



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

Leonardo Costalonga Rodrigues<sup>1,2(\*)</sup>, José Luiz Costa<sup>1,2</sup>

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

2 Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNICAMP, Campinas.

### 1. INTRODUÇÃO

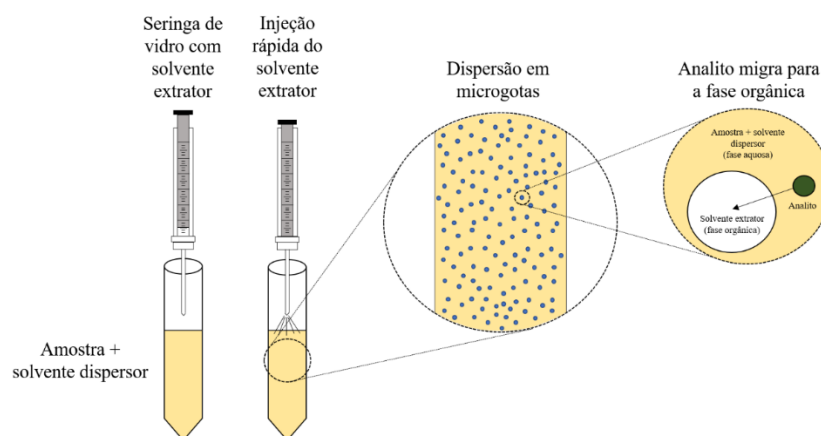
A *Cannabis* é uma das plantas mais usadas como droga de sendo seu principal constituinte psicoativo, o  $\Delta^9$ -tetraidrocanabinol (THC), que é encontrado principalmente nas florações, na resina e nas folhas da planta. Outros compostos que também são encontrados em quantidades significantes são o canabidiol (CBD) e o canabinol (CBN). Após a administração do THC, esta substância é biotransformada em dois metabólitos principais, o 11-hidroxi- $\Delta^9$ -tetraidrocanabinol (THC-OH) e o ácido 11-nor- $\Delta^9$ -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  $\mu$ L para o solvente dispersor e 100, 175 e 250  $\mu$ L para o solvente extrator. Os melhores volumes foram 50  $\mu$ L de solvente extrator e 100  $\mu$ L de solvente dispersor.

Após a otimização destes parâmetros, o procedimento experimental desenvolvido foi baseado na utilização de 300  $\mu$ L de urina, com adição de 30  $\mu$ L da solução padrão (no preparo de calibrantes e controles) e 30  $\mu$ L da solução de padrão interno. A seguir, houve a adição de 50  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu\text{L}$  de solvente dispersor (acetonitrila, escolhido pela otimização acima descrita) seguido por breve agitação em vortex (10 s), sendo então adicionado 50  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  de acetato de etila e 25  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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.