



DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO MINIATURIZADO DE EXTRAÇÃO (MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA – DLLME) PARA ANÁLISE DE ÁCIDO 11-NOR- Δ^9 -TETRAIDROCANABINOL-CARBOXÍLICO (THC-COOH) EM AMOSTRAS DE URINA

Leonardo Costalonga Rodrigues^{1,2(*)}, José Luiz Costa^{1,2}

1 Centro de Informação e Assistência Toxicológica de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas.

2 Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNICAMP, Campinas.

1. INTRODUÇÃO

A *Cannabis* é uma das plantas mais usadas como droga de sendo seu principal constituinte psicoativo, o Δ^9 -tetraidrocanabinol (THC), que é encontrado principalmente nas florações, na resina e nas folhas da planta. Outros compostos que também são encontrados em quantidades significantes são o canabidiol (CBD) e o canabinol (CBN). Após a administração do THC, esta substância é biotransformada em dois metabólitos principais, o 11-hidroxi- Δ^9 -tetraidrocanabinol (THC-OH) e o ácido 11-nor- Δ^9 -tetraidrocanabinol-carboxílico (THC-COOH).

O preparo de amostra é uma das etapas fundamentais de um processo analítico. Por conta desta importância, diferentes métodos têm sido desenvolvidos para otimizar às extrações. Uma das técnicas de preparo de amostra convencional é a extração líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*). Esse método se baseia na partição da amostra com um solvente orgânico imiscível, requer grandes volumes de solventes e envolve várias etapas que podem ser associadas com a perda de analito e com a contaminação. A fim de melhorar essa técnica, foi desenvolvida a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*), proposta em 2006 por REZEE e colaboradores. Desde sua introdução, esta técnica vem sendo utilizada com frequência na área de toxicologia forense para a determinação de drogas de abuso em plasma, sangue e urina.

A DLLME se baseia na utilização de um solvente dispersivo que seja miscível em um solvente extrator, correspondente a fase orgânica, e na amostra,

correspondente a fase aquosa. É uma técnica de extração que consiste na pré-concentração das amostras. O tempo de extração é o intervalo decorrente entre a injeção da mistura de solventes e a centrifugação. A área superficial entre o solvente de extração e a fase aquosa é substancial, de maneira que, ocorra uma rápida transferência dos analitos da fase aquosa para a fase extratora, possibilitando atingir o estado de equilíbrio rapidamente.

Os solventes selecionados são adicionados à amostra em um tubo de fundo cônico, no qual ocorre a extração dos analitos por partição. A adição dos solventes deve ser realizada por meio de uma rápida injeção, para que ocorra a dispersão da fase orgânica (solvente extrator) na forma de microgotas com grande área superficial, nas quais ocorre a partição. A Figura 1 apresenta a injeção da mistura dos solventes a amostra, a dispersão do solvente extrator e a partição do analito entre a amostra e o solvente extrator.

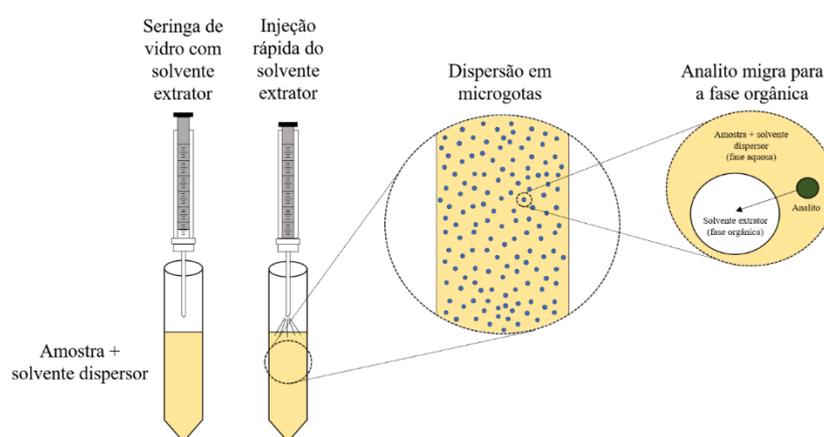


Figura 1. Esquema demonstrativa para a injeção da mistura de solventes à amostra, para a dispersão do solvente extrator na amostra e para a partição do analito.

Feito isso, a mistura é centrifugada para que o solvente extrator seja sedimentado no tubo e então possa ser coletado e analisado. As principais vantagens desta técnica são referentes a miniaturização, ou seja, baixo custo, rapidez e eficiência de extração.

Na literatura científica, vários métodos já foram descritos para análise de canabinoides, mas nenhum deles utiliza a técnica miniaturizada de DLLME como técnica de preparo de amostras. A DLLME é largamente utilizada para a preparação de amostras de água para fins ambientais e raramente é utilizada para análise de drogas em matrizes biológicas.

Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo otimizar os parâmetros de

extração e validar um método para análise de canabinoides por DLLME e cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas sequencial (GC-MS/MS). O método desenvolvido pôde ser utilizado para diagnóstico laboratorial de intoxicações causadas por estes agentes tóxicos.

O método otimizado foi validado seguindo as recomendações do guia da *Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX)*. Com limite de detecção em 1 ng/mL e limite de quantificação em 5 ng/mL. O método se mostrou linear entre 5 e 500 ng/mL ($1/x^2$, $r > 0,990$), seletivo quando analisado em presença de outros 42 fármacos e os analitos foram estáveis em amostrador automático (24h/10°C), 3 ciclos de descongelamento e 7 dias de armazenamento (4 °C e -20 °C).

2. METODOLOGIA

2.1. OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO POR DLLME

Para verificar a adequação das condições de extração propostas pela literatura de DLLME para o caso específico do THC-COOH foi realizado um planejamento experimental em dois níveis e dois parâmetros (2^2) para a escolha do solvente extrator e dispersor. O tratamento dos dados de área absoluta obtido foi feito com auxílio do software *Unscrambler X* versão 10.3, *CAMO Software AS* (Oslo, Noruega). A análise dos dados foi feita por ANOVA ($p=0,05$) e os melhores solventes selecionados foram o clorofórmio e acetonitrila, como solvente dispersor e extrator, respectivamente.

Os volumes de solvente extrator e dispersor também foram otimizados por planejamento experimental em dois níveis e dois parâmetros (2^2). Os volumes testados foram 50, 100 e 150 μ L para o solvente dispersor e 100, 175 e 250 μ L para o solvente extrator. Os melhores volumes foram 50 μ L de solvente extrator e 100 μ L de solvente dispersor.

Após a otimização destes parâmetros, o procedimento experimental desenvolvido foi baseado na utilização de 300 μ L de urina, com adição de 30 μ L da solução padrão (no preparo de calibrantes e controles) e 30 μ L da solução de padrão interno. A seguir, houve a adição de 50 μ L de solução aquosa de hidróxido de sódio na concentração de 10 mol/L para a hidrólise da conjugação glicurónica. O tubo de polipropileno com esta mistura foi agitado e então aquecido em chapa de aquecimento à 70°C por 10 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, foram adicionados 300 μ L de solução aquosa de ácido sulfúrico a 5% para ajuste de pH entre 3,0 e 3,5,

adequado para extração do THC-COOH.

Para a realização da DLLME, foram adicionados 100 μL de solvente dispersor (acetonitrila, escolhido pela otimização acima descrita) seguido por breve agitação em vortex (10 s), sendo então adicionado 50 μL de solvente extrator (clorofórmio) com uma seringa de vidro de *headspace*. Feito isso, houve agitação e centrifugação por 5 minutos à 5500 rpm.

Por fim, 50 μL da fase inferior (orgânica) da mistura foi transferida para um vial e o conteúdo foi evaporado com fluxo de nitrogênio à 40°C por 5 minutos. Houve a ressuspensão com 75 μL de acetato de etila e 25 μL de BSTFA+1%TMCS, com aquecimento à 70°C por 20 minutos em chapa de aquecimento e, após resfriamento à temperatura ambiente (10 min), o conteúdo do vial foi transferido para insert de vidro com mola de polipropileno, acondicionado no mesmo vial, sendo então realizada a injeção de 2 μL no GC-MS/MS.

2.2 VALIDAÇÃO

A validação do método otimizado foi então realizada seguindo as recomendações do guia da *Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX)*.

O método se mostrou linear entre 5 e 500 ng/mL ($1/x^2$, $r > 0,990$), com limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) em 1 e 5 ng/mL, respectivamente. Os resultados, como mostrados na tabela 1, se mostraram satisfatórios para os testes de imprecisão intradia e interdia, com valores menores ou iguais a 5,1% e 10,5% respectivamente. Os testes de imprecisão foram avaliados usando análise de variância de um fator (ANOVA, $p < 0,05$).

A inexatidão (variação aceitável em até $\pm 20\%$) não excedeu 4,9%. Resultados para efeito matriz menores que 2,4% foram observados para os controles baixo e alto em seis amostras de urina diferentes. Os testes de recuperação obtiveram resultados de, ao menos, 38% para o THC-COOH. Mesmo com uma recuperação não tão alta o método foi capaz de quantificar o analito com boa precisão e eficácia.

A inexatidão do método foi avaliada ainda através de ensaio de proficiência interlaboratorial, promovido pela *United Nations Office for Drugs and Crime (UNODC)*. Uma amostra de urina com concentração determinada pela agência internacional de 690 ng/mL foi analisada utilizando o método aqui desenvolvido, sendo obtido o resultado de

702 ng/mL, o que representa inexatidão de 1,7%. Assim, pode-se demonstrar que o método possui excelente inexatidão, tanto em avaliação com controles fortificados no laboratório quando em amostras de ensaio de proficiência.

Tabela 1. Resultados dos testes de imprecisão intradia e interdia, inexatidão e efeito matriz de método para quantificação de THC-COOH por GC-MS/MS.

Analito	CQ	Imprecisão	Imprecisão	Inexatidão (%) (n=15)	Efeito	Eficiência
		Intradia (%CV) (n=3)	Interdia (%CV) (n=15)		Matriz (%) (n=10)	de Extração (%) (n = 6)
	LQ	5,1	6,5	-4,9	NA	NA
THC-COOH	Baixo	4,5	10,5	-1,6	-0,1	38,2
	Médio	2,7	4,1	-1,8	NA	NA
	Alto	2,4	6,8	2,7	2,4	40,2

%CV coeficiente de variação em porcentagem, NA não avaliado, CQ controle de qualidade (LQ 5 ng/mL, baixo 15 ng/mL, médio 75 ng/mL, alto 400 ng/mL)

Na a avaliação da estabilidade em amostrador automático, o analito THC-COOH foi estável por 24 horas após a primeira injeção para os três controles (baixo, médio e alto). O maior decréscimo foi de 14,6% no controle baixo (15 ng/mL). O analito não foi estável após três ciclos de congelamento e descongelamento no controle baixo, com decréscimo de 20,4%. Entretanto, para o controle alto (400 ng/mL) o analito se mostrou estável, com decréscimo de 11,1%.

A estabilidade após 7 dias de armazenamento a 4°C e -20°C mostraram decréscimos de concentração de 23,9% e 25,1% para o controle baixo (15 ng/mL) a 4°C e -20°C, respectivamente. Para o controle alto (400 ng/mL), o decréscimo foi de 4,9% e 15,1 % a 4°C e -20°C, respectivamente.

Não houve efeito residual (*carryover*) quando realizada a injeção de uma amostra negativa após a injeção do maior ponto da curva de calibração (500 ng/mL).

O método se mostrou seletivo quando analisado na presença de outros 42 fármacos à 10 ou 100 µg/mL, para as amostras negativas.

Para demonstrar a aplicabilidade do método proposto, 24 amostras de urina de pacientes foram analisadas. Dessas 24, 22 apresentaram resultado positivo para THC-COOH e, nas outras duas (23 e 24), não foi detectada a presença do analito. Esses dados sugerem que o LQ deste método foi baixo o suficiente para ser usado em análises clínicas e toxicológicas.