

OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA ANÁLISE DE COCAÍNA EM MANCHAS DE URINA SECA (DUS)

Ana Carolina Baule de Oliveira (PIBIC/CNPq/FA/UEM), 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 Gasosa; Cocaína; *Dried Urine Spot*.

RESUMO

A produção e o consumo de cocaína vêm aumentando mundialmente e seu uso está relacionado a efeitos tóxicos relevantes, tornando-se importante alvo para análises toxicológicas. Este trabalho teve como objetivo otimizar a metodologia analítica para detecção e quantificação de cocaína e seu principal metabolito, a benzoilecgonina, por manchas de urina seca (*DUS*), associada a Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM). Foram coletadas amostras de urina provenientes de voluntários que não fizeram uso de cocaína, para o desenvolvimento do método. As variáveis analisadas foram tempo de agitação e volume de solvente, e os melhores resultados foram 20 minutos e 750 μ l. Os resultados obtidos nesta otimização serão cruciais para posterior validação para assegurar sua precisão, exatidão e reprodutibilidade.

INTRODUÇÃO

A cocaína (COC) possui efeito estimulante no Sistema Nervoso Central (SNC), sendo considerada a droga estimulante mais potente, com elevada capacidade de induzir dependência, sendo administrada comumente por inalação e via intravenosa (Jacques, 2017). A análise toxicológica de drogas e seus metabólitos é essencial para diagnósticos hospitalares, mas a instabilidade dos analitos em amostras biológicas durante transporte e armazenamento é um desafio. Existem diversas matrizes que podem ser utilizadas para a determinação de substâncias psicoativas, uma das mais utilizadas para detecção de drogas lícitas e ilícitas é a urina, por permitir coleta não invasiva e por conter altos níveis de seus metabólitos (Tey; See, 2021). Amostras do tipo *Dried Urine Spots* (DUS) estão se tornando cada vez mais

populares, sendo uma opção atrativa. Entre as principais vantagens deste método estão a notória estabilidade do mesmo sob diferentes tempos e temperaturas de armazenamento, fácil armazenamento e transporte e a utilização de baixas quantidades de matriz biológica para a sua realização (Grignani *et al.*, 2022; Protti *et al.*, 2020). Assim, no presente estudo objetivou-se realizar a otimização de metodologia de extração e análise por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM) para a detecção e quantificação de COC em DUS.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras biológicas

Amostras de urina negativas (branco) foram obtidas de voluntários que declararam a não ingestão de cocaína. 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 56482016.1.0000.0104, parecer n. 5.709.700, (Anexo I).

Otimização e preparo de amostras de DUS

Para a confecção da DUS, 30 μL de urina foram aplicados em papel filtro, seco por 2 horas à temperatura ambiente. Um círculo de 8 mm do papel com a urina seca foi transferido para um tubo Eppendorf, onde foi adicionado 500 μL de solvente de extração (metanol/acetonitrila) com padrões internos a 100 ng/mL. Após agitação a 1.000 rpm por 5 minutos e centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos, a fase extratora foi evaporada em banho úmido a 60 °C. As amostras secas foram derivatizadas com 50 μL de MSTFA a 70 °C por 30 minutos e 1 μL foi injetado no CG-EM para análise. Foram otimizadas variáveis como volume de solventes e tempo de agitação com base na 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 utilizada a coluna capilar Rxi®-5ms (5% fenilpolisilfenilosiloxano) (30m x 0,25mm x 0,25 μm) 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

Foi realizada a otimização de uma metodologia para a extração e análise de COC e seu metabólito, benzoilecgonina (BZE), considerando tempo de agitação e volume de solvente. Foram avaliados três tempos de agitação: 10, 15 e 20 minutos. Para a COC, ao comparar 10 minutos com 15 minutos, houve um aumento de 5% na eficiência de extração, com o coeficiente de variação (CV) reduzido de 12,20% para 8,69%. Comparando 15 com 20 minutos, a eficiência de extração aumentou 61%, com o CV passando de 8,69% para 6,14%, indicando que 20 minutos é o mais eficaz para maximizar a extração e minimizar a variação. Para a BZE, comparando 10 minutos com 15 minutos, houve um aumento de 39% na eficiência de extração, com o CV reduzido de 14,59% para 9,28%. Ao comparar 15 com 20 minutos, a eficiência de extração aumentou 85%, mas o CV subiu de 9,28% para 19,34%, ultrapassando o limite desejável, o que indica maior variabilidade, mas o aumento significativo na eficiência justifica o uso de 20 minutos.

Foram testados volumes de 500 μ L, 750 μ L e 1000 μ L. Para a COC, aumentar o volume de 500 μ L para 750 μ L resultou em um aumento de 152% na extração, com o CV reduzido de 22,09% para 8,69%. No entanto, ao aumentar o volume de 750 μ L para 1000 μ L, a eficiência de extração reduziu 42%, com o CV passando de 8,69% para 9,24%, indicando que 750 μ L é o volume ideal. Para a BZE, aumentar o volume de 500 μ L para 750 μ L resultou em um aumento de 571% na eficiência de extração, com o CV reduzido de 12,31% para 9,15%. No entanto, ao aumentar o volume de 750 μ L para 1000 μ L, a eficiência caiu abruptamente em 800%, embora o CV tenha diminuído de 9,28% para 8,15%. Assim, o volume de 750 μ L foi considerado ideal, já que volumes de 500 μ L e 1000 μ L resultaram em extrações menos eficazes.

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

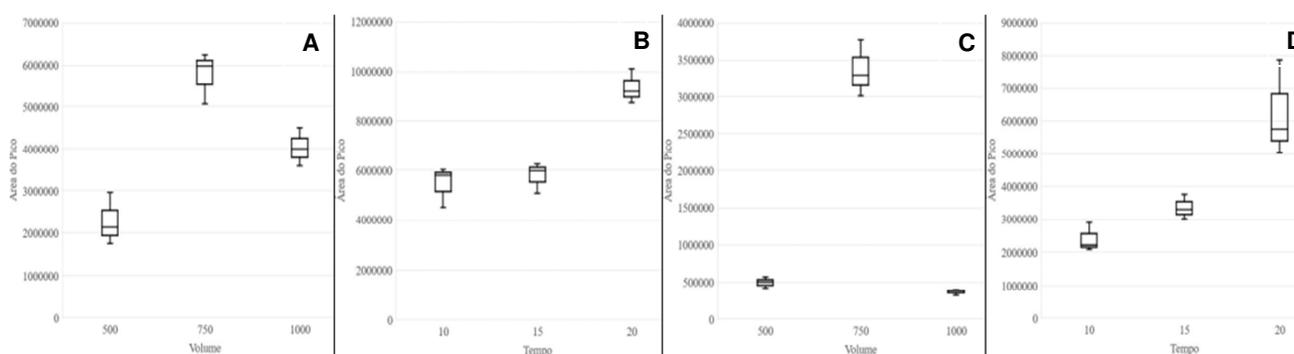


Figura 1. (A) Área do pico da cocaína em relação ao tempo de agitação. (B) Área do pico da cocaína em relação ao volume de solvente. (C) Área do pico da benzoilecgonina em relação ao tempo de agitação. (D) Área do pico da benzoilecgonina em relação ao volume de solvente.

CONCLUSÕES

Os resultados indicaram que o tempo de agitação de 20 minutos, associado ao uso de um volume de solvente de 750 μL , proporcionou uma extração mais eficaz de cocaína e benzoilecgonina em manchas de urina seca. Os resultados obtidos nesta otimização serão cruciais para posterior validação para assegurar sua precisão, exatidão e reprodutibilidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq (Bolsa PIBIC/CNPq/FA/UEM), ao Laboratório de Toxicologia, a minha orientadora, ao meu coorientador e pôr fim a Universidade Estadual de Maringá.

REFERÊNCIAS

GRIGNANI, P. et al. Genetic individual identification from dried urine spots: A complementary tool to drug monitoring and anti-doping testing. **Drug Testing and Analysis**, v. 14, n. 7, p. 1234–1243, 1 jul. 2022.

JACQUES, Ana Laura. **Desenvolvimento de método analítico para análise de drogas de abuso utilizando a técnica de dried spot para fluido oral**. 2017. Tese (Doutorado em Farmácia) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

PROTTI, M. et al. Dried urine microsampling coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for the analysis of unconjugated anabolic androgenic steroids. **Molecules**, v. 25, n. 14, 1 jul. 2020.

TEY, H. Y.; SEE, H. H. A review of recent advances in microsampling techniques of biological fluids for therapeutic drug monitoring. **Journal of Chromatography A**, v. 1635, 4 jan. 2021.