

OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE *HEADSPACE* ASSOCIADA À CG-EM PARA ANÁLISE DE ÁLCOOL EM SANGUE TOTAL

Ana Carolina Baule de Oliveira (PIC), Larissa da Silva Teixeira (PIC), Deborah Thais Palma Scanferla, Kleber Ota de Oliveira (Coorientador), Simone Aparecida Galerani Mossini (Orientador). E-mail: anacarolinabaule@outlook.com

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

Área e subárea: Farmácia / Análises Toxicológicas

Palavras-chave: Cromatografia em fase gasosa; *headspace*; etanol

RESUMO

O álcool é a substância psicoativa de maior uso abusivo no mundo, assumindo o papel de destaque como principal analito de interesse em exames toxicológicos na atualidade. Este trabalho teve como objetivo otimizar a etapa inicial de uso de *headspace* associado à cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) para análise de etanol em amostras de sangue total. Foram coletadas amostras de sangue provenientes de voluntários que não fizeram uso de bebidas alcóolicas, para a avaliação do método. As variáveis analisadas foram temperatura, tempo e volume de amostra, e os melhores resultados foram 70 °C, 15 minutos e 1000 µl. Os resultados obtidos pela otimização são cruciais para realização dos parâmetros de validação da metodologia, de forma a assegurar a confiabilidade do método de cromatografia em fase gasosa para emprego em amostras autênticas de sangue na pesquisa de etanol, seja na área toxicológica Forense, Social ou Clínica.

INTRODUÇÃO

A determinação de etanol em sangue é uma das análises mais frequentes e importantes realizadas pelos laboratórios de toxicologia clínica e forense. Em 2020, foram divulgados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) os dados de consumo de álcool e outros parâmetros de saúde da população adulta brasileira, coletados em 2019 na Pesquisa Nacional de Saúde – PNS, que constatou que os brasileiros estão consumindo mais bebidas alcóolicas. O abuso de álcool constitui fator de risco crescente para acidentes/violências e/ou traumas físicos, culminando em internações hospitalares, perdas funcionais temporárias e permanentes, e em agravos que geram elevados custos sociais e econômicos (SANTANA; OLIVEIRA, 2017). Existem diversas amostras ou matrizes biológicas que podem ser usadas para a análise de substâncias exógenas no corpo humano, como a urina, fluido oral, cabelo, mas o sangue continua sendo até hoje uma das mais usadas, por fornecer adequadamente a correlação da concentração da droga no sangue com o estado clínico do indivíduo, e o período decorrido desde a administração. Porém, trata-se de

uma técnica invasiva, que exige uma certa experiência do profissional que irá coletar e possui uma janela de detecção restrita, pois as drogas de abuso podem ser rapidamente metabolizadas (BORDIN et al., 2015). É essencial que laboratórios responsáveis por esse tipo de análise, em especial os de interesse forense, disponham de métodos precisos, rápidos e eficientes que sejam validados de acordo as normas existentes, garantindo a qualidade e confiança das análises. Atualmente, a ferramenta *Headspace* associado a CG, é a técnica mais comum para a análise de álcool em amostras biológicas. O preparo de amostra por *Headspace* tem a vantagem de prolongar a vida útil da coluna e prevenir a contaminação do injetor (SPINOSA DE MARTINIS et al., 2004). A cromatografia gasosa (CG) tem sido utilizada na determinação do etanol, sendo considerada nos dias atuais como o método de referência. Ziavrou et al. (2005) descrevem a detecção e quantificação por CG, após preparo da amostra por *Headspace*, como o método de escolha para a detecção de etanol em sangue ou outras amostras devido à acurácia e à sensibilidade fornecidos. Desta forma, o objetivo deste projeto é otimizar para posterior validação um método para a determinação de etanol empregando *Headspace*-CG-EM e aplicação à determinação deste composto em amostras de sangue total.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostra biológica

Amostras de sangue negativas (branco) foram obtidas de voluntários que declararam a não ingestão de etanol. O volume coletado foi de aproximadamente 2 mL em tubos, contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) como anticoagulante. Todos os voluntários aceitaram participar do estudo. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá (COPEP/UEM), CAAE nº 56482016.1.0000.0104, sob o parecer nº 2.025.144.

Otimização do preparo de amostras por Headspace

Uma alíquota da amostra de sangue total foi transferida para um *vial* próprio para *Headspace* (Filtrilo) de 20 mL, onde foram adicionados água deionizada e n-propanol, como padrão interno e etanol absoluto (padrão externo/quantitativo). O *vial* foi fechado com uma tampa rosca metal magnética (Filtrilo), com septo de PTFE/Silicone e colocado na estufa a 70 °C durante um período. Após, 500 µL foram recolhidos com o auxílio de uma seringa *gas-tight*, e injetados manualmente e diretamente no equipamento CG-EM. As variáveis do preparo de amostra *Headspace* com análise por CG-EM, para otimização, e que foram avaliadas incluem: volume de amostra (sangue total), temperatura e tempo de extração dos analitos em estufa. Os parâmetros foram definidos conforme a melhor taxa de recuperação do analito.

Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

O sistema cromatográfico que foi utilizado para a otimização do método analítico foi o cromatógrafo a gás ISQ TRACE 1300, acoplado a um espectrômetro de massas quadrupolo de alto desempenho (ThermoScientific®), com amostrador automático AI 1310. Para análise das drogas de abuso foi utilizado a coluna capilar Rxi®-5ms (5% fenilpolisilfenilenosiloxano) (30m x 0,25mm x 0,25µm) e hélio como gás de arraste. Os dados foram processados utilizando o software TraceFinder (Thermo Scientific). Para a obtenção dos cromatogramas, os dados brutos foram extraídos dos softwares de cada equipamento e plotados no programa Microsoft Excel® 2010.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As variáveis do preparo da amostra analisadas para a otimização foram temperatura e tempo em estufa e volume de amostra. As temperaturas analisadas foram 60 °C, 70 °C e 80 °C. De 60 °C para 70 °C a extração obteve um aumento de 49% e o coeficiente de variação (CV) passou de 7,90% em 60 °C para 2,7% em 70 °C. Já de 70 °C para 80 °C a extração aumentou em 39%, porém houve também um aumento no CV que passou de 2,7% em 70 °C para 14,63% em 80 °C. Ao analisar os resultados entende-se que a temperatura ideal para a extração do etanol no sangue é 70 °C, pois em menor temperatura a extração é baixa não apresentando bons resultados e em temperaturas maiores apesar de a extração aumentar, o CV também aumenta, indicando que diminui a precisão de uma análise para a outra.

O tempo ideal em estufa foi a segunda variável analisada para a extração do etanol no sangue, os tempos utilizados foram 5, 10 e 15 minutos. O tempo de 5 minutos para 10 minutos apresentou um aumento de extração de 6%, e o CV passou de 6,24% para 2,47%. Já no tempo de 10 minutos para 15 minutos a extração aumentou em 21% e o CV passou de 2,47% para 1,93%, o que evidenciou um aumento significativo na extração e uma diminuição ainda maior no CV, indicando que o tempo ideal para a extração do etanol no sangue é de 15 minutos.

A última variável analisada foi o volume de amostra, os volumes utilizados foram de 400 µl, 700 µl e 1000 µl. Entre 400 µl e 700 µl a extração do etanol no sangue aumentou em 28% e o CV reduziu de 14,92% para 3,73%. Já de 700 µl para 1000 µl houve um aumento na extração de 10% e o CV passou de 3,73% em 700 µl para 2,47% em 1000 µl. A partir disso é possível observar que o volume ideal para a extração é 1000 µl, pois apresentou uma melhor extração e um menor CV.

Na figura 1, estão apresentados os dados relativos à mudança na área do pico em relação as variáveis temperatura, tempo e volume de amostra.

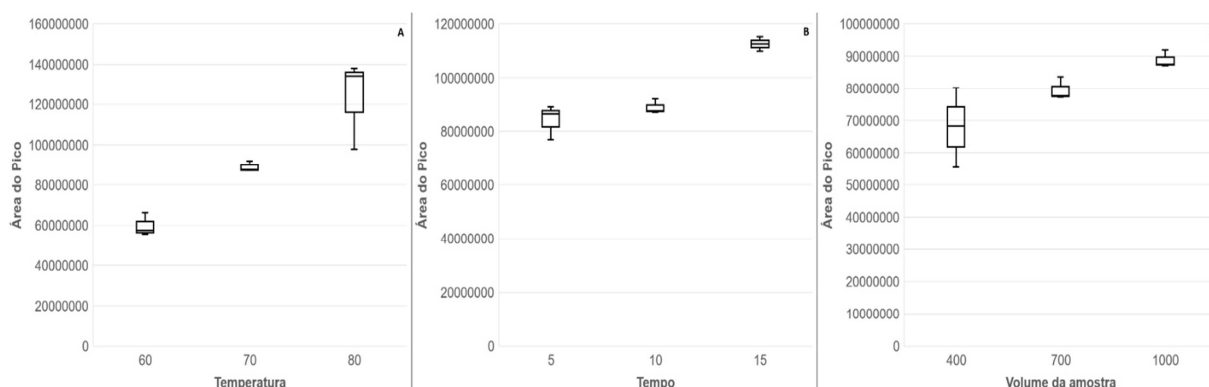


Figura 1. (A) Mudança na área do pico do etanol em relação a temperatura. (B) Mudança na área do pico do etanol em relação ao tempo. (C) Mudança na área do pico do etanol em relação ao volume da amostra.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que as variáveis adequadas para uma melhor extração do etanol em sangue são 70 °C em estufa por 15 minutos e com um volume de amostra de 1000 µl. Os resultados obtidos nesta otimização serão cruciais para posterior validação da metodologia, de forma a assegurar a confiabilidade do método de cromatografia em fase gasosa para emprego em amostras autênticas de sangue na pesquisa de etanol.

REFERÊNCIAS

IBGE. Pesquisa Nacional da Saúde: Downloads. 2020. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/saude/9160-pesquisa-nacional-de-saude.html?=&t=downloads>> Acesso em: 17 de agosto de 2023.

SANTANA, C. J.; OLIVEIRA, M. L. F. Effects of drug involvement on long-term users' family members. **Northeast Network Nursing Journal**, v. 18, n. 5, p. 671-678, 2017.

BORDIN, D.; MONEDDEIRO, F.F.S.S.; CAMPOS, E.G.; ALVES, M.N.R.; BUENO, L.H.P.; MARTINIS, B.S. **Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense**. v. 7, n. 2, p. 125–143, 2015.

SPINOSA DE MARTINIS, B. et al. Determination of ethanol in human blood and urine by automated headspace solid-phase microextraction and capillary gas chromatography. **Forensic Science International**, v. 522, p. 163-168, 2004.

ZIAVROU, K.; BOUMBA, V. A.; VOUGIOUKLAKIS, T. G. Insights into the origin of postmortem ethanol. **International Journal of Toxicology**. v. 24, p. 69-77, 2005.