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

Eduardo Calixto (PIBIC AFIS/CNPq/FA/UEM), Kleber Ota Oliveira (Co-orientador), Simone Aparecida Galerani Mossini (Orientadora). E-mail:sagmossini@uem.br
Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR

Farmacologia, Toxicologia

Palavras-chave: etanol; *headspace*; metanol

RESUMO

O etanol e metanol estão presentes de diferentes formas em nosso cotidiano. Porém a maior preocupação é o risco de intoxicações, pois são depressores do sistema nervoso central e o metanol é implicado em casos de adulteração de bebidas, podendo gerar danos ao fígado e, em casos graves, o óbito. A identificação do metanol como adulterante é fundamental para um tratamento rápido e eficaz, então são necessários métodos de identificação e quantificação. Este trabalho tem como objetivo otimização da técnica *headspace* associado à cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) para análise de etanol e metanol, podendo ser empregado em amostras autênticas de sangue na pesquisa de ambas substâncias, seja na área toxicológica forense, social ou clínica.

INTRODUÇÃO

O etanol está amplamente distribuído no cotidiano, presente em bebidas alcoólicas, combustíveis, solventes, desinfetantes. Quando oriundo de bebidas alcoólicas, é absorvido rapidamente no estômago (70%) e no duodeno (25%), o restante acaba sendo absorvido nas demais partes do trato intestinal e pequena porcentagem excretada de forma inalterada na urina. Após a ingesta de grandes doses pode resultar em quadro de intoxicação aguda (OLSON, K. R., 2014).
O metanol é um líquido incolor, inflamável e volátil, é oriundo da destilação destrutiva de madeiras, processamento da cana-de-açúcar e predominantemente a partir de gases naturais. Apesar da absorção em diferentes vias, os sintomas de intoxicação são parecidos devido a correlação de concentração e efeito, podendo ser observado náusea, vômito, tontura, dor de cabeça e abdominal, visão borrada e fotofobia nas primeiras horas após consumo e dependendo da quantidade ingerida, depressão do sistema nervoso central (SNC), bradicardia, problemas respiratórios

(devido a acidose metabólica) e convulsão (OLSON, K. R., 2014). O principal adulterante observado em bebidas falsificadas é o metanol, isso devido a seu menor custo de produção (ASLAN, M., 2015).
Devido aos potenciais riscos à saúde, é essencial a detecção e identificação desses compostos em casos de suspeita de intoxicação. Com sua característica de alta volatilidade, a análise de amostras suspeitas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) associada ao método de headspace (HS) se adequa ao propósito, pois é possível isolar, com o método HS, identificar e quantificar uma substância com CG (SITHERSINGH, M. J., 2021).
O HS consiste em uma técnica que avalia a presença de substâncias voláteis presente no gás dentro de um recipiente, chamado de *vial*, localizado entre a amostra e a tampa do recipiente. A técnica consiste na delimitação de parâmetros a serem testados, geralmente relacionado a temperatura, que fazem com que os analitos sofram alterações permanecendo no estado gasoso, assim possibilitando a retirada de uma alíquota padronizada através de uma seringa e análise ´pr cromatografia. Esta técnica é empregada principalmente em amostras de alta complexidade, garantindo maior extração de substâncias voláteis (SITHERSINGH, M. J., 2021).

MATERIAIS E MÉTODOS

Equipamentos
Foi utilizado um Cromatógrafo em fase gasosa CG-EM Quadrupolo de alto desempenho modelo ISQ TRACE 1300, acoplado a espectrômetro de massas (ThermoScientific®), com amostrador automático de líquidos AI 1310, e coluna capilar para cromatografia a gás, fase TR-5 MS (5% fenilpolisilfenilenosiloxano) com dimensões: 30m de comprimento x 0,25mm de diâmetro X 0,25µm de espessura de filme.

Amostra biológica
Amostras de sangue negativas (branco) foram obtidas de voluntários que declararam a não ingestão de etanol ou metanol. Projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (COPEP/UEM), CAAE nº 56482016.1.0000.0104, parecer nº 6.117.104.

Otimização do preparo da amostra por headspace
Alíquotas das amostras adicionadas de padrão de metanol e etanol 200µg/mL foram transferidas para um vial próprio para Headspace (Filtrilo) de 20 mL, sendo testados os volumes de 400µL, 700µL e 1000µL de amostra. Foi adicionado n-propanol, como

padrão interno. Os vials foram fechados com uma tampa rosca metal magnética (Filtrilo) com septo de PTFE/Silicone e colocados na estufa a 60ºC, 70ºC e 80ºC durante um período padronizado para teste de 5, 10 e 15 minutos. Após, 500 µL foram recolhidos com o auxílio de uma seringa gas-tight e injetados manualmente no CG-EM. Os parâmetros de otimização foram definidos conforme a melhor taxa de recuperação dos analitos. Os cromatogramas foram extraídos dos softwares de cada equipamento e plotados no programa Microsoft Excel® 2010.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi realizado a otimização das variáveis temperatura, volume e tempo de extração do método para a determinação de metanol e etanol empregando Headspace associada à CG-EM (Headspace-CG-EM) em triplicata para cada experimento.

Temperatura

De acordo com os dados de temperatura analisados, de 60ºC para 70ºC, houve um aumento de médio de 98% na extração do metanol e para o etanol um aumento de apenas 49%. Porém quando comparado 70ºC e 80ºC houve aumento médio de 53% e 39% para o metanol e etanol, respectivamente. Ao comparar e analisar os dados referentes à temperatura foi possível determinar que em 80ºC houve uma extração mais eficiente que nas outras temperaturas testadas, porém quanto maior a temperatura, apesar da maior extração, ocorre também aumento da instabilidade da molécula como consequência, resultando em imprecisão.

Tempo

Observou-se um aumento de 112% quando comparado o tempo de 5 minutos e 10 minutos para o metanol, e apenas 6% para o etanol. Porém quando comparado 10 minutos com 15 minutos, observou-se uma queda de 29% da extração no metanol e um aumento de 21% para o etanol. Com isso, é possível compreender que 5 minutos resulta em uma baixa extração de ambos, indicando a necessidade de um maior tempo para extração, porém 15 minutos apresentou queda na extração de metanol, podendo indicar que houve degradação da molécula pelo maior tempo de exposição à temperatura elevada. Assim, essa análise indica que o melhor tempo de extração para o metanol e etanol ocorre em 10 minutos, fornecendo uma extração de 6% e 112% para o etanol e metanol, respectivamente, quando comparado o tempo de 5 min e 10min.

Volume

Quanto aos volumes de amostra testados, entre 400µl e 700µl, obteve-se um aumento médio de 59% para o metanol e 28% para o etanol de extração. Mas entre 700µl e 1000µl houve um aumento médio de 363% na extração de metanol e apenas 10% para o etanol. Conforme os dados obtidos, é possível afirmar que o volume ideal de amostra para o metanol é de 1000µl, porém para extração de etanol entre os volumes 700µl e 1000µl não houve diferença significativa. Esse dado era esperado, uma vez que com o aumento do volume líquido no interior do frasco de Headspace, há uma tendência na diminuição do espaço da fase gasosa dentro do frasco, possibilitando uma maior concentração do analito e posteriormente e aumentando a extração.

CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos nos experimentos foi possível concluir que as variáveis sugestivas para otimização da extração do metanol são 80ºC em estufa por 10 minutos, com um volume de amostra de 1000µl. Porém para o etanol obteve-se maior extração em 80ºC em estufa por 15 minutos com um volume de amostra de 1000µl. Todos os dados obtidos são essenciais para posterior validação do método, de forma a garantir a confiabilidade do método de cromatografia em fase gasosa utilizado.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Araucária que forneceu incentivo financeiro à pesquisa, e ao Laboratório de Toxicologia da Universidade Estadual de Maringá, pela infraestrutura disponibilizada para a realização deste projeto.

REFERÊNCIAS

ARSLAN, M. Mustafa et al. Analysis of methanol and its derivatives in illegally produced alcoholic beverages. **Journal of forensic and legal medicine**, v. 33, p. 56-60, abr. 2015. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26048498/

SITHERSINGH, M. J.; SNOW, N. H. Headspace gas chromatography. In: Gas chromatography. **Elsevier**, 2021. p. 251-265. Disponível em: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385540-4.00009-2

OLSON, K. R. **Manual de toxicologia clínica**. 6. ed. Porto Alegre: AMGH Editora, 2014.