



Desenvolvimento de método analítico para determinação de metilfenidato, etilfenidato e ácido ritalínico em amostras de urina por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

Kauê de Oliveira Chinaglia^{1,2}; José Luiz da Costa^{1,2}

¹Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas-SP, Brasil

²Centro de Informação e Assistência Toxicológica (CIATox), Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas-SP, Brasil

1. Introdução

O metilfenidato (MFD), princípio ativo do medicamento conhecido no Brasil com o nome comercial de Ritalina®, é uma substância relacionada estruturalmente às anfetaminas e um dos estimulantes mais consumidos no mundo, sendo principalmente utilizado para o tratamento do Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH).

A principal via de biotransformação do MFD consiste na hidrólise da ligação éster metílico por esterases para formar o ácido ritalínico (AR), sendo um composto farmacologicamente inativo, que apresenta um tempo de meia vida maior e é comumente adicionado a métodos de detecção de MFD.

O uso abusivo de um análogo estrutural do MFD, o etilfenidato (EFD), foi identificado pela primeira vez em 2011 pelo European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). Esse composto possui mecanismo de ação e efeitos psicoestimulantes semelhantes ao fármaco lícito, podendo ser sintetizado em laboratório ou mesmo ser encontrado in vivo em pacientes que combinam MFD com etanol, através de mecanismos de transesterificação durante a biotransformação. A Figura 1 apresenta as estruturas do MFD, EFD e AR.

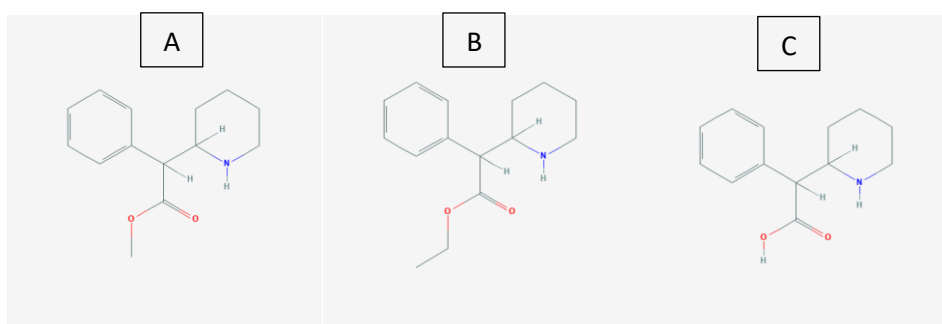


Figura 1. Estrutura química do metilfenidato (A), etilfenidato (B), ácido ritalínico (C)



No entanto, muitos universitários que não apresentam critérios para o uso do fármaco e de seu análogo, os utilizam mesmo assim como um meio de melhorar o rendimento dos estudos. Os principais efeitos colaterais relacionados ao consumo desse composto são alucinações, insônia ou sonolência, hipertensão e ausência de pensamentos e sensações. Também apresenta risco de dependência e abuso.

Existem diversas matrizes biológicas que podem ser utilizadas para análises toxicológicas. A utilização de urina pode ser vantajosa por conta da facilidade de coleta e a grande disponibilidade de volume de amostra para análise

A técnica de extração por *QuEChERS* inicialmente foi desenvolvida para a determinação de resíduos de pesticidas básicos, neutros e ácidos presentes em alimentos. No entanto, devido às suas características, tem sido empregada para outros compostos. Também apresenta um conjunto de vantagens extremamente úteis para o preparo de amostras e análises, como rapidez, facilidade, economia, efetividade, robustez e segurança.

O uso de MFD para melhorar a performance cognitiva recebeu o nome de “aprimoramento cognitivo farmacológico” e chamou a atenção de países como Canadá, Estados Unidos, Brasil e Inglaterra.

Apesar de existir vários casos pelo mundo de uso abusivo destes compostos, há poucos métodos relacionados à sua quantificação em urina e campanhas de prevenção de consumo desses compostos como drogas de abuso.

2. Objetivos

O objetivo desse estudo é desenvolver um método quantitativo para análise de MFD, do análogo EFD e do metabólito AR em urina, utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS).

3. Metodologia

Para o preparo das amostras utilizadas na etapa de validação do método, pesou-se 50 mg do *QueChERS salt* (Q150 - AOAC method) (MgSO₄ 4:1 NaOAc) em tubo plástico de polipropileno com volume total de 5 mL. Adicionou-se 100 µL de urina branco, 10 µL de solução padrão, 10 µL padrão interno (MDMA-d₅) 1000 ng/mL e 200 µL de acetonitrila. Homogeneizou-se o tubo em vortex a 2500 RPM por um período de 5 minutos e centrifugou-se a 14.700 g por 5 minutos. Em seguida, transferiu-



se 50 μL do sobrenadante em placa de 96 poços contendo 50 μL de fase móvel A e injetou-se 5 μL da solução final no sistema LCMS-8040.

Para a análise das amostras utilizou-se LCMS-8040 (Shimadzu®, Japão) e coluna ACQUITY UPLC BEH C18 (2,1 mm X 50 mm, 1,7 μm) com temperatura definida em 50 °C. A temperatura do amostrador foi definida em 15 °C e o solvente de lavagem utilizado foi metanol:água ultrapura (MilliQ) (70:30, v/v). A fase móvel foi composta por (A) água ultrapura e (B) metanol contendo 2 mmol/L de formiato de amônio e 0,1% de ácido fórmico (v/v) com uma vazão definida em 350 $\mu\text{L}/\text{min}$. O tempo de corrida de cada amostra foi de 4,50 minutos.

O espectrômetro de massas foi equipado com fonte de ionização por *electrospray* operando em modo positivo, e para cada analito foram selecionadas duas transições de MRM, sendo uma para quantificação e a segunda para qualificação (com uma janela de tolerância máxima de 20%).

4. Resultados

Para a otimização do método, verificou-se primeiramente o tempo de retenção, intensidade do pico no cromatograma e os íons majoritários de cada composto (Figura 2).

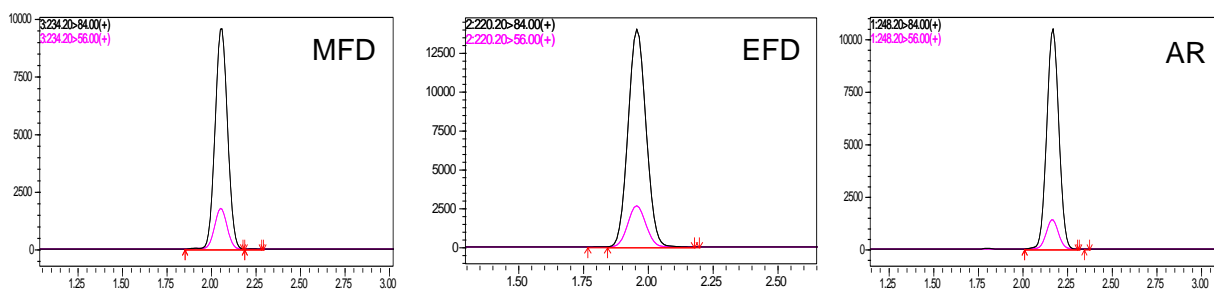


Figura 2. Cromatogramas de íons extraídos de amostra de urina branco fortificada com metilfenidato e etilfenidato na concentração de 5 ng/mL, e ácido ritalínico em 100 ng/mL

A figura 3 exemplifica a separação cromatográfica obtida no método em LC-MS 8040.

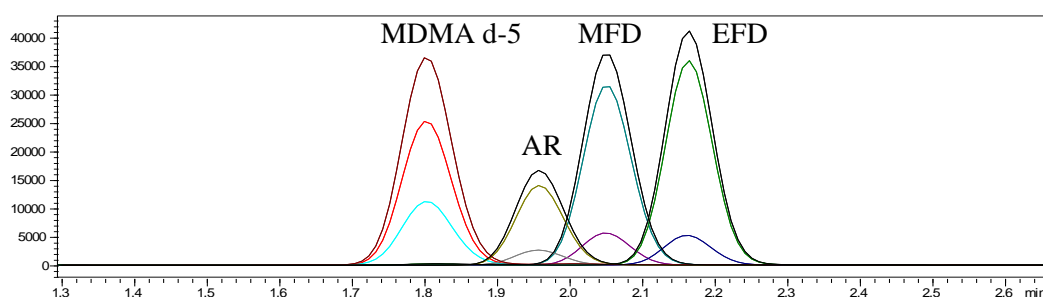


Figura 3. Cromatograma de amostra de urina branco fortificada na concentração de 100 ng/mL



O limite de quantificação e detecção (LQ/LOD) para o MFD e EFD foi de 5 ng/mL, apresentando linearidade de 5 a 500 ng/mL ($r > 0,99$, $1/x^2$). Para o ácido ritalínico, o LQ e o LOD foi de 100 ng/mL com linearidade de 100 a 5000 ng/mL ($r > 0,98$, $1/x^2$). A validação foi realizada em um período de 5 dias sendo que a cada dia eram analisadas triplicatas dos controles baixo, médio e alto. Os resultados obtidos, como mostrados na tabela 1, se mostraram satisfatórios para os testes de imprecisão intradia, interdia e inexatidão (variação aceitável em até $\pm 20\%$), efeito matriz e recuperação.

Tabela 1. Resultados dos testes de imprecisão intradia e interdia, inexatidão, efeito matriz e recuperação entre os controles baixo (15 e 300 ng/mL), médio (125 e 1250 ng/mL) e alto (250 e 2500 ng/mL)

Analitos	Imprecisão intra-dia (%RSD) (n=3)			Imprecisão inter-dia (%RSD) (n=15)			Inexatidão (%) (n=15)			Efeito matriz (%)		Recuperação (%)	
	Baixo	Médio	Alto	Baixo	Médio	Alto	Baixo	Médio	Alto	Baixo	Alto	Baixo	Alto
Metilfenidato	17,5	5,8	17,3	14,9	6,1	14,4	-11,9	2,2	-9,1	-37,5	-36,7	90,5	97,9
Etilfenidato	16,7	10,7	14,1	14,4	9,6	11,9	-6,3	6,7	-7,8	-29,2	-31,0	93,7	104,4
Ácido Ritalínico	10,6	12,6	14,6	9,6	10,7	12,4	3,5	5,1	-15,1	57,4	27,5	83,1	81,7

Também foi possível realizar a análise de duas amostras reais, verificando a presença de MFD e AR (Figura 4)

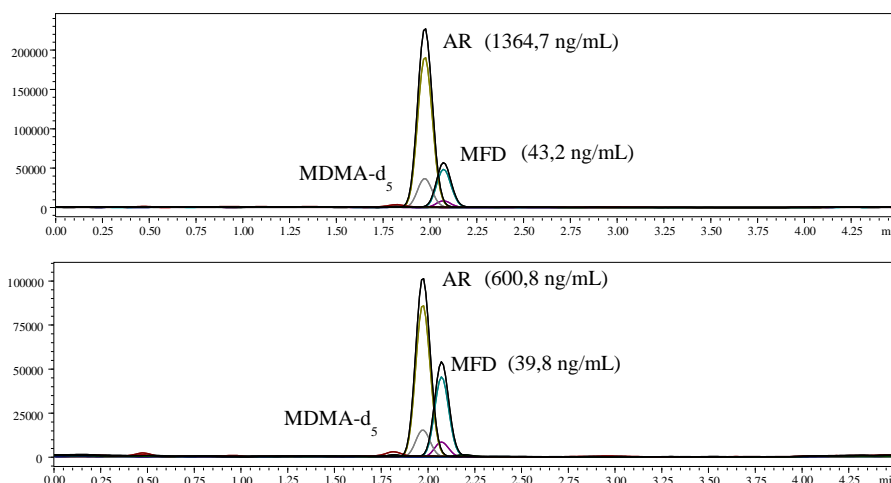


Figura 4. Cromatogramas obtidos de análises realizadas em amostras reais



5. Conclusão

Um método quantitativo capaz de detectar metilfenidato, etilfenidato e ácido ritalínico em amostras de urina foi desenvolvido e validado utilizando *micro-QuEChERS* e LC-MS/MS. Foi possível verificar boa linearidade, sensibilidade, e precisão e exatidão satisfatórios. Além disso, análise de amostras reais foram realizadas.

6. Referências

- Ávila AA. Nuevas sustancias psicotrópicas: un nuevo reto en urgencias Editorial. *Urgent Int Med Emergencias*. 2017;1(3).
- Casale J, Hays P. Ethylphenidate: An analytical profile. *Microgram J* [Internet]. 2011;8(2):58–61. Available from: http://www.dea.gov/pr/microgram-journals/2011/mj8-2_58-61.pdf
- Dellalibera-Joviliano R. UROANÁLISE: ABORDAGENS GERAIS (Urinalysis: general approaches). 2011;
- DeSantis A, Webb EM, Noar SM. Illicit use of prescription adhd medications on a college campus: A multimethodological approach. *J Am Coll Heal*. 2008;
- Gjerde H, Øiestad EL, Christophersen AS. Using biological samples in epidemiological research on drugs of abuse. *Nor Epidemiol*. 2011;
- Ho JH, Bailey GP, Archer JRH, Dargan PI, Wood DM. Ethylphenidate: Availability, patterns of use, and acute effects of this novel psychoactive substance. *Eur J Clin Pharmacol*. 2015;
- Linhares MI. Análise toxicológica forense: da ficção científica à realidade. 2012;
- Lunelli M, Mery M. Considerações acerca do aumento do consumo de “ritalina” nas crianças em âmbito escolar. 1994;1–13.
- Parks C, McKeown D, Torrance HJ. A review of ethylphenidate in deaths in east and west Scotland. *Forensic Sci Int*. 2015;
- Pouliopoulos A, Tsakelidou E, Krokos A, Gika HG, Theodoridis G, Raikos N. Quantification of 15 Psychotropic Drugs in Serum and Postmortem Blood Samples after a Modified Mini-QuEChERS by UHPLC – MS-MS. 2018;(January):337–45.
- Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. *J Anal Toxicol*. 2013 Sep;37(7):452–74.