos em estufa a 50 °C. Após esse tempo, o volume foi transferido do *vial* para o *insert* e levado para análise no equipamento CG-EM. 2 μ L da alíquota final foi injetado no CG-EM.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente método DLLME-CG/EM mostrou-se linear para os analitos COC e CE, dentro de todos os intervalos de calibração adotados para os analitos, com coeficiente de correlação (*r*) próximo de 0,99. A homocedasticidade foi determinada pela falta de ajuste (*Lack off fit*) para avaliação da existência de algum valor anormal nos resíduos e verificação do ajuste no modelo. A falta de ajuste (valor de *p*) foi superior a 0,05, conforme ilustrado na Tabela 1. Desta forma, as curvas lineares foram corretamente ajustadas, pela indicação dos modelos matemáticos ao nível de 5%. O ponto de calibração mais baixo, referente ao Limite de Quantificação (LoQ) foi de 6 ng mL⁻¹ para ambos, COC e CE. Os valores do Limite de Detecção (LoD) obtidos pelo método DLLME- CG/EM foram de 4 ng mL⁻¹ e 2 ng mL⁻¹ para COC e CE, respectivamente. Esses valores foram mais baixos e, portanto, adequados para este estudo, visto que o valor de corte para COC é de 8 ng mL⁻¹ e de 2 ng mL⁻¹ para CE, em FO, segundo recomendações da “Substance Abuse and Mental Health Services Administration” (SAMHSA, 2019), publicado em “Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs— Oral/Fluid”. O método foi seletivo, pois não foram observados picos interferentes próximos aos três tempos de retenção dos analitos selecionados e nem no tempo de retenção do padrão deuterado (COC-d3). Também não houve efeito residual, pois logo após injeção de extrato referente ao ponto de calibração mais alto dos analitos (COC e CE), não se observou picos nos tempos de retenção dos analitos nas amostras branco, injetadas subsequencialmente ao limite superior de quantificação.

Tabela 1. Resultados de linearidade do método de determinação de cocaína e cocaetileno em amostra de fluido oral.

Analito	LoD (ng mL ⁻¹)	LoQ (ng mL ⁻¹)	Faixa de concentração	Equação da reta	R	<i>Lack of fit</i>
COC	4	6	LoQ a 150ng mL ⁻¹	Y=0.0221 x - 0.0775	0,994	0.082
CE	2	6	LoQ a 70ng mL ⁻¹	Y=0.0437 x - 0.1331	0,985	0.075

Sendo LoD = Limite de Detecção; LoQ = Limite de quantificação; R = Coeficiente de correlação; *Lack of fit* = valor *p* para o nível de significância de 0,05.

CONCLUSÕES

A metodologia de análise realizada mostrou-se linear, sensível, pelos baixos níveis de detecção e quantificação e valores dentro dos limites adequados para precisão e exatidão. Desta forma destaca-se a sua confiabilidade para detecção e quantificação de cocaína e seu produto de biotransformação quando há consumo concomitante de bebidas alcoólicas (CE) em amostras autênticas de fluido oral, além da possibilidade de aplicabilidade em rotina laboratorial para avaliação do consumo recente das substâncias psicoativas, com consequente manejo correto do paciente.

REFERÊNCIAS

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, 24/07/2017. Guia para validação de métodos analíticos** - julho, 2017.

ALVES, B. E. P. & CARNEIRO, E. O. **Drogas psicoestimulantes: uma abordagem toxicológica sobre cocaína e metanfetamina, 21 f, Tese de pós-graduação em Farmácia e Química Forense, pela Pontifícia Universidade Católica de Goiás/IFAR, 2012.**

ARAÚJO, L.F. et al. Representações sociais da cocaína: estudo comparativo entre universitários das áreas de saúde e jurídica v, 24 n, 3 (2007): **Estudos de Psicologia (Campinas)**, 2022.

MARTINS, M.L. PRIMEL, E.G. et al. **Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações, Scientia Chromatographica Instituto Internacional de Cromatografia.** v, 4, n, 1, p, 35-51, 2012.

SAMHSA. **Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs— Oral/Fluid- Effective January 1, 2020**, Department of Health and Human Services (HHS)/Substance Abuse and Mental Health Administration (SAMHSA), Rules and Regulations, Rockville, EUA, Vol, 84, No, 207 / Friday, October 25, 2019.

UNODC. **United Nations Office on Drugs and Crime, Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment Used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens.** United Nations, New York, 2009. https://www.unodc.org/documents/scientific/validation_E.pdf.