



## Desenvolvimento de método miniaturizado de extração para determinação de anfetaminas e seus derivados em amostras de fluido oral usando microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME).

Júlia M. M. Kahl<sup>1,4\*</sup>, Kelly F. da Cunha<sup>2,3,6</sup>, José Luiz Costa<sup>1,2,5\*\*</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de Campinas, Campinas, São Paulo 13083-859, Brasil.

<sup>2</sup>Centro de Controle de Intoxicação, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Campinas, Campinas, São Paulo 13083-859, Brasil.

<sup>3</sup>Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Campinas, Campinas, São Paulo 13083-859, Brasil.

<sup>4</sup>CPF: 497.543.828-32 E-MAIL: [juliammkahl@gmail.com](mailto:juliammkahl@gmail.com) TEL.: (19) 981702322

<sup>5</sup>CPF: 278.446.588-86 E-MAIL: [costajl@yahoo.com.br](mailto:costajl@yahoo.com.br) TEL.: (11) 993190542

<sup>6</sup>E-MAIL: [cunha\\_ph@hotmail.com](mailto:cunha_ph@hotmail.com)

### Área

Biomédicas

### Órgão de financiamento

PIBIC – SAE/UNICAMP

### RESUMO

O uso de estimulantes no mundo vem aumentando constantemente desde 2008, de acordo com o World Drug Report (UNODC, 2019). Este grupo de drogas inclui substâncias como anfetaminas, metanfetamina e ecstasy (MDMA, MDEA e MDA). Neste trabalho, um método analítico usando microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) para quantificar anfetaminas e derivados em amostras de fluidos orais por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) foi desenvolvido e validado. O método apresentou desempenho analítico satisfatório, com linearidade alcançada entre 20 a 5000 ng/mL ( $r > 0,992$ , regressão linear ponderada  $1/x^2$ ), com limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) de 20 ng/mL. A imprecisão (% desvio padrão relativo) e a inexatidão (%) foram avaliados em três níveis de concentração (20, 1000 e 4000 ng/mL), e os resultados não foram superiores a 9,1 e -12,3%, respectivamente. O efeito matriz para todos os analitos foi superior a 14,6%. Não foi observado *carryover* nem interferentes. Todos os analitos se mostraram estáveis após três ciclos de congelamento e descongelamento. As amostras permaneceram estáveis após 24 horas no amostrador automático (10°C), exceto pela anfetamina e metanfetamina, que foram estáveis até 18 horas. O método desenvolvido foi aplicado com sucesso à análise de amostras reais de fluidos orais (n=140), obtidas de voluntários em festas.

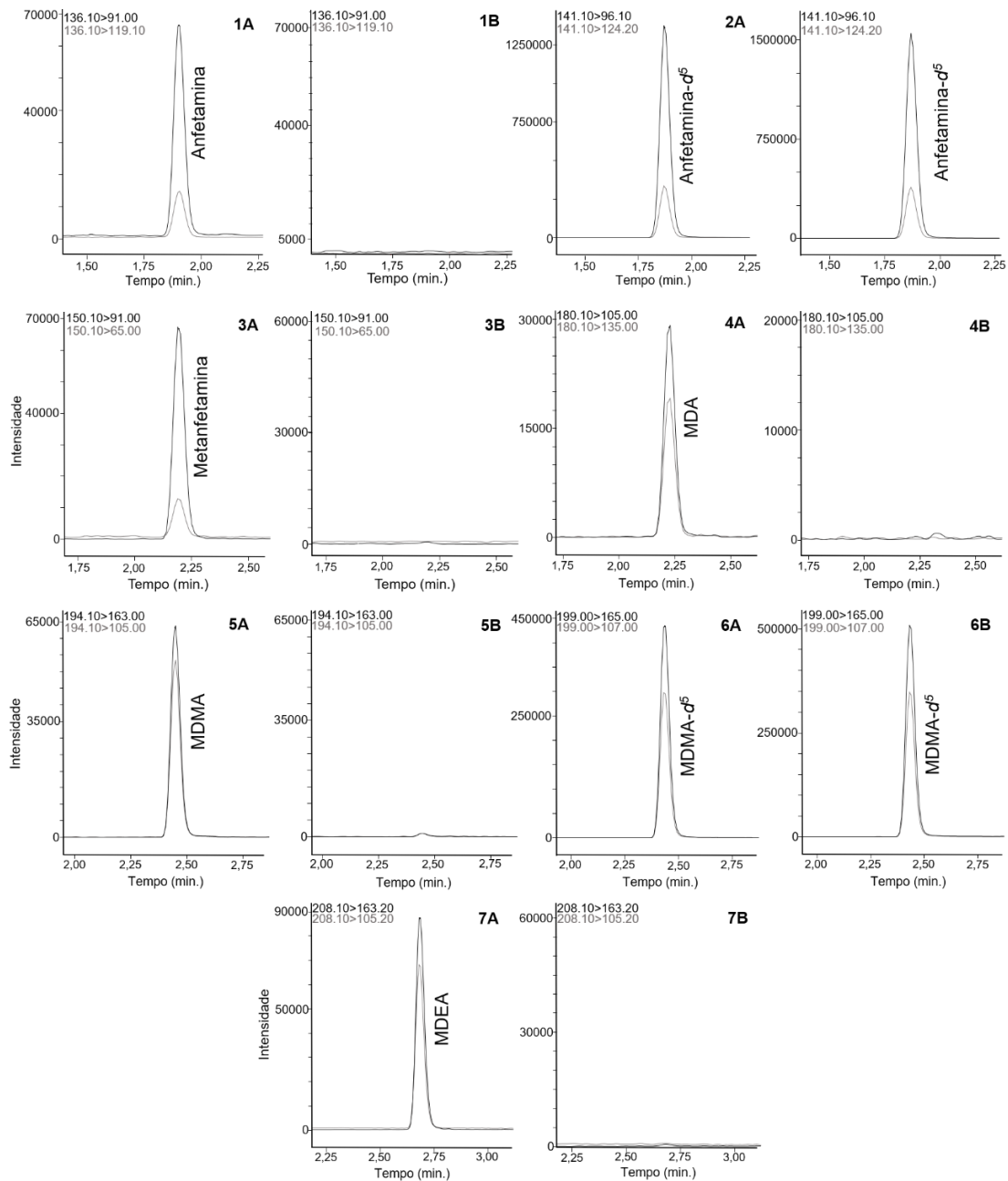
### Palavras-chave

toxicologia, DLLME, LC-MS/MS.

## RESULTADOS

Otimizou-se, inicialmente, o procedimento de extração por DLLME para obter o melhor desempenho de extração. Os parâmetros apurados foram seleção do solvente dispersor, seleção do solvente extrator, volume do solvente dispersor e volume do solvente extrator (para dispersor: 100, 175 e 250  $\mu\text{L}$ ; extrator: 50, 100 e 150  $\mu\text{L}$ ). O solvente dispersor deve ser miscível no solvente extrator (fase orgânica) e na amostra (fase aquosa), portanto foram estudados para este fim acetonitrila e metanol. Por outro lado, o solvente extrator deve ser imiscível apenas na fase aquosa, estudando, portanto, clorofórmio e diclorometano. A otimização foi realizada a partir de experimento fatorial  $2^4$ , sendo avaliado a resposta dos analitos em função da área para determinar a melhor combinação de solventes e volumes.

Os resultados atingidos evidenciaram que os melhores dados foram obtidos utilizando 100  $\mu\text{L}$  de acetonitrila como solvente dispersor e 50  $\mu\text{L}$  de clorofórmio como solvente extrator. Com os solventes extratores e dispersores a serem utilizados, foram realizados testes para garantir o limite de detecção e quantificação em 20 ng/mL (Figura 1), concentração inferior ao preconizado por agências europeia e americana para análises confirmatórias de derivados anfetamínicos em amostras de fluido oral (25 ng/mL para o European Union's Driving Under the Influence of Drugs – DRUID e 50 ng/mL pelo Substance Abuse and Mental Health Services Administration – SHAMSA). A partir deste ponto, a validação foi realizada para 5 analitos, anfetamina, metanfetamina, MDMA, MDEA e MDA



**Figura 1.** Cromatogramas extraídos para anfetamina (1), anfetamina- $d_5$  (2), metanfetamina (3), MDA (4), MDMA (5), MDMA- $d_5$  (6) e MDEA (7) em amostras negativa (B) e na concentração de 20 ng/mL (A).

O método se apresentou linear na faixa de concentração de 20 a 5000 ng/mL para todos os analitos, com ponderação  $1/x^2$  e coeficiente de correlação ( $r$ ) maior que 0,992 nos 5 dias de validação. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) são ambos 20 ng/mL para todos os analitos. Os valores de imprecisão para os controles de qualidade (CQ) baixo (60 ng/mL), médio (1.000 ng/mL) e alto (4.000 ng/mL) foram avaliados em triplicata, dentro de um mesmo dia (intradia,  $n=3$ ) e durante 5 dias (interdia,  $n=15$ ), com uso de análise de variância de fator único (ANOVA) em um nível de confiança de  $p,0,05$ . Já a inexatidão, foi calculada levando em consideração os 5 dias de validação ( $n=15$ ).

A anfetamina teve como resultado o menor valor de imprecisão intradia (n=3), enquanto o MDA obteve o maior, variando, portanto, de 3,5% a 7,9%. Enquanto para a imprecisão interdia (n=15), os analitos que obtiveram a menor variação relativa foram anfetamina e MDA no valor de 5,4%, enquanto a maior foi de 9,1% para o MDMA. Já a inexatidão apresentou variação máxima de -12,3%, valor relativo ao MDA e mínima de 1,1%, relativo à anfetamina.

O efeito matriz teve uma variação de -6,8% a 14,6%, valores referentes, respectivamente, ao MDMA e ao MDA (ver Tabela 1). Os analitos MDA, MDMA e MDEA se apresentaram estáveis em amostrador automático durante 24 horas (10 °C), mas a anfetamina e a metanfetamina variaram -28,4 e -25,8% em relação a concentração após terem sido reinjetados 24 horas após a primeira injeção, respectivamente. Novo ensaio foi realizado e foi verificada a estabilidade da anfetamina e metanfetamina em até 18 horas. Todos os analitos foram estáveis após 3 ciclos de congelamento e descongelamento, com maior variação em relação ao dia zero pertencente ao MDA, no valor de 16,2%.

Todos os valores se apresentam dentro dos  $\pm 20\%$  recomendados pela SWGTOX, como pode ser observado com maiores detalhes na Tabela 1

**Tabela 1.** Resultados dos testes de imprecisão intradia e interdia, inexatidão, efeito matriz e recuperação de método para quantificação de anfetaminas e derivados por DLLME e LC-MS/MS.

Analito	CQ (ng/mL)	Imprecisão	Imprecisão	Inexatidão	Efeito	Estabilidade	Estabilidade
		Intradia (%CV) (n=3)	Interdia (%CV) (n=15)	(%) (n=15)	Matriz (%) (n=10)	Amostrador 24h (%)	C/D (%)
Anfetamina	60	3,5	6,1	-8,1	14,5	16,2 <sup>a</sup>	-4,7
	1.000	5,8	5,4	1,1	NA	NA	NA
	4.000	5,8	8,6	-6,9	-0,8	10,7 <sup>a</sup>	1,2
Metanfetamin a	60	4,2	4,9	-6,5	13,3	14,8 <sup>a</sup>	-2,3
	1.000	5,5	5,8	1,9	NA	NA	NA
	4.000	5,7	8,0	-2,4	-1,1	11,5 <sup>a</sup>	1,9
MDA	60	7,9	8,4	-7,4	14,6	5,9	-8,8
	1.000	5,1	7,2	-6,5	NA	NA	NA
	4.000	5,1	5,4	-12,3	-5,0	3,3	16,2
MDMA	60	4,4	5,9	-8,6	5,6	-3,7	-5,2
	1.000	5,5	8,0	-3,5	NA	NA	NA
	4.000	4,9	9,1	-7,5	-6,8	10,0	11,1
MDEA	60	4,7	8,3	-7,3	13,8	2,3	-2,6
	1.000	5,4	6,9	-5,2	NA	NA	NA
	4.000	4,7	6,9	-8,4	-5,4	11,1	15,2

%CV coeficiente de variação em porcentagem, NA não avaliado, CQ controle de qualidade <sup>a</sup>  
18h em amostrador

Para estudo de interferentes exógenos foram adicionados a uma amostra de fluido oral branco uma mistura contendo, no total, 15 diferentes padrões de drogas de abusos e fármacos comumente utilizados, em concentrações variando de 500 a 5.000 ng/mL, descritos na Tabela 2. Essa amostra foi extraída e analisada conforme protocolo validado. Nenhuma das substâncias apresentou interferência aos analitos estudados. Não foi observado carryover quando uma amostra negativa foi analisada em sequência ao ponto mais alto da curva. O método foi ainda específico quando 10 amostras de fluido oral branco de diferentes voluntários foram analisadas a fim de avaliar possíveis interferentes endógenos. Para os testes de interferentes e de carryover foi considerada a ausência de picos que atingissem o critério de identificação nas janelas de aquisição de cada analito.

**Tabela 2.** Mistura de 15 fármacos e drogas de abuso adicionados às amostras branco para teste de interferentes exógenos ao método.

	Concentração (ng/mL)	Analitos
Fármacos	5.000	carisoprodol, cetoprofeno, diclofenaco, ácido acetil salicílico, dipirona sódica, ibuprofeno
Drogas de Abuso	500	THC, THC-COOH, OH-THC
	2.000	LSD
	5.000	cocaína
Outro	5.000	Nicotina, Cafeína, estricnina

A integridade de diluição para o MDMA, MDA e MDEA foi avaliada a 20.000 ng/mL com uma diluição de 1/50 em amostras de fluido oral branco. O maior valor de inexatidão obtido foi -18,8%. Após a validação o método foi usado para quantificar 140 amostras autênticas e que apresentaram resultado positivo para pelo menos um dos analitos abrangidos neste método durante uma análise de triagem. As coletas estavam de acordo com o Comitê de ética em Pesquisa da UNICAMP (CAAE 88770318.0.0000.5404), e os critérios de inclusão utilizados foram ter idade superior a 18 anos e relato de uso de pelo menos uma substância psicoativa ilícita nas últimas 24 horas

As análises confirmaram a presença de metanfetamina em 5 amostras, MDMA em 135, MDA em 72 e MDMA em 14. Nenhuma das amostras foi positiva para anfetamina. As concentrações variaram de 31,5 a 248,1 ng/mL para metanfetamina, 21,6 a >200.000 ng/mL para MDMA, 22,7 a 10.067 ng/mL para MDA e 42,5 a 2186 ng/mL para MDEA. Trinta e quatro amostras obtiveram valores acima de 5.000 ng/mL para o MDMA e duas dessas para MDA. Nestes casos, uma nova extração foi realizada utilizando o fator de diluição conforme validação.