

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**DETERMINAÇÃO DE OPIÓIDES EM CABELO VIA
ELETROFORESE CAPILAR (CE)**

**ELIZABETE CAMPOS DE LIMA
TESE DE DOUTORADO**

Orientadora: Profa. Dra. Marina F. M. Tavares

São Paulo

2003

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

L732d Lima, Elizabete Campos de
Determinação de opióides em cabelo via eletroforese
capilar (CE) / Elizabete Campos de Lima. -- São Paulo,
2003.
169p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.

Orientador: Tavares, Marina Franco Maggi

1. Eletroforese capilar : Química analítica 2. Droga de
abuso : Medicina 3. Toxicologia 4. Cabelo : Fisiologia
humana I. T. II. Tavares, Marina Franco Maggi, orientador.

543.0871 CDD

“Determinação de Opióides em Cabelo Via Eletroforese Capilar (CE)”

ELIZABETE CAMPOS DE LIMA

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Química – Área: Química Analítica.

Aprovada por:

Profa. Dra. MARINÁ FRANCO MAGGI TAVARES
IQ – USP
(Orientadora e Presidente)

Profa. Dra. PIERINA SUELI BONATO
FCF – USP

Profa. Dra. ÉRIKA ROSA MARIA KEDOR
FCF – USP

Prof. Dra. REGINA LÚCIA DE MORAES MOREAU
FCF – USP

Profa. Dra. ALICE APARECIA DA MATTA CHASIN
FOC

SÃO PAULO
25 DE ABRIL 2003.

RESUMO: DETERMINAÇÃO DE OPIÓIDES EM CABELO VIA ELETROFORESE CAPILAR (CE)

A análise química para a verificação do uso de drogas de abuso vem sendo requisitada com o objetivo de identificar o usuário para que medidas de prevenção e controle possam ser tomadas uma vez que o seu uso está atingindo indivíduos de variadas faixas etárias e camadas sociais. O cabelo é uma matriz biológica interessante de se trabalhar pois não requer cuidados especiais para seu transporte e armazenamento e além disso é de difícil adulteração.

O presente projeto de pesquisa teve como objetivo o desenvolvimento de metodologias analíticas alternativas para a separação de 15 opióides, em cabelo, utilizando a eletroforese capilar (CE). Foi desenvolvida uma metodologia de extração inédita para a digestão das amostras de cabelo utilizando-se a extração em fase sólida com cartucho de fase estacionária trocadora de íons (MCX) os extratos obtidos foram analisados via CE utilizando-se com eletrólito de separação tampão fosfato 20 mmol/l, pH 2,5; injeção eletrocínética da amostra (5 s/5 kV); 25 kV durante a análise; detecção em 200 nm e 25 °C de temperatura. As análises foram feitas utilizando-se uma coluna capilar de sílica fundida de 75 μm de diâmetro interno, $L_t = 47$ cm e $L_{efe} = 40$ cm. A metodologia desenvolvida e, especificamente validada para morfina, foi aplicada a um conjunto de 100 amostras da área clínica (cabelo de 35 pacientes sob medicação a base e de morfina).

A validação do método proposto para a determinação de morfina em amostras de cabelo apresentou boa linearidade ($R > 0,99$), valores de limite de

detecção e quantificação da ordem de 0,064 mg/L (ou 0,12 ng de morfina/mg de cabelo) e 0,214 mg/L (ou 0,37 ng morfina/mg de cabelo) respectivamente; com precisão e exatidão adequadas (erro relativo < 20%), valores de recuperação média de 81,19 % e com seletividade apropriada e especificidade única testada para 4 principais interferentes (morfina-3 β D-glicuronídeo, nalorfina, clonidina e codeína).

O nível de morfina nas amostras de cabelo provenientes dos pacientes selecionados (pacientes do Grupo da Dor do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo – HCFMUSP) variou de 1,3 a 18,4 ng de morfina/ mg de cabelo.

Além disso, foram otimizadas 2 separações de misturas de opióides um envolvendo os principais opióides utilizados em clínica médica e outra contendo esses mesmos opiáceos acrescida de seus metabólitos. A primeira mistura de padrões foi separada utilizando-se tampão fosfato 20 mmol/L, pH 2,5. A segunda mistura de padrões foi separada utilizando-se tampão fosfato 60 mmol/L, pH 2,5 contendo 8 mmol/L β -ciclodextrina + 4% metanol.

DETERMINATION OF OPIATES IN HAIR BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS (CE)

Abstract

This work describes a series of studies aiming at the determination of opiates of clinical and forensic importance using hair as an alternative biological matrix and capillary electrophoresis (CE) as the technique of choice. Electrolyte compositions were critically explored using CE in its diverse modes of operation and the separation of 15 opiates and metabolites (petidine, morphine, tramadol, naloxone, phentanyl citrate, alfentanil HCl, sufentanyl citrate, 6-acetylmorphine, pentazocine, nalorphine, codeine, 6-acetylcodeine, methadone, morphine-3 β -D-glucuronide, norphentanyl) was accomplished in less than 14 min using as electrolyte, phosphate buffer 60 mmol/L, pH 2.5 with 8 mmol/L β -cyclodextrine and 8 % methanol in the conditions: inj. 5 s/10 kV, 30 kV during analysis, detection 200nm and 20 °C. Additionally, a comparative evaluation of the strategies for hair extraction and pre-concentration of opiates to contemplate the concentration sensitivity restraints of capillary electrophoresis have been investigated. Recoveries of target analytes (petidine, naloxone, tramadol, fentanyl, alfentanil and sufentanyl) using liquid-liquid extraction and solid-phase extraction employing a variety of solvents and stationary phases were estimated.

A novel, simple and reliable strategy for digestion and extraction of morphine in hair was developed based upon acidic hydrolysis (45 °C, 12 h) followed by solid-phase extraction in ion-exchange resin cartridges (MCX, Supelco). Recoveries of morphine up to 81.4% were obtained with this procedure.

Hair extracts were analyzed via CE using 20 mmol/L phosphate buffer at pH 2.5, electrokinetic injection (5 kV, 5 s), 25 kV applied voltage, detection at 200 nm in a capillary with dimensions 75 μm i.d., 47 cm total length and 40 cm effective length. The methodology was validated with respect to precision (CV < 20 %), accuracy (relative error < 20 %), linearity ($r > 0.99$), limit of detection and quantification, 0.064 mg/L (0.12 ng of morphine per mg of hair) and 0.214 mg/L (0.37 ng of morphine per mg of hair), respectively, with appropriate selectivity and specificity, tested for four major interfering compounds (morphine-3 β D-glucuronide, nalorphine, clonidine and codeine)

Hair analyses of over 100 samples from *c.a.* 35 patients (Grupo da Dor, Hospital das Clínicas, Universidade de São Paulo, HC-FMUSP) suffering from radicular or medullar lesion, receiving morphine by implantable intrathecal systems were conducted. Levels of morphine in the patients hair was found in the range of 1.3-18.4 ng/mg.

Dedicatória

Ao Clóvis L. Silva que sempre esteve presente não só em momentos felizes mas em todos os momentos difíceis em minha vida tanto pessoal como profissional dando força e buscando soluções para todos os problemas.

Agradecimentos

- A Deus que sempre ilumina meus caminhos alimentando minha fé e me dando forças para enfrentar esta coisa louca que é a vida.
- Aos meus pais pelo incentivo aos estudos.
- À FAPESP pela bolsa de estudos concedida processo 99/04131-3.
- À Professora Dra. Marina F. M. Tavares pela orientação, oportunidade de realização e consolidação deste projeto de pesquisa. Foram muitos os desafios tanto a nível profissional como pessoal, mas Graças a Deus nós superamos tudo isso. Obrigada por tudo.
- Aos colegas do LACE - Laboratório de Cromatografia e Eletroforese Capilar, em especial ao Gustavo A. Mücke que sempre trouxe idéias interessantes para a resolução de problemas encontrados em alguns momentos.
- À Dona Fátima que mesmo sempre com muitos problemas a resolver nunca deixou de me incentivar e trazer uma palavra amiga em momentos difíceis.

- Ao pessoal da Seção de Protocolo do IQ-USP que me ajudou a resolver vários problemas de ordem burocrática disponibilizando o serviço de FAX.
- Ao Prof. Dr. Bronisław Polakiewicz que através do Núcleo de pesquisas da Indústria Farmacêutica Cristália forneceu os padrões de Fentanil e homólogos.
- Ao Dr. Adilson Alves Dias que forneceu amostras de cabelo e padrão de cloridrato de tramadalina (Tramal).
- A Alice A. P. da Matta Chasin por ter me colocado em contato com o Grupo da Dor do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo.
- A Dra. Magnólia Leão da Nóbrega pelas amostras de cabelo fornecidas.
- A todos que ajudaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

QUE TIPO DE PESSOA VOCÊ QUER SER?

Olavo foi transferido de projeto.

Logo no primeiro dia, para fazer média com o novo chefe, saiu-se com esta:

- Chefe, o senhor nem imagina o que me contaram a respeito do Silva. Disseram que ele ...

Nem chegou a terminar a frase, e o chefe, aparteu:

- Espere um pouco, Olavo. O que vai me contar já passou pelo crivo das Três Peneiras?

- Peneiras? Que Peneiras, Chefe?

- A primeira, Olavo, é a da VERDADE.

Você tem certeza de que esse fato é absolutamente verdadeiro?

- Não. Não tenho, não. Como posso saber? O que sei foi o que me contaram. Mas eu acho que...

E, novamente, Olavo é interrompido pelo chefe:

- Então sua história já vazou a primeira peneira.

Vamos então para a segunda peneira que é a da BONDADE. O que você vai me contar, gostaria que os outros também dissessem a seu respeito?

- Claro que não! Deus me livre, Chefe!

- diz Olavo, assustado.

- Então, - continua o chefe - sua história vazou a segunda peneira.

Vamos ver a terceira peneira, que é a da NECESSIDADE. Você acha mesmo necessário me contar esse fato ou mesmo passá-lo adiante?

- Não chefe. Pensando desta forma, vi que não sobrou nada do que eu iria contar - fala Olavo, surpreendido.

- Pois é Olavo! Já pensou como as pessoas seriam mais felizes se todos usassem essas peneiras? - diz o chefe sorrindo e continua:

- Da próxima vez em que surgir um boato por aí, submeta-o ao crivo das Três Peneiras:

VERDADE - BONDADE - NECESSIDADE

Antes de obedecer ao impulso de passá-lo adiante, porque:

**PESSOAS INTELIGENTES FALAM SOBRE
IDÉIAS**

PESSOAS COMUNS FALAM SOBRE COISAS

**PESSOAS MESQUINHAS FALAM SOBRE
PESSOAS**

(Desconheço o Autor)

ÍNDICE GERAL

Índice de Tabelas	I
Índice de Figuras	iv
Capítulo 1	1
Introdução	1
1.1 – Os opióides	1
1.2 – Classificação dos opióides	6
1.3 – Principais opiáceos utilizados pelo homem e seus efeitos terapêuticos e toxicológicos	8
Morfina	8
Codeína	8
Heroína	9
Pentazocina	10
Fentanil	10
Propoxifeno	11
Metadona	11
Naloxona	12
1.4 – Métodos analíticos utilizados para detectar e identificar as drogas de abuso (fármacos opióides e demais classes)	13
1.5 – Eletroforese capilar: da origem aos dias atuais	15
1.5.1 – Instrumentação utilizada em CE	17
1.6 – Fundamentos teóricos da CE	18
1.6.1 – O Fluxo eletrosmótico	20
1.7 – Eletroforese capilar em solução livre, cromatografia eletrocinética micelar capilar e em meio não-aquoso	24
1.7.1 – Eletroforese em solução livre	24
1.7.2 – Cromatografia eletrocinética micelar capilar	26
1.7.3 – Eletroforese capilar em meio não-aquoso	29
1.8 – Cabelo como matriz analítica de estudo	30
1.8.1 – Incorporação das drogas no cabelo	31
1.8.2 - Amostragem	37
Coleta	37
Descontaminação	38
Digestão e extração	39

Capítulo 2	
2 – Objetivos	44
Capítulo 3 – Instrumentação, materiais, métodos, reagentes e amostras	45
3 – Materiais e reagentes	45
3.1 - Instrumentação	46
Equipamento de eletroforese capilar	46
Banho-maria	46
pHmetro	46
3.2 – Materiais utilizados na preparação de soluções e amostras	46
3.3 – Reagentes e soluções	47
Capítulo 4 – Estudo sistemático de composição de eletrólitos para separação de opióides via CE	54
4.1 – Mix A	54
4.1.2 – Condições experimentais utilizadas no estudo de otimização do mix A via FSCE	55
4.2 – Otimização da separação do mix B	56
4.3 – Condições experimentais utilizadas no estudo de otimização do mix B via CE	56
4.4 - Conclusões	70
Capítulo 5	71
5 – Estudo de metodologias de extração para a determinação de opióides via FSCE	72
5.1 - Introdução	72
5.2 – Estratégias para aumento de sensibilidade em eletroforese capilar (CE) visando a determinação de traços de analitos	73
5.3 – Enriquecimento e clean-up de analito por extração líquido-líquido (LLE): algumas considerações para uso em CZE	75
5.3.1 – Algumas considerações sobre a solução a ser injetada	80
5.4 – Extração em fase sólida (SPE)	81
5.4.1 – Extração em fase sólida de drogas em fluidos biológicos	82
5.4.2 – Procedimentos de análise com cartuchos SPE	82
5.5 – Como os compostos são retidos na fase estacionária?	83

5.5.1 – SPE – Fase Reversa	84
5.5.2 – SPE – Fase Normal	85
5.5.3 – Solventes utilizados para spe em fase reversa e normal	86
5.5.4 – SPE – Troca iônica	87
5.6 – Microextração em fase sólida (SPME)	87
5.6.1 – SPME e análise de drogas	88
5.7 – Extração com fluido super crítico (SFE)	89
5.8 - O conceito de recuperação	90
5.9 – Resultados e discussão	92
5.9.1 – Extrações LLE	99
5.9.2 – Extrações SPE	105
5.10 – Cartuchos spe com fase estacionária MCX	112
5.11 - Conclusões	119
Capítulo 6 – Validação do método desenvolvido	120
6 – Validação do método desenvolvido	120
6.1 - Introdução	120
6.2 – Resultados e discussão	124
6.2.1 – Método analítico otimizado	124
6.2.2 – Preparação das amostras de cabelo	124
Linearidade	126
Recuperação	130
Limite de detecção e quantificação	132
Precisão e exatidão	133
Seletividade e especificidade	136
6.3 - Conclusões	138
Capítulo 7 – Aplicação do método desenvolvido	139
Aplicação do método de desenvolvido e validado em amostras reais	139
7.1 - Introdução	140
7.2 – Avaliação dos resultados obtidos com base nas informações clínicas disponíveis	145
7.3 - Conclusões	153
Capítulo 8	154
8 – Capítulo 8	154

8 - Eletrocromatografia	154
8.1 – Aspectos operacionais da CEC	157
8.2 - Instrumentação	157
8.2.2 – Desenvolvimento de método utilizando CEC	158
8.3 Resultados preliminares obtidos utilizando-se colunas CEC	158
8.4 - Conclusões	164
Capítulo 9 – Conclusões gerais e perspectivas futuras	165
9 – Conclusões gerais e perspectivas futuras	165
9.1 – Conclusões Gerais	165
9.2 – Perspectivas Futuras	167
Anexo 1 – Eletroferogramas das amostras de cabelo analisadas	168
Anexo 2 – Curriculum Vitae	169

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 4.1- Variáveis experimentais e instrumentais utilizadas para a otimização da separação do mix A	54
Tabela 4.2 – Variáveis analíticas e instrumentais exploradas para o estudo de separação do mix B no modo FSCE	57
Tabela 4.3 – Variáveis instrumentais e analíticas exploradas para o estudo de otimização da separação do mix B no modo MEKC	64
Tabela 4.4 – Variáveis instrumentais e analíticas exploradas para o estudo de otimização do mix B no modo NACE	66
Tabela 5.1 – Coeficientes de extração (E_E) como função da relação de volumes amostra/solvente de extração	77
Tabela 5.2 – Processo de retenção de analitos	83
Tabela 5.3 – Características dos solventes utilizados em spe	86
Tabela 5.4 – Polaridade dos solventes utilizados nas extrações LLE	99
Tabela 5.5 – Valores de pKa da mistura de padrões mix A	101
Tabela 5.6 – Valores de recuperação obtidos para as extrações LLE com diclorometano para diferentes valores de concentração da matriz de extração	103
Tabela 5.7 – Parâmetros de estudo utilizados para a extração da mistura de padrões mix A utilizando-se spe	105
Tabela 5.8 –Valores de recuperação obtidos através das extrações spe	111
Tabela 5.9 – Valores de recuperação obtidos para a amostra de cabelo fortificada com mix A	117
Tabela 5.10 – Reprodutibilidade para a extração spe de morfina utilizando-se cartucho de troca iônica MCX	118
Tabela 6.1 – Definição dos termos requeridos para validação de metodologias	122
Tabela 6.2 – Faixa de linearidade do método desenvolvido	128
Tabela 6.3 – Porcentagem de recuperação obtida para morfina utilizando-se spe com cartucho MCX	131
Tabela 6.4 – Limite de detecção e quantificação obtidos para morfina	133
Tabela 6.5 – Precisão e exatidão intra-ensaio (n = 18)	135
Tabela 6.6 – Precisão e exatidão interensaios (n = 54)	135
Tabela 6.7 – Validação do método com respeito à seletividade	136

Tabela 7.1 – Valores de concentração de morfina encontrados nas amostras analisadas	141
Tabela 7.2 – Informações clínicas disponíveis dos pacientes cujas amostras de cabelo foram analisadas	146
Tabela 8.1 – Condições analíticas exploradas para o teste de colunas CEC	159

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - Estrutura dos principais opiáceos utilizados atualmente	7
Figura 1.2 - Representação esquemática de um sistema de eletroforese capilar	18
Figura 1.3 - Representação do EOF em um capilar de sílica fundida utilizado em CE	21
Figura 1.4 - Representação esquemática de uma micela aniônica	26
Figura 1.5 - Representação esquemática da migração de solutos neutros (A) por eletrocromatografia micelar aniônica e na presença de uma fase auxiliar (B)	28
Figura 1.6 - Estrutura de um fio de cabelo	33
Figura 3.1 - Equipamento CE utilizado para a realização das análises	45
Figura 3.2 - Estrutura dos opióides que constituem o mix B	51
Figura 4.1 - Melhor separação obtida para o mix A	55
Figura 4.2 - Eletroferograma obtido para o mix B via CE, modo FSCE	58
Figura 4.3 - Eletroferogramas obtidos para o mix B comparando-se análise na presença e ausência de Metanol (MeOH) no modo FSCE	59
Figura 4.4 - Eletroferogramas obtidos para o mix B utilizando-se diferentes aditivos orgânicos	60
Figura 4.5 - Eletroferogramas obtidos para o mix B comparando-se análises feitas com tampão fosfato pH 2,5 em diferentes concentrações	61
Figura 4.6 - Eletroferogramas obtidos para o mix B variando-se a espécie de ciclodextrina	62
Figura 4.7 - Separações MEKC obtidas para o mix B	65
Figura 4.8 - Separações NACE obtidas para o mix B	67
Figura 4.9 - Melhor condição de separação obtida para o mix B	69
Figura 5.1 - Representação esquemática de um cartucho spe	83
Figura 5.2 - Esquema de extração utilizando-se hidrólise alcalina	92
Figura 5.3 - Esquema de extração utilizando-se hidrólise ácida	93
Figura 5.4 - Esquema de extração utilizando-se hidrólise em pH = 7,0	94
Figura 5.5 - Eletroferogramas obtidos para os testes extração de	95

hidrólise em diferentes pH's	
Figura 5.6 – Eletroferogramas obtidos para o teste de extração utilizando-se procedimento sugerido por Tagliaro e colaboradores	96
Figura 5.7 – Esquema de extração ilustrando os testes de extração avaliados utilizando-se solução padrão mix A 10 mg/L	98
Figura 5.8 – Eletroferogramas obtidos para as extrações LLE	100
Figura 5.9 – Eletroferogramas obtidos para a extração LLE utilizando-se diclorometano	102
Figura 5.10 – Eletroferogramas obtidos para os extratos spe utilizando-se cartucho com fase estacionária C ₁₈	106
Figura 5.11 – Eletroferogramas obtidos para os extratos spe utilizando-se cartucho com fase estacionária CN	107
Figura 5.12 – Eletroferogramas obtidos para os extratos spe utilizando-se cartucho com fase estacionária NH ₂	108
Figura 5.13 – Eletroferogramas obtidos para os extratos spe utilizando-se cartucho com fase estacionária trocadora de íons (MCX)	109
Figura 5.14 – Estrutura química da fase estacionária MCX	113
Figura 5.15 – Esquema de extração spe utilizando-se fase estacionária trocadora de íons (MCX)	114
Figura 5.16 – Gráfico de barras mostrando os resultados obtidos para o estudo de extração efetuado utilizando-se o cartucho com fase estacionária trocadora de íons (MCX)	115
Figura 5.17 – Eletroferogramas obtidos para: A) mistura de padrões mix A 1 mg/L, B) amostra de cabelo de indivíduo não-usuário de opióides e C) amostra de cabelo de indivíduo não-usuário de opióides fortificada com solução padrão mix A 1 mg/L .	116
Figura 6.1 – Detalhes do sistema de bomba intratecal, região do corpo onde ele é implantado e como é feita a recarga da solução de morfina	125
Figura 6.2 – Esquema de extração utilizado para digestão das amostras de cabelo analisadas	126
Figura 6.3A – Curva de calibração para a faixa de concentração de 0,1 a 1,5 mg/L	129
Figura 6.3B – Curva de calibração obtida para a faixa de concentração de 1,5 a 10 mg/L utilizada para a quantificação das amostras de	129

cabelo	
Figura 6.3C – curva de calibração obtida para a faixa de 0,1 a 100 mg/L	130
Figura 6.4 – Eletroferogramas obtidos para o teste de seletividade	137
Figura 7.1 – Eletroferograma obtido para o extrato de cabelo de JANC	144
Figura 7.2 – Gráfico de correlação para a morfina encontrada no cabelo vs dosagem de morfina auto-administrada	149
Figura 7.3 – Gráfico de correlação para morfina encontrada no cabelo vs dosagem auto-administrada	150
Figura 7.4 - Gráfico de correlação para concentração de morfina encontrada no cabelo vs coloração dos cabelos analisados	151
Figura 8.1 – Representação esquemática da origem do fluxo eletrosmótico (EOF) em um capilar de sílica fundida com uma fase estacionária com grupos ionizáveis	156
Figura 8.2 – Eletrocromatograma obtido para uma mistura teste 100 mg/L	160
Figura 8.3 – Eletroferogramas obtidos utilizando-se uma coluna CEC EP-75-30-3-C ₁₈	161
Figura 8.4 – Eletrocromatograma obtido para a mistura de padrões mix A	162

LCE

Laboratório de Cromatografia e Eletroforese Capilar

CAPÍTULO 1

1 - Introdução

Drogas são substâncias que alteram ou influenciam as funções do corpo quando consumidas. Na medicina, as drogas são usadas no tratamento de doenças, para obtenção de diagnósticos, na cura e prevenção de doenças ou para o alívio de sintomas. A maioria das drogas tem uma gama de ações, das quais uma ou mais podem ser terapêuticas; as ações remanescentes são chamadas de efeitos colaterais, que são previsíveis e podem não ocorrer. A fim de criar uma resposta terapêutica, uma concentração suficiente (nível terapêutico) da droga tem de atingir seu alvo e a dosagem deve ser monitorada para se tentar conseguir esse ideal. Contudo, os regimes de dosagem são projetados para a maioria dos pacientes e diferenças individuais podem causar uma grande variação na resposta esperada.

As drogas também podem se tornar parte da vida diária. O consumo de álcool, chá e café são exemplos do uso generalizado de drogas psicoativas. Além disso, outras drogas psicoativas como a nicotina, a heroína e a maconha podem ser usadas para alterar as funções do corpo. Entre as drogas psicoativas mais utilizadas pelo homem, desde a Antiguidade, destaca-se um grupo: **os opióides**.¹

1.1- Os opióides

Os *opióides* constituem um grupo de fármacos semelhantes à morfina e são empregados principalmente como analgésicos, entretanto, possuem uma

¹ A. Goldstein; L. Aronow & M. Kalman; "*Principles of drugs action the basis of pharmacology*"; 2ª. Ed., New York; A. Wiley Biomedical Health Publication; 1978.

Capítulo 1 - Introdução

gama variada de outros efeitos farmacológicos que serão descritos mais adiante.

Inicialmente a terminologia utilizada para esses fármacos foi a palavra *opiáceos* para designar fármacos derivados do ópio. Mais tarde, foi introduzido o termo *opióides* para designar os fármacos de origem natural semi-sintética que apresentavam ações semelhantes à da morfina.² A palavra narcótico caiu no desuso da terminologia químico-farmacológica, embora tenha sido utilizada por muitos anos para designar de narcoanalgésicos os fármacos semelhantes à morfina. No contexto legal, o uso do termo narcótico refere-se amplamente às substâncias que desenvolvem dependência, sendo sinônimo de entorpecentes.³

O conhecimento das propriedades terapêuticas e euforizantes do ópio se perde na obscuridade dos tempos e admite-se que o ópio tenha sido utilizado pelos sumerianos, antigos povos da Babilônia há 4000 a.C. No entanto, foram os gregos os que mais difundiram as propriedades do vegetal. Quando as propriedades terapêuticas do ópio (combater a dor e a diarreia) chegaram até os médicos árabes, estes foram responsáveis pela popularização do uso terapêutico no oriente Médio. Acredita-se também que os comerciantes árabes, agindo como intermediários, muito contribuíram para a difusão do uso do ópio no Ocidente, às margens do Mediterrâneo e, chegando até a China.

Apesar do uso milenar do ópio, foi apenas no séc. XIX (1803) que um farmacêutico alemão, Friedrich Sertuner, isolou o primeiro alcalóide natural do ópio, o qual determinou morfina.

² L. B. S. Valle; “*Farmacologia Integrada – Fundamentos Farmacológicos da Terapêutica – Vol. II*”, Atheneu, São Paulo, 1991.

³ S. Oga; “*Fundamentos de toxicologia*”, Atheneu Editora São Paulo Ltda., São Paulo; 1996.

Capítulo 1 - Introdução

Para produzir efeitos euforizantes e analgésicos, o ópio costuma ser usado sob a forma de goma de mascar ou de solução. Pode também ser fumado em cachimbos especiais para obtenção de efeitos euforizantes, essa forma de uso popularizou-se no Oriente por volta do século XVIII.

Nos Estados Unidos da América (EUA), o problema do vício foi acentuado pelo afluxo de trabalhadores imigrantes chineses, fumadores de ópio, pelo emprego generalizado da morfina nos soldados feridos na guerra civil e pela disponibilidade irrestrita da droga. Os remédios utilizados para o tratamento das complicações mais comuns como diarreia, tosse, dores em geral e também os sedativos e calmantes para crianças continham ópio, seus alcalóides ou derivados.

Em 1960, o número de mortes por superdose de narcóticos nos E.U.A. foi de 300 e subiu para 1000 em 1970. Recentemente, no ano de 1991, o número de emergências e internações por drogas nos E.U.A. atingiu um total de 398.349, sendo a heroína responsável por 37.185 casos, ou 9,3 % dos casos. Neste mesmo período, no Brasil, de um total de 3.071 internações, os opióides foram responsáveis por 64 casos, ou seja 2 % dos casos. Deve ser ressaltado que esses dados brasileiros não refletem, nem de longe, o número real de viciados em opióides e outras drogas, muito menos o número de pessoas que deveriam ser internadas por esse tipo de problema.⁴

O início da dependência a opióides pode se dar de duas formas principais. Na primeira, mais rara, o indivíduo toma contacto com a droga através de receita médica e persiste no seu uso, mesmo após a cura da doença que motivou a prescrição, tentando convencer os médicos de que

Capítulo 1 - Introdução

ainda necessita dela. Na segunda, mais frequente, o início se dá por imitação, ou “pressão do grupo” que já são usuários ilegais. Dentro desse contexto, várias são as razões alegadas para se iniciar o uso da droga e um outro fator importantíssimo é a curiosidade do indivíduo aliada à disponibilidade e a possibilidade de auto-administração; isso explica porque médicos e enfermeiros tornam-se dependentes de drogas em maior proporção que outros profissionais.⁵ O opióide de escolha, muito utilizado nos EUA atualmente, é a heroína, administrada via endovenosa. No Brasil, no setor médico-hospitalar devido à facilidade de manuseio há muitos profissionais da saúde que fazem uso de opióides intravenosos (fentanil e homólogos) e há pouco tempo foi anunciado nos meios de comunicação que a heroína começou a entrar no Brasil através das rotas internacionais de tráfico que cortam o país.⁶

As doses utilizadas por usuários ilegais são muito difíceis de se precisar, em função de vários fatores como efeito desejado, experiência do usuário com aquela droga e mesmo o seu grau de pureza. No homem, uma dose inicial de 100 a 200 mg de morfina pode ser suficiente para provocar profunda sedação, depressão respiratória, anoxia e morte, porém, em indivíduos tolerantes, doses de 4000 mg em 24 horas podem não produzir efeitos adversos, evidenciando assim, um alto grau de tolerância.

Diferentemente de outras drogas, a tolerância aos opióides se instala rapidamente. Os opióides apresentam como característica um alto grau de tolerância cruzada, independente da sua semelhança química estrutural. Isso

⁴ S. A. Nappo & E. A. Carlini; Centro Brasileiro de Informações sobre drogas psicoativas, CEBRID, São Paulo, Boletim n°. 10/Setembro de 1992.

⁵ J. E. Murad; “*Como enfrentar o abuso de drogas*”, 4ª. Edição, Belo Horizonte, Abraço, 1992.

⁶ Informações retiradas do site: www.imesc.sp.gov.br/infodroga.htm (O IMESC é o Instituto de Medicina Social e de Criminologia de São Paulo)

Capítulo 1 - Introdução

significa que um usuário de heroína apresenta tolerância tanto à morfina quanto ao propoxifeno ou fentanil.

Do ponto de vista neurobiológico, as substâncias pertencentes ao grupo denominado opióides provocam marcante dependência, caracterizada por:

- a) desejo, compulsão ou necessidade incontroláveis de continuar tomando o fármaco e obtê-lo sejam quais forem os meios;
- b) tendência de aumentar a dose em função da tolerância;
- c) a tolerância é acompanhada, invariavelmente, pela dependência. A retirada abrupta do fármaco causa síndrome de abstinência.
- d) a síndrome de abstinência caracteriza-se por: agitação, ansiedade, bocejo, transpiração, calafrio, febre, vômitos, respiração ofegante, perda de apetite, insônia, hipertensão, perda de peso, rinorréia e convulsões. As pupilas tornam-se dilatadas e estão associadas aos sinais de hiperatividade do sistema nervoso simpático;
- e) indivíduos tolerantes à morfina são também à heroína, metadona, meperidina, porém não ao álcool e barbitúricos.

Em pacientes com dor, a morfina produz uma sensação de bem-estar e tranquilidade (euforia); entretanto em indivíduos sem dor, a resposta à morfina nem sempre é agradável, produzindo, algumas vezes mal-estar geral, sensação de ansiedade e medo (disforia).

Assim, a maioria das drogas abusadas pelo homem funciona como recompensa, reforçando o comportamento que induzem à auto-administração.⁷

⁷ S. E. Hyman & E. J. Nestler, *"The molecular Foundation of psychiatry"*, New York, American Psychiatry Press Inc., 1993.

1.2 -Classificação dos opióides

Os opióides podem ser classificados nos seguintes grupos:

- a) alcalóides naturais do ópio: morfina e codeína.
- b) peptídeos opióides: encefalina, beta-endorfina e dinorfina;
- c) análogos sintéticos de alta potência analgésica: meperidina, metadona e levofernal;
- d) análogos sintéticos de baixa potência analgésica: propoxifeno;
- e) análogos semi-sintéticos: heroína (diacetylmorfina), dionina e metopon;
- f) antagonistas opióides: naloxona, nalorfina e levalorfam.

As estruturas dos principais opióides utilizados atualmente são mostradas na Figura 1. No item 1.3 é feita uma breve descrição destas drogas bem como seus principais usos terapêuticos.

Capítulo 1 - Introdução

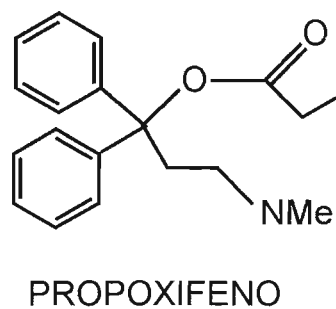
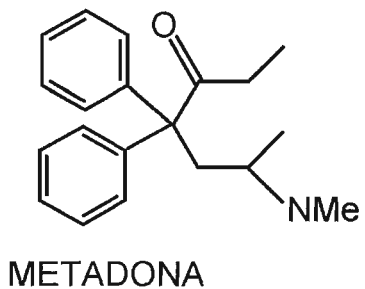
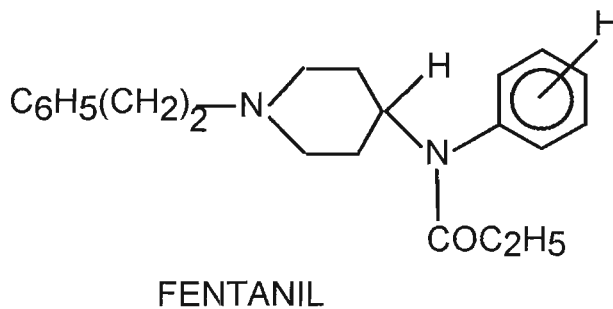
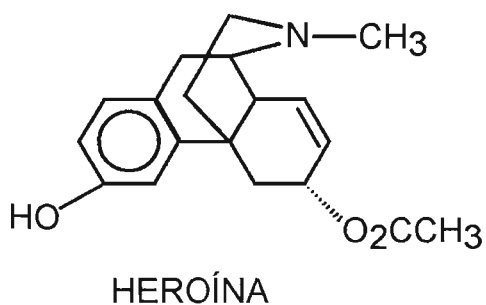
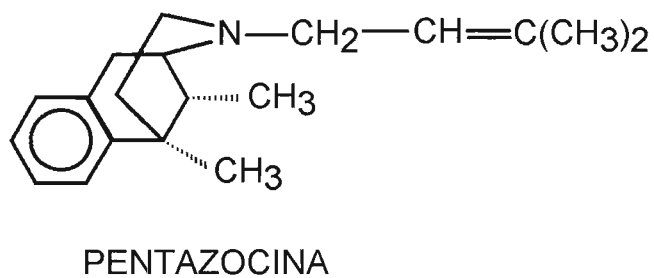
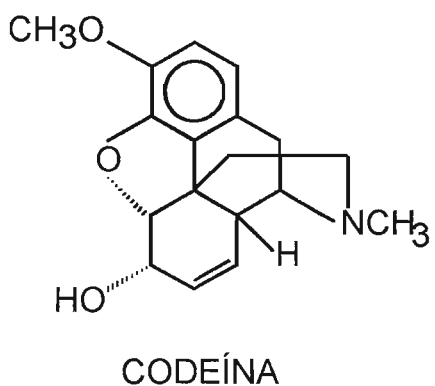
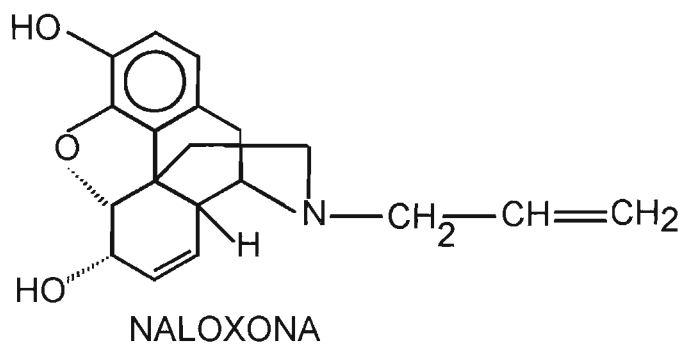
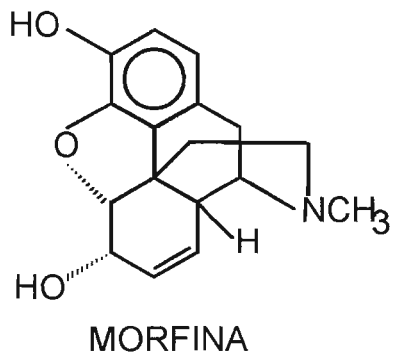


Figura 1.1 - Estruturas dos principais opióides utilizados atualmente.

Capítulo 1 - Introdução

1.3 - Principais opióides utilizados pelo homem e seus efeitos terapêuticos e toxicológicos

Morfina

A morfina é o protótipo dos opióides e tem sido usada na clínica médica extensivamente, principalmente no combate à dor visceral e à dor intensa. Ela é bem absorvida pelas mucosas e soluções de continuidade da pele. A via de eliminação mais importante na excreção da morfina é a renal cerca de 80 % dela é excretada pela urina, 7 a 10 % pelas fezes e 3 a 6 % pelo ar expirado.

Quanto à velocidade, cerca de 80 % da morfina é excretada em 6 horas, sendo eliminada quase que totalmente em 24 horas. Quanto à forma, aproximadamente 7 % da morfina que é excretada na urina está na forma livre, e o restante na forma conjugada como morfina-3-glicuronídeo.¹

Codeína

A codeína vem sendo usada há mais de 150 anos como droga antitussígena e analgésica, apresentando somente cerca de 1/10 da potência analgésica da morfina.

A codeína é bem absorvida pelo trato gastrointestinal. Quanto à distribuição, o nível máximo de codeína e seus produtos de biotransformação e de codeína livre no cérebro aparece dentro de 15 a 30 minutos após administração subcutânea.²

Capítulo 1 - Introdução

Heroína

Foi introduzida no mercado pela Bayer® em 1898 como medicamento, na esperança de que a forma diacetilada da morfina continuasse efetiva contra a tosse, sem os efeitos colaterais da morfina. Isso não aconteceu, além de tornar-se, nos E. U. A., a droga de escolha dos farmacodependentes.

Tradicionalmente, no ocidente, a heroína é auto-administrada por via intravenosa, entretanto, vem ocorrendo uma gradual mudança na preferência pela via de administração, tal como a intranasal e inalatória (fumada). Isso se deve a duas razões: a primeira, de ordem técnica, pois a heroína inalada oferece vantagens como rápida liberação da droga no sítio de ação no cérebro sem passar pelo fígado. Além disso, fumar evita freqüentes superdoses, sequelas de agulhas e infecções por vírus de hepatite e, pior ainda, pelo vírus da AIDS (sigla inglesa para síndrome imuno-deficiência adquirida), o HIV (sigla inglesa para vírus da imuno-deficiência humana); a outra razão é de ordem econômica. Com a queda nas vendas (devido talvez ao surto de AIDS), a quantidade do produto e a qualidade melhoraram de tal forma a atrair mais usuários.

Devido à alta lipossolubilidade, a heroína é bem absorvida por todas as vias (nasal, mucosas, retal, pulmonar) e deixa rapidamente a corrente circulatória, atingindo seu sítio de ação no SNC (Sistema Nervoso Central).

A heroína é, talvez, a droga mais perigosa que existe sob o ponto de vista de dependência. Às vezes, poucos dias de uso podem levar o indivíduo à dependência. O mais triste é que a heroína atravessa facilmente a placenta e 1 em cada 250 bebês de mães dependentes nascem também dependentes. Não é conhecido o exato mecanismo pelo qual a heroína provoca a morte, pois

Capítulo 1 - Introdução

ela pode ocorrer dentro de poucos minutos após o uso e não é devido aos efeitos farmacológicos típicos dos opióides.²

Pentazocina

As diferenças entre opiáceos e opióides semi-sintéticos são mínimas quando se trata de intoxicações agudas, seus sinais e sintomas. Assim, a pentazocina, um derivado benzomorfolano, como analgésico é 3 a 4 vezes menos potente que a morfina e esperava-se possuir um potencial mínimo de abuso.

A pentazocina, através da administração intravenosa, é largamente usada na clínica, no controle de pacientes que apresentam dores agudas ou crônicas, como no câncer, cólica espasmódica ou neuralgia. É fracamente absorvida pelo trato gastrointestinal, cerca de 35% em relação à via parental. Quanto à eliminação, menos de 13% de uma dose, no homem, aparece como fármaco livre e 12 a 30% como glicuronato.

A pentazocina exerce suas principais ações sobre o SNC e músculos lisos.²

Fentanil

O fentanil foi introduzido na clínica no final da década de 60 como anestésico/analgésico. É, no momento, a principal droga usada como medicação pré-anestésica e como anestésico pós-cirúrgico, sendo cerca de 200 vezes mais potente que a morfina; seu efeito é quase imediato e tem curta duração. Embora não seja quimicamente similar a outros opióides, clinicamente eles são equivalentes.²

Capítulo 1 - Introdução

Propoxifeno

Estrutural e farmacologicamente relacionado com a metadona, o propoxifeno foi introduzido na clínica, nos E. U. A., em 1957. Embora com eficiência inferior à codeína e até mesmo ao ácido acetilsalicílico (AAS), o propoxifeno em formulação associada com AAS ou paracetamol, alcançou, no final da década de 60, um verdadeiro sucesso comercial nos E. U. A. No final da década de 60, um laboratório forense na Inglaterra indicava o propoxifeno como a principal droga de abuso e causa de morte. Em 1978, somente um hospital admitiu 130 pacientes intoxicados por auto-administração de Distalgesic[®]; muitos se recuperaram e um dos pacientes permaneceu com graves danos cerebrais. Durante os anos 80, nos países nórdicos, através do Instituto de Medicina Forense em Aarhus, Dinamarca, registraram-se 238 vítimas fatais e, em Oslo, na Noruega, 263, por narcótico analgésico, principalmente propoxifeno.²

Metadona

Quimicamente, a metadona difere bastante da morfina, porém, na ação e potência analgésica é bastante similar pois 7,50 mg de metadona equivalem a 10,0 mg de morfina. Devido à dependência cruzada com opióides e maior lentidão no seu desenvolvimento comparada à morfina, a metadona é empregada no tratamento de indivíduos dependentes de narcóticos analgésicos, tanto na detoxicação como nos programas de terapia substitutiva. Apesar da metadona ser utilizada no tratamento da dependência a outros opióides, ela não deixa de ser uma droga perigosa.²

Capítulo 1 - Introdução

Naloxona

A naloxona é um derivado da hidromorfona, a N-alil-7,8-diidro-14-hidroxi morfina que, apesar de ser um opióide, não é utilizada como droga de abuso. Pelo contrário, a naloxona é um antagonista específico sem qualquer propriedade agonista, antagonizando sintomas que são provocados pelos outros opióides. Assim, a naloxona reverte a ação depressora respiratória provocada por opióides dando imediata proteção às vias aéreas e agindo sobre outros sinais e sintomas como sonolência, vasodilatação periférica, melhorando o débito cardíaco. A naloxona é utilizada tanto na terapêutica das superdoses de opióides quanto no diagnóstico da intoxicação, pois precipita a síndrome de abstinência nos indivíduos dependentes. Dada a sua lipossolubilidade ela é rapidamente absorvida por todas as vias. Quanto ao mecanismo de ação, a naloxona desloca os opióides dos seus sítios receptores a eles se ligando imediatamente. Ao contrário da nalorfina e levalorfano, também antagonistas opióides, ela antagoniza os efeitos sedativos, analgésico e ocular dos opióides e favorece o aparecimento de efeitos narcóticos, quando precedida pela administração de algum opióide. Por ser um antagonista puro, a naloxona vem substituindo todos os outros compostos no tratamento das intoxicações por opióides.²

1.4 - Métodos analíticos utilizados para detectar e identificar as drogas de abuso (fármacos opióides e demais classes)

Fazendo-se um levantamento bibliográfico minucioso, nos últimos 20 anos, várias metodologias analíticas têm sido desenvolvidas para a determinação de fármacos de relevância clínica e drogas de abuso. O maior interesse na análise de fármacos presentes em fluidos e diferentes tecidos biológicos provém das áreas farmacêuticas (análises clínicas e toxicológicas) e da medicina legal. Os métodos analíticos que se destinam à quantificação de fármacos e seus metabólitos em amostras de origem biológica são importantes na obtenção de dados de biodisponibilidade, bioequivalência e farmacocinética.^{8,9} Os métodos cromatográficos como HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) e GC/GC-MS (cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas) são os mais utilizados para a determinação e quantificação de drogas em indivíduos e em seus fluidos e tecidos biológicos (sangue, urina, cabelo, etc).^{10, 11 e 12} Entre as técnicas analíticas utilizadas para a separação e identificação de substâncias e, que vem rapidamente crescendo e se desenvolvendo nas últimas duas décadas, destaca-se a eletroforese capilar (CE).¹³ A CE teve um rápido avanço desde a sua implementação na década de 1980 e, atualmente, é largamente empregada na indústria farmacêutica e, a cada dia mais vem ganhando destaque em diversas áreas. A razão deste fenômeno é em virtude da CE ser uma técnica de fácil

⁸F. Bressole; M. Audran; T. N. Pham; J. J. Vallon; *J. Chromatogr. B*; 687 (1996), 303.

⁹D. Levêque; C. Gallion-Renault; H. Monteil; F. Jehl; *J. Chromatogr. B*, 697 (1997), 67.

¹⁰S. Härter, B. Jansen; C. Hiemke, M. Leal, H. Weiggmann; K. Unger; *J. Chromatogr. B*, 712 (1998), 253.

¹¹M. A. Rogawski; R. J. Porter; *Pharmacol. Rev.*, 42 (1990), 224.

¹²L. J. Brunner; J. T. Diprio; S. Feldman; *J. Chromatogr.*, 662 (1993), 98.

¹³M. F. M. Tavares; *Química Nova*, 19 (1996), 173.

Capítulo 1 - Introdução

implementação e que oferece uma variedade de modos de separação, que podem ser efetuados em uma única coluna capilar¹⁴, onde compostos presentes nas mais diversas matrizes podem ser analisados¹⁵.

A análise de drogas, tanto em formulações farmacêuticas como em fluidos biológicos representa uma das áreas de maior crescimento de uso da CE. Um excelente *review* abordando o uso da CE na análise de drogas de abuso foi feito por Lurie¹⁶. Mas foi através do trabalho pioneiro de Weimberger e Lurie¹⁷, publicado em 1991, que a CE consolidou-se definitivamente como uma ferramenta viável para a análise de drogas de abuso. Neste trabalho é mostrada a separação e quantificação de impurezas ácidas e neutras de amostras ilícitas de heroína utilizando-se a CE como técnica analítica. O conhecimento da composição das drogas apreendidas muitas vezes leva as autoridades policiais ao descobrimento dos traficantes que são responsáveis pela fabricação e comercialização ilegal de tais drogas. A partir desta publicação inicial uma série de outros trabalhos foram publicados utilizando a CE como técnica de separação e identificação de fármacos e drogas abuso nas mais diversas matrizes.

¹⁴ K. D Altria,.; *Capillary Electrophoresis Guidebook.principles, instrumentation, operation, and applications; Methods in Molecular Biology, Series 52; Series Editor J. M. Walker; Humana Press, 1995.*

¹⁵ J. P.Landers,.; *Handbook of High Performance Capillary Electrophoresis; CRC Press, 1993.*

¹⁶ I. S. Lurie, Analysis of seized drugs by capillary electrophoresis – in “ J.A. Adamovics (ed.). *Analysis of Addictive and Misused Drugs*”. Marcel Dekker, New York, 1994, 151.

1.5 - Eletroforese Capilar: da origem aos dias atuais

A eletroforese é uma técnica analítica de separação de compostos carregados sob a influência de um campo elétrico sendo empregada desde de 1930 até os dias atuais na análise de biomoléculas. Na eletroforese clássica solutos carregados são separados através do uso de um meio líquido condutivo sobre uma superfície que permite o deslocamento da solução de eletrólitos e dos solutos; caracteriza-se pelo uso de papel ou gel como superfície de separação, com necessidade de manipulação intensiva e longos tempos de análise. A maior limitação para a rapidez, eficiência e aumento da escala de separações eletroforéticas é a incapacidade do papel ou gel em dissipar o calor causado pela passagem de corrente através do meio condutor, o chamado *efeito Joule*. Em tais condições, surgem gradientes de temperatura que induzem a gradientes de densidade, que por sua vez podem causar convecção. Os fluxos convectivos misturam as bandas já separadas.

A CE segue os mesmos princípios da eletroforese clássica, porém, a separação é conduzida em tubos capilares com dimensões de 15 a 100 μm de diâmetro interno e 30 a 100 cm de comprimento, preenchidos com um eletrólito condutor e submetidos à ação de um campo elétrico elevado.¹³⁻¹⁵

O uso de tubos com dimensões capilares minimiza as limitações relativas ao efeito Joule, uma vez que a geometria do capilar (elevada área superficial interna relativa ao volume) favorece a dissipação de calor. Com isso, a convecção é praticamente eliminada e, conseqüentemente, aumenta-se a eficiência da coluna por permitir a aplicação de campos elétricos mais

¹⁷ R. Weimberger; I. S. Lurie; *Anal. Chem.*, 63 (1991), 823.

Capítulo 1 - Introdução

elevados, o que também resulta em uma considerável redução do tempo de análise. O consumo de amostra e solventes também é reduzido.

Na década de 1980 foram registrados os primeiros trabalhos relativos à CE^{18,19}, destacando-se o trabalho de Terabe e colaboradores²⁰ que foi responsável pela introdução da cromatografia eletrocinética micelar (sigla inglesa MEKC). Com o advento da MEKC a CE avançou ainda mais e fez com que esta técnica ganhasse mais espaço e destaque entre as técnicas de separação e em diversas áreas da Química Analítica, por possibilitar a análise não só de compostos carregados, mas também de compostos neutros entre si.

Na década de 1990 a CE vislumbrou o desenvolvimento da eletrocromatografia capilar (CEC), que se caracteriza pelo uso de capilares recheados com uma fase estacionária e a solução de eletrólito é acrescida de um solvente orgânico. A CEC funciona com uma espécie de interface entre a cromatografia líquida de alta eficiência e a CE já que faz uso de duas fases, uma estacionária e outra líquida, a qual flui através do capilar devido ao fluxo eletrosmótico.

Mais recentemente, a CE alcançou a evolução tecnológica da miniaturização, caracterizada por separações eletroforéticas em microcanais em tempos extremamente reduzidos.²¹

A CE é uma técnica que pode ser operada com diferentes mecanismos de separações e todos são executados utilizando-se a mesma coluna de separação. Os diferentes modos de separação mais utilizados são a eletroforese capilar de zona (CZE, do inglês, Capillary Zone Electrophoresis) ou

¹⁸ F. E. P. Mikkers; F. M. Everaerts; Th. P. E. M. Verheggen, *J. Chromatogr.*, 169 (1979), 11.

¹⁹ J. W. Jorgenson; K. D. Lukacs; *J. Chromatogr.*, 218 (1981), 209

²⁰ S. Terabe; K. Otsuka; K. Ichikawa; A. Tsuchiya; T. Ando; *Anal. Chem.*, 56 (1984), 111.

Capítulo 1 - Introdução

eletroforese capilar de solução livre (sigla inglesa FSCE); a cromatografia eletrocínética micelar capilar (MEKC), eletroforese capilar em gel (CGE); eletroforese capilar por focalização isoelétrica (CIEF) e a isotacoforese capilar (CITP).²²

A separação de drogas de abuso é realizada principalmente nos modos CZE e MEKC.²³ As matrizes de escolha geralmente são sangue e urina mas poucos são os trabalhos utilizando o cabelo como matriz de interesse.

No presente trabalho foram utilizados os modos da eletroforese capilar em solução livre, cromatografia eletrocínética micelar (sigla inglesa MECK) e eletroforese capilar em meio não-aquoso no estudo da otimização da separação de duas misturas de padrões de opióides. Os mecanismos de separação utilizados neste estudo serão descritos nos próximos tópicos em maior detalhe após a descrição da instrumentação utilizada.

1.5.1 – Instrumentação utilizada em CE

Um esquema típico de um sistema de um sistema CE é mostrado na Figura 1.2. O sistema consiste de uma fonte de alta tensão, um capilar, eletrodos (geralmente platina) e um detector apropriado. A fonte de alta tensão é conectada, através dos eletrodos de platina, a dois reservatórios contendo uma solução de um eletrólito conveniente. O tubo capilar de sílica fundida é então preenchido com a solução, e serve como canal de migração. O sistema de detecção é interfaciado a uma computador e os dados obtidos são analisados através de programas gráficos adequados. O sistema de

²¹ S. Beale; *Anal. Chem.*, 70 (1998), 279R.

Capítulo 1 - Introdução

introdução de amostra no capilar pode se dar de duas formas: eletrocineticamente ou hidrodinamicamente. Na injeção eletrocinética, um gradiente de potencial é estabelecido entre as extremidades do capilar, enquanto que na injeção hidrodinâmica utiliza-se um gradiente de pressão, por um tempo determinado.¹³

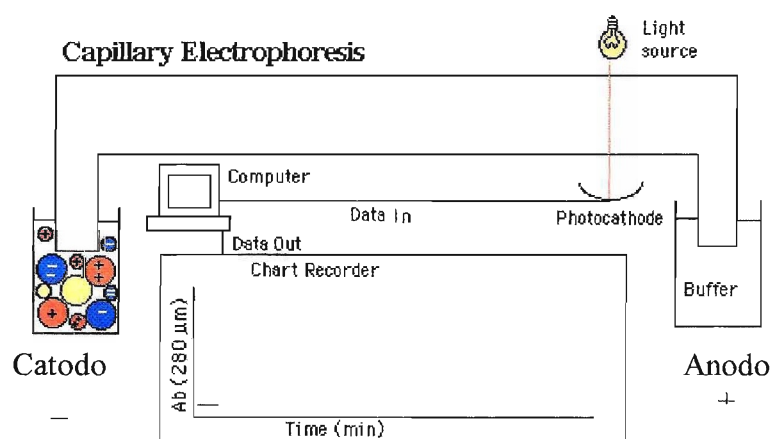


Figura 1.2 – Representação esquemática de um sistema CE.²⁴

1.6 – Fundamentos teóricos da CE

O princípio da separação em CE baseia-se nas diferentes velocidades que um soluto apresenta, de acordo com o meio em que se encontra. A velocidade de um soluto sob a influência de um campo elétrico é determinada através da equação [1]:

$$v_{\text{elef}} = \mu_{\text{elef}} \times E \quad [1]$$

²² R. Kuhn; S. Hoffstetter-kuhn; "Capillary electrophoresis: principles and practice", New York: Springer Verlag, 1993, 375.

Capítulo 1 - Introdução

Onde: v_{elef} é a velocidade eletroforética do íon; μ_{elef} é a mobilidade eletroforética e E o campo elétrico.

A mobilidade eletroforética (μ_{elef}) de um soluto varia conforme a sua carga e tamanho e pode ser descrita através da seguinte equação:

$$\mu_{\text{elef}} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad [2]$$

Onde: q é a carga do íon; η é a viscosidade da solução e r o raio do íon hidratado.

Quando ocorre a separação, os íons se movem em direção ao eletrodo de carga contrária e atravessam o detector. A mobilidade de um íon é determinada pelo seu tamanho e carga iônica (equação 2). Um íon pequeno se moverá mais rápido que um íon maior com a mesma carga. Similarmente, um íon com duas cargas se moverá mais rapidamente que um íon com somente uma carga e de tamanho equivalente. Dessa forma, quando se separa uma mistura teórica de íons com diferentes tamanhos e cargas, os menores e mais altamente carregados serão primeiramente detectados. Moléculas neutras têm mobilidade eletroforética igual a zero.¹⁴

²³ F. Tagliaro; W. F. Smyth; S. Turrina; Z. Deyl; M. Marigo; *Forensic Sci. Int.*, 70 (1995), 93.

1.6.2 – O Fluxo Eletrosmótico

Além da migração eletroforética dos íons, outro fenômeno de migração ocorre, a eletrosmose, ou seja, o fluxo de solução induzido pelo campo elétrico o qual confere à técnica de CE parte de suas características de alta eficiência.²⁵ O fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês, electroosmotic flow) é inerente às espécies presentes no meio, isto é, cátions migram em direção ao cátodo (eletrodo negativo) e os ânions migram em direção ao ânodo (eletrodo positivo). O EOF é a força motriz nas separações por CE. Este fluxo origina-se no ânodo, segue em direção ao cátodo e bombeia eficientemente os íons do soluto ao longo do capilar.²¹

O EOF ocorre em razão da dissociação dos grupos silanóis ácidos (SiOH) presentes na parede interna do capilar quando em contato com o meio aquoso tamponado (eletrólito).²⁵ Em condições de pH alto, os grupos silanóis estão dissociados sob a forma de silanoatos (SiO⁻), que resulta em uma superfície carregada negativamente. Nestas condições (Figura 3) cátions presentes em solução (contra-íons) se organizam próximos à superfície da parede do capilar (camada fixa). Como estes contra-íons não são suficientes para neutralizar a carga negativa da superfície da parede, uma nova camada de cátions é igualmente atraída (camada móvel). As camadas fixa e móvel formam uma dupla camada do modelo de dupla camada elétrica de Gouy-Chapman-Stern-Grahame.

²⁴ Figura retirada do site: www.electrodoc.com

²⁵ M. F. M. Tavares, *Química Nova*, 20 (1997), 493.

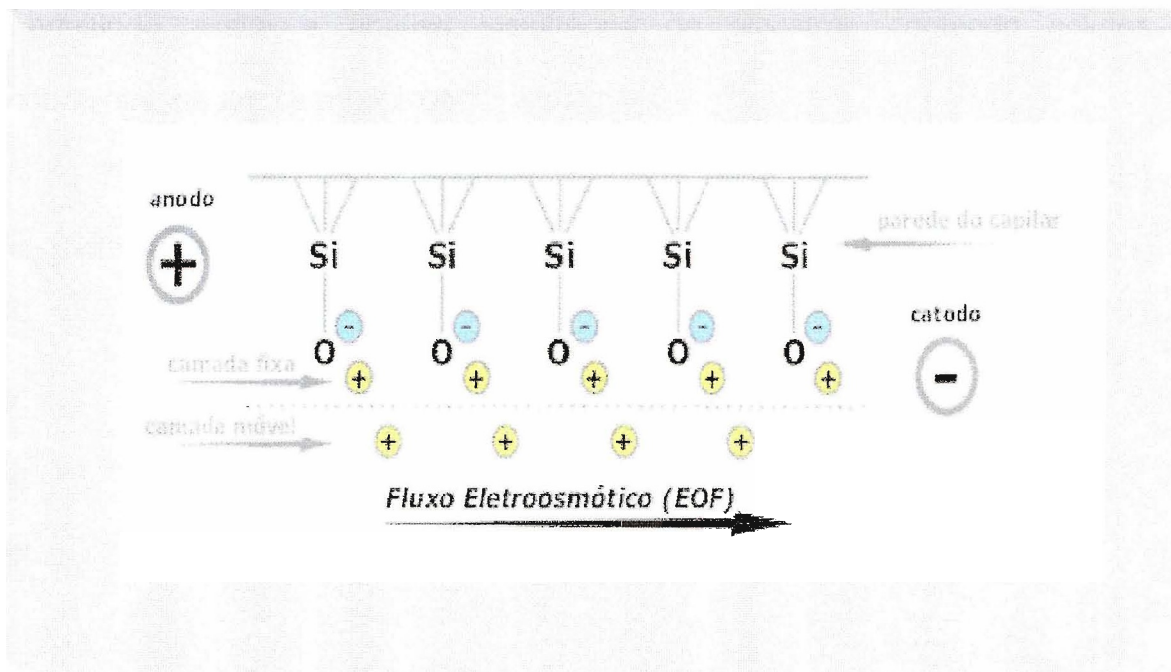


Figura 1.3 – Representação do EOF em um capilar de sílica fundida utilizado em CE.

Com a aplicação de um potencial através do sistema ilustrado na Figura 1.3, a camada móvel é arrastada em direção ao catodo em função da atração eletrostática. As moléculas de água de solvatação dos cátions também se movem e originam um fluxo de solução ao longo do capilar, que serve como canal de migração denominado *fluxo eletrosmótico*.

Dentro do tubo capilar, o EOF é caracterizado por um perfil linear constante de velocidade, não contribuindo, portanto, para o alargamento das bandas. Esta peculiaridade distingue a CE dos métodos cromatográficos em fase líquida, que apresentam uma variação parabólica para o perfil radial de velocidade dentro da coluna, característico do fluxo induzido por pressão. Além disso, o EOF, em geral, de grande magnitude é responsável pela condução dos solutos, sem distinção de carga, na direção do detector,

Capítulo 1 - Introdução

permitindo assim a análise simultânea de amostras contendo solutos catiônicos, neutros e aniônicos.²⁵

A magnitude do EOF pode ser expressa em termos de velocidade (v_{EOF}) ou mobilidade (μ_{EOF}):

$$v_{\text{EOF}} = -\frac{\varepsilon\varepsilon_0\zeta E}{4\pi\eta} \quad [3]$$

ou

$$\mu_{\text{EOF}} = -\frac{\varepsilon\varepsilon_0\zeta}{4\pi\eta} \quad [4]$$

onde: ε é a constante dielétrica da solução; ε_0 é a permissividade do vácuo; ζ é potencial zeta; E é o campo elétrico e η é a viscosidade da solução tampão.

A velocidade é dependente do pH e da concentração da solução de eletrólitos (os quais influenciam o potencial zeta) e, em menor intensidade da tensão aplicada, da temperatura e de modificações químicas da parede interna do capilar. Em pH baixo (3,0 a 4,0) a ionização dos grupos silanóis é pequena, o potencial zeta é reduzido e o EOF é insignificante. Em pH abaixo de 2,0 não há EOF em capilares de sílica fundida, pois a maioria dos grupos silanóis está protonada. Em pH alto os grupos silanóis estão completamente dissociados, o que aumenta o potencial zeta e, conseqüentemente, a velocidade do EOF é alta. A presença do EOF permite a separação e detecção de cátions e ânions em uma mesma análise, já que é suficientemente forte em pH 7,0 e, acima deste, consegue-se arrastar ânions para o catodo.²⁶ Se a temperatura não é controlada, o aumento da concentração da solução tampão pode causar um

Capítulo 1 - Introdução

aumento no EOF pelo aumento da corrente, que conseqüentemente, aumenta a temperatura, reduzindo a viscosidade do meio.²⁶

A velocidade do EOF (v_{EOF} , cm/s) pode ser medida através do tempo de migração, em segundos, de um composto neutro ($t_{m,n}$) conhecido como marcador neutro (metanol em geral é utilizado), que pode ser adicionado à amostra ou injetado diretamente em um capilar de comprimento efetivo (L_{ef}) conhecido através da equação:

$$v_{\text{EOF}} = \frac{L_{\text{ef}}}{t_{m,n}} \quad [5]$$

A mobilidade eletrosmótica (μ_{EOF} , $\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$) pode ser calculada dividindo-se a velocidade eletrosmótica pelo campo elétrico (E), em Volts/cm:

$$\mu_{\text{EOF}} = \frac{v_{\text{EOF}}}{E} \quad [6]$$

Valores típicos de μ_{EOF} estão entre 10^{-5} a $10^{-4} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$.

O movimento líquido ou aparente das espécies carregadas presentes dentro de um capilar é a soma do EOF com a migração eletroforética individual de cada soluto. Primeiramente eluem os cátions por possuírem migração eletroforética na mesma direção do EOF e os ânions, mais lentamente, devido ao seu movimento eletroforético ser oposto ao EOF.²⁶

Uma vez conhecidos ou medidos experimentalmente (dados de um eletroferograma) e demais parâmetros instrumentais torna-se possível calcular

²⁶ D. R. Baker; “*Capillary electrophoresis*”, New York: John Wiley & Sons, 1995, 244.

Capítulo 1 - Introdução

a mobilidade aparente (μ_{ap}) de um determinado analito conforme a equação dada a seguir:

$$\mu_{ap} = \frac{L_t \times L_{ef}}{t_m \times V} \quad [7]$$

onde: L_t = comprimento total do capilar; L_{ef} = comprimento efetivo do capilar; t_m = tempo de migração e V = tensão (V).

1.7 - Eletroforese capilar em solução livre, cromatografia eletrocínética micelar capilar e eletroforese capilar em meio não-aquoso

1.7.1 - Eletroforese capilar em solução livre

A eletroforese capilar em solução livre (free solution capillary electrophoresis, FSCE ou capillary zone electrophoresis, CZE, como é ainda comumente conhecida) é um dos modos de separação eletroforética mais usados na prática, provavelmente em razão da facilidade de sua implementação e otimização de condições. Em FSCE, o tubo capilar é simplesmente preenchido com um eletrólito, geralmente com características tamponantes. A separação ocorre como resultado de duas estratégias: maximizar as diferenças entre as mobilidades efetivas dos solutos e minimizar as causas de alargamento das zonas.

As equações tradicionais que descrevem resolução (R), eficiência (N) e tempo de migração (t_m) em FSCE incorporam o fenômeno de difusão como única causa de alargamento das zonas, e podem ser escritas como:

Capítulo 1 - Introdução

$$R = \frac{1}{4\sqrt{2}} (\mu_{ap} - \mu_{ap+1}) \left(\frac{V}{D(\mu_{m\u00e9dia} + \mu_{EOF})} \right)^{1/2} \quad [8]$$

$$N = \frac{L_{ef}(\mu_{elef} + \mu_{EOF}) \cdot V}{2DL_t} \quad [9]$$

$$t_m = \frac{L_{ef}L_t}{(\mu_{elef} + \mu_{EOF})} \quad [10]$$

onde μ_{ap} e μ_{ap+1} s\u00e3o as mobilidades aparentes de dois solutos eluindo em posi\u00e7\u00f5es adjacentes, $\mu_{m\u00e9dia}$ \u00e9 a mobilidade m\u00e9dia dos solutos, μ_{elef} \u00e9 a mobilidade eletrofor\u00e9tica do soluto i , μ_{EOF} \u00e9 a mobilidade do fluxo eletrosm\u00f3tico, V \u00e9 a diferen\u00e7a de potencial aplicada, D \u00e9 a m\u00e9dia dos coeficientes de difus\u00e3o dos dois solutos, L_t \u00e9 o comprimento total do capilar e L_{efe} \u00e9 a dist\u00e2ncia do ponto de inje\u00e7\u00e3o \u00e0 posi\u00e7\u00e3o do detector.

As equa\u00e7\u00f5es 8 a 10 indicam que o uso de tens\u00f5es elevadas \u00e9 vantajoso, pois implica em um ganho de resolu\u00e7\u00e3o e efici\u00eancia, assim como na diminui\u00e7\u00e3o do tempo de an\u00e1lise. Outra observa\u00e7\u00e3o pertinente \u00e9 que, em separa\u00e7\u00f5es dif\u00edceis, a resolu\u00e7\u00e3o de pares de solutos eluindo muito pr\u00f3ximos pode ser melhorada pelo ajuste da magnitude do fluxo eletrosm\u00f3tico. Quando a mobilidade eletrosm\u00f3tica for aproximadamente igual, mas de sinal oposto \u00e0 mobilidade dos solutos, um ganho de resolu\u00e7\u00e3o \u00e9 alcan\u00e7ado (equa\u00e7\u00e3o 8). As penalidades para este tipo de estrat\u00e9gia, no entanto, s\u00e3o: perda de efici\u00eancia (equa\u00e7\u00e3o 9) e aumento consider\u00e1vel do tempo de an\u00e1lise (equa\u00e7\u00e3o 10).¹³

1.7.2 - Cromatografia Eletrocinética Micelar (MEKC)

A MEKC foi introduzida por Terabe e colaboradores em 1984.²⁰ Neste modo um surfactante iônico (detergente) é adicionado à solução de eletrólitos. As moléculas do surfactante, em quantidade apropriada, formam micelas. As micelas são formadas por um grupo hidrofóbico orientado para o centro do agregado e o grupo carregado, que se orienta para fora do agregado. Uma representação esquemática de uma micela aniônica é mostrada na Figura 1.4 e uma representação esquemática do princípio de separação do modo MEKC é ilustrado na Figura 1.5.

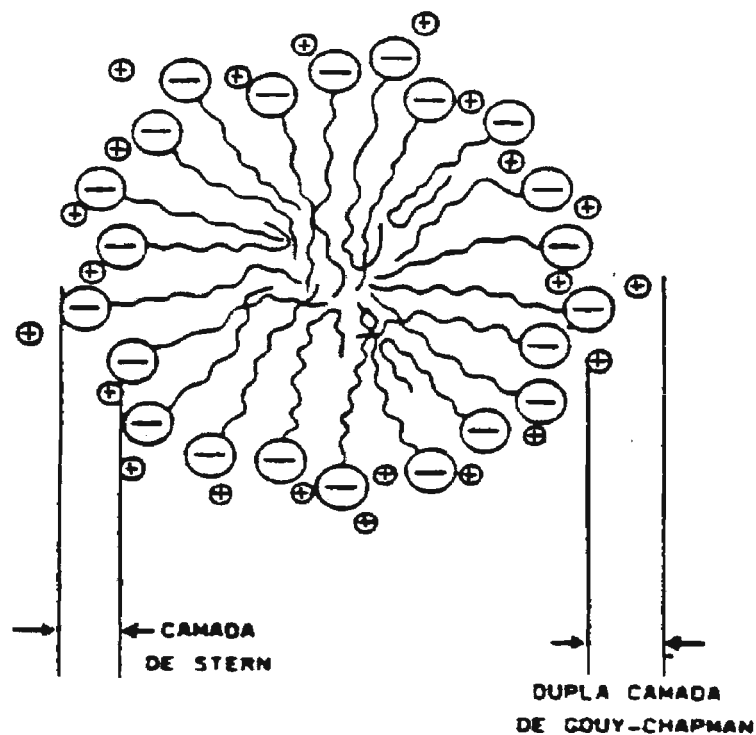


Figura 1.4 - Representação esquemática de uma micela aniônica.

Capítulo 1 - Introdução

A micela é envolvida pela camada de Stern que contém os grupos iônicos e também 50 a 80% dos contra-íons, conferindo à micela uma carga residual positiva ou negativa em função da carga das cabeças. A camada de Stern é envolvida por uma dupla camada elétrica difusa, denominada de dupla camada de Gouy-Chapman, e que contém os restantes dos contra-íons solvatados.²⁷

²⁷ D. Attwood.; A.T. Florence,. *"Surfatants Systems. Their Chemistry, Pharmacy and Biology"*, Chapman and Hall, London, 1983.

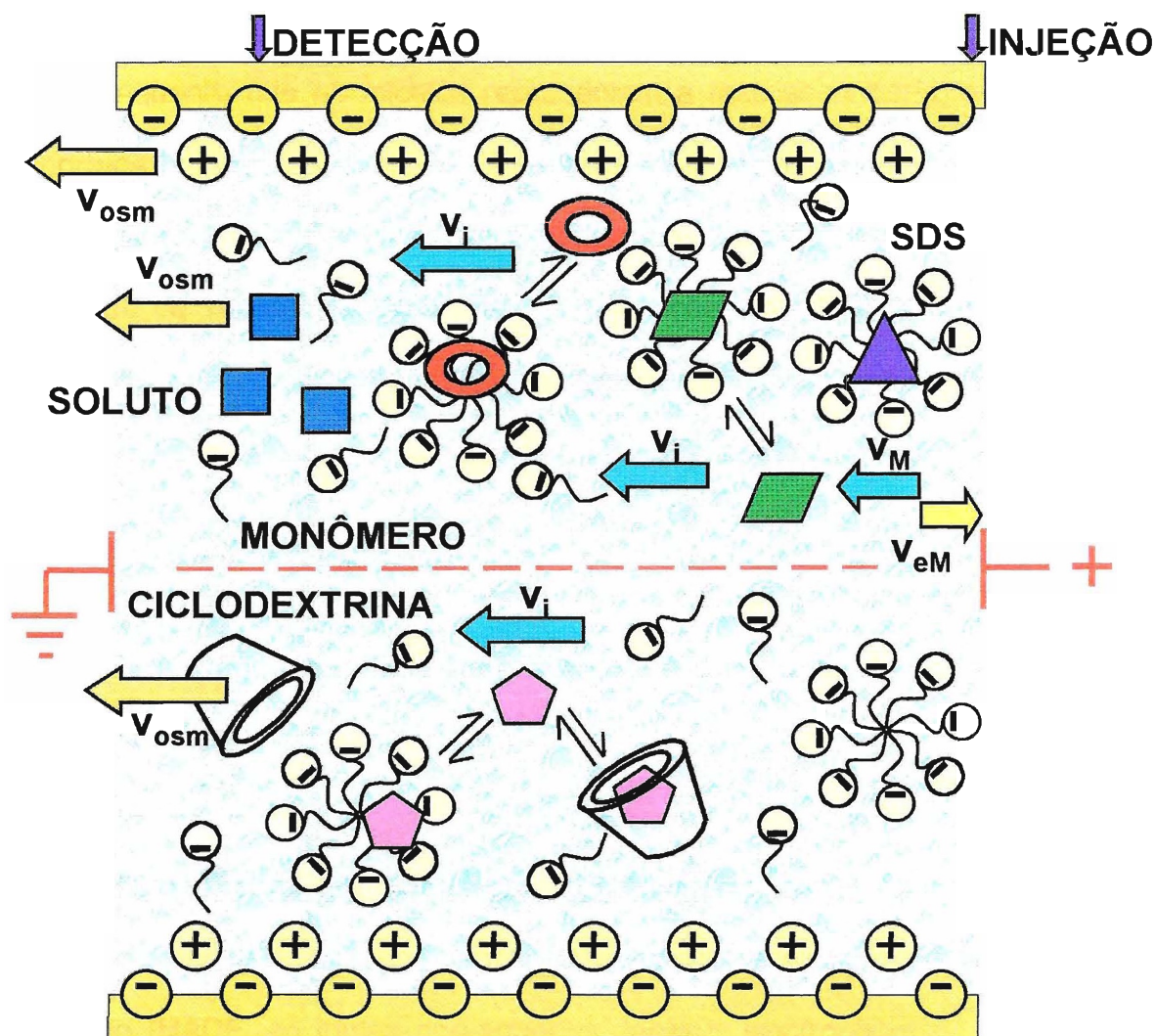


Figura 1.5 – Representação esquemática da migração de solutos neutros por cromatografia eletrocinética micelar aniônica (A) e na presença de uma fase auxiliar (B). Detalhe mostrando monômeros e micelas de SDS, ciclodextrinas e a interação de diversos solutos neutros com ambas as fases. Um soluto não-retido pela micela migra com velocidade do fluxo eletrosmótico, v_{osm} (v_{EOF}). A velocidade eletroforética da micela é $v_{e,M}$ enquanto que sua velocidade aparente final é v_M .

Os agentes tensoativos adicionados ao eletrólito de corrida funcionam como uma fase pseudo-estacionária propiciando assim a formação de um sistema cromatográfico de duas fases. O eletrólito representa a fase

Capítulo 1 - Introdução

estacionária, a qual é transportada eletrosmoticamente sob ação do campo elétrico, enquanto que as micelas representam a fase secundária, a qual é transportada por uma combinação de eletroforese e eletrosmose. A partição diferenciada de solutos neutros entre estas duas fases é responsável pela seletividade da separação. Problemas de coeluição em MEKC são em parte solucionados pela adição de uma fase complexante auxiliar: as ciclodextrinas. Toda uma classe de separações que faz uso de ciclodextrinas de diferentes tamanhos pertence a esta categoria, e vem sendo referida como MEKC-CD. Sendo neutras as ciclodextrinas migram com a velocidade eletrosmótica. A partição diferenciada de solutos entre a micela e a cavidade da ciclodextrina produz a seletividade extra requerida.¹³

1.7.3 – Eletroforese capilar em meio não-aquoso

Em relação à eletroforese capilar convencional, a eletroforese em meio não-aquoso (NACE, do inglês *non-aqueous capillary electrophoresis*) explora uma série de propriedades físico-químicas que os solventes oferecem para controle de fluxo eletrosmótico (EOF) e da migração do analito.²⁸

As aplicações da CE em meio não-aquoso vem se tornando bastante frequentes nos últimos anos e inúmeras têm sido as aplicações desta técnica para a separação e identificação de solutos nas mais diversas matrizes e solutos que não possuem carga.²⁹ As separações em NACE têm sido empregadas com bastante sucesso na análise de drogas para teste de pureza³⁰, separações quirais³¹ entre muitas outras³².

²⁸ M. L. Riekkola; M. Jussila; S. P. Porras; I. E. Valkó; *J. Chromatogr. A*, 892 (2000), 155.

²⁹ J. L. Miller; M. G. Khaledi; D. Shea; *Anal. Chem.*, 69 (1997), 1223.

³⁰ I. Bjornsdottir; S. H. Jansen; *J. Chromatogr. A*, 711 (1995), 313.

Capítulo 1 - Introdução

No capítulo 4 serão mostrados os resultados obtidos referente ao uso dos modos FSCE, MEKC e NACE no estudo da separação de duas misturas de padrões de opióides: o mix A e o mix B cujos constituintes foram identificados no Capítulo 3.

1.8 – Cabelo como matriz analítica de estudo

Os primeiros trabalhos de análise de cabelo foram publicados por Hoppe³³ no século XVIII (1858), onde o As foi determinado em cabelos de cadáveres com aproximadamente 11 anos de sepultamento. Mas só foi no ano de 1979, com uma publicação de Baumgartner³⁴, que a análise de drogas de abuso em cabelo tornou-se destaque na área científica. Ele determinou os níveis de concentração de opióides no cabelo humano através de uma extração com metanol utilizando radioimunoensaio (RIA).

O cabelo é um substrato interessante para a investigação do uso de drogas de abuso, pois diferentemente dos demais materiais biológicos, o cabelo exibe um grande período de detecção dos analitos.^{35,36,37} Vários estudos têm sido desenvolvidos para verificar o uso de drogas de abuso ilícitas em cabelo, tais como heroína e cocaína e seus produtos de biotransformação, que podem ser identificados meses ou anos após seu uso.³⁸ Além disso, o cabelo é uma fonte de amostragem que apresenta inúmeras vantagens: a

³¹ F. Wang; M. G. Kaledi; *Anal. Chem.*; 68 (1996), 3460.

³² M. Jussila; S. Palonen; S.P. Porras; M.-L. Riekkola; *Electrophoresis*, 21 (2000), 586.

³³ H. Sachs; *Forensic Sci. Int.*, 84 (1997), 7.

³⁴ A. M. Baumgartner; P. F. Jones; W. A. Baumgartner; C. T. Black; *The Journal of Nuclear Medicine*, 20 (1979), 748.

³⁵ A. M. B. Barreira; S. S. Rossi; *Forensic Sci. Int.*, 70 (1995), 203.

³⁶ C. Jurado; C. Rodriguez-Vicente; M. Menéndez; M. Repetto; *Forensic Sci. Int.*, 84 (1997), 61.

³⁷ P. Kintz; P. Mangin; *Forensic Sci. Int.*; 70 (1995), 3.

³⁸ S. Magura; R. C. Freeman; Q. Siddiqi; D. S. Lipton; *Int. J. Addict.*, 27 (1992), 51.

Capítulo 1 - Introdução

coleta das amostras de cabelo é um processo simples, não invasivo, sendo difícil sua adulteração. Não são necessárias condições especiais de transporte e armazenamento, pois as amostras de cabelo são estáveis por um longo período de tempo.³⁹ Existe ainda a possibilidade de se obter uma segunda amostra, similar e correspondente à anteriormente coletada, para a realização de uma posterior análise se necessário.⁴⁰

A metodologia utilizada para a identificação de drogas de abuso compõe-se de duas etapas: primeiramente é realizada uma triagem prévia, onde são utilizados métodos imunológicos, seguida de uma técnica de confirmação, como a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/MS), que é a técnica mais citada na literatura especializada para a identificação de opióides em cabelo, assim como outras drogas de abuso.⁴¹

1.8.1 - Incorporação das drogas no cabelo

Os fios de cabelo originam-se de pequenas organelas chamadas folículos capilares localizados na epiderme, 3 a 4 cm abaixo da membrana epitelial. Estão próximos e associados às glândulas secretoras: a sebácea, a sudorípore e a apócrina. As secreções produzidas por estas glândulas nutrem os fios de cabelo, sendo possíveis veículos para a transferência de drogas para a estrutura capilar.⁴²

³⁹ T. Cairns; D. J. Kippemberge; A. A. M. Gordon; "Hair analysis for detection of drugs of abuse". In S. H. Y. Wong; *Analytical therapeutic drug monitoring and toxicology*. Boca Raton: CRC Press, 1997, 237.

⁴⁰ A. A. M. Chasin; A. F. Midio; *Rev.Farm. bioquim. S. Paulo*, São Paulo, 27 (1991), 1.

⁴¹ A. Polentini; C. Stramesi; C. Vignali; M. Montagna; *Forensic Sci. Int.*, 84 (1997), 259.

⁴² V. Cirimele; P. Kintz; P. Mangin; *Biomedical Chromatography*, 10 (1996), 179.

Capítulo 1 - Introdução

Cada fio de cabelo é constituído de três estruturas celulares distintas: a cutícula, o córtex e a medula.⁴³ A cutícula externa é composta por uma única camada de células alongadas justapostas. A cutícula envolve o córtex central composto por células queratinizadas longas, formando fibras alongadas, que se mantêm unidas através de um cimento químico especial. Nas células corticiais, são encontrados grânulos pigmentares chamados de melanina, responsáveis pela cor dos fios de cabelo, dos olhos e da pele de cada indivíduo. A medula se localiza na região central do pelo, e pode não estar presente se este for muito fino. É observada em fios de cabelo mais espessos.

Na Figura 1.6 é mostrada esquematicamente a estrutura de um fio de cabelo.

⁴³ M. A. Huestis; E. J. Cone; "Alternative testing matrices". In S. B. Karch; *"Drug abuse Handbook"*, Boca Raton: CRC Press, 1998, 799.

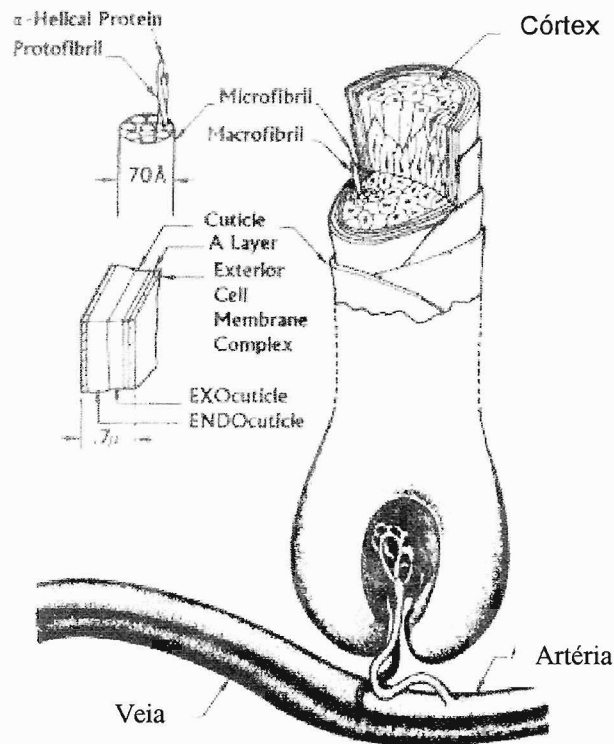


Figura 1.6 – Estrutura de um fio de cabelo.⁴⁷

O ciclo de vida do fio de cabelo humano consiste de três fases; a anágena, a catágena e telógena. A fase anágena é a de crescimento do fio de cabelo permanecendo por dois a três anos. Durante esse período a média de crescimento é de 0,3-0,4 mm/dia (0,9 – 1,2 cm/mês) e os capilares sanguíneos que envolvem o folículo fornecem nutrientes e outras substâncias exógenas, como traços de metais, drogas, fármacos, etc. Essas substâncias exógenas são incorporadas ao fio de cabelo, e pressupõe-se, que com seu crescimento sejam transportadas ao longo dos fios.⁴⁴

A segunda fase chamada de catágena é de transição entre o crescimento ativo e a fase de repouso. Sua raiz torna-se queratinizada,

⁴⁴ R. O. Bost; *Forensic Sci. Int.*, 63 (1993), 31.

Capítulo 1 - Introdução

formando uma única estrutura, e começa a se separar do bulbo ou papila. Após esse estágio, cessa o crescimento dos pelos, sendo a fase de repouso, conhecida como telógena podendo durar de dois a três meses. Durante esse período, os pelos são facilmente removidos se puxados. Começa então a ocorrer o crescimento de um novo fio de cabelo, na papila pilosa, sendo expulso o fio em repouso.³³

O modelo geralmente proposto para explicar o mecanismo de incorporação de drogas no cabelo é a difusão passiva da droga através da corrente sanguínea durante seu crescimento na base do folículo. Ou ainda as drogas podem ser incorporadas ao cabelo através das secreções das glândulas apócrinas e sebáceas ou através da contaminação ambiental.⁴⁵

O mecanismo pelo qual a droga é depositada nesta matriz e a estabilidade das ligações químicas da droga nos sítios ligantes é um dos fatores importantes para a interpretação dos resultados obtidos quando são analisadas amostras de cabelo.⁴⁶ Em relação aos possíveis sítios de ligação de drogas, três componentes da estrutura capilar podem ser considerados: proteínas, lipídeos e melanina. Em alguns estudos foram evidenciados que os principais responsáveis pela interação das drogas nos cabelos são a melanina e as proteínas. A quantidade de melanina presente nos cabelos é um fator relevante na determinação de drogas nesta matriz, devido a diferenças individuais. Em cabelos escuros encontra-se maior concentração de melanina, quando comparados com cabelos claros ou brancos.⁴⁷

⁴⁵ G. L. Handersen; *Forensic Sci. Int.*, 63 (1993), 19.

⁴⁶ E. J. Cone; *Ther. Drug Monitor.*, 18 (1996), 438.

⁴⁷ L. Pötsh; G. Skopp; M. R. Moeller; *Forensic Sci. Int.*, 84 (1997), 25.

Capítulo 1 - Introdução

Outro fator importante a ser considerado é a estrutura molecular da droga estudada assim como suas propriedades físico-químicas.⁴⁸ Forças eletrostáticas e forças de Van der Waals também são significativas na interação droga/melanina. Presume-se que formas catiônicas das drogas são atraídas pelos sítios aniônicos da melanina (possivelmente em grupos carboxílicos ionizados). Forças secundárias, tais como forças de Van der Waals, provavelmente estão presentes na atração entre as estruturas aromáticas das drogas e o núcleo aromático indol da melanina. Os opióides e a cocaína são compostos que apresentam em sua estrutura esses grupamentos funcionais.⁵⁰

Os principais conceitos bioquímicos, citados por Potsch e colaboradores⁵¹, para o entendimento da incorporação das drogas e conservação de fármacos e seus produtos de biotransformação durante a formação das fibras capilares, são baseados no transporte biológico através das membranas celulares, princípios de biotransformação de drogas e afinidade da substância à melanina. A rápida proliferação celular é associada com a alta atividade metabólica no folículo capilar. Isso se deve à presença de inúmeras enzimas capazes de promover reações de biotransformação das substâncias presentes. A permanência das drogas na estrutura capilar pode ser explicada pela interação entre a droga e as proteínas presentes na fibra queratinizada.

Alguns processos químicos, como descoloração, permanente e tingimentos geralmente são realizados com o objetivo de modificar a aparência dos cabelos. Os cosméticos utilizados atuam destruindo ou modificando

⁴⁸ Y. Nakahara; K. Takahashi; R. X. Kikura; *Biol. Pharm. Bull.*, **18** (1995), 1223.

Capítulo 1 - Introdução

estruturas que constituem os fios de cabelo. Os ingredientes desses produtos podem também reagir com moléculas de drogas presentes no cabelo e degradá-las, causando alterações nos locais onde provavelmente ocorra deposição da droga, ou em seus sítios de ligação (melanina, proteínas, lipídeos).⁴⁹

Um histórico sobre o uso de produtos cosméticos com intensidade sobre a estrutura capilar deve ser considerado na realização de análises de drogas em cabelo. Alguns estudos demonstram que tratamentos cosméticos que levam a uma perda de melanina, como a descoloração, afetam a quantidade da droga consumida nos cabelos, provando que um dos principais fatores na incorporação de drogas nos cabelos é a afinidade pela melanina.

Várias questões relacionadas à análise para identificação de opióides e outras substâncias nos cabelos ainda não estão totalmente esclarecidas. Fatores como a influência de tratamentos cosméticos na concentração da droga, a possibilidade de contaminação externa e a difusão através dos fios podem interferir na análise. Uma grande preocupação para os analistas é o tempo em que as substâncias se incorporam nos cabelos após sua administração e o período em que neles permanecem.⁵⁰

⁴⁹ G. Skopp; L. Pötsh; M. R. Moeller; *Forensic Sci. Int.*, **84** (1997), 43.

1.8.2 – Amostragem

Coleta

Não há referências na literatura sobre uma padronização em relação ao procedimento de coleta de amostra de cabelo. Há um consenso entre os estudiosos na área, que elegem como melhor local para a coleta dos cabelos, a região do vértice posterior, situada na região distal da cabeça. Esta região comparada com outras regiões da cabeça é a escolhida pois tem menor variabilidade no crescimento capilar, o número de fios é mais constante e o cabelo está menos sujeito a interferências individuais, como sexo e idade. Além disso, a coleta realizada nesta região é menos aparente, esteticamente.^{51,52 e 53}

Deve-se considerar também questões éticas em relação à coleta. Realizada na região do vértice posterior apresenta menos problemas do que em outras regiões corpóreas. Amostras de cabelo oferecem menor invasão de privacidade na coleta que amostras de urina.⁴¹ É uma tarefa relativamente simples, podendo ser realizada em público, em um tempo mínimo, se comparada à coleta de urina.⁵⁴

Os cabelos coletados devem pesar de 50 a 200 mg conforme relatos de recentes publicações. Como existem diferenças individuais em relação à espessura e comprimento dos fios, há dificuldade em estabelecer a quantidade necessária de fios de cabelo para a análise.

⁵⁰ W. R. Reid *et al.*; *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, 34 (1996), 685.

⁵¹ R. L. Comissaris; "Cocaine Pharmacology and Toxicology". In: K. K. Redda *et al.*, "Cocaine, marijuana, designer drugs: chemistry, pharmacology and behaviour"., Boston: CRC Press, 1989, 71.

⁵² J. P. Goullé; P. Kintz; *Anal. Biol. Clin.*, 55 (1997), 435.

⁵³ C. M. Selavka; F. Rieders; *Forensic. Sci. Int.*, 70 (1995), 155.

⁵⁴ M. J. Welch; *Forensic Sci. Int.*, 63 (1993), 295.

Capítulo 1 - Introdução

Os cabelos crescem em média 1 a 1,5 cm por mês, podendo-se então estimar o período em que o indivíduo fez uso da substância, através da análise do cabelo segmentado nessas medidas a partir da extremidade mais próxima da raiz capilar.⁴⁸ Sugere-se um segmento com 3 cm de comprimento, medidos a partir da raiz, para procedimentos de triagem. Dessa forma, obtêm-se informações relativas a três meses do uso da droga, anteriores à coleta do material, podendo-se provar a abstinência recente.⁴⁰

Levando-se em conta a variação dos níveis de crescimento dos cabelos, estes resultados não devem ser usados para determinar um período preciso de exposição. Quanto mais distante da raiz capilar, maiores cuidados devem ser tomados na interpretação dos resultados quantitativos nas secções individuais.

Vale a pena ressaltar que o cabelo em si é uma estrutura estável. Muitos problemas associados a outros materiais biológicos, como transporte, armazenamento, adulteração e preservação podem ser evitados, sendo esta também uma vantagem em utilizar o cabelo como espécime biológico.⁵⁵

Descontaminação

Como o cabelo pode sofrer contaminação externa, é necessário um procedimento de descontaminação prévio à análise, para eliminar os possíveis interferentes depositados.^{56, 57}

Esse procedimento de descontaminação é também importante na remoção de tratamentos cosméticos, os quais podem originar resíduos

⁵⁹ M. Martinez and col¹ *J. Anal. Toxicol.*, 17 (1993), 138.

⁵⁶ Wl L. Wang; E. J. Cone; *Forensic Sci. Int.*, 70 (1995), 13.

⁵⁷ D. L. Blank; D. A. Kidwell; *Forensic Sci. Int.*, 70 (1995), 13.

Capítulo 1 - Introdução

inadequados para análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS) e para eletroforese capilar.⁵⁸

A International Society of Hair Testing recomenda que o processo de descontaminação deve consistir em uma lavagem inicial com um solvente orgânico, uma segunda com água ou uma solução tampão e uma terceira lavagem com um solvente orgânico.⁵⁹

Os procedimentos de lavagem devem ser efetivos na remoção da contaminação externa, mas não dos componentes presentes no interior dos cabelos.⁵⁹ Segundo Kintz e Mangin³¹, soluções tampão ou solventes orgânicos usados nos processos de descontaminação são também usados para a solubilização das drogas nos cabelos, podendo estas ser extraídas.

Para solucionar esses problemas são propostos alguns critérios, estabelecendo relações entre as concentrações encontradas nas soluções de lavagem e aquelas encontradas após a digestão dos cabelos.⁶⁰ Alguns pesquisadores propõem a determinação de produtos de biotransformação da substância para evidenciar seu consumo, garantindo maior confiabilidade ao resultado encontrado.⁶¹

Digestão e extração

O cabelo é uma amostra sólida e muitos laboratórios efetuam sua digestão antes dos demais procedimentos analíticos. Preconiza-se o uso de

⁵⁸ D. A. Kidwell; D. L. Blank; Comments on the papeer by W. A. Baumgartneer and V. A. Hill: sample preparation techniques. *Forensic Sci. Int.*, **63** (1993), 137.

⁵⁹ Society of hair Testing; *Forensic Sci. Int.*, **63** (1997), 3.

⁶⁰ W. A. Baumgartner and col.; Comments on the paper by D. L. Blank and col.: external contamination of hair cocaine na issue in forensic interpretation. *Forensic Sci. Int.*, **63** (1993), 157.

⁶¹ G. Koren and col.; *J. Clin. Pharmacol.*, **32** (1992), 671.

Capítulo 1 - Introdução

ácidos e bases fortes para a digestão.⁶² Sabe-se que soluções alcalinas promovem a hidrólise da heroína ou 6-monoacetilmorfina em morfina, podendo não refletir corretamente a concentração de cada analito presente na amostra. É necessário tomar precauções para evitar essas transformações pois poderá ocorrer perda do analito durante a digestão.⁶³

A solubilização das substâncias presentes no cabelo pode ser feita através da hidrólise química, ácida ou alcalina, da hidrólise enzimática, ou ainda da extração direta com solventes.⁶⁴

A digestão e extração dos analitos realizada em meio ácido, com ácido clorídrico (HCl) é o procedimento mais empregado.⁶⁵⁻⁶⁶⁻⁶⁷ A digestão em meio alcalino, com hidróxido de sódio (NaOH) é pouco utilizada, quando se pretende identificar a presença de cocaína e opióides e seus produtos de biotransformação.⁶⁸

Os cabelos segmentados em pequenas partículas podem melhorar a recuperação de duas a três vezes. A recuperação em uma extração direta de cabelos segmentados é menor do que em cabelos pulverizados, independente das propriedades de permeabilidade do cabelo em relação ao solvente de extração. Segundo Eser e colaboradores⁶⁹, a recuperação dos analitos é melhor quando se analisam cabelos pulverizados comparando-os com cabelos segmentados.

⁶² D. A. Kidwell; *J. Forensic. Sci.*, 38 (1993), 272.

⁶³ W. A. Baugartner and col., *Forensic Sci. Int.*, 63 (1993), 121.

⁶⁴ J. Klein and col.; *Ther. Drug Monit.*, 16 (1994), 37.

⁶⁵ O. Curcuruto et al.; *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 6 (1992), 434.

⁶⁶ D. Fritch and col.; *J. Anal. Toxicol.*, 16 (1992), 112.

⁶⁷ A. C. Springfield and col., *Forensic Sci. Int.*, 63 (1993), 269.

⁶⁸ M. R. Moeller; *J. Chromatogr. C*, 580 (1992), 125.

⁶⁹ H. P. Eser; L. Potsch; G. Skopp; R. M. Manfred, *Forensic Sci. Int.*, 84 (1997), 271.

Capítulo 1 - Introdução

Existem na literatura especializada numerosos métodos para extrair substâncias presentes nos cabelos.^{53,58,63,64 e 70} Além da estabilidade do analito, um dos requisitos para um procedimento de extração apropriado é que o solvente utilizado alcance as diversas partes do cabelo onde tais substâncias encontram-se presentes. O método mais adequado parece ser a completa digestão do cabelo. Entretanto, para muitas substâncias, a digestão do cabelo é problemática, em muitos casos impossível, devido à instabilidade do analito em condições químicas necessárias para a digestão da amostra.⁶⁴

Vários processos químicos empregados nos cabelos podem impedir a recuperação das drogas ou destruí-las completamente. Processos de descoloração dos cabelos geralmente feitos sob condições fortemente alcalinas, podem degradar as substâncias existentes no cabelo.⁷¹

Um procedimento de extração em fase sólida, destruindo-se as fibras capilares mecanicamente pode ser uma alternativa. Esse método pode ser produzido pela pulverização das fibras ou pelo aumento da superfície de contato por banho de ultra-som das amostras de cabelo em solventes orgânicos.

Eser e colaboradores⁷³ encontraram melhores resultados na recuperação de drogas – opióides, cocaína e benzoilecgonina -, quando realizados processos de extração aquosos com metanol, em amostras de cabelo.

Os requisitos do solvente para a extração das drogas são:

- Deve alcançar os sítios onde as moléculas da droga estão particularmente localizadas;

⁷⁰ C. Offidani; S. Strano-Rossi; M. Chiarotti; *Forensic. Sci. Int.*, 63 (1993), 171.

Capítulo 1 - Introdução

- Não deve decompor os analitos;
- Deve ter um ótimo coeficiente de partição solvente/cabelo, de acordo com os princípios de extração em fase sólida.

Estudos de difusão de corantes provaram que os solventes orgânicos não penetram na matriz capilar queratinizada com a mesma magnitude que as moléculas de água. Embora, muitas drogas em sua forma não ionizada dissolvam-se melhor em metanol, moléculas de água são capazes de alcançar todas as estruturas do cabelo queratinizado e capacitar a difusão da fase capilar e de forma eficiente.⁷²

Considerando o conceito bioquímico de incorporação de drogas, a ligação das moléculas das drogas pode ocorrer com o complexo da membrana celular, com grânulos de melanina, e com proteínas capilares. O complexo da membrana celular é altamente exposto quando os cabelos são pulverizados. De todos os álcoois, o metanol é reconhecido como o melhor para penetrar o material queratinizado. Portanto, é recomendável a recuperação de drogas utilizando metanol e soluções aquosas.⁶⁹

Processos de extração aquosos em cabelos segmentados, e a eluição em metanol permitem uma razoável triagem para evidenciar o uso de drogas. Neste aspecto, a análise de cabelo fornece resultados preferencialmente semiquantitativos e quantitativos. Isso deve ser ressaltado, para que uma recuperação completa da droga existente no cabelo seja considerada diferente. É necessário, para cada substância em particular, um processo de extração altamente específico. Muitos fatores devem ser considerados para a escolha da melhor metodologia de extração de drogas em cabelo; Chiarotti,

⁷¹ V. Cirimele; P. Kintz; O. Mangin; *J. Anal. Toxicol.*, 20 (1996), 555.

Capítulo 1 - Introdução

em um trabalho de revisão sobre extração de drogas em cabelo enumera estes fatores.⁷³

Pichini e colaboradores⁷⁴ avaliaram diferentes processos de digestão e extração para opióides em amostras de cabelo, utilizando meio ácido, metanólico e meio aquoso. Relataram que diferentes concentrações de opióides foram encontradas quando submetidos aos métodos estudados e que a diferença nos resultados da relação entre a 6-monoacetilmorfina e morfina ocorre devido ao fenômeno de hidrólise durante o processo de extração. Segundo esses pesquisadores não existe um método ideal de digestão e extração. Deve ser escolhido de acordo com o objetivo de análise a ser atingido, a substância que se pretende identificar e a relação custo/benefício. Concluem que a digestão realizada em meio ácido promove uma melhor recuperação dos analitos.

No presente trabalho diferentes metodologias de descontaminação, digestão/extração de amostra foram testadas e avaliadas para a análise de opióides em cabelo via CE. No Capítulo 5 (estudo de metodologias de extração de drogas em fluidos biológicos) serão mostrados e discutidos em maiores detalhes os resultados obtidos durante procedimentos de extração diversos e qual foi o método de digestão de escolha utilizados para a quantificação de morfina e dos demais opióides utilizado em clínica médica.

⁷² L. Pötsh; G. Skoop; M. R. Moeller; *Forensic. Sci. Int.*, 84 (1997), 25.

⁷³ M. Chiarotti; *Forensic Sci. Int.*, 63 (1993), 61.

⁷⁴ S. Pichini and col.; *Annual Meeting of Internatioan Association of Forensic Toxicologists 35*, Padova, 1997, Proceedings, Padova, University of Padova, 1997, 665.

LACE

Laboratório de Cromatografia e Eletroforese Capilar

CAPÍTULO 2

2 – Objetivos

A grande maioria dos trabalhos publicados objetivando a determinação de drogas de abuso como os fármacos opióides em cabelo têm sido feitos utilizando-se a técnica de cromatografia gasosa (GC) acoplada à espectrometria de massas (MS) e/ou HPLC que são técnicas bem estabelecidas e que fornecem resultados confiáveis. A CE comparativamente à GC e HPLC ainda é uma técnica relativamente nova e não são muitos os trabalhos encontrados em literatura mostrando o quão útil e poderosa é a CE como técnica analítica para a determinação de drogas, não só opiáceos, mais uma gama muito variada de outras drogas. Porém uma grande dificuldade encontrada para determinação e identificação de opiáceos em cabelo via CE foi a adaptação de uma metodologia de digestão de amostra já existente e utilizada por uma das técnicas acima citadas. Foram inúmeros os procedimentos de extração/digestão de amostra testados para a elaboração deste trabalho que objetivava não só o uso da CE, como também da CEC, como técnicas alternativas para a determinação de opióides em cabelo.

Dessa forma este trabalho teve como principais objetivos:

- 1 – Desenvolver uma metodologia de extração/pré-concentração de opióides em amostras de cabelo.
- 2 – Desenvolver uma metodologia CE para a separação e identificação de opióides de diferentes classes em amostras de cabelo.
- 3 – Validar o métodos desenvolvido especificamente para morfina.
- 4 – Aplicar o método desenvolvido e devidamente validado na análise de amostras reais.

L/CE

Laboratório de Cromatografia e Eletroforese Capilar

CAPÍTULO 3

3 - Instrumentação, materiais, métodos, reagentes e amostras

3.1 - Instrumentação

Equipamento de eletroforese capilar

Para a realização das análises CE foi utilizado um equipamento de eletroforese capilar *Agilent Technologies* (Palo Alto, CA, EUA) equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) de 190 a 600 nm, fonte de alta tensão de $0 \pm 30\text{kV}$, controlador de temperatura por circulação de ar, controle do equipamento e aquisição de dados através do software *Chemstation CE* (versão 5.0 ver. A.08.03) da *Agilent*. Na Figura 3.1 é mostrada uma foto do equipamento utilizado.

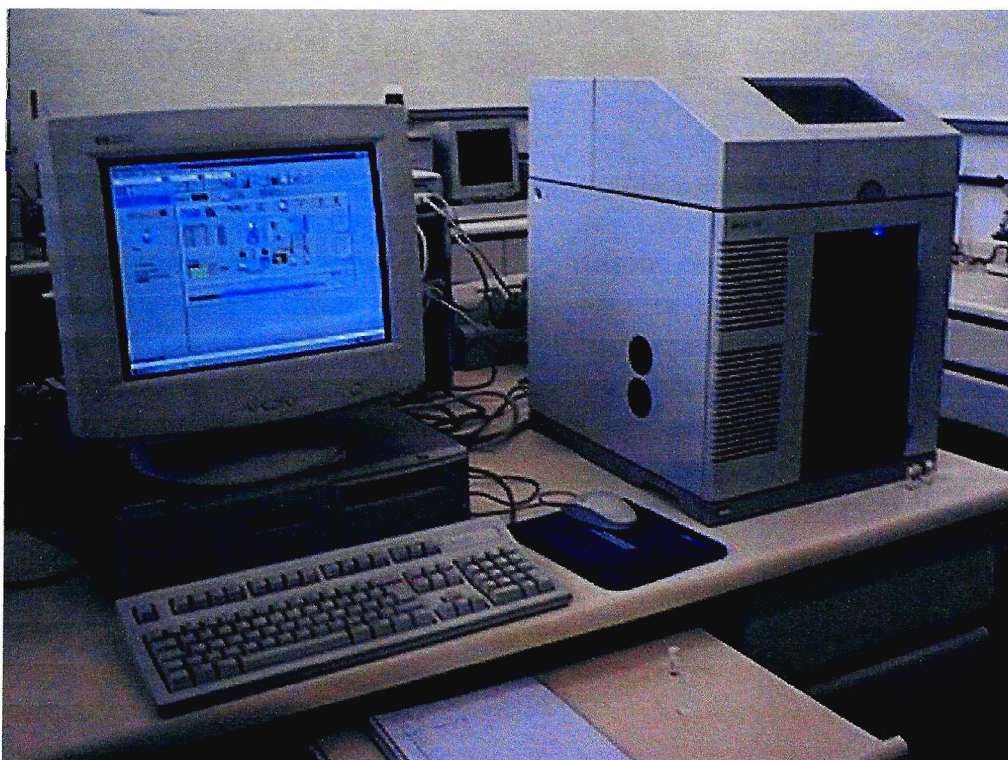


Figura 3.1 – Equipamento de CE utilizado para a realização das análises

Banho-maria

Um banho-maria modelo 550 (Fisaton, SP), com controlador de temperatura de 30-110°C foi utilizado.

pHmetro

Um pHmetro DM (Digimed, SP) com eletrodo de vidro combinado Ag/AgCl foi utilizado para a determinação de pH das soluções preparadas.

3.2 - Materiais utilizados na preparação de soluções e amostras

- a) micropipetas volumétricas da Gilson: 0-250 μL ; 200-1000 μL e 1000-5000 μL .
- b) funil de separação de 25 μL .
- c) Placas de Petri descartáveis.
- d) luvas e bisturis descartáveis para o manuseio das amostras de cabelo.
- e) balões volumétricos de 5, 10, 25, 50 e 100 mL.
- f) cartuchos para extração em fase sólida (SPE) com fases estacionárias: CN (ciano), amino (NH_2), C_{18} (ocatadecil sílica) (Strata, Phenomenex, Labtron, Brasil), e cartuchos de troca iônica (Oasis MCX, Waters Corp., Milford, MA, E.U.A.)
- g) barras magnéticas para agitação.
- h) *vials* de 1 e 150 μL .
- i) unidades Filtrantes Millex (Dr. Millex, Millipore, SP) de 0,22 μm e 0,45 μm .
- j) Seringas descartáveis.
- k) Tubos eppendorf de 2 mL.

Capítulo 3 - Instrumentação, materiais, métodos, reagentes e amostras

- l) capilares de sílica fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, EUA) de 75 μm de diâmetro interno e 360 μm de diâmetro externo.
- m) Manyfold Supelco *VispredTM DL* (Supelco, Sigma-Aldrich Family, São Paulo), 12 portas.

3.3 - Reagentes e soluções

Os solventes orgânicos utilizados para a preparação de solução padrão de opióides, empregados nos testes de extração foram todos de grau HPLC, obtidos da Merck.

Foi utilizada água desionizada (Milli-Q system, Millipore, Bedford, MA, E.U.A.) para a preparação de soluções de ácidos e bases assim como das soluções tampão. A seguir são descritas as soluções utilizadas durante a realização deste trabalho.

\Rightarrow Solução concentrada de NaOH, 1 mol/L

Foram dissolvidos 4 g de NaOH (Reagente PA – Aldrich, Sigma-Aldrich Family, SP) em 100 mL de água desionizada e a solução foi armazenada em frasco de polietileno.

\Rightarrow Solução de HCl 3,0 mol/L

Foram preparados 100 mL de uma solução estoque de 3,0 mol/L utilizando-se 29,53 mL do reagente concentrado (HCl PA Merck, $\tau = 32\%$, $d = 1,16$ g/L) utilizando-se água desionizada. A solução foi armazenada em frasco de polietileno e mantida à temperatura ambiente.

⇒ **Solução tampão de ácido fosfórico/monofosfato de sódio (H_3PO_4/NaH_2PO_4)**

Esta solução será identificada a partir desta seção pela sigla *TF*.

Foram preparados 250 mL de uma solução estoque TF 100 mmol/L com pH 2,5. Estas soluções foram preparadas através da diluição/ dissolução adequadas dos reagentes H_3PO_4 (Merck, grau PA, $\tau = 85\%$ e $d = 1,95$ g/L) NaH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, grau PA) segundo a equação de Handersen-Halsebach. O pH foi medido com o uso de um pHmetro. Foram utilizados 2,09 g de NaH_2PO_4 e 0,5 mL de H_3PO_4 concentrado. A solução obtida foi acondicionada em frasco de polietileno e mantida sob refrigeração.

⇒ **Solução tampão de tetraborato de sódio ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$)**

Esta solução será identificada a partir desta seção através da sigla TBS.

Foi preparada uma solução estoque de TBS 100 mmol/L a partir da dissolução de 9,53 g de $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ (Sigma-Aldrich, grau PA) em 250 mL de H_2O . A solução foi armazenada em um frasco de polietileno e mantida sob refrigeração.

⇒ **Soluções de dodecilsulfato de sódio (SDS) e ciclodextrinas**

Foram preparadas 100 mL de solução 100 mmol/L de SDS através da dissolução de 2,88 g do reagente padrão (SDS grau PA, Merck). A solução obtida foi acondicionada em frasco de polietileno.

Foram utilizadas ciclodextrinas com diferentes graus de substituição (α , β , δ -ciclodextrinas) de diferentes procedências (Merk e Beckman). Como tratam-se de reagentes caros e vendidos em pequenas quantidades (250 mg a

Capítulo 3 - Instrumentação, materiais, métodos, reagentes e amostras

1 g) os eletrólitos de corrida que utilizaram estes reagentes foram preparados em pequeno volume (5 mL) pesando-se a massa necessária (em mg) para a concentração requerida, diretamente no balão de preparo do eletrólito.

⇒ **Padrões de opióides**

Padrões de diferentes classes de opióides foram adquiridos juntos à Radian (Austin, Texas, E.U.A.). Estes padrões são comercializados como soluções metanólicas ou em acetonitrila e acondicionadas em ampolas de vidro (vidro âmbar) na concentração de 1000 mg/L. Foram preparadas soluções estoque em metanol de 100 mg/L de cada um dos padrões. Estas soluções foram acondicionadas em frascos âmbar de 5 mL e mantidas sob refrigeração (-12°C). Além disso, todos os reagentes foram protocolados na seção de protocolo do Instituto de Química para a oficialização do seu uso no presente trabalho de pesquisa.

Soluções de trabalho foram preparadas com as seguintes características:

1 – *mix A*: contém os padrões dos principais opiáceos utilizados em clínica médica: petidina (meperidina), morfina; tramal, naloxona, citrato de fentanila, alfentanil HCl e citrato de sufentanila. Para esta mistura de padrões foi realizado o estudo de validação segundo o Protocolo ICH – Q 2B Novembro de 96 para a separação FSCE otimizada.

2 – *mix B* que contém os seguintes padrões de opiáceos: petidina (meperidina), 6-acetil-morfina, morfina-3 β -glucuronídeo, morfina, codeína, tramal, naloxona, metadona; pentazocina, nalorfina, 6-acetil-codeína, citrato de fentanila,

alfentanil HCl, citrato de sufentanila e norefentanil. A estrutura destes opiáceos é mostrada na Figura 3.2.

Capítulo 3 - Instrumentação, materiais, métodos, reagentes e amostras

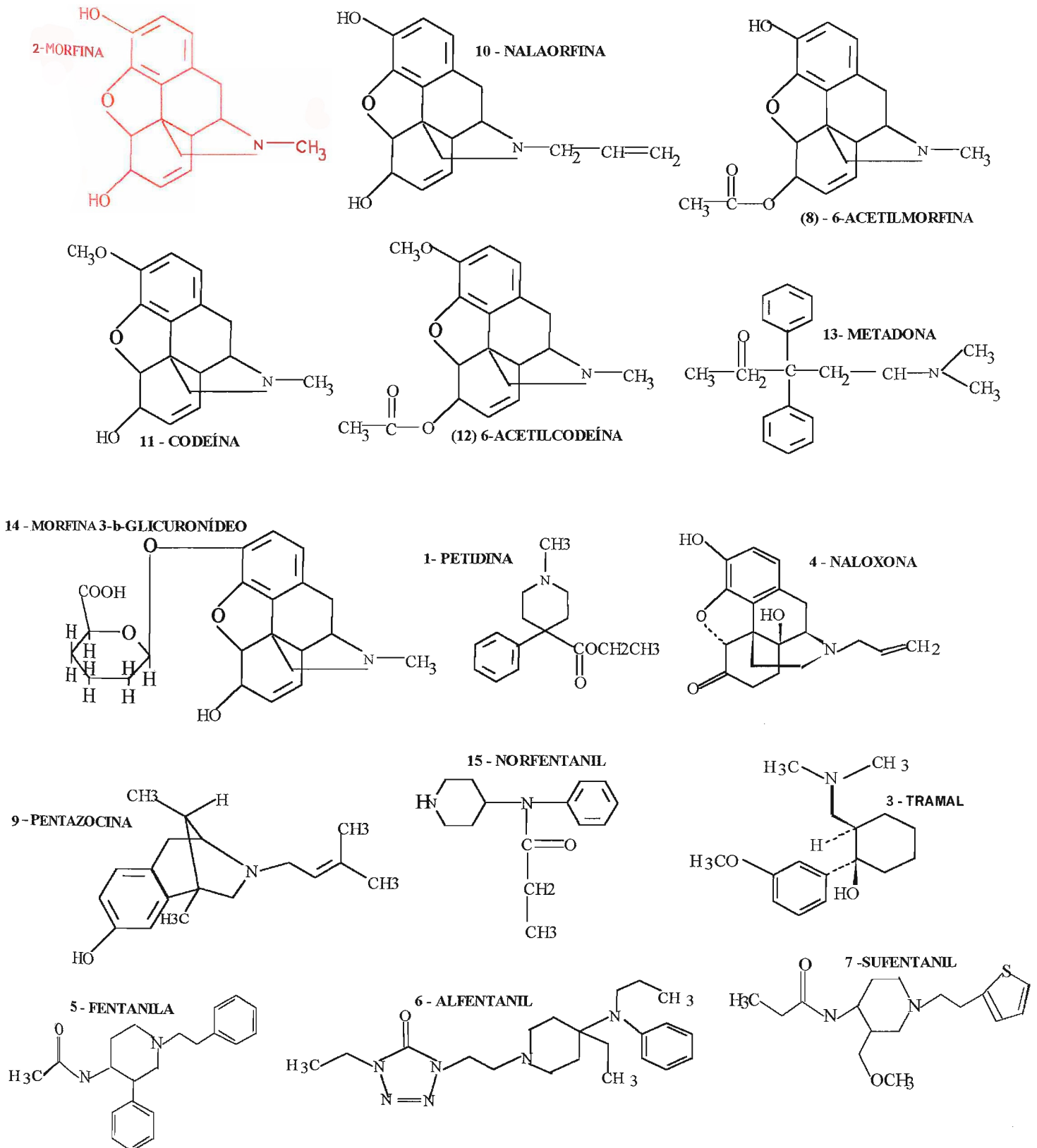


Figura 3.2 – Estruturas dos opióides que constituem a mistura de padrões mix B.

⇒ **Amostras de cabelo**

Amostras de cabelo da região do vértice posterior da cabeça, de um grupo de pacientes, do Grupo da Dor do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) foram selecionados para a realização deste estudo foram coletadas. Após a coleta, as amostras foram armazenados em saquinhos plásticos individuais, identificados através das iniciais dos nomes de cada indivíduo. Outros dados de identificação foram: idade, sexo e cor do cabelo. Antes do uso as amostras eram picotadas com o auxílio de um bisturi cirúrgico descartável sendo manipuladas sempre com o uso de luvas descartáveis.

Inicialmente foi feito um *pool* de cabelo com amostras dos diferentes indivíduos. Este pool foi utilizado na realização dos testes de extração (Capítulo 5).

⇒ **Condicionamento de capilares**

Colunas capilares novas, antes de serem utilizadas foram lavadas previamente com NaOH 1,0 mol/L por 25 min, água desionizada por 20 min e por último com o eletrólito de corrida por 25 min. Durante a realização das análises, a coluna capilar era lavada com o eletrólito de corrida por 3 min entre cada análise efetuada.

LCE

Laboratório de Cromatografia e Eletroforese Capilar

CAPÍTULO 4

4 - Estudo sistemático de composição de eletrólitos para separação de opióides via CE

4.1 - Mix A

O *mix A*, como foi descrito no capítulo 3, é constituído pelos principais opióides utilizados em clínica médica: petidina; morfina, tramal; naloxona; citrato de fentanila, alfentanil HCl e citrato de sufentanila 1 mg/L.

O estudo de separação desta mistura de padrões foi feito utilizando-se o modo FSCE.

4.1.2 - Condições experimentais utilizadas no estudo de otimização do mix A via FSCE

Na Tabela 4.1 são mostradas as condições experimentais utilizadas no estudo de otimização do *mix A*.

Tabela 4.1 – Variáveis experimentais e instrumentais utilizadas para a otimização da separação do *mix A*

	Detecção	capilar	eletrólito	injeção	tensão
Mix A 1 mg/L	200 nm	L _t = 47 cm e L _{efe} = 40 cm	TF* 10 a 20 mmol/L pH 2,5	1; 5 e 10 s/ 50mBAr	20 a 30 kV (intervalos de 5 kV)
				1; 5 e 10 s/ 5kV	

TF = tampão fosfato, preparação da solução conforme descrição no Capítulo 3

A melhor separação obtida para o *mix A* é ilustrada na Figura 4.1.

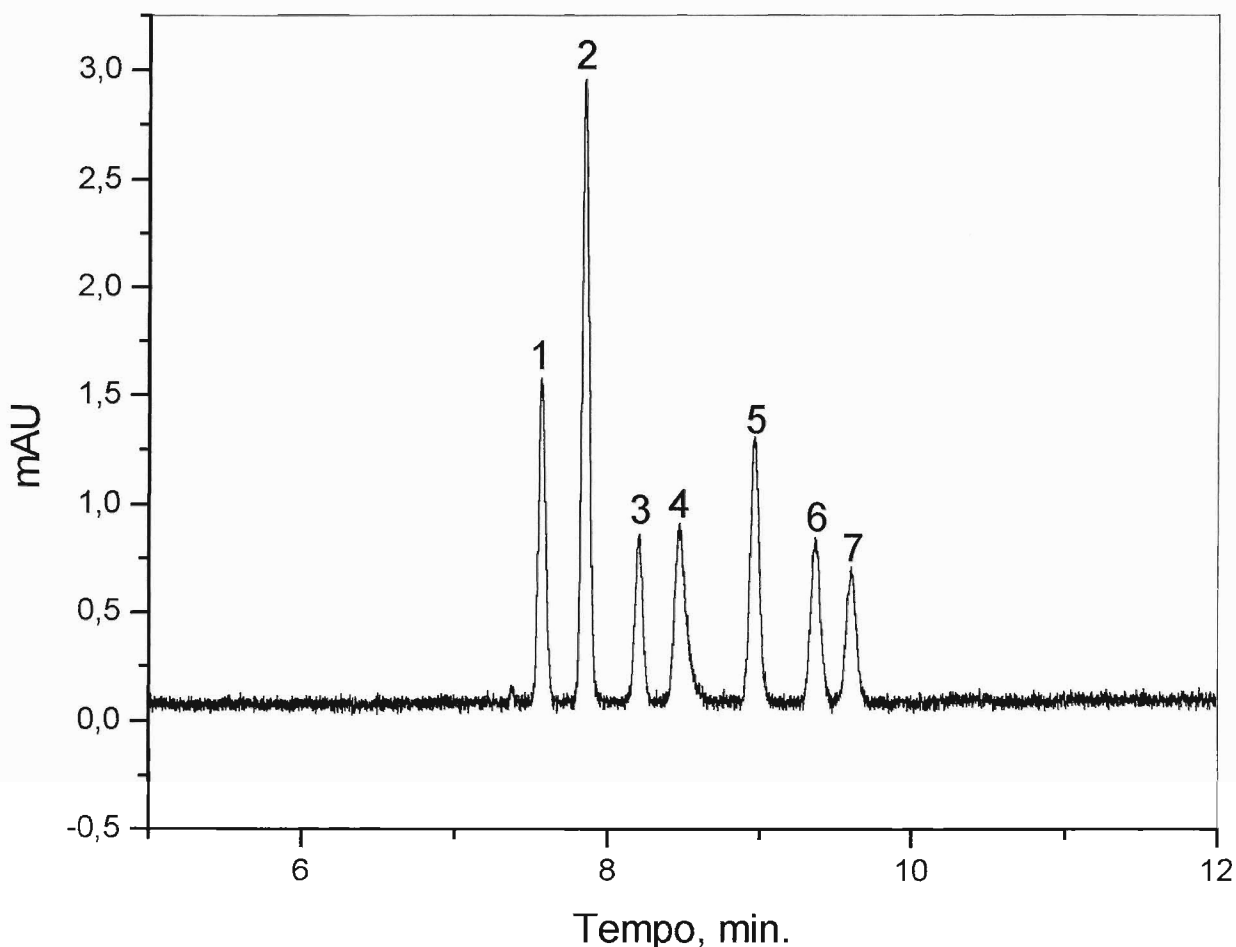


Figura 4.1 – Melhor separação obtida para o *mix A* 1 mg/L via CE. Condições de análise: FSCE utilizando TF 20 mmol/L, pH 2,5, inj. 5 s/5 kV, 25 kV durante a análise, 200 nm, 25 °C. Os picos referem-se a 1)petdina, 2)morfina, 3)tramal, 4) naloxona, 5) citrato de fentanila, 6)alfentanil HCl e 7)citrato de sufentanila.

Pode-se verificar através da Figura 4.1 que foi obtida a separação completa para os componentes do mix A na linha de base.

4.2 - Otimização da separação do mix B

O *mix B*, como foi descrito no capítulo 3, constitui uma mistura com 15 opióides entre eles os principais opióides utilizados em clínica médica (*mix A*), alguns antagonistas e os principais metabólitos da morfina, codeína e fentanil. As estruturas dos opióides que constituem esta mistura é mostrada na Figura 3.2. do Capítulo 3.

No estudo de separação do *mix B* foram utilizados 3 modos da CE: a MECK (cromatografia eletrocínética micelar); a FSCE (eletroforese capilar em solução livre) e a NACE (eletroforese capilar em meio não aquoso). Todos estes modos de separação foram abordados em detalhes no capítulo introdutório.

4.3 – Condições experimentais utilizadas no estudo de otimização do mix B via CE

Nas Tabelas 4.2, 4.3 e 4.4 são dadas as informações à respeito dos modos de CE explorados para a otimização da mistura de padrões *mix B*. Nesses estudos foi utilizada uma solução na concentração de 5 mg/L.

O procedimento de análise em meio não-aquoso proposto para a separação de padrões *mix B* foi feito com base em um trabalho encontrado na literatura onde é feita a separação de uma mistura constituída pelos seguintes fármacos: metadona; pentazocina; levofernal e dihidrocodeína.⁷⁴

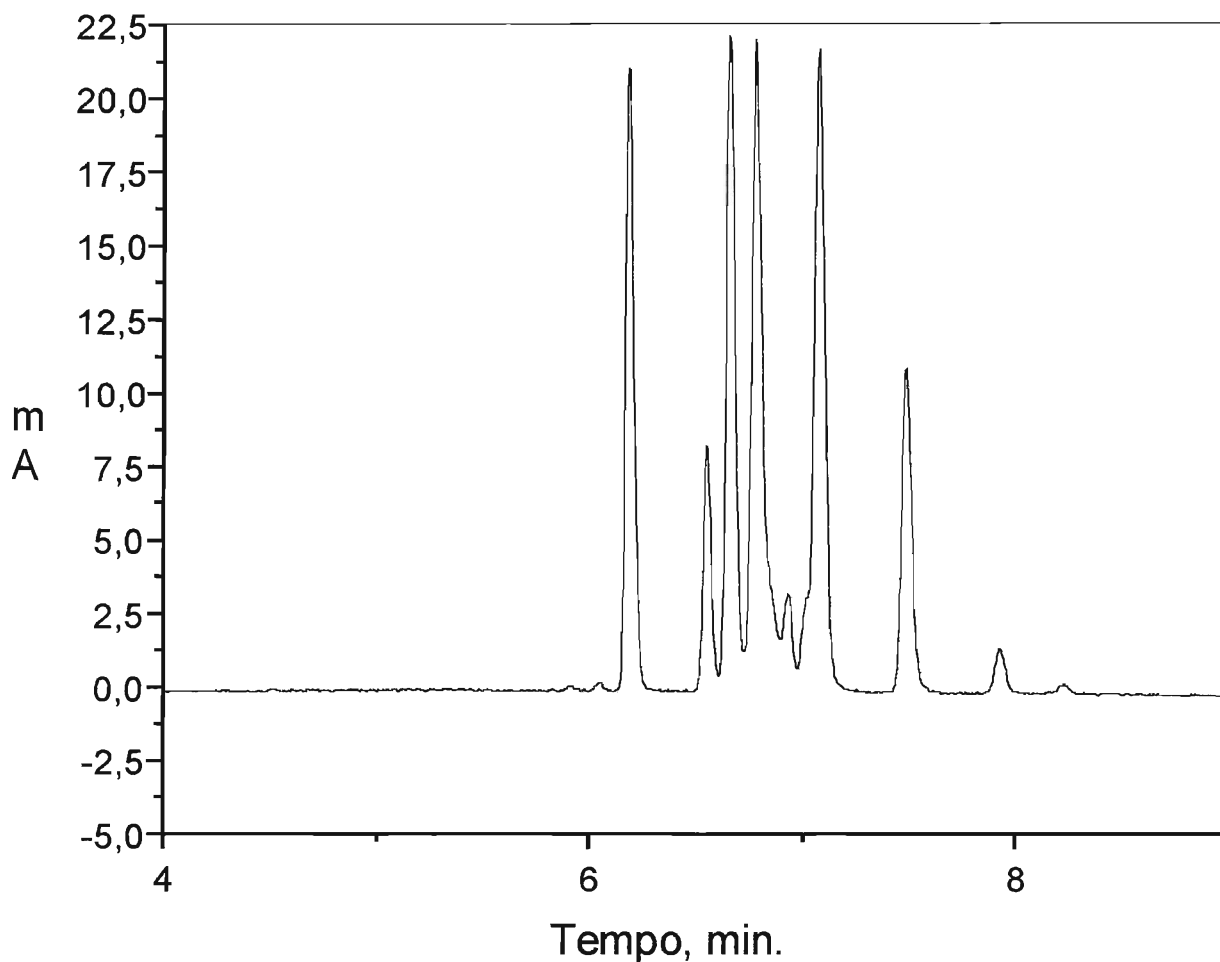
⁷⁴ S. P. Porras ; M. Jussila; K. Sinervo; M. – L. Riekkola; *Electrophoresis*, 20 (1999), 2150.

Tabela 4.2 – Variáveis analíticas e instrumentais exploradas para o estudo de separação do mix B no modo FSCE

Modo CE utilizado	Eletrólito (tampão; mmol/L)	Modo de injeção da amostra	Tensão aplicada durante a análise (kV)	Temperatura (°C) e comprimento de onda (nm)	Aditivos utilizados	Figura mostrando as condições de separação avaliadas
FSCE	100; pH 2,5	1 s/ 5 kV	25	25, 200	-	Figuras 4.2 a 4.6
		5 s/ 5 kV	25	20, 200	-	
		3 s/ 5 kV	27	20, 200	-	
"Stacking"	100; pH 2,5	10 s/ 50 mBar plug de H ₂ O e 5 s/ 5 kV amostra	27	20, 200	-	Figuras 4.2 a 4.6
FSCE-CD ²	100 < C _{TF} ¹ < 20	5 s/ 5 kV	20, 200	5% < MeOH ³ < 10%		
				5 % < ACN ⁴ < 10%		
					α-CD ⁵ ; β-CD; δ-CD	

1 – C_{TF} = concentração do tampão fosfato; 2 – FSCE-CD = CE em solução livre- ciclodextrina;
 3 - MeOH = metanol; 4 – ACN = acetonitrila; 5 – CD = Ciclodextrina

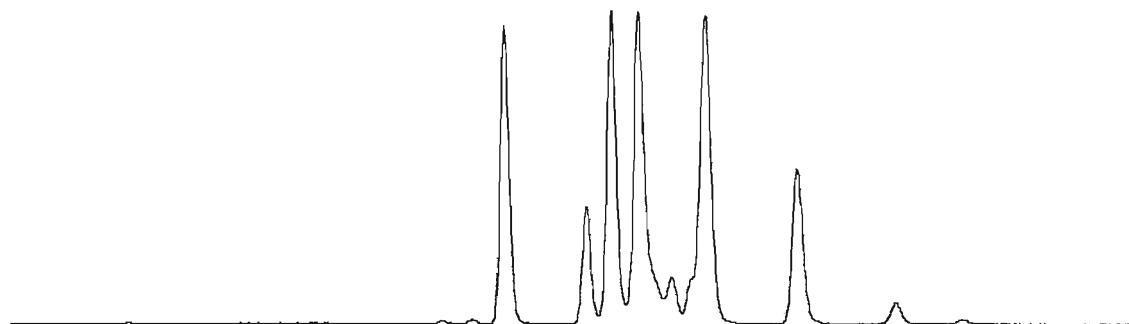
Nas Figuras 4.2 a 4.6 são mostrados eletroferogramas explorando algumas das condições experimentais mostradas na Tabela 4.2.



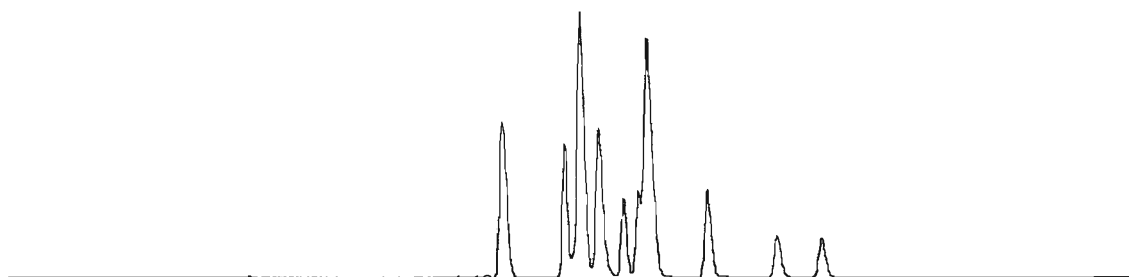
**Figura 4.2 - Eletroferograma obtido para o *mix B* via CE, modo FSCE.
Condições de análise: tampão fosfato 100 mmol/L, pH 2,5; inj. 5 s/5 kV; 25
kV durante a análise; 25°C, 200 nm.**

A Figura 4.2 mostra que não foi obtida uma boa separação para a mistura padrão mix B nas condições analíticas exploradas.

tampão fosfato 100 mmol/L, pH 2,5; inj 5seg/5kV; 25 kV, 25°C; 200 nm



tampão fosfato 100 mmol/L, pH 2,5+ 2% MeOH; inj. 5seg/5 kV, 25 kV, 25°C, 200 nm



4

6

8

Tempo, min.

Figura 4.3 – Eletroferogramas obtidos para o *mix B* comparando-se análises na presença e ausência Metanol (MeOH) no modo FSCE.

A Figura 4.3 mostra que com a adição de MeOH ao eletrólito de corrida há uma melhoria na resolução da separação.

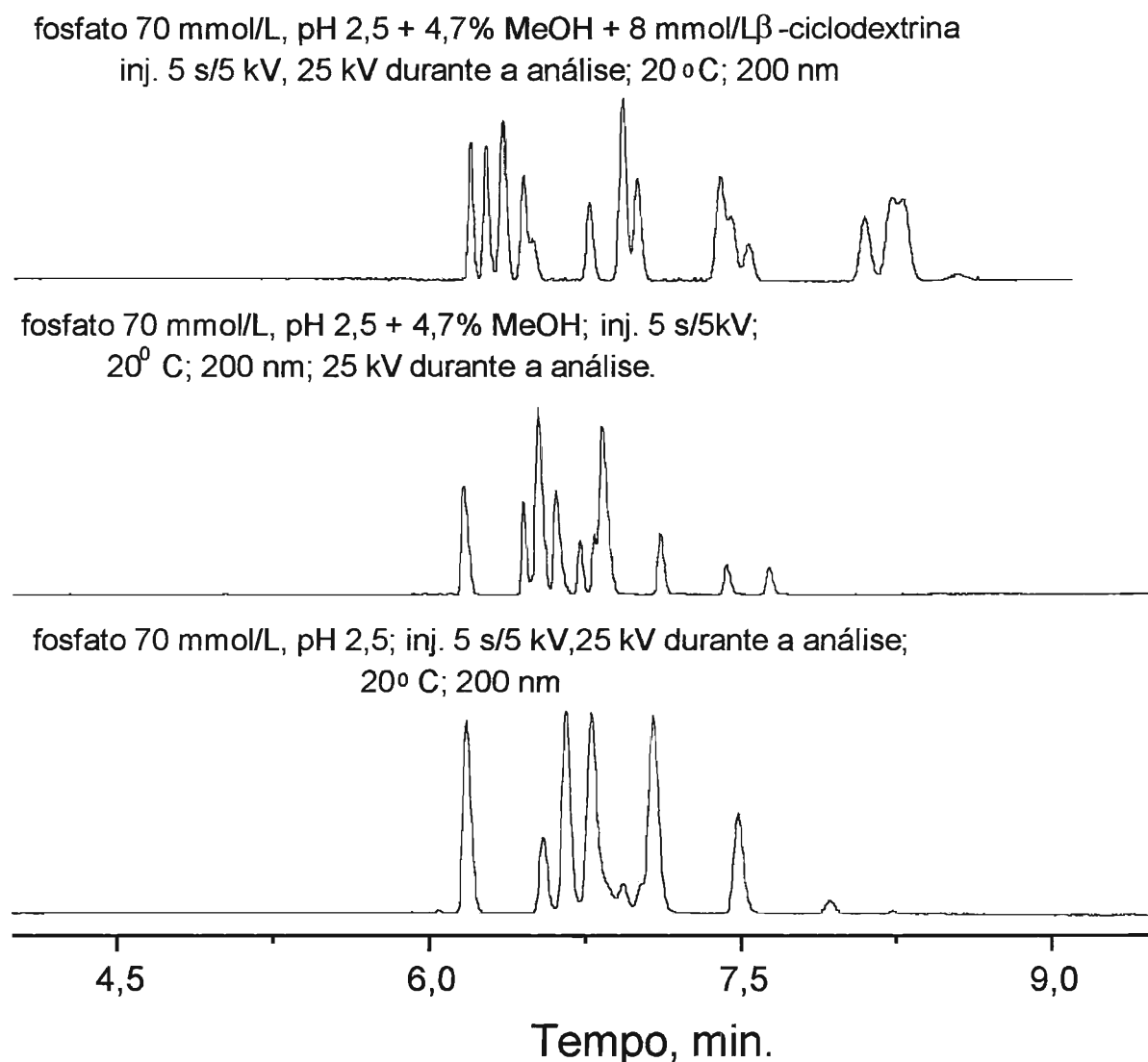


Figura 4.4 – Eletroferogramas obtidos para o *mix B* comparando-se análises feitas com eletrólitos utilizando diferentes aditivos orgânicos.

Observando-se a Figura 4.4 nota-se que com a introdução da β -ciclodextrina no eletrólito de corrida ocorre uma melhoria na seletividade da separação; em pH 2,5 o fluxo eletrosmótico é muito baixo, a ciclodextrina não tendo carga fica parada no capilar agindo como uma fase estacionária

Capítulo 4 - Estudo sistemático de composição de eletrólito para separação de opióides via CE

semelhante ao processo de partição que ocorre em HPLC (cromatografia líquida de alto desempenho) onde os componentes da amostra particionam entre a fase móvel e a estacionária e, conseqüentemente, ocorre a separação dos componentes que constituem a amostra.

Na Figura 4.5 são mostrados alguns eletroferogramas obtidos variando-se a concentração de eletrólito mantendo-se fixas as concentrações de β -ciclodextrina (8 mmol/L) e a porcentagem de metanol utilizada (4,7 %).

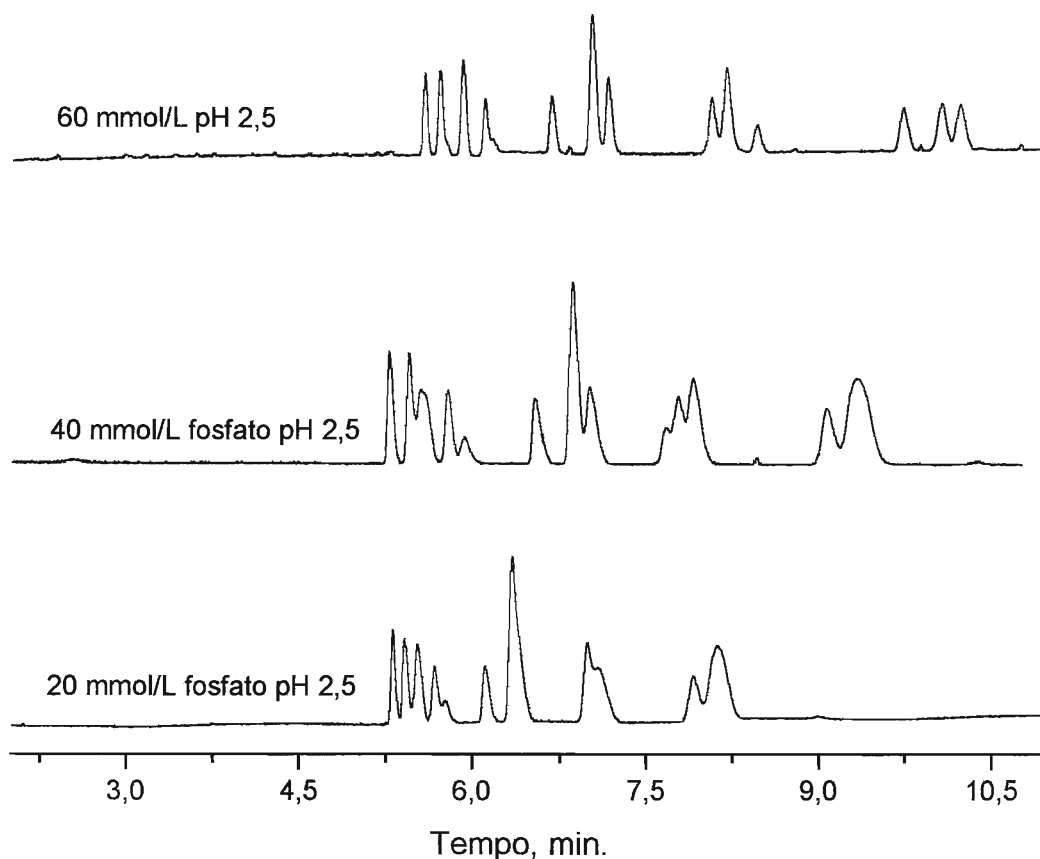


Figura 4.5 – Eletroferogramas obtidos para diferentes valores de concentração de eletrólito. Outras condições de análise: inj. 5 s/5 kV, 25 kV durante a corrida, $\lambda = 200$ nm, 20 °C de temperatura.

Capítulo 4 - Estudo sistemático de composição de eletrólito para separação de opióides via CE

A partir dos resultados mostrados na Figura 4.5 optou-se por fixar a concentração do eletrólito em 60 mmol/L; nesta faixa de concentração os picos estão um pouco melhor resolvidos. Na Figura 4.6 são mostrados os eletroferogramas obtidos variando-se a espécie de ciclodextrina utilizada.

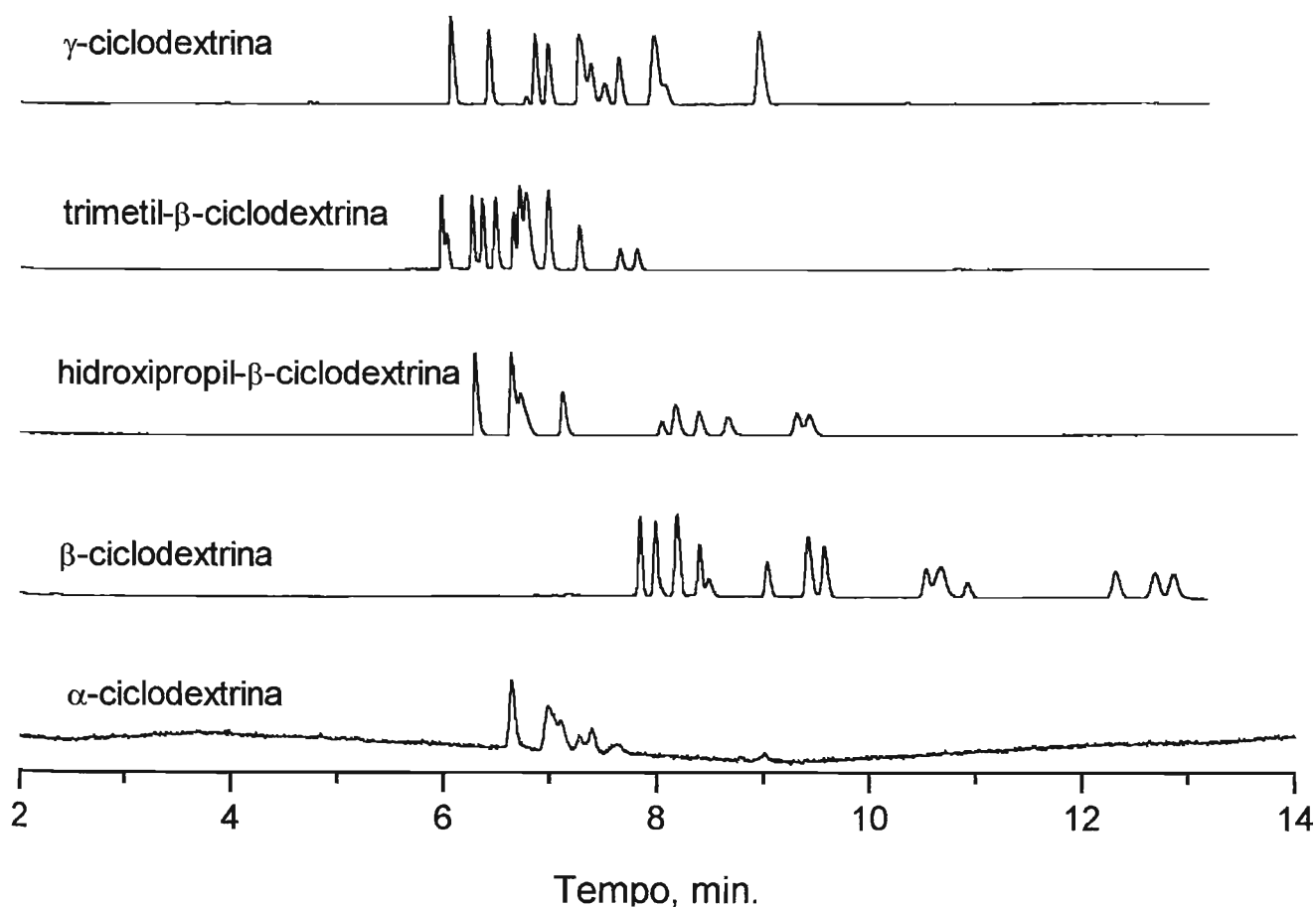


Figura 4.6 – Eletroferogramas obtidos variando-se a espécie de ciclodextrina. Outras condições de análise: 60 mmol/L tampão fosfato pH 2,5+ 4,7% Metanol, 25 kV durante a análise; inj. 5 s/5 kV; $\lambda = 200\text{nm}$ e 20°C de temperatura. As concentrações das CD utilizadas foi fixada em 8 mmol/L.

Capítulo 4 - Estudo sistemático de composição de eletrólito para separação de opióides via CE

Nas Tabelas 4.3 e 4.4 são mostradas as variáveis analíticas e instrumentais avaliadas nos modos MEKC e NACE no estudo de otimização da separação do mix B. E também, são mostrados alguns dos eletroferogramas obtidos para algumas das condições avaliadas.

Tabela 4.3 - Variáveis instrumentais e analíticas exploradas para o estudo de otimização da separação do mix B no modo MEKC

Eletrólito (tampão)	Modo de injeção da amostra	Tensão aplicada durante a análise (kV)	Temperatura (°C) e comprimento de onda (nm)	Aditivos utilizados	Figura exemplificando a melhor condição de separação obtida
Tetraborato de sódio, pH 9 15 mmol/L	1,5 s/ 50 mBar	25	25, 200	α -CD ³ , β - CD, dimetil e trimetil β - CD e δ -CD MeOH ¹ e ACN ²	Figura 4.7
		27			
Tetraborato de sódio, pH 9 20 mmol/L	2 s/ 50 mBar	25			
		27			

1 - MeOH = metanol; 2 - ACN = acetonitrila; 3 - CD = Ciclodextrina

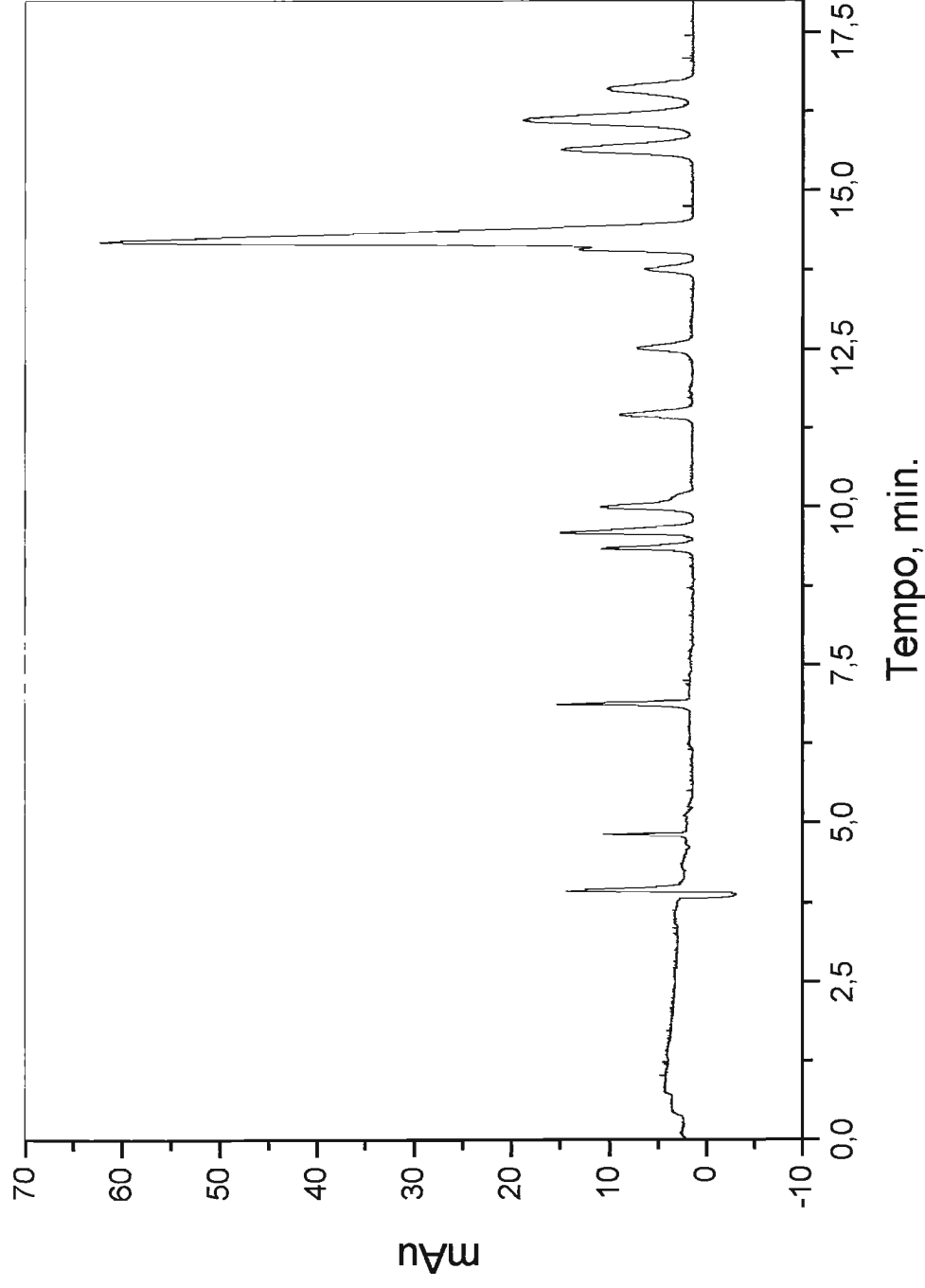


Figura 4.7 – Separação MEKC obtida para o mix B utilizando tampão TBS 15 mmol/L + 40 mmol/L SDS + 11,5 mmol/L de β -CD, injeção 1,5 s/50 mBar; 25 kV durante a corrida; 25°C de temperatura e detecção em 200 nm.

Tabela 4.4 – Variáveis instrumentais e analíticas exploradas para o estudo de otimização do mix B através do modo NACE

Eletrólito (tampão)	Modo de injeção da amostra	Tensão aplicada durante a análise (kV)	Temperatura (°C) e comprimento de onda (nm)	Figura mostrando a melhor condição de separação obtida
1 mol ácido acético+25 mmol/L de acetato de amônio+MeOH:ACN (1:1, v/v)	1 s/ 50 mBar	25	25, 200	Figura 4.8 A e B
SDS 20 mmol/L+10mmol/L HClO ₄ +MeOH:ACN* (1:1, v/v)				

* MeOH = Metanol e ACN = acetonitrila

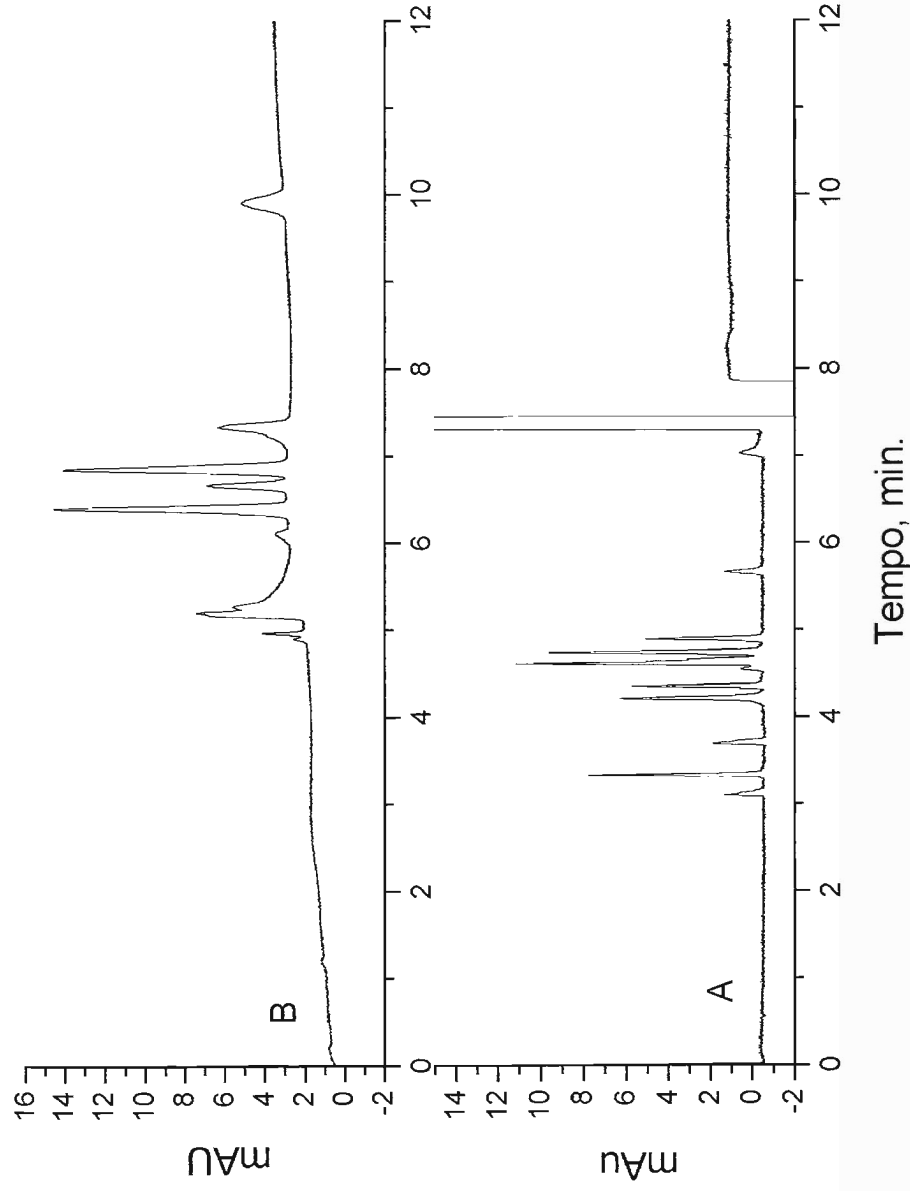


Figura 4.8 – Separações NACE obtidas para o mix B de padrões de opióides. Condições analíticas: (A) tampão 1 mol/L ácido acético + 25 mmol/L de acetato de amônio + MeOH:ACN (1:1, v/v); injeção 1 s/50 mBar; 25 kV durante a corrida; 25°C e detecção em 200 nm. (B) tampão SDS 20 mmol/L + 10 mmol/L HClO₄ + MeOH:ACN (1:1, v/v); injeção 1 s/50 mBar; 25 kV durante a corrida; 25°C e detecção em 200 nm.

Capítulo 4 - Estudo sistemático de composição de eletrólito para separação de opióides via CE

Entre todas as condições de separação avaliadas para a mistura de padrões mix B a melhor condição de análise obtida é ilustrada pela Figura 4.9, mostrada a seguir, utilizando como eletrólito de corrida tampão fosfato 60 mmol/L + 8 mmol/L β -CD + 4 % de MeOH (modo FSCE-CD); não foi possível a resolução na linha de base para todos os picos da mistura de padrões mix B porém, foi possível a identificação de todos os componentes desta mistura de padrões.

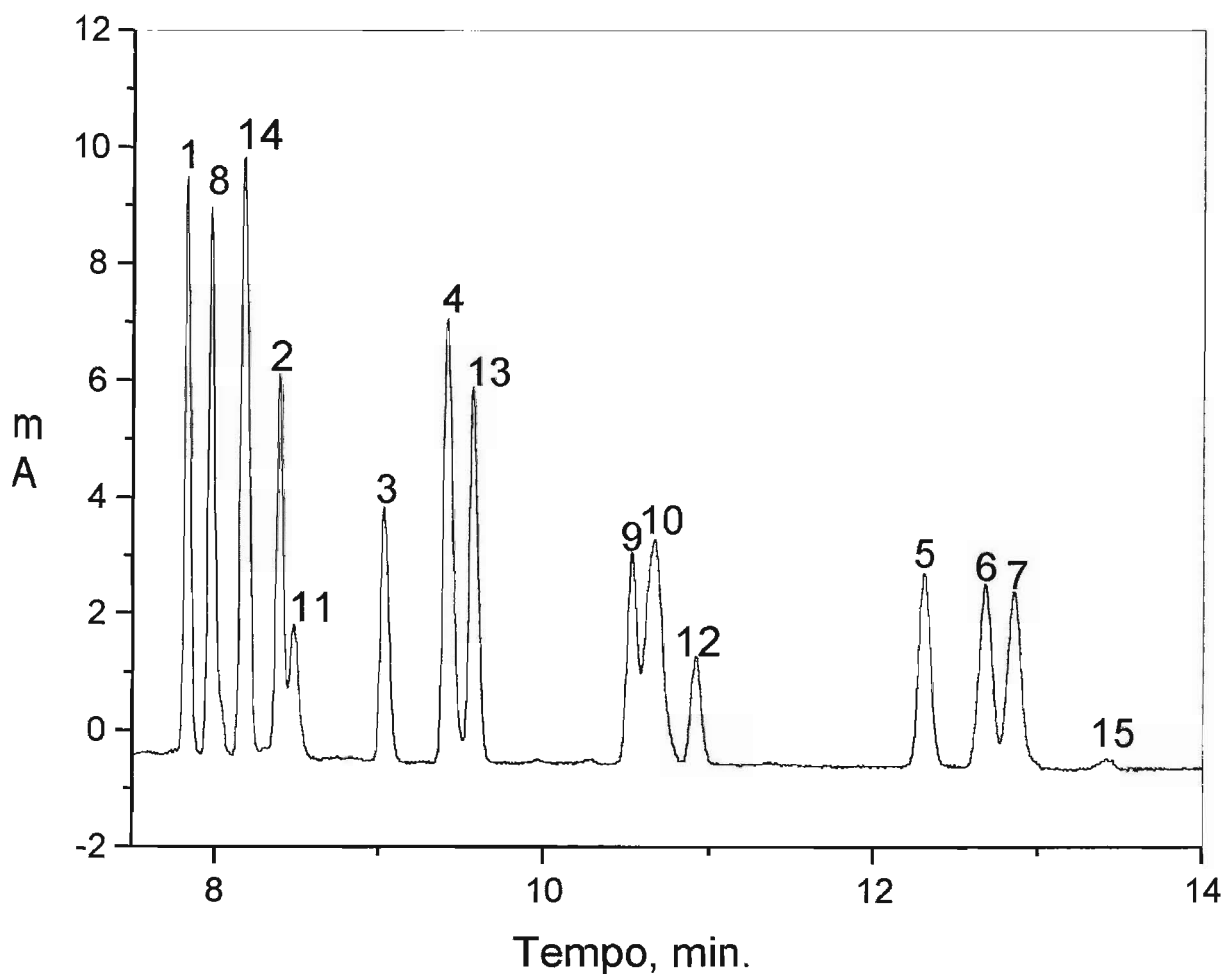


Figura 4.9 – Melhor condição de análise obtida para o mix B utilizando-se como eletrólito tampão fosfato 60 mmol/L, pH 2,5 + 8 mmol/L β -ciclodextrina+4% de Metanol; inj. 5 s/10KV. 30 kV durante a análise, 200 nm e 20°C de temperatura. Os picos referem-se a: 1) petidina, 2) morfina, 3) Tramal, 4) naloxona, 5) citrato de fentanila, 6) alfentanil HCl, 7) citrato de sufentanila, 8) 6-acetilmorfina, 9) pentazocina, 10) nalorfina, 11) codeína, 12) 6-acetilcodeína, 13) metadona, 14) morfina-3 β -D- glicuronídeo, 15) norfentanil

4.4 – Conclusões

- A separação da mistura de padrões mix A que é constituída pelos principais opióides utilizados em clínica médica foi feita utilizando-se o modo de eletroforese capilar em solução livre nas seguintes condições analíticas: eletrólito de corrida TF 20 mmol/L, pH 2,5, inj. 5 seg/5 kV, 25 kV durante a análise, 200 nm, 25°C com resolução na linha de base para todos os picos desta mistura padrão (Figura 4.1).
- A separação do mix B que é constituído por 15 padrões de opióides foi realizada utilizando-se o modo FSCE-CD nas seguintes condições analíticas: eletrólito de corrida tampão fosfato 60 mmol/L, pH 2,5 + 8 mmol/L β -ciclodextrina+4% de Metanol; inj. 5 s/10KV. 30 kV durante a análise, 200 nm e 20°C de temperatura não foi possível a resolução na linha de base para todos os constituintes desta mistura padrão porém foi possível a identificação de todos os picos (Figura 4.9).

L/CE

Laboratório de Cromatografia e Eletroforese Capilar

CAPÍTULO 5

5 – Estudo de metodologias de extração para a determinação de opióides em cabelo para determinação via FSCE

5.1 – Introdução

Na maioria dos trabalhos encontrados em literatura sobre a determinação de opióides em cabelo, as etapas de extração envolvem procedimentos complexos de reações de derivatização para posterior análise por GCMS (espectroscopia de massas acoplada à cromatografia gasosa).⁷⁵ Porém tais procedimentos de análise algumas vezes podem promover reações de hidrólise que levam à formação de outras formas da droga a ser analisada e que não são do interesse da análise.⁷⁵ Além disso, um bom método de digestão e extração de amostra deve apresentar uma boa relação custo/benefício. Portanto a escolha do processo de digestão/extração de amostra é uma etapa crucial para a determinação de traços de opióides em cabelo.

Os métodos geralmente usados para a extração de um componente de uma matriz são os seguintes:

- Extração líquido-líquido (LLE);
- Extração em fase sólida (SPE);
- Microextração em fase sólida (SPME);
- Extração com fluido super crítico (SFE).

A aplicabilidade destas metodologias muitas vezes limita-se à natureza química e física da matriz de interesse e do método instrumental com o qual pretende-se efetuar tais análises. Além disso, algumas vezes se faz necessário

⁷⁵ S. Pichini; I. Altieri; M. Pelegrini; R. Pacifici, P. Zuccaro, V. Furnari; C. Furnari; *Annual Meeting of International Association of Forensic Toxicologists*, 35, Padova, 1997, Proceedings, Padova, University of Padova, 1997, 665.

também um processo de *clean-up* do analito a fim de se eliminar possíveis contaminantes e melhorar o desempenho da análise.

Os procedimentos de extração citados anteriormente assim como quais são as vantagens que estes métodos podem oferecer para o uso em eletroforese capilar e, serão abordados nos próximos tópicos. Além disso, estas técnicas de extração de amostra podem também auxiliar no aumento de sensibilidade (limite de detecção) de traços de analitos em diversas matrizes entre as quais destaca-se a determinação de drogas em cabelo.

5.2 – Estratégias para aumento de sensibilidade em eletroforese capilar (CE) visando a determinação de traços de analitos

Em eletroforese capilar de zona (CZE), analitos catiônicos e aniônicos podem ser separados devido às suas diferenças de carga e tamanho e subseqüentemente medidas *on-column* com detecção UV. Comparado-se a CZE com as técnicas cromatográficas tradicionais, a CZE apresenta-se como uma técnica alternativa de separação, propiciando análises mais rápidas que na cromatografia, com uma boa eficiência e com baixo consumo de reagentes assim como de solventes. Com base nessas vantagens, a CZE vem sendo utilizada em diferentes aplicações incluindo-se as seguintes áreas: farmacêutica, bioquímica, agroquímica, em análise de água, de resíduos de diferentes espécies em gama variada de amostras (alimentos, tecidos e fluidos biológicos etc.); tensoativos e química fina.⁷⁶

Infelizmente, a CZE apresenta altos limites de detecção devido aos volumes de amostras injetados que são limitados (nL) e devido ao uso da

⁷⁶ K. D. Altria, S. M. Bryant, *LC-CG*, 15 (1997), 448.

detecção UV que é feita diretamente no capilar em uma janela de detecção de dimensões restritas e diminutas. Por isso, para a aplicação da CZE na análise de traços, a quantidade de analito ou a janela de detecção do sistema precisa ser aumentada. O último aspecto pode ser implementado através do uso de “extensores de caminho óptico” em conexão com o sistema de detecção UV, ou alternativamente através do uso da detecção de fluorescência por laser induzido (LIF).⁷⁷ Em ambos os casos, celas bolha ou celas em Z têm sido utilizadas como recursos visando o aumento da janela de detecção para os sistemas de detecção UV; porém o uso destes artifícios promove um aumento da relação sinal-ruído por um fator de 3-6 vezes. A sensibilidade do detector pode ser teoricamente aumentada com o uso da cela em Z, porém pode apresentar resultados com baixa resolução. O uso de recursos que visam aumentar o tamanho da janela de detecção em eletroforese capilar muitas vezes não promovem aumentos substanciais na sensibilidade do sistema. O uso da detecção por LIF, uma sensibilidade extremamente alta de massa tem sido descrita pela literatura, porém os sistemas de detecção LIF somente são aplicáveis a poucos analitos assim como os comprimentos de onda disponíveis nos sistemas comerciais por detecção LIF são ainda limitados.

Outra alternativa para se promover o aumento da quantidade de analito injetada no capilar é conseguida com a *focalização do analito* no capilar durante a análise. Este último conceito envolve o *stacking* do analito, que pode ser feito quando um *plug* de amostra é colocado (“sanduichado”) entre dois eletrólitos o líder e o terminador (técnica esta denominada isotacoforese⁷⁸). Outra situação de focalização acontece quando a amostra possui

⁷⁷ G. Hempel, *Electrophoresis*, 21 (2000), 691.

⁷⁸ P. Gebauer, W. Thormann, P. Bacek, *J. Chromatogr.*, 608 (1992), 17.

condutividade mais baixa que o eletrólito de corrida (técnica denominada campo amplificado^{79,80}). Com o uso destas estratégias os limites de detecção podem ser grandemente diminuídos, porém o uso das técnicas de *stacking* de amostra em análises de rotina pode apresentar sérias limitações de ordem prática. Na isotacoforese as dificuldades começam na seleção adequada dos eletrólitos apropriados para ocorrer o *stacking* e a separação dos analitos. Já no caso do campo amplificado as dificuldades se encontram na dependência da resistência de massa que depende da condutividade da amostra.

Para se superar os problemas encontrados quando se pretende aumentar a sensibilidade, uma das saídas mais práticas está na preparação da amostra. Neste contexto muitas técnicas de extração têm sido utilizadas conjuntamente com a CZE, incluindo: extração em fase sólida (SPE), microextração em fase sólida (SPME), microdiálise, pré-concentração *on-line* através do uso de fases estacionárias empacotadas dentro do capilar e a extração líquido-líquido (LLE) a fim de se obter aumentos de sensibilidade.

5.3 - Enriquecimento e clean-up de analito por extração líquido-líquido (LLE): algumas considerações para uso em CZE

Em LLE, constituintes hidrofóbicos da amostra são extraídos da fase aquosa com solventes orgânicos imiscíveis em água. Vários solventes orgânicos voláteis são usados, incluindo pentano, hexano, éter etílico, acetato de etila, clorofórmio e cloreto de metileno (diclorometano). Para um analito *i*, o processo de extração pode ser ilustrado pela equação:

⁷⁹ R. L. Chien, D. S. Burgi, *Anal. Chem.*, 64 (1992), 489A.

⁸⁰ S. H. Chen, Y. H. Chen, *Electrophoresis*, 20 (1999), 831.

$$i_{amostra} \rightleftharpoons i_{fase\ org\ anica} \quad [11]$$

onde o índice subscrito *amostra* representa a solução da amostra e o subscrito *fase orgânica* representa o solvente orgânico utilizados para a extração. Em equilíbrio, o coeficiente de partição para o analito *i* (K_i) em um sistema de duas fases é:

$$K_i = \frac{C_{i, fase\ org\ anica}}{C_{i, amostra}} \quad [12]$$

onde $C_{i, fase\ org\ anica}$ é a concentração de equilíbrio do analito (*i*) no solvente de extração e $C_{i, amostra}$ é a concentração de equilíbrio do analito (*i*) na fase da amostra.

Para uma extração LLE ser bem sucedida, o analito deve ser extraído quantitativamente da amostra pela fase orgânica, a eficiência de extração ou recuperação [$E_E = \text{quantidade extraída de } i / \text{quantidade original de } i \text{ na amostra} \times 100 \%$] que deve ser da ordem de 100 %. A eficiência de extração é relacionada a ambos os coeficientes de partição (K_i) e o volume do solvente orgânico utilizado para a extração ($V_{fase\ org\ anica}$):

$$E_E = \frac{1}{\left[\left(\frac{V_{amostra}}{k_i V_{fase\ org\ anica}} \right) + 1 \right]} \quad [13]$$

onde $V_{amostra}$ é o volume da amostra. De acordo com o que está ilustrado na Tabela 5.1, extrações com alta eficiência podem ser obtidos em geral utilizando

grandes volumes de solvente orgânico relativamente ao volume de amostra a ser extraído.

Tabela 5.1 – Coeficientes de extração (E_E) como função da relação de volumes amostra/solvente de extração ($V_{sample}/V_{amostra}$) e o coeficiente de extração (k_i)

Relação de volumes ($V_{sample}/V_{fase\ orgânica}$)	Coeficiente de extração (E_E)				
	$K_i = 1$	$K_i = 10$	$K_i = 100$	$K_i = 1000$	$K_i = 10000$
100	0,99	9,1	50	91	99
10	9,1	50	91	99	99,9
1	50	91	99	99,9	99,99
0,1	91	99	99,9	99,99	99,999
0,01	99	99,9	99,99	99,999	99,9999

Compostos com alto coeficiente de partição podem ser extraídos efetivamente com altos valores para a relação $V_{amostra}/V_{fase\ orgânica}$, o volume de solvente orgânico é normalmente comparável ou pouco excede o volume da amostra para reações de handabilidade ou para acelerar o processo da LLE. Para os compostos que são usualmente analisados por CZE, que podem ser ácidos ou básicos, o ajuste de pH é de alta importância para assegurar que altos valores de coeficiente de partição sejam conseguidos. Por isso, antes de se fazer uma LLE de compostos básicos, o pH da amostra deve ser ajustado dentro de um intervalo alcalino, enquanto que LLE de compostos ácidos deve feita em pH baixo. Na forma desionizada, ácidos hidrofóbicos ou bases são facilmente extraídos na fase orgânica imiscível em água. Em contraste, quanto mais hidrofílicos são os compostos, mais baixos são os coeficientes de partição encontrados para suas formas deionizadas. Nestes casos, extrações de par-

iônico serão requeridas para se aumentar a eficiência de extração⁸¹; ou alternativamente, LLE pode ser realizada com altos valores para a relação $V_{\text{fase orgânica}}/V_{\text{amostra}}$. Para altos valores de coeficientes de extração (E_E) como já foi discutido anteriormente, em um procedimento LLE bem sucedido a etapa de pré-concentração torna possível que altas concentrações de analito sejam determinadas pela CZE (é o chamado *fator de enriquecimento*). Normalmente, o extrato (fase orgânica) é evaporado até a secura e o resíduo é reconstituído em um pequeno volume para alcançar um alto fator de enriquecimento. Devido a razões práticas o volume de reconstituição é normalmente de 50 a 500 μL . Por isso quando o volume de amostra é limitado, isto é, 1,0 mL, o fator de enriquecimento máximo teórico é da ordem de 2 a 20 (com 100 % de eficiência de extração). Esta limitação é freqüente no caso de amostras biológicas (especialmente para plasma), onde substancialmente altos enriquecimentos de analitos (> 20) podem ser obtidos em casos onde grandes volumes de amostra são disponíveis.

Além disso, no enriquecimento de analito, a LLE propicia o *clean-up* da amostra. Sais inorgânicos são normalmente insolúveis nos solventes orgânicos utilizados em LLE e, conseqüentemente eles são retidos preferencialmente na fase aquosa da amostra. Para amostras de plasma, proteínas podem afetar a análise porque são facilmente adsorvidos na superfície do capilar na CZE, porém as proteínas são também quase insolúveis nos solventes orgânicos usados em LLE. Todavia a LLE promove excelente *clean-up* para sais e macromoléculas biológicas, um grande número de outros compostos podem ser co-extraídos durante a LLE. Como está ilustrado na

⁸¹ J. Z. Song; H. F. Chen; S. J. Tian; Z. P. Sun; *J. Chromatogr. B*, 708 (1998), 277.

Capítulo 5 - Estudo de metodologias de extração

Tabela 5.1, matrizes com componentes iguais podem com uma relação de coeficientes baixa pode ser extraída durante as condições normais de LLE com

$$V_{\text{fase orgânica}} \geq V_{\text{amostra}}$$

5.3.1 - Algumas considerações sobre a solução a ser injetada

Os solventes orgânicos utilizados para a LLE, que são imiscíveis em água, não são injetáveis em CZE. Por isso, a LLE para CZE inclui a evaporação do solvente orgânico. A reconstituição deverá ser feita com um solvente que seja miscível com o tampão de separação e que gere condições de corrente estáveis durante a CZE. Para se obter um alto enriquecimento de analito, a reconstituição deverá ser feita com pequenos volumes de solvente de 50 a 500 μL . O ideal é fazer esta reconstituição em água pura. Esta solução se misturará facilmente com o tampão de corrida e propiciará a formação de um excelente meio para a aplicação da técnica de campo amplificado da amostra. Todavia, muitos dos analitos que são extraídos por LLE e analisados via CZE apresentam baixa solubilidade em água pura; a sua reconstituição é normalmente realizada em um tampão aquoso ou em uma mistura de água e solvente orgânico. Em alguns casos, dependendo do tipo de reconstituição, atenção deve ser dada à força iônica do tampão, porque a alta condutividade do meio de injeção pode causar deterioração dos picos. Para a reconstituição de misturas de água e solventes orgânicos polares a acetonitrila é o solvente mais utilizado, pois permite uma boa solubilidade e uma condutância elétrica compatível com a da água. Tipicamente, misturas 1:1 (v/v) de água e acetonitrila são utilizadas, algumas vezes, quantidades maiores de acetonitrila podem ser usadas para a reconstituição e analitos hidrofóbicos. Infelizmente, a injeção de solventes puros na CZE em meio aquoso pode vir a causar flutuações na corrente de separação em CZE. Uma solução para este problema pode ser o uso da CZE em meio não-aquoso (NACE), onde a amostra poderá ser reconstituída com o mesmo solvente orgânico utilizado no

eletrólito de corrida. O uso da NACE pode ser uma opção interessante NACE, pois propicia diferenças de seletividade quando comparada com a CZE.

Do ponto de vista prático, a etapa de evaporação em LLE é enfadonha, e perdas do analito poderão acontecer devido à adsorção nas paredes do recipiente ou devido à evaporação parcial. Estes são naturalmente os inconvenientes da LLE para a CZE. Porém, por outro lado, a LLE promove um excelente *clean-up* para diferentes tipos de matrizes. A remoção de sais das matrizes ocorre automaticamente durante a LLE porque a maioria dos sais é insolúvel nos solventes orgânicos utilizados para as extrações. Por isso, os extratos resultantes da LLE constituem um excelente meio para a prática de estratégias de aumento de sensibilidade durante a injeção da amostra.

5.4 – Extração em fase sólida (SPE)

A extração em fase sólida, (do inglês solid phase extraction, SPE), é uma técnica de preparação de amostra, mais eficiente que a extração líquido-líquido resultando em extrações mais quantitativas que são mais facilmente realizadas podendo ainda ser automatizadas. O uso de solventes e o tempo de trabalho em laboratório podem ser significativamente diminuídos.

O SPE é mais utilizado para preparar amostras líquidas e extratos semi-voláteis e não voláteis de analitos, por isso também pode ser utilizada com amostras sólidas, cujos componentes são pré-extraídos com solventes. Além disso, propiciam uma boa extração de amostra, concentração e *clean-up*. Os extratores SPE são encontrados numa grande variedade de materiais químicos com diferentes tipos de adsorventes e tamanhos. É importante saber escolher o produto mais adequado para cada tipo de amostra.

5.4.1 - Extração em fase sólida de drogas em fluidos biológicos

Materiais biológicos, como urina, sangue, soro e cabelo são matrizes muito complexas que possuem em suas estruturas proteínas, sais, ácidos, bases e diferentes outros tipos de compostos orgânicos com propriedades químicas similares à dos analitos de interesse. Além disso, entre as diferentes classes de drogas; como benzodiazepínicos, opióides, barbitúricos, possuem uma variedade de grupamentos ácido-base e grupos funcionais que podem vir a afetar fortemente a solubilidade ou afinidade de acordo com o sorbente utilizado. Por isso, geralmente os métodos de extração propostos para matrizes biológicas são muito complexos. Para matrizes biológicas, extrações seletivas de drogas podem ser obtidas utilizando-se cartuchos SPE.⁸² Os princípios de operação utilizados para uma extração SPE são descritos no próximo tópico.

5.4.2 - Procedimentos de análise com os cartuchos SPE

As colunas ou cartuchos SPE são feitos de polipropileno ou vidro com volumes que variam de 1 a 20 mL, contendo de 100 a 1000 mg de material adsorvente (fase estacionária). Na Figura 5.1 é mostrado um cartucho spe.

⁸² R. Majors; D. Raynie, *LC-GC*, 15 (1997), 1106.

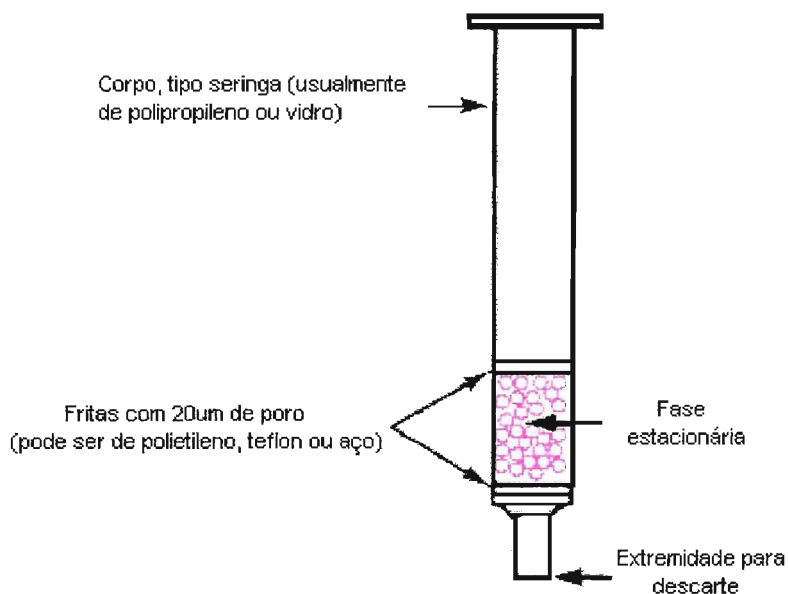


Figura 5.1 – Representação esquemática de um cartucho spe

5.5 - Como os compostos são retidos na fase estacionária?

Os analitos de interesse são retidos na fase estacionária conforme é descrito na Tabela 5.2:

Tabela 5.2 – Processo de retenção dos analitos

1) Fase Reversa (fase móvel polar, fase estacionária não polar)

Interações hidrofóbicas do tipo:

- não-polar/não-polar
- van der Waals ou forças de dispersão

2) Fase Normal (fase móvel não-polar, fase estacionária polar)

Interações do tipo hidrofílicas

- polar/polar
- pontes de hidrogênio
- $\pi - \pi$
- dipolo-dipolo

- dipolo induzido/dipolo

3) Troca Iônica

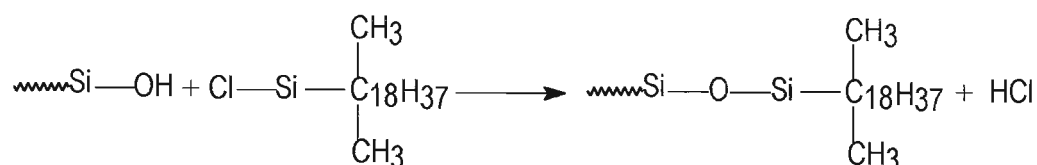
Atrações eletrostáticas dos grupos carregados do analito com os grupos carregados da superfície do material da fase estacionária.

4) Adsorção

Interações do tipo hidrofóbicas-hidrofílicas podem ser exploradas e dependem da natureza química da fase estacionária

5.5.1- SPE – Fase Reversa

Separações (ou extrações) em fase reversa envolvem um solvente polar (geralmente aquoso) ou moderadamente polar (fase móvel) e uma fase estacionária não-polar. O analito de interesse é moderadamente não-polar. Vários dos materiais que constituem a fase reversa são sílicas do tipo alquil ou aril (como por exemplo, C₁₈, C₈). Os grupos silanóis hidrofílicos que constituem a superfície da sílica (geralmente com tamanho de poro de 60 Å com partículas de 40 μm de tamanho) são modificados quimicamente com grupamentos funcionais de natureza hidrofóbica, como os grupos alquil e aril, conforme a seguinte reação:



A retenção dos analitos orgânicos da solução polar na fase estacionária é devido primeiramente às forças de interação entre as ligações carbono-

hidrogênio do analito e os grupos funcionais da superfície da sílica. Estas interações não-polar/não-polar envolvem interações do tipo forças de van der Waals. Para eluir o analito que ficou retido na fase estacionária deve-se usar um solvente não-polar, que quebra as ligações feitas entre a fase estacionária e o analito de interesse.

5.5.2 - SPE – Fase Normal

Separações (ou extrações) em fase normal envolvem um solvente polar à moderadamente não-polar (fase móvel) e uma fase estacionária polar. Sílicas não substituídas ou modificadas (ciano, amino e diol) além de alumina e florissil são tipicamente utilizados sob condições de fase normal de eluição. A retenção de um analito em fase normal é devido às interações entre os grupos funcionais polares do analito com os grupos polares da fase estacionária. Estas interações incluem pontes de hidrogênio, interações do tipo $\pi - \pi$, dipolo-dipolo e dipolo induzido-dipolo entre outros. Um composto adsorvido através destes mecanismos é eluído com um solvente mais polar que o solvente original da matriz.

As sílicas com grupamentos amino, ciano e diol possuem grupamentos alquil na geometria “cadeira” que estão ligados aos grupamentos funcionais polares da superfície da sílica. Estas sílicas, devido a estes grupamentos funcionais são muito mais hidrofílicas do que as sílicas utilizadas em fase reversa. Assim como as sílicas de fase normal, estes “recheios” podem ser utilizados para adsorver compostos polares de matrizes não-polares. Os cartuchos SPE são utilizados para reter e eluir seletivamente compostos de estrutura similar (isto é, isômeros), ou misturas complexas, ou ainda, de

Capítulo 5 - Estudo de metodologias de extração

diferentes classes químicas, como drogas e lipídeos. Estes materiais também podem ser usados sob condições de fase reversa (com amostras aquosas), para explorar as propriedades hidrofóbicas das cadeias alquil.

5.5.3 - Solventes utilizados para SPE em fase reversa e normal

Na Tabela 5.3 algumas características de solventes orgânicos comumente utilizados em SPE são mostradas.

Tabela 5.3 – características dos solventes utilizados em SPE

Polaridade		Solventes	Miscível em água?
Não-Polar	Fase reversa forte	Hexano	não
		Isooctano	Não
		Tetracloro de carbono	Não
		Clorofórmio	Não
		Cloreto de metileno (diclorometano)	Não
		Tetrahydrofurano	Sim
		Éter dietílico	Muito pouco
		Acetato de etila	Sim
		Acetona	Sim
		Acetonitrila	Sim
		Isopropanol	Sim
		Metanol	Sim
		Água	Sim
		Ácido acético	Sim
	Fase normal fraca		
	Fase normal forte		

5.5.4 - SPE – Troca Iônica

Os cartuchos SPE de troca iônica podem ser utilizados para extrações de compostos que são carregados quando em solução (geralmente em meio aquoso, mas algumas vezes em solvente orgânico). O mecanismo de retenção destes compostos é baseado principalmente nas atrações eletrostáticas dos grupamentos carregados do analito com os grupamentos carregados da superfície da fase estacionária.

5.6 – Microextração em fase sólida (SPME)

Microextração é definida como uma extração onde o volume da fase extratora é menor do que o volume da amostra a ser extraída e a extração dos analitos de interesse não é exaustiva. Em muitos casos pequenas frações do analito inicial são extraídas para análise. A eficiência da extração é determinada pela partição do analito entre a matriz e a fase de extração. A microextração em fase sólida (SPME) foi desenvolvida na década de 80 do século passado por Arthur e Pawliszyn.⁸³ O primeiro SPME comercial foi desenvolvido pela Supelco em 1993 e um sistema automatizado foi desenvolvido pela Varian. Um guia das recentes aplicações mostrando cerca de 400 análises realizadas por SPME⁸⁴ e três livros textos dedicados ao assunto foram publicados^{85,86, 87}. Em um trabalho recente de SPME, estudos de dinâmica e química de processos de extração de amostras são

⁸³ C. Arthur; J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, **62** (1990), 2145.

⁸⁴ SPME Applications Guide, Supelco, Bellfonte, PA, 1999.

⁸⁵ J. Pawliszyn; in: *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*, Wiley-VCH, New York, 1998.

⁸⁶ J. Pawliszyn (Ed.), *Applications of Solid Phase Microextraction*, Royal Society of Chemistry, London, 1999.

⁸⁷ S. A. Scheppers Wercinski (Ed.); *Solid Phase Microextraction: A Practical Guide*, Marcel Decker, New York, 1999.

discutidos^{88,89}; mas os mecanismos da extração SPME ainda não são muito bem conhecidos. A SPME foi interfaciada à HPLC (high performance Liquid Chromatography) em 1995⁹⁰ e também à CE (Eletroforese Capilar)⁹¹, GC-ICP-MS⁹² e a muitas outras técnicas analíticas. Em um livro texto, Pawliszyn⁹³ descreveu extensivamente o desenvolvimento de método envolvido na SPME.

5.6.1 – SPME e análise de drogas

Quando são desenvolvidas metodologias SPME para a análise de drogas, o analista tem em mãos uma grande gama de escolhas. No livro de J. Pawliszyn⁹⁸ há um capítulo que descreve detalhadamente como deve ser um desenvolvimento de método SPME para a análise de drogas em fluidos biológicos.

Atualmente a SPME vem sendo empregada por uma grande variedade de análises de drogas em fluidos biológicos acoplada a diferentes tipos de técnicas instrumentais. É uma técnica que apresenta baixos limites de detecção e excelentes limites de quantificação. Especialmente quando a modalidade *headspace*⁹⁴ é utilizada, as extrações SPME oferecem um grande potencial para clean-up de matrizes. Muitas aplicações vêm sendo feitas nas áreas toxicológica e forense; a SPME apresenta um grande potencial de aplicação para a análise de drogas e seu metabólitos em fluidos biológicos

⁸⁸ D. Louch; S. Matlagh, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, **64** (1992), 185.

⁸⁹ K. Buchholz, J. Pawliszyn; *Anal. Chem.*, **66** (1994), 160.

⁹⁰ J. Chen; J. Pawliszyn; *Anal. Chem.*, **67** (1995), 2530.

⁹¹ C. W. Whang, in J. Pawliszyn (Ed.), *Applications of Solid Phase Microextraction*, Royal Society of Chemistry, London, 1999, pg. 41.

⁹² L. Moens; T. DeSmaele. R. Dams; P. VanDenBroeck; P. Sandra; *Anal. Chem.*, **15** (1996), 604.

⁹³ J. Pawliszyn; in J. Pawliszyn; *Applications of Solid Phase Microextraction*, Royal Society of Chemistry, London, 1999, pg. 3.

⁹⁴ Z. Zhang; J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, **65** (1993), 1843.

principalmente quando interfaciada a técnicas instrumentais como a eletroforese capilar.⁹⁸

5.7 – Extração com fluido super crítico (SFE)

Fluido super crítico (SF) é uma substância que está nas condições de temperatura e pressão críticas. Extração supercrítica depende da capacidade do fluido supercrítico dissolver seletivamente várias quantidades de substâncias não voláteis.⁹⁵ As propriedades de transporte de massa favoráveis são capazes de variar as condições de temperatura e pressão do SF, promovendo mudanças nas propriedades do solvente capacitando-o à extração de substâncias de diferentes matrizes. Por estas razões, muitos pesquisadores têm investigado o uso da SFE como uma alternativa aos métodos convencionais de análises de drogas em cabelo^{96, 97}.

Foi Sachs e colaboradores^{98,99} que demonstraram pela primeira vez o uso de fluido supercrítico para a extração de drogas em cabelo. Desde então, uma vasta literatura sobre o assunto sobre a extração de opióides e cocaína em cabelo vem sendo publicada¹⁰⁰.

Antes de dar prosseguimento aos resultados e discussão deste capítulo há um conceito muito importante a ser definido e entendido: o conceito de RECUPERAÇÃO quando se aborda o tema extração.

⁹⁵ W. B. Street, *Phase equilibria in fluid and solid mixtures at high pressure*, in: M. E. Paulaitis, J. M. L. Penninger; R. D. Gray; P. Dacidson (eds.), *Chemical Engineering at supercritical Fluid Conditions*, Ann Arbor Science, Ann Arbor, MI, 1983, pg. 3.

⁹⁶ C. Staub; P. Edder; J. Veuthey, Importance of supercritical fluid extraction (SFE) in hair analysis, in: P. Ktz (Ed.), *Drug Testing in Hair*, CRC Press, Inc., Boca Ration, FL, 1996, p.121.

⁹⁷ R. J. Maxwekk, J. F. Morrison, in; S. Wong, I. Sunshine (Eds.); *Handbook of Analytical Therapeutic Drug Monitoring and Toxicology*, CRC Press, Inc, Boca Ration, FL, 1997, Ch. 5.

⁹⁸ H. Sachs; M. Uhl; *Toxichem. Krimtech*, 59 (1992), 114.

⁹⁹ H. Sachs; I. Raff; *Forensic Sci. Int.*, 63 (1993), 207.

5.8 – O conceito de recuperação

O isolamento inicial de um fármaco e seus metabólitos em amostras de origem biológica é feito através da LLE ou outros procedimentos. Algumas vezes, é necessária a combinação de múltiplos procedimentos para permitir uma separação adequada. Muitos destes procedimentos de preparação de amostra causam perda do fármaco de interesse, devido à extração incompleta, adsorção, perda de volume ou coprecipitação. Raramente o analito de interesse pode ser completamente recuperado, salvo algumas exceções, a partir de amostras de origem biológica, mas a perda poderá ser minimizada pela otimização das condições do procedimento de extração¹⁰¹. O estudo de recuperação reflete a quantidade do analito que é recuperada em um procedimento de extração em relação à quantidade real presente na amostra¹⁰².

A *recuperação absoluta* de um método analítico é medida como a resposta de uma matriz fortificada e extraída, expressa como porcentagem da resposta produzida por uma solução padrão que não foi submetida ao procedimento de extração¹⁰³. Dessa forma estima-se o quão eficiente é o processo de extração. A recuperação é melhor estabelecida pela comparação das respostas de matrizes extraídas fortificadas com concentrações baixas, média e altas, em replicatas e extraídas, com aquelas obtidas para as soluções padrão não-extraídas, as quais representam 100 % de recuperação. Embora a estratégia para a elaboração de um processo de extração objetivo obter recuperação próxima de 100% para maximizar a sensibilidade, é improvável

¹⁰⁰ P. Edder; C. Staub; J. Veuthey, I. Pierroz; W. Haerdi; *J. Chromatogr. B*, 658 (1994), 75.

¹⁰¹ G. W. Peng; W. L. Chiou; *J. Chromatogr.*, 531 (1990), 3.

¹⁰² F. Bressole; M. Bromet-Petit; *J. Chromatogr. B*, 686 (1996), 3.

¹⁰³ G. Szepesi; M. Gazdag; K. Mihályfi; *J. Chromatogr.*; 464 (1989), 265.

Capítulo 5 - Estudo de metodologias de extração

que uma recuperação de 50 % venha comprometer a aplicação da metodologia proposta¹⁰⁴. Um método com baixa recuperação (< 75 %) mas reprodutível, pode ser aceitável quando as amostras são analisadas com a calibração apropriada dos padrões. No entanto, não há boa precisão e exatidão quando a recuperação do analito não é reprodutível.¹⁰⁵

¹⁰⁴ R. Causon, *J. Chromatogr. B*; 689 (1997), 689.

5.9 – Resultados e discussão

Os testes de extração foram feitos utilizando-se um *pool* constituído por diversos tipos de cabelo (cabelos de indivíduos brancos, amarelos, negros) em tratamento clínico à base de opióides.

Inicialmente optou-se por seguir os procedimentos existentes na literatura os esquemas dos procedimentos de extração avaliados são mostrados nas Figuras 5.2 a 5.4.

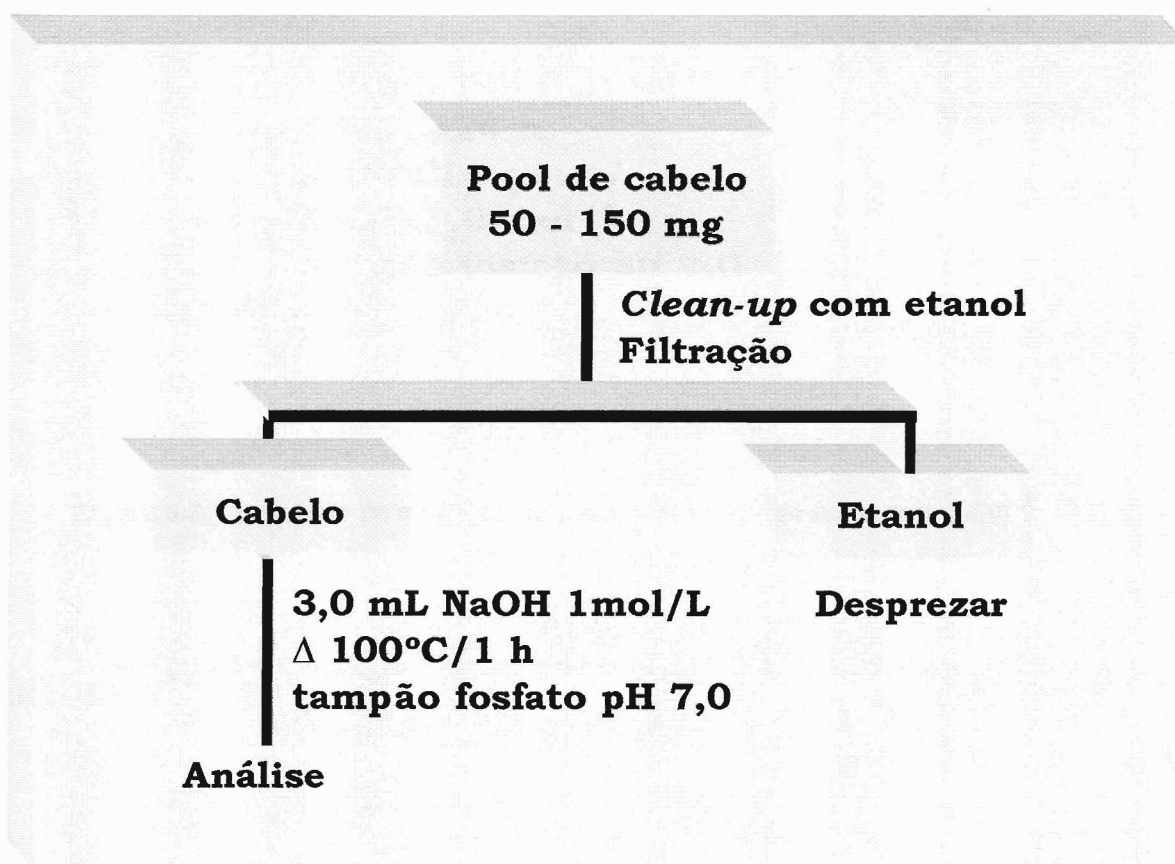


Figura 5.2 – Esquema de extração utilizando-se hidrólise alcalina (pH =

12)¹⁰⁶⁻¹⁰⁷

¹⁰⁵ G. Peng; W. L. Chiou; *J. Chromatogr.*, 531 (1990), 3.

¹⁰⁶ J. Klein; R. Forman; C. Eliopoulos; G. Koren; *Ther. Drug. Monit.*, 16 (1994), 67.

¹⁰⁷ G. Koren; J. Klein; R. Forman; K. Graham. *J. Clin. Pharmacol.*; 32 (1992), 671.

Na Figura 12 é mostrado o esquema de extração utilizando-se hidrólise ácida (pH < 4,0).

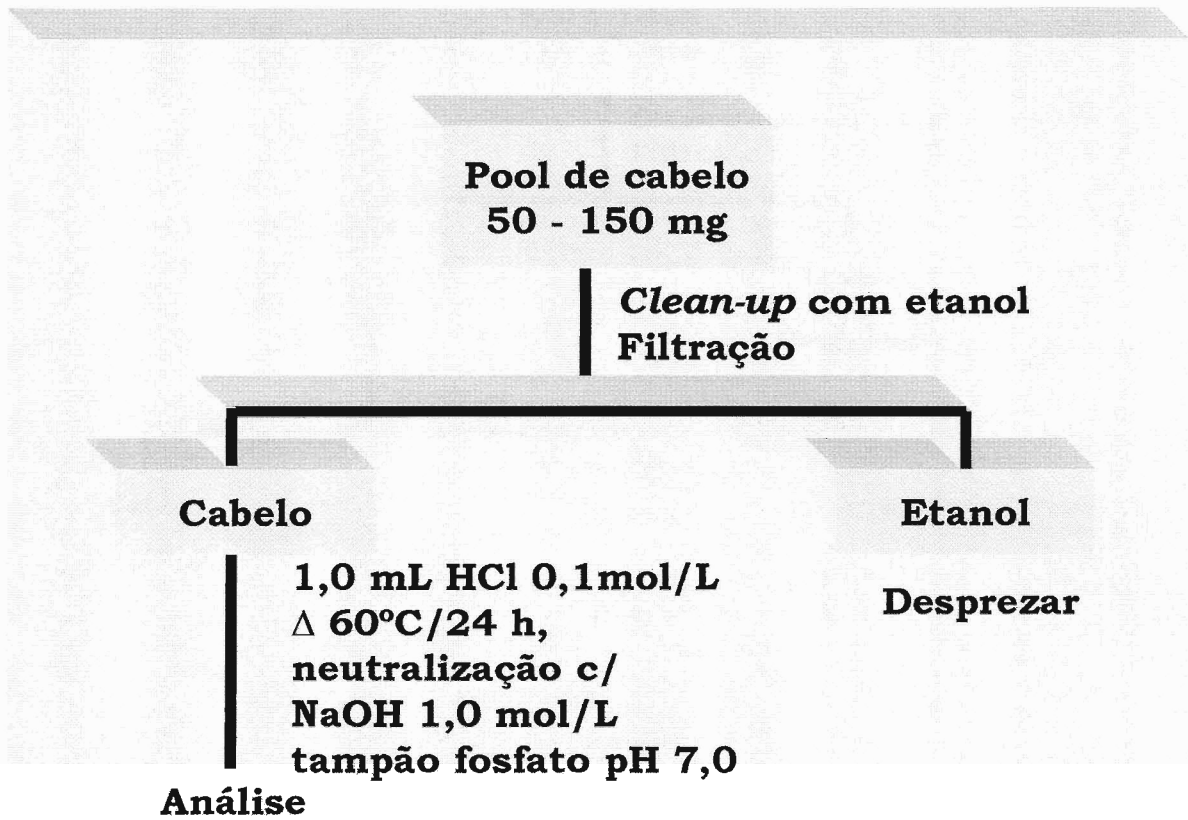


Figura 5.3 – Esquema de extração utilizando-se hidrólise ácida (pH < 4,0).¹⁰⁸⁻¹⁰⁹

Na Figura 5.4 é mostrado o esquema de extração utilizando-se hidrólise em pH neutro (pH = 7,0)

¹⁰⁸ D. Valente; M. Cassini; M. Pipliapochi; G. Vansetti; *Clin. Che.*; 27 (1991), 1952.

¹⁰⁹ W. A. Baumgartner; V. A. Hill; *Forensic Sci. Int.*, 63 (1993), 121.

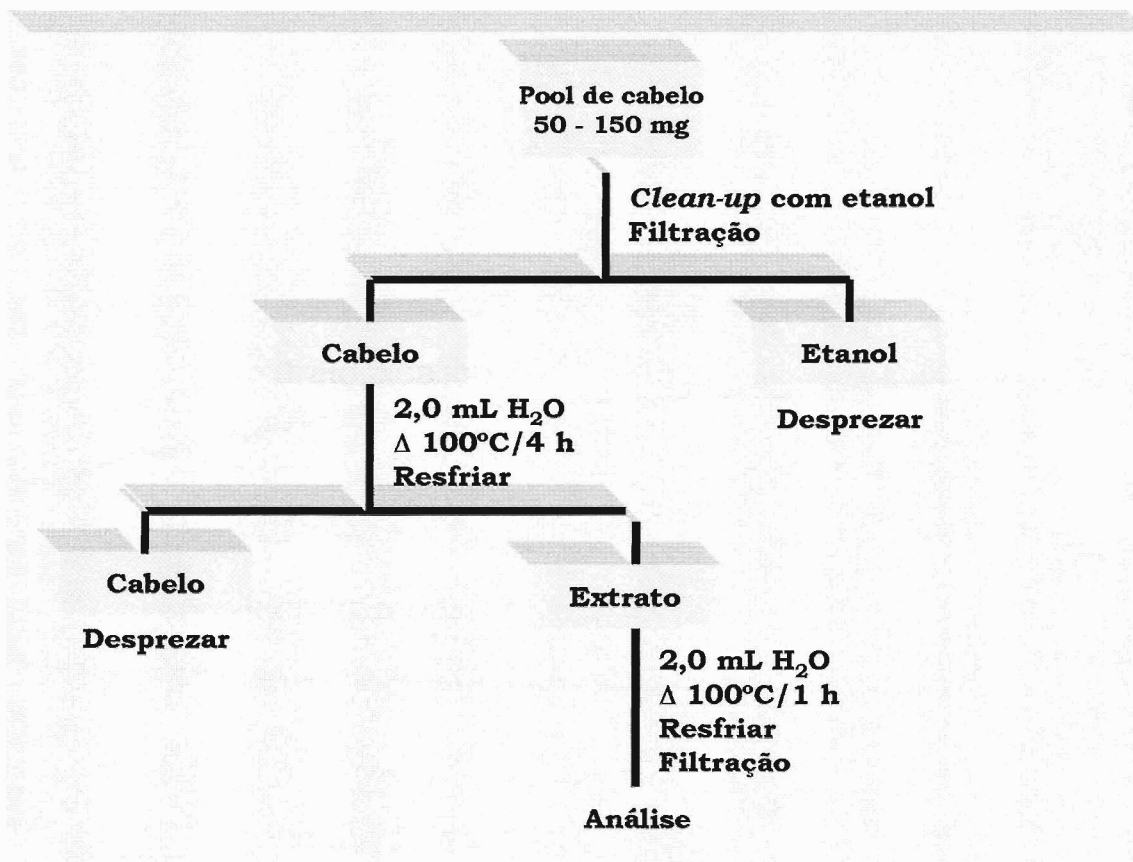


Figura 5.4 – Esquema de extração utilizando-se hidrólise em pH = 7,0¹¹⁰

Na Figura 5.5 são mostrados os eletroferogramas obtidos para as diferentes metodologias de extração utilizando-se hidrólises em diferentes valores de pH, metodologias estas sugeridas pela literatura especializada e citadas no decorrer do texto.

¹¹⁰ S. P. Findlay; *J. Am. Chem. Society*, 76 (1954), 2855.

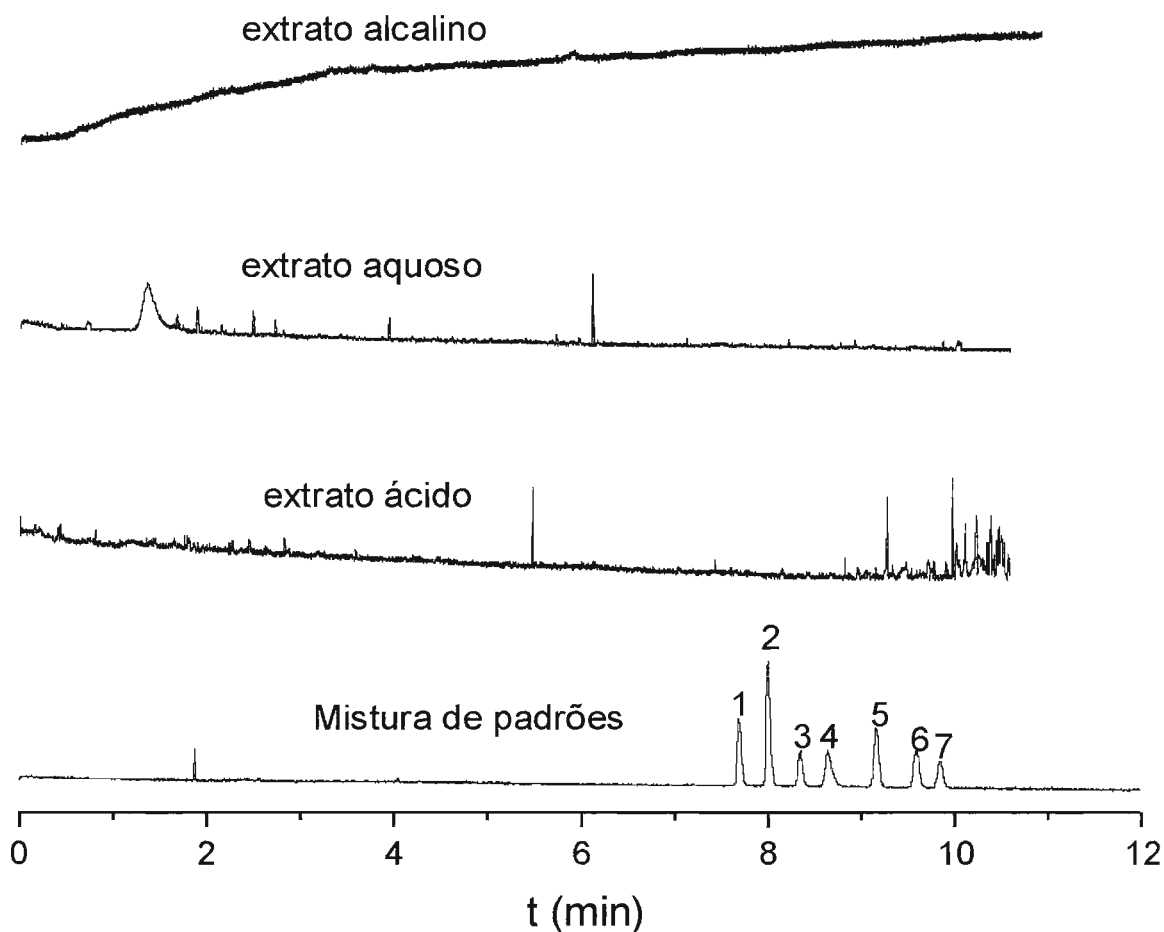


Figura 5.5 – Eletroferogramas obtidos para os testes de avaliação de extratibilidade para as hidrólises em diferentes pH's. Condições de análise: tampão TF 20 mmol/L , pH 2,5; inj. 5 s/5 kV, 25 kV durante a corrida, detecção em 200 nm, 25°C. Os picos referem-se a: 1 – petidina, 2 – morfina, 3- tramal, 4 – naloxona, 5 – citrato de fentanila, 6 – alfentanil HCl, 7 – citrato de sufentanila

Capítulo 5 - Estudo de metodologias de extração

Comparando-se os eletroferogramas obtidos para as hidrólises com o obtido para a mistura de padrão mix A verifica-se que nenhuma das metodologias propostas gerou resultados satisfatórios.

Uma das explicações é o fato de que em tais metodologias; o volume final do extrato analisado é muito grande, a concentração de opióides que possivelmente está presente neste meio está muito diluída; ou seja, fora do limite de detecção que a técnica de CE permite analisar.

Diante deste fato outras metodologias de extração encontradas em literatura foram avaliadas.¹¹¹

O resultados obtido a partir dos teste de extração realizado utilizando-se a preparação de amostra sugerida por Tagliaro e colaboradores¹¹⁶ partindo-se de uma alíquota de 100 μ L da solução padrão mix A 10 mg/L é mostrado na Figura 5.6.

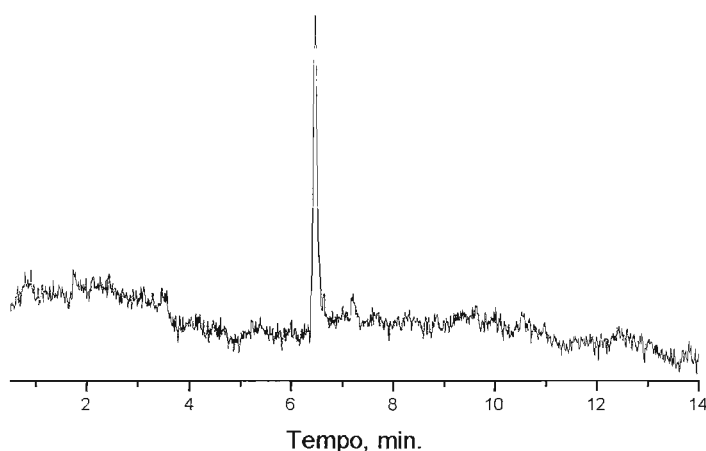


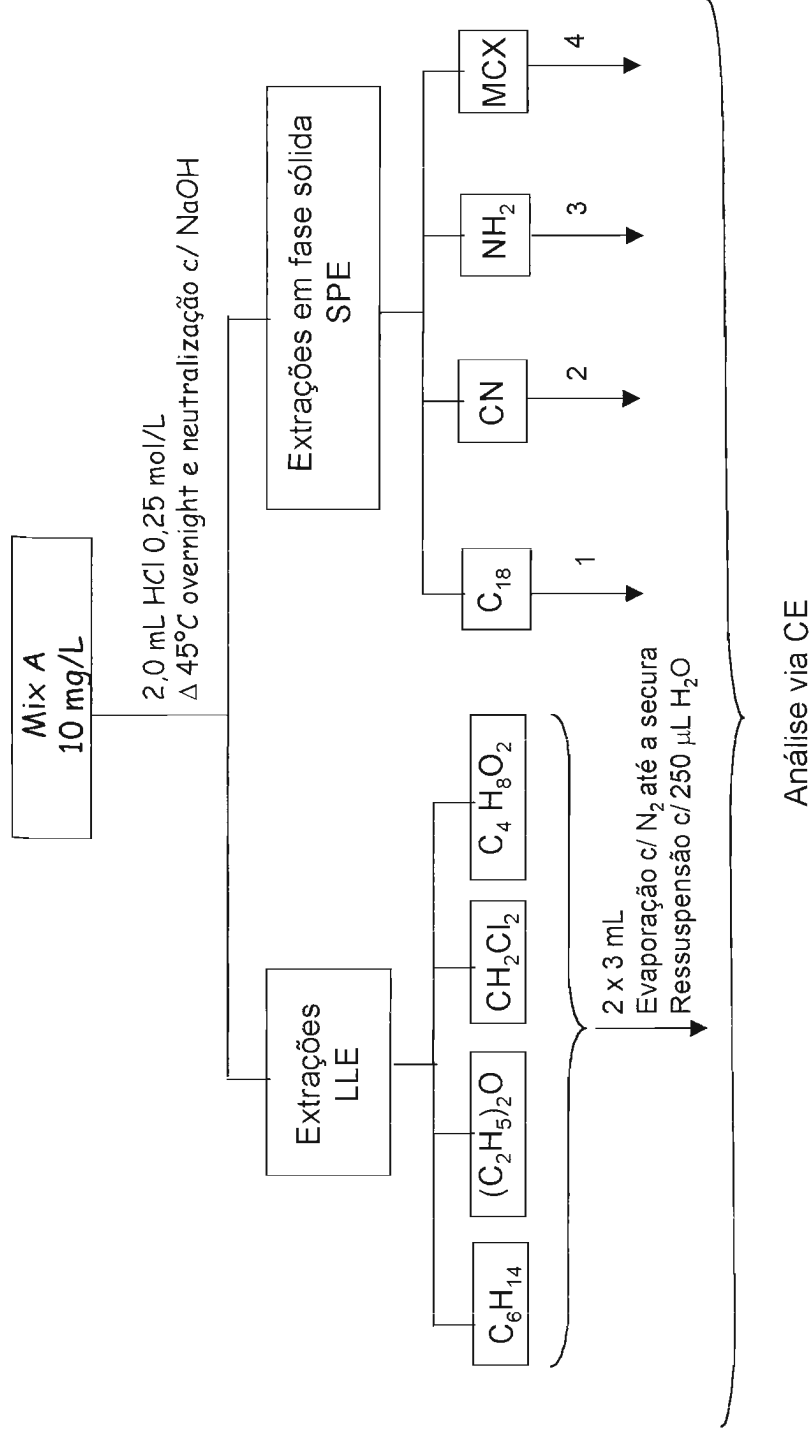
Figura 5.6 - Eletroferograma obtidos para o teste de extração utilizando-se o procedimento sugerido por Tagliaro e colaboradores¹¹⁶. Condições de análise vide Figura 5.5.

¹¹¹ F. Tagliaro; G. Manetto; D. Scarcella; M. Marigo; *Forensic. Sci. Int.*, 92 (1998), 201.

Capítulo 5 - Estudo de metodologias de extração

O procedimento proposto não forneceu nenhum resultado satisfatório o pico que aparece no eletroferograma não corresponde a nenhum dos padrões de opióides do mix A. E em função da falta de resultados satisfatórios foi feito um estudo sistemático de extração a fim de se obter uma metodologia de digestão de opióides em amostras de cabelo que apresenta-se uma boa recuperação dos analitos otimizando-se gastos com solventes e tempo de análise.

Na Figura 5.7 é apresentado um esquema que sumariza todos os testes LLE e SPE efetuados partindo-se de 3 alíquotas diferentes da mistura padrão mix A 10 mg/L (alíquotas de 25, 50 e 100 μ L) que é constituída pelos principais opióides utilizados em clínica médica. Optou-se por iniciar-se o procedimento de extração com uma pré-digestão executando-se uma hidrólise ácida utilizando-se HCl 0,25 mol/L, a Figura 5.7 sumariza todas as condições exploradas.



C₆H₁₄ = hexano, (C₂H₅)₂O = éter de petróleo, CH₂Cl₂ = diclorometano e C₄H₈O₂ = acetato de etila
 1 e 2 - eluição c/ 6 mL ACN
 3 - eluição c/ 5 mL, 35 % metanol:65% diclorometano
 4 - eluição c/ 2 mL 5 % NH₄OH em metanol

Figura 5.7 – Esquema ilustrando os testes de extração avaliados.

A seguir serão mostrados os resultados obtidos para as extrações efetuadas utilizando-se o esquema mostrado na Figura 5.7.

5.9.1 - Extrações LLE

Para as extrações LLE foram selecionados solventes com diferentes polaridades como é mostrado na Tabela 5.4:

Tabela 5.4 – Polaridade dos solventes¹¹² utilizados nas extrações LLE

Solvente orgânico	Polaridade
Dicloreto de metano	3,1
Hexano	0,1
Acetato de Etila	4,4
Éter de Petróleo	2,8

Na Figura 5.8 são mostrados os principais eletroferogramas obtidos para as extrações LLE do mix A com solventes utilizados.

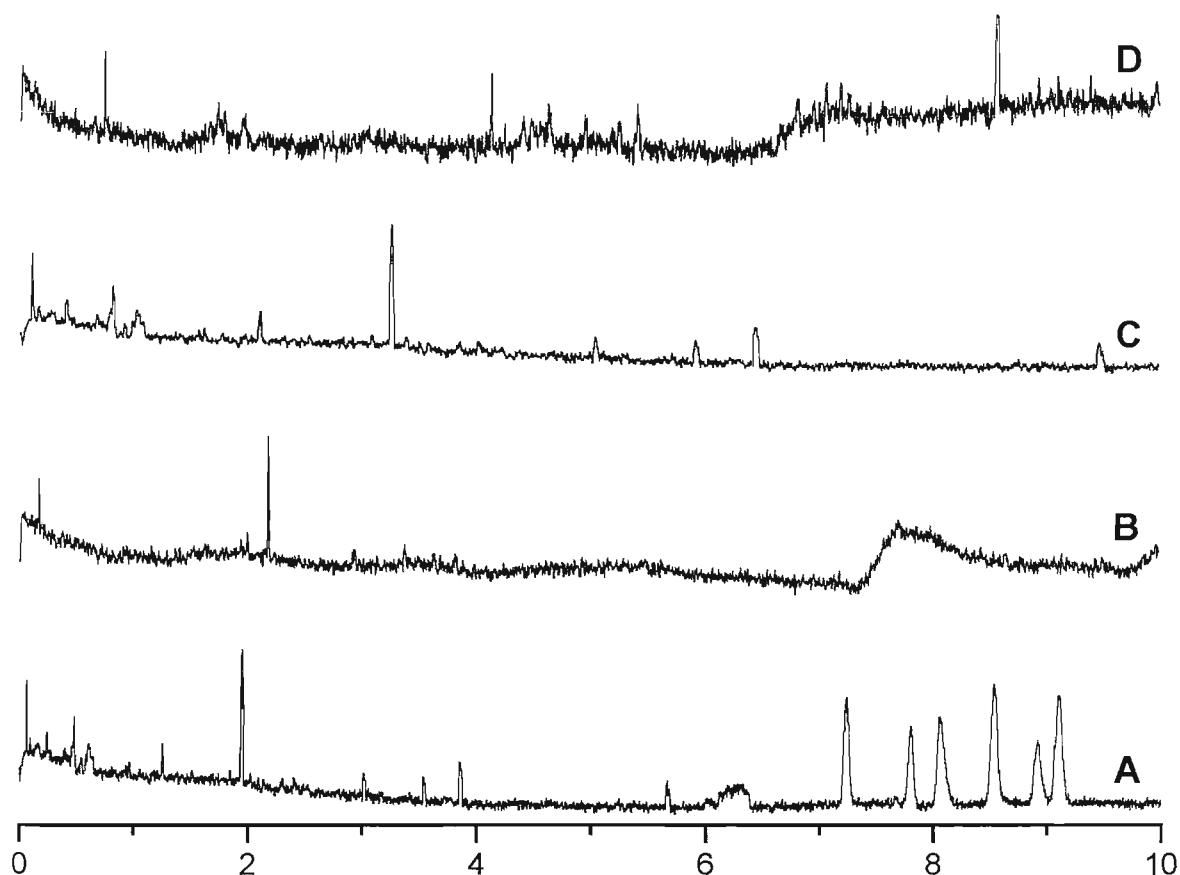


Figura 5.8 – Eletroferogramas obtidos para as extrações LLE utilizando-se como extratores: A – Diclorometano, B – Éter de Petróleo, C – Hexano, D – Acetato de etila. Condições de análise: tampão fosfato 20 mmol/L, pH 2,5; inj. 5 s/5 kV; 25 kV; $\lambda = 200$ nm; 25°C.

Entre os solventes utilizados o único que propiciou um resultado positivo foi o diclorometano. Com base nos valores de pKa dos opióides constituintes da mistura de padrões mix A, que são mostrados na Tabela 5.5, foi realizado

¹¹² Lloyd R Snyder; Joseph J. Kirkland; Joseph L. Glajch.; *Practical HPLC Method Development*, Second

um estudo a fim de se avaliar se o ajuste de pH do hidrolisado obtido após a etapa de hidrólise ácida era uma fator que afetava a extratibilidade dos componentes da mistura padrão utilizando-se como extrator o diclorometano que foi o único solvente da etapa anterior de testes que forneceu um resultado satisfatório.

Tabela 5.5 – Valores de pKa da mistura de padrões mix A

Compostos	Valores de pka
Petidina	7,9
Morfina	8,0
Tramal	7,94
Naloxona	8,5
Citrato de sufentanila	8,4
Alfentanil HCl	6,5

Na Figura 5.9 são mostrados os eletroferogramas obtidos para a LLE utilizando-se diclorometano manipulando-se o pH da fase de hidrólise com aquecimento (45°C, *overnight*).

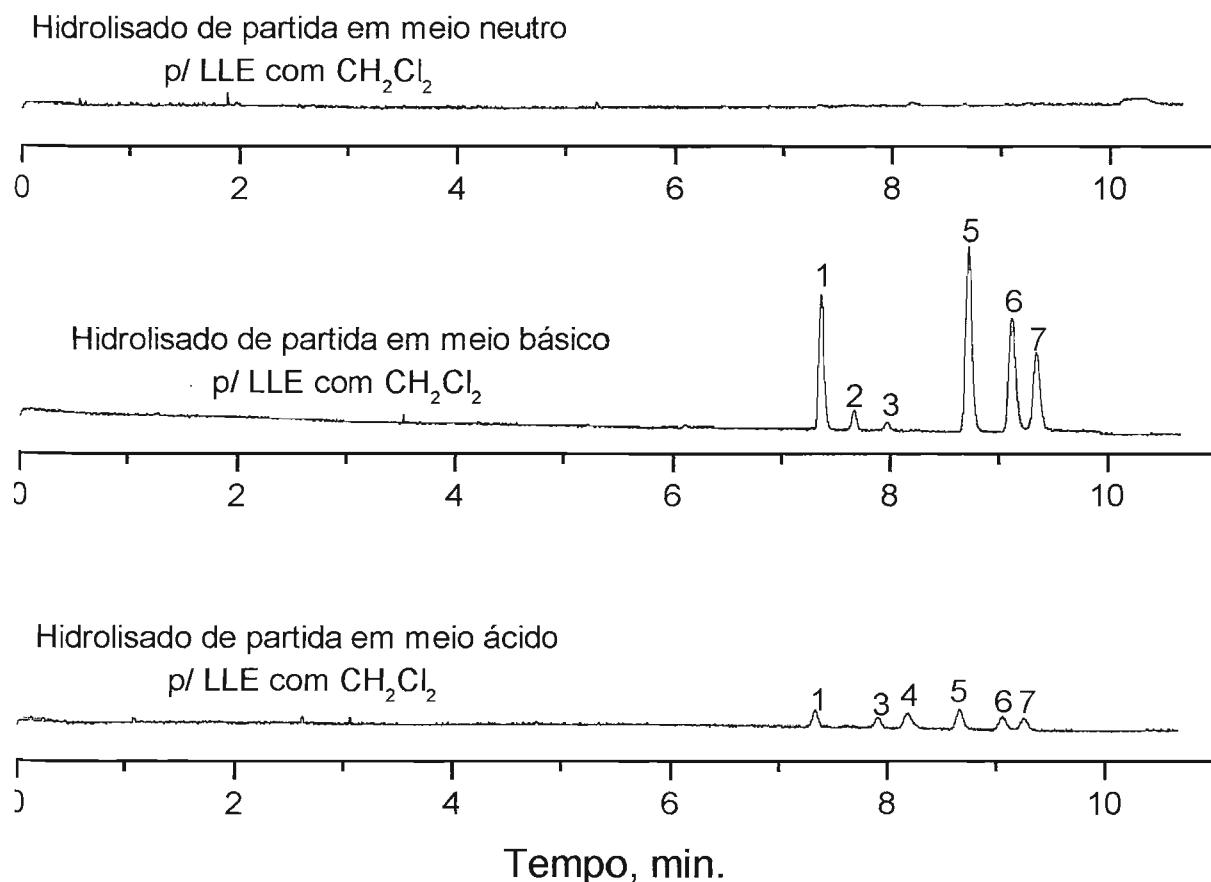


Figura 5.9 – Eletroferogramas obtidos para a extração LLE com diclorometano para diferentes valores de ajuste de pH do hidrolisado após etapa de aquecimento (para alíquota de 50 μ L da mistura padrão *mixseven*). Condições de análise: tampão fosfato 20 mmol/L, pH 2,5; inj. 5 s/5 kV; 25 kV durante a análise; λ = 200 nm e 25°C. Os picos referem-se a; 1)petidina; 2)morfina; 3) tramal; 4)naloxona; 5)citrato de fentanila; 6)alfentanil HCl e 7)citrato de sufentanila

Através da Figura 5.9 verifica-se que a *morfina* é extraída por diclorometano quando o pH do hidrolisado de partida é ajustado; após a etapa de hidrólise ácida com aquecimento, para pH básico. Os diferentes opióides que constituem a mistura de padrões estudada possuem valores de pKa altos, ou seja, em meio básico estes opióides estão neutros, estando neutros, são

Capítulo 5 - Estudo de metodologias de extração

mais facilmente extraídos pela fase orgânica extratora. Na Tabela 5.6 são mostrados os valores de recuperação obtidos para a extração LLE com diclorometano partindo-se de alíquotas de 25, 50 e 100 µL da solução padrão *mix A* 10mg/L, considerando-se o hidrolisado de partida ajustado em pH 12 após a etapa de hidrólise ácida com aquecimento .

Tabela 5.6 – Valores de recuperação obtidos para as extrações LLE com diclorometano para diferentes valores de concentração da matriz de extração

Compostos extraídos	% recuperação*		
	para alíquota de 25 µL	para a alíquota de 50µL	para a alíquota de 100 µL
bupropiona (ou bupropiona)	57,6 ±2,00	57,4	57,8
bupropiona	10,7±1,4	10,6±1,2	10,8±0,80
bupropiona	5,4±0,30	7,9±0,45	7,6±0,50
bupropiona	Não foi extraída	Não foi extraída	Não foi extraída
bupropiona	de 11,5±2,30	12,1±1,2	11,8±1,2
bupropiona			
bupropiona HCl	74,3±3,4	75,4±2,4	74,8±2,00
bupropiona	de 49,5±1,80	48,9±2,30	49,2±1,2
bupropiona			

- *valores calculados com base nos valores de área obtidos para cada pico, em relação às áreas obtidas com a mistura de padrões que não foi submetida ao tratamento em questão.
- Injeção em triplicata

Capítulo 5 - Estudo de metodologias de extração

Os valores de recuperação obtidos foram baixos, exceção feita ao alfentanil HCl cujos índices de recuperação superam a margem de 70 %. A naloxona não é extraída em meio básico. Para os demais opióides extraídos, as taxas de recuperação variaram de 10 a 50%. A morfina é destacada, pois todo o estudo de extração avaliado visa a determinação deste opióide em especial, visto que, as amostras de cabelo selecionadas para estudo pertencem a um grupo de pacientes sob medicação a base de morfina.

Além disso, como os valores de recuperação obtidos através dos testes LLE com diclorometano estão abaixo de 50 % o que torna esta metodologia de análise inviável para o grupo de amostra selecionado para estudo.

Com a finalidade de se encontrar uma metodologia de extração com a qual níveis de recuperação melhores pudessem ser atingidos, testes de extração em fase sólida (SPE) utilizando-se cartuchos com diferentes fases estacionárias foram realizados. Na seção introdutória deste capítulo foram abordados os aspectos operacionais sobre SPE¹¹³ (mecanismo de extração da fase estacionária, polaridade do solvente de eluição, condicionamento do cartucho, eluição e preparação de amostra, etc.). Nesta seção são apresentados os resultados obtidos para as extrações efetuadas para diferentes alíquotas de extração do *mix A* 10 mg/L (alíquotas de 25, 50 e 100 µL) utilizando-se diferentes faixas estacionárias.

5.9.2 – Extrações SPE

O modo como deve ser feito o condicionamento, lavagem e eluição das amostras nestes cartuchos podem ser encontradas no Guia para extração em fase sólida fornecido pela Supelco.¹²⁸

Na Tabela 5.7 são encontradas as informações relativas ao tipo de eluição (fase reversa ou normal) e quais foram os solventes e pH utilizados durante este processo. A extrações foram realizadas partindo-se de 25, 50 e 100 µL de solução padrão *mix A* 10 mg/L e foram submetidas ao tratamento mostrado esquematicamente na Figura 5.

Tabela 5.7 – Parâmetros de estudo utilizados para as extração da mistura de padrões mix A utilizando-se SPE

Tipo de cartucho	C₁₈	NH₂	CN	MCX
Aliquotas de volume da solução padrão mix A 10 mg/L Utilizadas para realização dos testes de extração	50 µL			
PH do hidrolisado após etapa de hidrólise ácida a quente	Ácido, básico e neutro			
Eluição	5 mL acetonitrila	5 mL de 35% de metanol + 65% de diclorometano	5 mL acetonitrila	2 ml 5 % NH ₄ OH em Metanol

¹¹³Bulletin 910, Guide to Solid Phase Extraction, Supelco, Sigma-Aldrich Co., 1998; www.supelco.com.

Nas Figuras 5.10 a 5.12 são mostrados os eletroferogramas obtidos para os extratos SPE analisados.

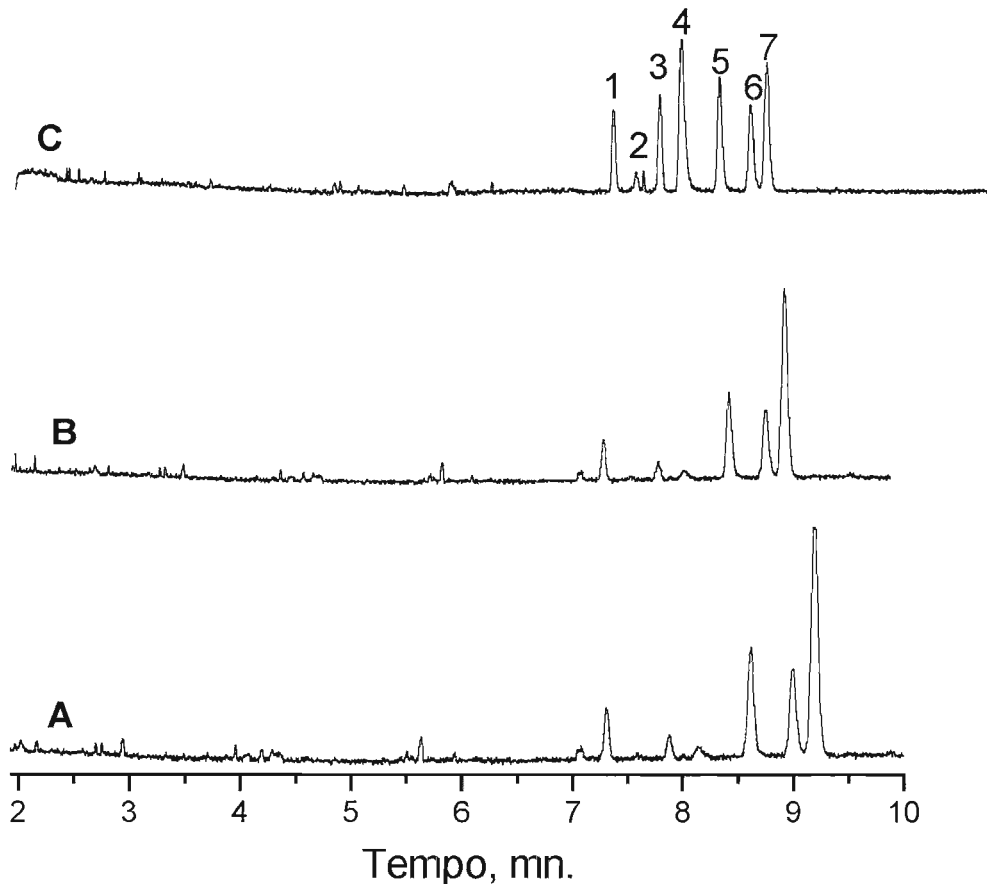


Figura 5.10 – Eletroferogramas obtidos para os extratos SPE utilizando-se cartucho com fase estacionária C₁₈ ; partindo-se do hidrolisado ajustado em pH A) neutro, B) ácido e C) básico, após a etapa de hidrólise ácida a quente. Condições de análise: tampão de corrida TF 20 mmol/L, inj. 5 s/ 5 kV, 25 kV durante a corrida, detecção em 200 nm e 25°C de temperatura.

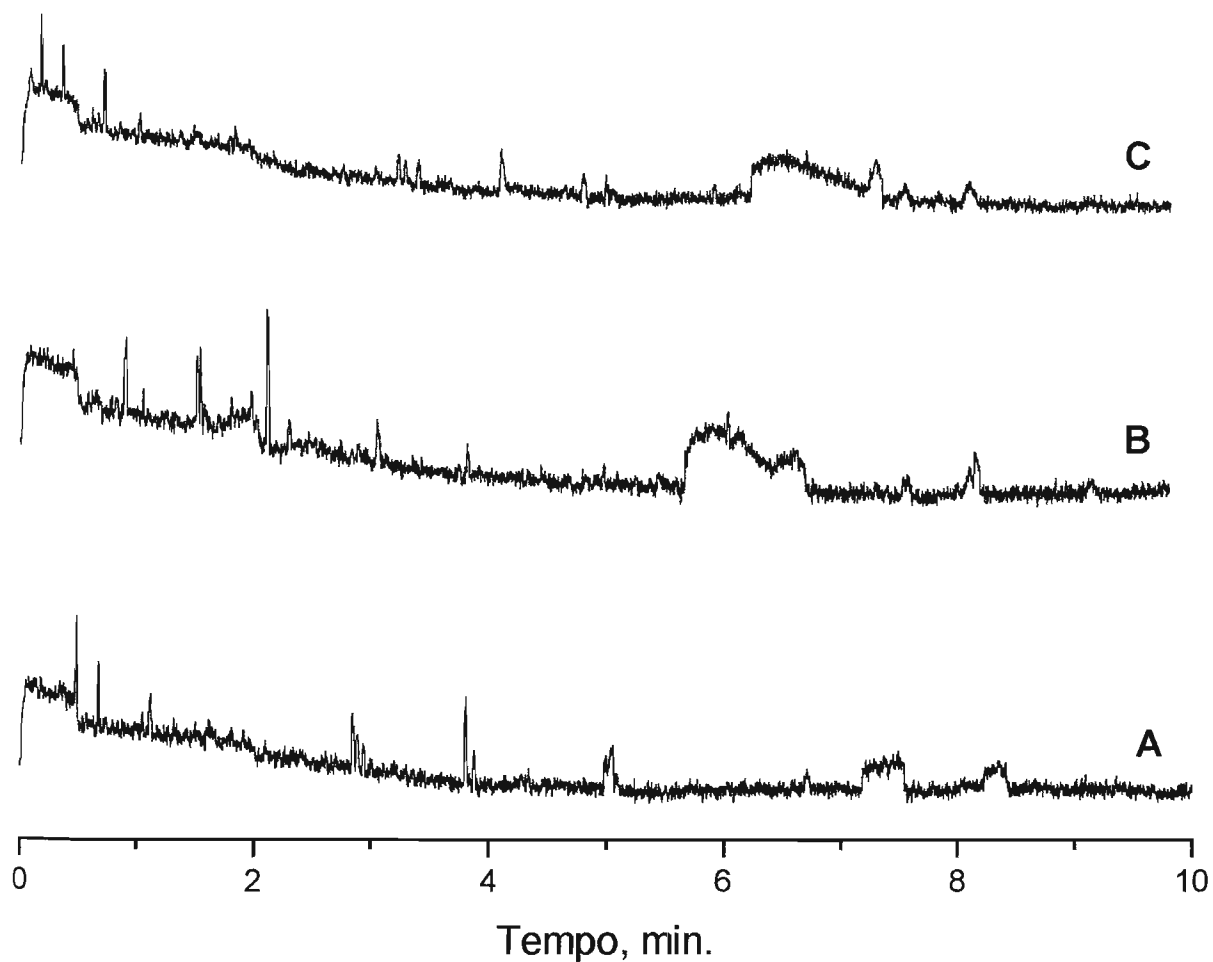


Figura 5.11 – Eletroferogramas obtidos para os extratos SPE utilizando-se cartucho com fase estacionária CN; partindo-se do hidrolisado ajustado em pH A) neutro, B) ácido e C) básico, após a etapa de hidrólise ácida a quente. Condições de análise: tampão de corrida TF

20 mmol/L, inj. 5 s/ 5 kV, 25 kV durante a corrida, detecção em 200 nm e 25°C de temperatura.

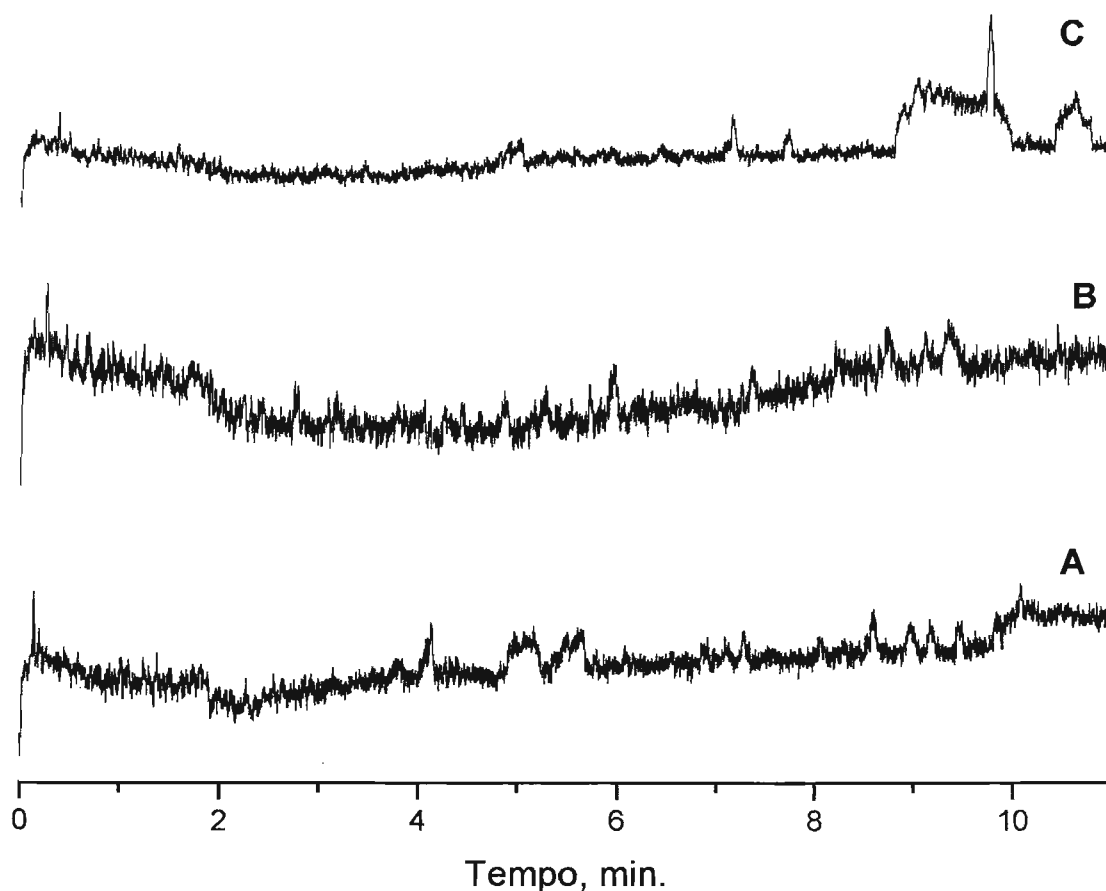


Figura 5.12 - Eletroferogramas obtidos para os extratos SPE utilizando-se cartucho com fase estacionária NH₂; partindo-se do hidrolisado ajustado em pH A) neutro, B) ácido e C) básico, após a etapa de hidrólise ácida a quente. Condições de análise: tampão de corrida TF 20 mmol/L, inj. 5 s/ 5 kV, 25 kV durante a corrida, detecção em 200 nm e 25°C de temperatura.

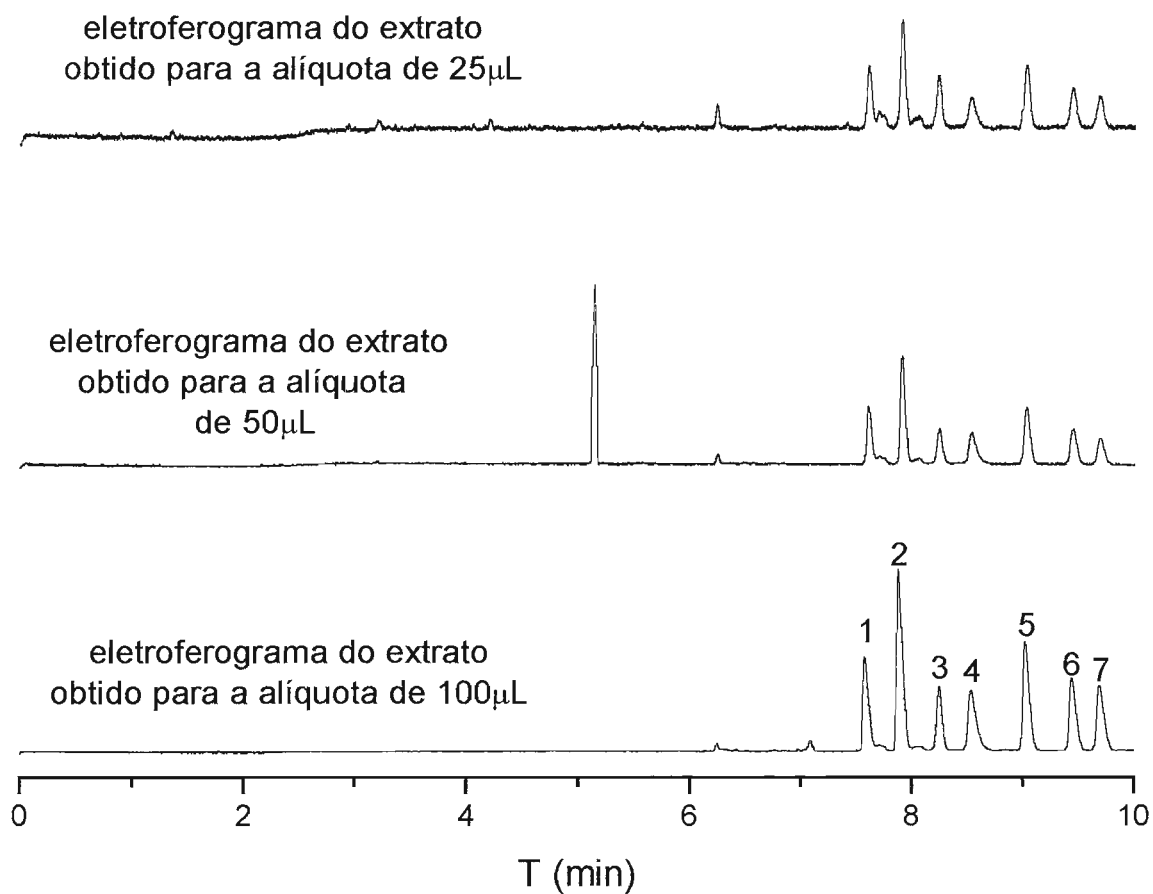


Figura 5.13– Eletroferogramas obtidos para os extratos SPE utilizando-se fase estacionária MCX. Condições de análise: tampão fosfato 20 mmol/L, pH 2,5; inj. 5 seg/5 kV; 25kV; λ = 200 nm, 25°C. Os picos referem-se a: 1)petidina; 2)morfina; 3)tramal; 4)naloxona; 5)citrato de fentanila, 6) alfentanil HCl e 7)citrato de sufentanila

Capítulo 5 - Estudo de metodologias de extração

Na Tabela 5.8 são mostrados os valores de recuperação obtidos para as fases estacionárias SPE citadas na Tabela 5.7 acima e um detalhamento maior será feito para o cartucho com fase estacionária MCX. O processo de extração com esta fase estacionária é mais fácil comparativamente às demais metodologias de extração até aqui testadas e propiciou taxas de recuperação consideráveis como pode ser verificado observando-se a Tabela 5.8.

Tabela 5.8 – Valores de recuperação obtidos através das extrações SPE com cartuchos de fase estacionária C₁₈, CN e NH₂ % de Recuperação para as diferentes fases estacionárias

Opióides Extraídos	% de Recuperação											
	C ₁₈			NH ₂			CN			MCX		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Petidina	67,5±0,20	66,8±0,50	67,4±0,35	NE	NE	NE	NE	NE	NE	94,4±0,20	88,4±0,30	86,8±0,70
Morfina	15,7 ±0,40	15,3±0,65	15,5±0,70	NE	NE	NE	NE	NE	NE	91,8±0,50	99,6±0,70	100,0
Tramal	36,9±3,20	37,1±2,4	36,8±1,2	NE	NE	NE	NE	NE	NE	100±0,10	100±0,05	100±0,10
Naloxona	96,9±1,20	97,5±0,80	97,2±0,50	NE	NE	NE	NE	NE	NE	68,0±0,50	68,7±0,20	67,8±0,30
Citrato de fentanila	68,2±2,40	67,9±1,25	67,9±1,10	NE	NE	NE	NE	NE	NE	84,9±0,40	73,6±0,10	74,8±0,30
Alfentanil HCl	62,3±2,50	62,2±1,70	61,9±3,1	NE	NE	NE	NE	NE	NE	76,0±0,20	67,6±0,25	65,4±0,15
Citrato de sufentanila	28,3±3,20	27,9±2,4	28,20±2,60	NE	NE	NE	NE	NE	NE	79,7±0,20	77,9±0,60	82,0±0,10

A = alíquota de 25µL/ B = alíquota de 50µL/ C = alíquota de 100 µL/ NE = não extraído

Capítulo 5 - Estudo de metodologias de extração

As extrações efetuadas utilizando-se cartucho com fase estacionária amino (NH_2) e ciano (CN) não forneceram resultados positivos de extração para nenhuma das alíquotas de partida. O único a fornecer resultados positivos foi o cartucho com fase estacionária C_{18} . Valores de recuperação acima de 80% foram alcançados para a naloxona (96% em média) e valores acima de 60% para petidina (67% em média) e acima de 60% para citrato de fentanila e alfentanil HCl. Para a morfina o valor de recuperação ainda é consideravelmente baixo, em torno de 10%. Já a extração utilizando o cartucho MCX propiciou uma recuperação superior a 90 % para a morfina, que é o analito de interesse. E de 68 a 80 % de recuperação para os demais padrões de opiáceos do mix A. A extração SPE utilizando-se o cartucho com fase estacionária trocadora de íons foi escolhido como metodologia de digestão/extração para o grupo de amostra selecionado para estudo. No próximo tópico serão dadas maiores informações à respeito desta fase estacionária.

5.10 - Cartuchos SPE com fase estacionária MCX

Cartuchos SPE com fase estacionária MCX. São da linha de produtos OASIS[®], comercializados pela Waters. A sigla MCX vem do inglês **M**ixed-mode **C**ation-**eX**change reversed-phase, constituído por uma fase polimérica sorbente muito utilizada para o processo de extração de drogas de natureza química básica, ácida e neutra em matrizes biológica (plasma, soro e urina), mais ainda de uso muito recente no Brasil, estes cartuchos foram introduzidos no mercado norte-americano em meados de 1996 e não precisam ser condicionados antes do uso, como é o caso das outras fases estacionárias

encontradas em cartuchos SPE. A estrutura do polímero que constitui esta fase estacionária é mostrada na Figura 5.14.

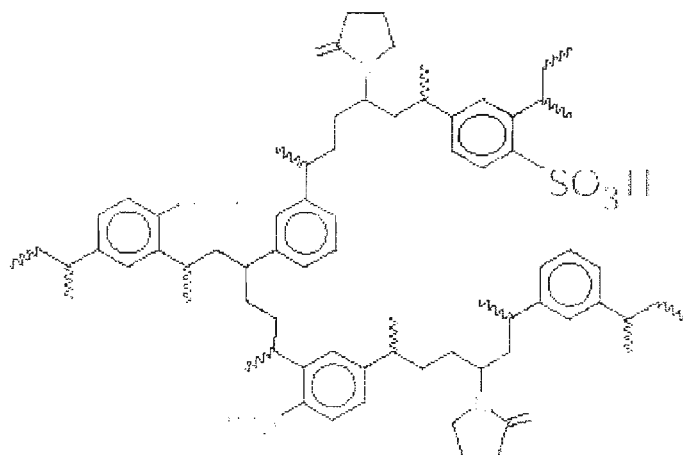
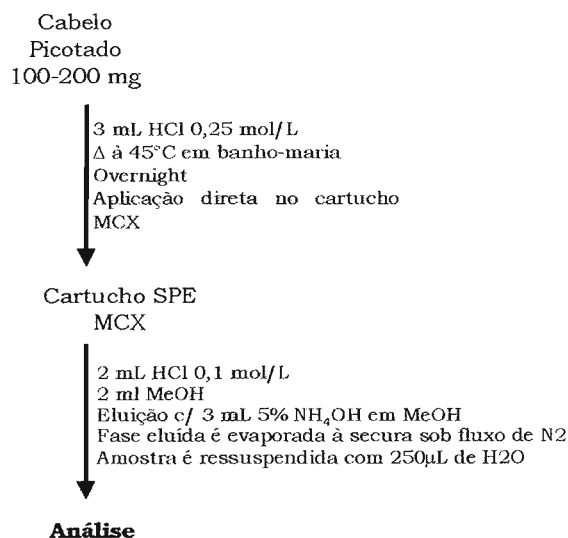


Figura 5.14 – Estrutura química da fase estacionária MCX

Na Figura 5.15 é mostrado esquematicamente como é feita a extração utilizando-se esta fase estacionária.



*Como foi feito anteriormente para os demais testes de extração avaliados foram utilizadas 3 alíquotas diferentes de solução padrão para os testes de extração (25, 50 e 100 μL do *mix A* 10mg/L), uma amostra de cabelo de um indivíduo não usuário fortificada com uma alíquota de 100 μL da mesma solução padrão utilizada para efetuar os testes de extração afim de se avaliar possíveis interferências de matriz

Figura 5.15 – Esquema de extração SPE utilizando-se fase estacionária

MCX

Na Tabela 5.8 foram mostrados os valores de recuperação obtidos para os constituintes da solução *mix A* e na Figura 5.16 é mostrado um gráfico de barras para ilustrar melhor os resultados alcançados utilizando-se esta fase estacionária e que já foram apresentados na Tabela 5.8.

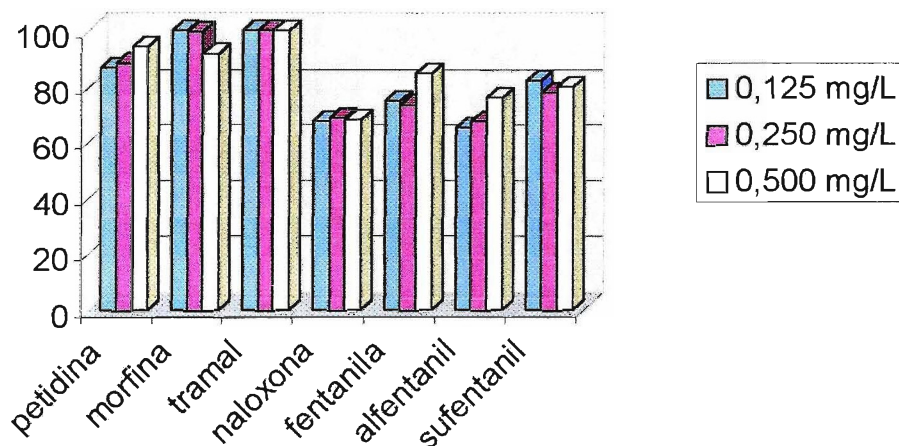


Figura 5.16 – Gráfico de barras para os resultados obtidos para o estudo de extração SPE efetuado utilizando-se a fase estacionária MCX

Através da Tabela 5.8 e do gráfico mostrado na Figura 5.16 verifica-se que os valores de recuperação para os constituintes da mistura padrão analisada superam a margem dos 70% exceção feita à naloxona cuja taxa de recuperação girou em torno dos 68% em média. Para a morfina, que é o opiáceo de maior interesse, as taxas de recuperações obtidas variaram de 91 a 100%. Estes valores de recuperação são melhores comparados aos demais resultados obtidos através das extrações LLE e SPE anteriormente mostrados.

Na Figura 5.17 são mostrados os eletroferogramas de uma amostra de cabelo de um indivíduo não usuário de opióides há mais de 6 meses fortificada com uma alíquota de solução padrão *mix A* de 1 mg/L para se verificar o efeito de matriz no processo de extração de escolha.

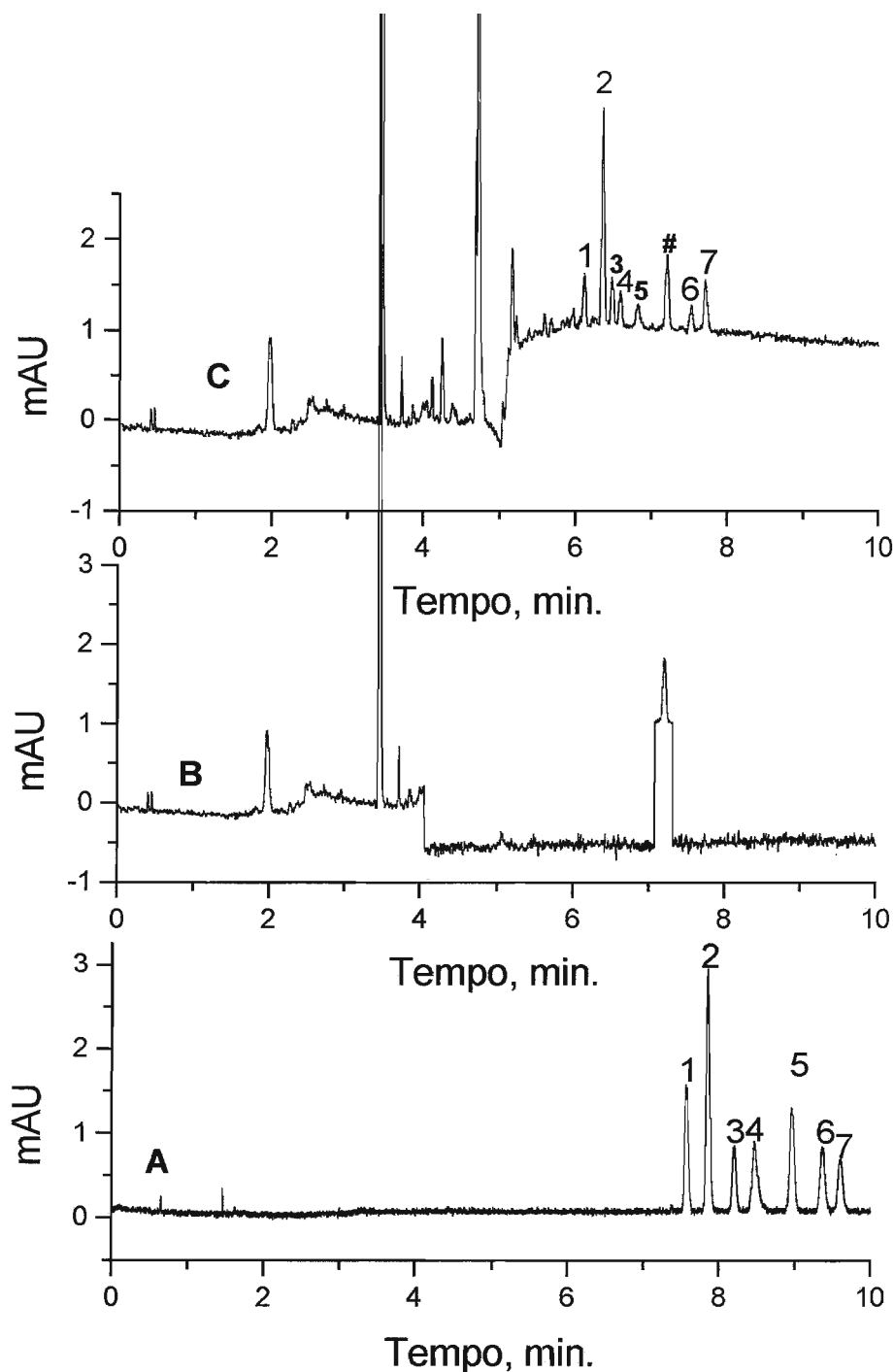


Figura 5.17 - Eletroferogramas obtidos para: A) mistura de padrões mix A 1 mg/L, B) amostra de cabelo de indivíduo não usuário e C) amostra de cabelo de indivíduo não usuário fortificada com solução padrão mix A 1 mg/L cabelo. Condições de análise: tampão fosfato 20 mmol/L, pH 2,5; inj. 5 s/5 kV, 25 kV; 25°C, $\lambda = 200$ nm. Os picos referem-se a: 1 – petidina; 2 morfina; 3 – Tramal; 4 – naloxona; 5 – citrato de fentanila; 6 – alfentanil HCl e 7 – citrato de sufentanila; # - pico não identificado.

Na Tabela 5.9 são mostrados os valores de taxa de recuperação obtidos para a amostra de cabelo fortificada com solução padrão mix A 1 mg/L.

Tabela 5.9 – Valores de recuperação obtidos para amostra de cabelo fortificada com mix A por extração em fase sólida utilizando-se cartucho com fase estacionária MCX

Compostos extraídos	% Recuperação ¹
Petidina	84,2±0,20
Morfina	99,8 ±0,50
Tramal	100±0,10
Naloxona	58,0±0,50
Citrato de Fentanila	64,9±0,40
Alfentanil HCl	66,0±0,20
Citrato de sufentanila	89,7±0,20

¹Valores calculados para 3 replicatas de análise

Observando-se a Figura 5.17 e os resultados mostrados na Tabela 5.9 indicam que os índices de recuperação para petidina, morfina e tramal superaram o patamar dos 80 %. Para o analito de interesse o índice de recuperação foi de 99,8 %, sendo assim não se verificou a influência do efeito de matriz . Com base nos resultados aqui avaliados e apresentados pode-se afirmar que a metodologia de extração e *clean up* escolhida para a extração de morfina em amostras de cabelo é uma metodologia adequada.. No Capítulo 8 são mostrados os resultados obtidos através da extração de amostras reais submetidas ao procedimento de extração

apresentado nesta seção. Na Tabela 5.10 são mostrados os resultados relativos à reprodutibilidade do método utilizando-se uma série de cartuchos MCX (10 diferentes cartuchos do mesmo lote, para uma alíquota de 100 μ L de solução padrão mix A 10mg/L) para o analito de maior interesse, a morfina.

Tabela 5.10 – Reprodutibilidade para a extração SPE de morfina utilizando-se cartucho de troca iônica (MCX)

Opióide	Área	CV
	17,82	
	17,75	
	17,64	
	17,83	
	17,11	
Morfina	17,57	
	17,23	
	17,37	
	17,17	
	17,54	
Média (n = 10)	17,50 \pm 0,25	1,44%

Verifica-se através da Tabela 5.10 que a metodologia de extração proposta apresenta uma boa reprodutibilidade com um coeficiente de variação da ordem de 1,44%.

5.11 - Conclusões

A partir dos resultados apresentados pode-se inferir que:

- Resultados positivos para os diferentes solventes utilizados para as extrações LLE só foram obtidos com o uso de diclorometano partindo-se do hidrolisado em meio básico (pH = 12,0) após a etapa de hidrólise a quente.
- Resultados positivos e com níveis consideráveis de extração foram alcançados para a extração em fase sólida (SPE) utilizando-se cartucho com fase estacionária trocadora de íons (MCX).

L/CE

Laboratório de Cromatografia e Eletroforese Capilar

CAPÍTULO 6

6 – Validação do método desenvolvido

6.1 - Introdução

“O procedimento de validação dos métodos pode ser tedioso, porém a consequência de não fazê-lo é, com certeza, um desperdício de tempo, dinheiro e recursos“ (J. M. A. Green, 1996)¹¹⁴

A validação de um método é o processo usado para estabelecer os parâmetros de desempenho analítico que são adequados para a aplicação para a qual é destinado¹¹⁵,¹¹⁶. Além disso, os dados da validação são também partes integrantes de qualquer documentação submetida às agências governamentais de regulamentação da Comunidade Européia, Japão, EUA e outros países, quando se pretende o registro de métodos usados para quantificação de fármacos em fluidos biológicos.¹¹⁷ É um dos elementos básicos de todo e qualquer sistema de qualidade laboratorial, como propõem as Boas Práticas de Laboratório (BPL) e a ISO Guia-25, entre outros.

Um consenso sobre os requerimentos para a validação de métodos analíticos foi obtido por um júri de peritos que se reuniram em uma conferência sobre Validação de Métodos Analíticos: Biodisponibilidade, Bioequivalência e Estudos Farmacocinéticos, em Washington, 1990. Os resultados foram compilados e reportados por Shah *et al*¹¹⁸. No Brasil, a discussão mais recente sobre validação de métodos analíticos aconteceu por ocasião da elaboração da

¹¹⁴ J. M. A. Green; *Anal. Chem.*, 68 (1996), 305 A.

¹¹⁵ F. Bressole; M. Audran; T. N. Pham; J. J. Vallon; *J. Chromatogr. B*, 687 (1996), 303.

¹¹⁶ R. Causon; *J. Chromatogr. B*, 689 (1997), 175.

¹¹⁷ J. R. Lang; S. Bolton; *J. Pharm. Biom. Anal.*; 9 (1991), 435.

¹¹⁸ P. D. Shah; *J. Pharm. Sci.*, 81 (1992), 309.

Capítulo 6 - Validação do método desenvolvido

Resolução 391 de 09/08/1999 que trata da regulamentação de medicamentos genéricos em nosso país.

Os principais parâmetros da validação de um método estão definidos na Tabela 6.1.

Tabela 6.1 – Definição dos termos requeridos para validação de metodologias

Nome	Definições
Linearidade	Corresponde a capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame dentro de uma determinada variação.
Recuperação	Relação entre a quantidade de amostra medida e adicionada a uma determinada matriz após um processo de extração.
Limite de detecção (LD)	Representa a mais baixa concentração da substância em exame que pode ser detectada com um certo limite de confiabilidade utilizando um determinado procedimento experimental.
Limite de Quantificação (LQ)	Representa a mais baixa concentração da substância em exame que pode ser quantificada com um certo limite de confiabilidade utilizando um determinado procedimento experimental.
Exatidão	É o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência.
Precisão	Representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais quando o procedimento é aplicado diversas vezes em uma mesma amostra homogênea em condições idênticas de análise.
Precisão Intermediária	Expressa o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como dias diferentes de análise, analistas, equipamentos, etc.
Repetibilidade	Corresponde aos resultados obtidos através de várias reproduções de um método sempre nas mesmas condições experimentais de análise.
Reprodutibilidade	Refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios
Robustez	Corresponde à capacidade de um método de não ser afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros.
Sensibilidade	Slope (inclinação) da curva de calibração.
Especificidade	Representa a capacidade do método desenvolvido de avaliar de forma inequívoca a substância em exame na presença de componentes que podem vir a interferir na sua determinação numa mistura complexa.

Capítulo 6 - Validação do método desenvolvido

Todos os termos definidos na Tabela 6.1 são conhecidos como parâmetros de performance analítica e algumas vezes como figuras analíticas de mérito. Muitos desses termos são familiares e usados diariamente no laboratório. Entretanto, podem significar diferentes conceitos para diferentes pessoas. Existem na literatura dois grandes guias de normalização e aplicação de metodologias de validação: as normas USP¹¹⁹ e as normas ICH.¹²⁰ Em ambas, as terminologias e definições utilizadas, diferem apenas semanticamente. A ICH considera o sistema de sensibilidade como parte da validação do método, enquanto que a USP faz uma abordagem do tema em um capítulo especial¹²¹. Em alguns casos as terminologias e definições adotadas pela ICH são adotadas pela USP e vice-versa.¹²² Para a validação da metodologia de análise desenvolvida neste trabalho foi adotado como guia de normas de validação as normas ICH, protocolo Q2B de novembro de 1996. A justificativa para o uso desta norma em especial é por ela se tratar de um protocolo de fácil implementação e de simples entendimento.

Na seção de resultados e discussões deste capítulo os parâmetros de validação serão discutidos e, também descritas as formas como estes parâmetros foram determinados experimentalmente. Vale a pena ressaltar que o método foi validado somente para a morfina, uma vez que o grupo de amostragem selecionado são pacientes que fazem uso deste opióide em especial.

¹¹⁹ United States Pharmacopeia (USP), US Pharmacopoeial Conventional Inc.; Rockville, MD 1995, pp 1982.

¹²⁰ International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Guidelines, www.ich.org

¹²¹ E. W. Ciurczak, *Spectroscopy*, 13 (1998), 24.

6.2 – Resultados e discussões

6.2.1 - Método analítico otimizado

As separações eletroforéticas foram conduzidas usando como eletrólito de separação tampão fosfato 20 mmol/L, pH 2,5.

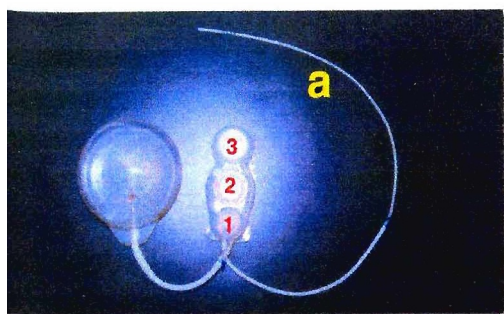
As condições analíticas foram as seguintes: potencial aplicado durante as análises foi de 25 kV (polaridade normal), 25°C de temperatura, a detecção foi fixada em 200 nm e a injeção da amostra foi feita pela aplicação de 5 kV de tensão por 5 s.

A coluna capilar, com $L_t = 47,5$ cm e $L_{efe} = 40$ cm, foi lavada previamente com NaOH 1,0 mol/L durante 20 min; água durante 20 min e por último com o tampão de corrida por 25 min. Entre as corridas foram feitas lavagens com o tampão de corrida durante 3 min.

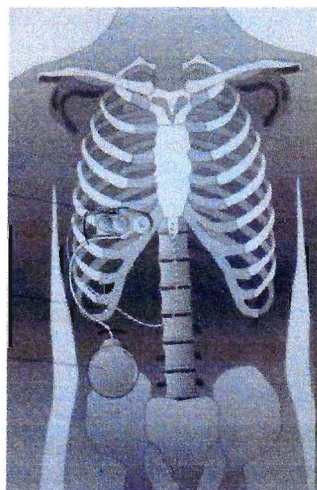
6.2.2 - Preparação das amostras de cabelo

Amostras de cabelo (50-150 mg) cortadas com cerca de 3 cm a partir da raiz foram obtidas de pacientes do Grupo da Dor do HC-FMUSP portadores de um implante de bomba intratecal abdominal. A bomba intratecal é preenchida com uma solução de morfina de concentração 50 mg/L e os pacientes se automedicam segundo recomendações médicas precristas ou de acordo com intensidade de dor que cada um sentir. Na Figura 6.1 é mostrado esquematicamente como é o sistema intratecal, onde ele é implantado e como é feita a recarga do sistema.

¹²² S. Wold; H. Martens; H. Wold; *Multivariate Calibration problem in Chemistry Solved by PLS Method*, Heidelberg, Springer-Verlag, March, 1992, pp. 286.



Sistema de bomba intratecal



Região de implante



Recarga do sistema

Figura 6.1 – Detalhes do sistema de bomba intratecal, região do corpo onde ele é implantado e como é feita a recarga da solução de morfina

O esquema de extração utilizado para a digestão das amostras é mostrado na Figura 6.2.

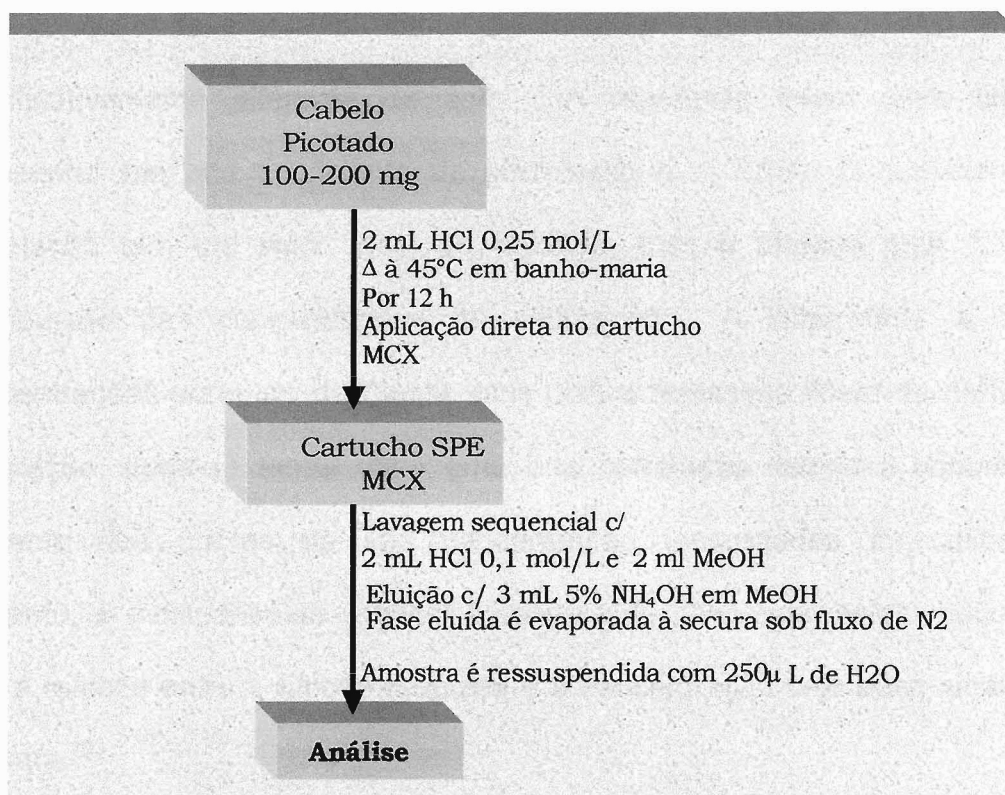


Figura 6.2 – Esquema de extração utilizado para a digestão das amostras de cabelo analisadas

Linearidade

A linearidade de um procedimento analítico é definida como sendo a capacidade de gerar resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame. A calibração é um dos mais importantes estágios na análise química. Sem um bom procedimento de calibração, precisão e exatidão não podem ser obtidas. Para a maioria das técnicas analíticas cromatográficas, assim como para a CE, uma relação de primeira ordem (linear) é observada entre a resposta do detector (y , área ou altura dos picos) e a concentração (x) do analito nas amostras, podendo ser descrita pela

Capítulo 6 - Validação do método desenvolvido

equação de regressão linear: $y = ax + b$, onde o parâmetro (a) é a inclinação da reta e o parâmetro (b) é a intersecção do gráfico de calibração. Idealmente (a) deve ser reprodutível de ensaio para ensaio e (b) não deve ser significativamente diferente de zero. A regressão linear deve também apresentar um alto coeficiente de correlação ($r > 0,99$). O coeficiente de correlação tem um valor ideal de unidade, mas é afetado pela faixa de distribuição das concentrações de calibração. A linearidade à baixas concentrações pode ser deficiente, mas com a regressão linear do gráfico de calibração, pode-se ainda obter uma boa correlação devido à contribuição influente dos pontos de alta concentração empregados na calibração. Portanto, é indispensável verificar o modelo de calibração selecionado para que a relação entre a função resposta e a concentração seja adequadamente descrita.¹²³

Na validação conduzida neste trabalho foram empregadas 3 tipos de curvas de calibração, uma delas usado em todos os experimentos realizados, que inclui as concentrações que são esperadas em amostras originados de estudos de determinação de opióides e outras drogas de abuso em cabelo. Para a construção de uma das curvas de calibração utilizada na quantificação de amostras de cabelo analisadas, alíquotas de 12,5; 25; 50; 75 e 100 μL de uma solução padrão de morfina de 50 mg/L foram transferidas para tubos de ensaio com tampas de rosca e submetidas ao processo de extração descrito pela Figura 6.2. Em seguida procedeu-se a análise eletroforética empregando-se as condições descritas na seção 6.2.1. Os valores de concentração foram calculados comparando-se os valores de área das alíquotas submetidas ao

¹²³ V. A. P. Jabor; "Avaliação da Eletroforese Capilar na análise enantiosseletiva de alguns fármacos com diferentes características ácido-base em plasma". Tese de Doutorado,

Capítulo 6 - Validação do método desenvolvido

processo de extração com as concentrações de soluções padrão (consideradas como 100 % de recuperação), que não foram submetidas ao processo de extração e, foram preparadas e analisadas nas mesmas condições analíticas das alíquotas extraídas. Este procedimento foi efetuado para se corrigir possíveis perdas na recuperação devido ao processo de extração quando amostras reais fossem analisadas.

Na construção dos outros tipos de curva de calibração foram utilizadas soluções de morfina em diferentes concentrações preparadas através da diluição adequada, partindo-se de uma solução estoque de morfina de 100 mg/L. Na Tabela 6.2 são descritas as equações das retas analíticas obtidas e na Figura 6.3 são mostrados os gráficos obtidos.

Tabela 6.2 – Faixa de linearidade do método desenvolvido

Tipo de curva de calibração	Faixa de concentração (mg/L)	Equação da reta obtida	R (coeficiente de correlação da reta)
Para estimativa do limite de detecção	0,1 — 1,5	$y = 0,0948 + 1,43 x$	0,999
Para quantificação das amostras de cabelo	0,625 — 10	$y = -1,75 + 7,09 x$	0,998
Para determinação da faixa linear	0,1—50	$y = 9,12 + 5,10 x$	0,979

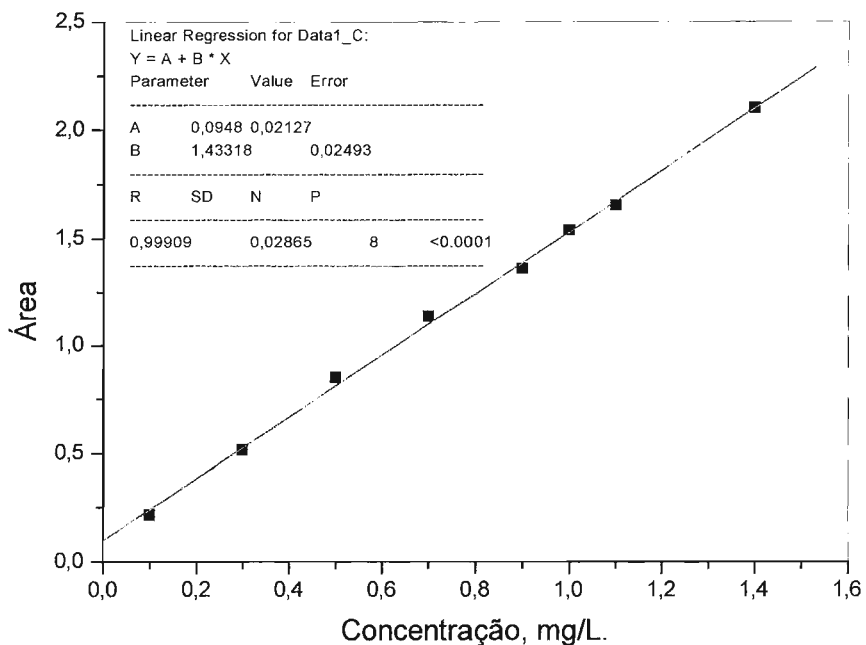


Figura 6.3 A – Curva de calibração obtida para a faixa de concentração de 0,1 a 1,5 mg/L.

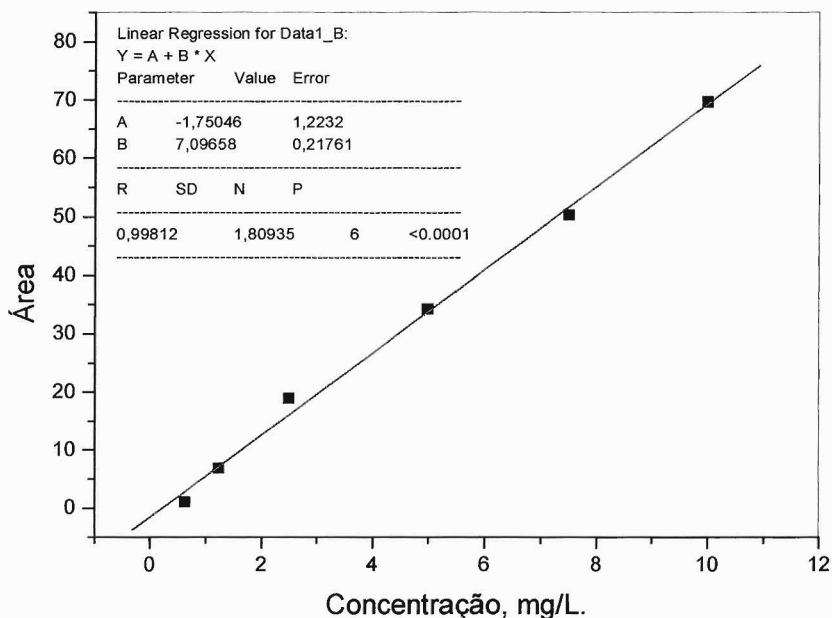


Figura 6.3 B – Curva de calibração obtida para a faixa de concentração 1,5 a 10 mg/L utilizada para a quantificação das amostras de cabelo.

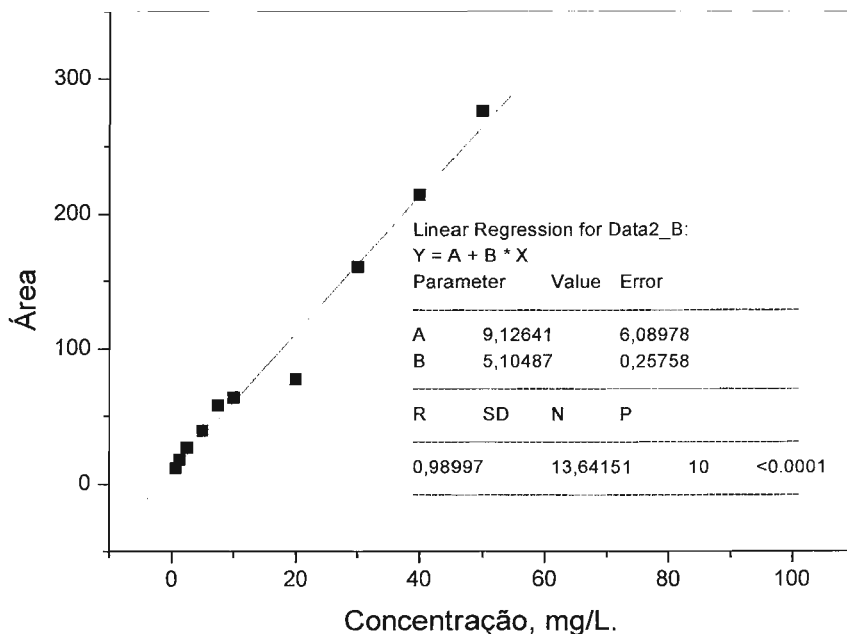


Figura 6.3 C – Curva de calibração obtida para a faixa de concentração de 0,1 a 100 mg/L para avaliação do intervalo de resposta linear do detector.

Recuperação

A recuperação absoluta (R, em %) foi calculada através da equação 1 :

$$\text{Recuperação absoluta} = \frac{\text{concentração obtida}}{\text{concentração real}} * 100 \quad [13]$$

Para avaliação da eficiência do procedimento de extração otimizado foi construído um gráfico com cinco pontos de calibração. Para isto, alíquotas de

Capítulo 6 - Validação do método desenvolvido

12,5; 25; 50; 75 e 100 µL partindo-se de uma solução padrão de morfina de 50 mg/L foram adicionadas a 100 mg de uma amostra de cabelo de um indivíduo não usuário de opiáceos e após serem submetidas ao processo de extração otimizado os extratos finais obtidos foram submetidas a análise. Foram feitas 3 replicatas de cada análise.

A concentração de morfina nas amostras de cabelo foram calculadas empregando-se um gráfico de calibração cujos pontos de calibração eram soluções padrão que não foram submetidas ao processo de extração (100 % de recuperação).

Na Tabela 6.3 são mostrados os valores de recuperação obtidos.

Tabela 6.3 – Porcentagem de recuperação para obtida para morfina utilizando a extração em fase sólida com cartucho de troca iônica (MCX)

Concentração real (mg/L)	Concentração obtida (mg/L)	% Recuperação
0,625	0,510	81,06
1,25	1,06	86,98
2,5	1,8	72,0
5,0	4,4	87,68
7,5	6,5	86,85
10	7,5	73,62
Recuperação média		81,4 ± 6,4 (CV = 7,9 %)

O método apresentou valores de recuperação superiores a 70 % em todos os níveis de concentração testados que é um valor considerado aceitável para a recuperação em métodos de extração empregados em amostras biológicas.

Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) de um procedimento analítico corresponde à menor concentração de substância em análises presente na amostra que pode ser detectada com um certo limite de confiabilidade através de um determinado procedimento experimental. Da mesma forma o limite de quantificação (LQ) de um procedimento analítico corresponde à menor concentração da substância em exame presente na amostra que pode ser quantitativamente determinada com aceitável precisão e exatidão através de um determinado procedimento experimental. O valor deduzido para o ruído multiplicado pelo fator 3 é utilizado para estimar o limite de detecção enquanto o limite de quantificação é estimado através do ruído multiplicado por um fator 10.¹²⁴ Outra possibilidade é a utilização de uma solução padrão do analito que fornece uma relação sinal/ruído igual a 3 LD ou a 10 LQ.¹²⁵ A ICH reconheceu a convenção sinal-ruído mas também indica duas outras alternativas para a determinação do LD: métodos visuais não-instrumentais e a média dos LD calculados. Os LDs também podem ser determinados com base no desvio padrão (DP) da resposta e a inclinação (I) estimados a partir de uma curva de calibração a níveis próximos ao LD a partir da fórmula $LD = 3,3 (DP/I)$. O DP da resposta pode ser determinado com base no DP do branco, no DP do residual da linha de regressão ou o DP da intercessão do y das linhas de regressão. Já o LQ pode ser calculado a partir da mesma curva de calibração utilizada para estimar o LD com base na relação $LQ = 10 (DP/I)$.

Na presente validação os limite de concentração e detecção foram calculados com base na relação sinal/ruído igual a 3 e 10 utilizando-se uma

¹²⁴ M. E. Swartz; I. S. Krull; *Pharmaceutical Technology*, junho 1998, 12.

¹²⁵ I.S Krull; M. E. Swartz, *LC-GC*; 15 (1997), 842.

Capítulo 6 - Validação do método desenvolvido

solução de partida de morfina 1 mg/L. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 6.4.

Tabela 6.4 - Valores de limite de detecção e quantificação para morfina

Limite de detecção (mg/L)	Limite de quantificação (mg/L)
0,064 ± 0,10	0,214 ± 0,20

Precisão e Exatidão

A precisão de um procedimento analítico representa o grau de concordância entre os resultados de análises individuais, quando o procedimento é aplicado repetidamente a múltiplas análises de uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições experimentais. A precisão é numericamente expressa pelo coeficiente de variação (CV, %) ou desvio padrão relativo¹²⁶¹²⁷ e calculada através da equação 15.

$$\text{Precisão (CV, \%)} = \frac{s}{\bar{X}} \times 100 \quad [15]$$

onde : s é o desvio padrão e

\bar{X} é média dos valores obtidos.

A exatidão de um procedimento analítico representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência. A exatidão é expressa como o percentual da resposta obtida,

¹²⁶ A. A. M. Chasin; E. S. Nascimento; L. M. Ribeiro-Neto; M. C. Salvadori; Revista Brasileira de Toxicologia, 11 (1998), 1.

¹²⁷ J. k. Taylor; Quality assurance of chemical measurements, 2°. Ed. Lewis publishers, Chelsea, 1987, 79p.

Capítulo 6 - Validação do método desenvolvido

através do ensaio de uma concentração conhecida da substância em exame, incorporada em um meio de composição definida.

A exatidão é a concordância entre o valor da concentração de morfina medida sem passar pelo processo de extração (concentração real, considerado como 100 %) e o valor das concentrações das alíquotas adicionadas à amostra de cabelo e submetidas ao processo de extração. É expressa em porcentagem do erro relativo, sendo calculada pela equação 16

128.

$$\text{Exatidão (erro relativo, \%)} = \frac{\text{valor obtido}}{\text{valor real}} \times 100 \quad [16]$$

A precisão e exatidão do método desenvolvido foram avaliadas através de estudos de repetibilidade intra e inter-ensaios.

Neste trabalho, para avaliação da precisão e exatidão do método desenvolvido amostras de cabelo de indivíduos não usuários de opióides foram fortificadas em 6 níveis de concentração, os mesmos níveis utilizados para a construção da curva de calibração na faixa 0,625 a 10 mg/L.

No estudo de precisão intra-ensaio o coeficiente de variação obtido através das concentrações das amostras de cabelo fortificadas nos 6 níveis de concentração foram considerados e no estudo da precisão interensaios foram considerados os resultados de análise das mesmas amostras 3 dias consecutivos. Em ambos os casos foram considerados os valores médios obtidos a partir da injeção em triplicata, para cada concentração.

Capítulo 6 - Validação do método desenvolvido

As Tabelas 6.5 e 6.6 mostram os resultados obtidos para avaliação da precisão intra-ensaio e inter-ensaios.

Tabela 6.5 – Precisão e exatidão intra-ensaio (n = 18)

Concentração real (mg/L)	Concentração obtida (mg/L)	Precisão (CV, %)	Exatidão (erro relativo, %)
0,625	0,605	9,9	3,2
1,25	1,16	8,5	7,2
2,5	2,2	4,1	12
5,0	4,4	5,5	12,0
7,5	6,5	5,4	13,2
10	8,5	2,4	15,0

Tabela 6.6 – Precisão e exatidão inter-ensaios (n =54)

Concentração real (mg/L)	Concentração obtida	Precisão (CV, %)	Exatidão (erro relativo, %)
0,625	0,550	11	13
1,25	1,12	8,9	9,0
2,5	2,2	1,1	10
5,0	4,5	3,3	10
7,5	6,7	3,8	11
10	8,8	2,3	12

Os valores obtidos são considerados aceitáveis (< 20%) que são os valores recomendados em literatura da área para a análise de fármacos em amostras biológicas.¹¹⁵

Seletividade e especificidade

A seletividade de um método representa a sua capacidade em separar os analitos dos produtos de degradação, de metabólitos e de fármacos co-administrados. A especificidade é relacionada com capacidade de avaliar indubitavelmente os analitos na presença de compostos endógenos, sendo altamente dependente da separação em si.

Para o estudo do parâmetro de seletividade, foram avaliados vários fármacos e alguns metabólitos que podem vir a interferir na análise eletroforética da morfina. Com base nos eletroferogramas obtidos e mostrados na Figura 6.4, foi realizado um exame cuidadoso de cálculo de mobilidade efetiva de cada fármaco. Os resultados foram expressos em tempo de migração e mobilidade efetiva para cada fármaco avaliado, os dados obtidos são mostrados na Tabela 6.7.

Tabela 6.7 – Validação do método com respeito à seletividade

Fármaco	Tempo de migração (min)	Mobilidade efetiva ($\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
Morfina	4,98	$2,52 \times 10^{-4}$
Codeína	4,53	$2,77 \times 10^{-4}$
Nalorfina	4,10	$3,06 \times 10^{-4}$
Morfina-3 β D-glicuronídeo	4,67	$2,68 \times 10^{-4}$
Clonidina	5,19	$2,41 \times 10^{-4}$

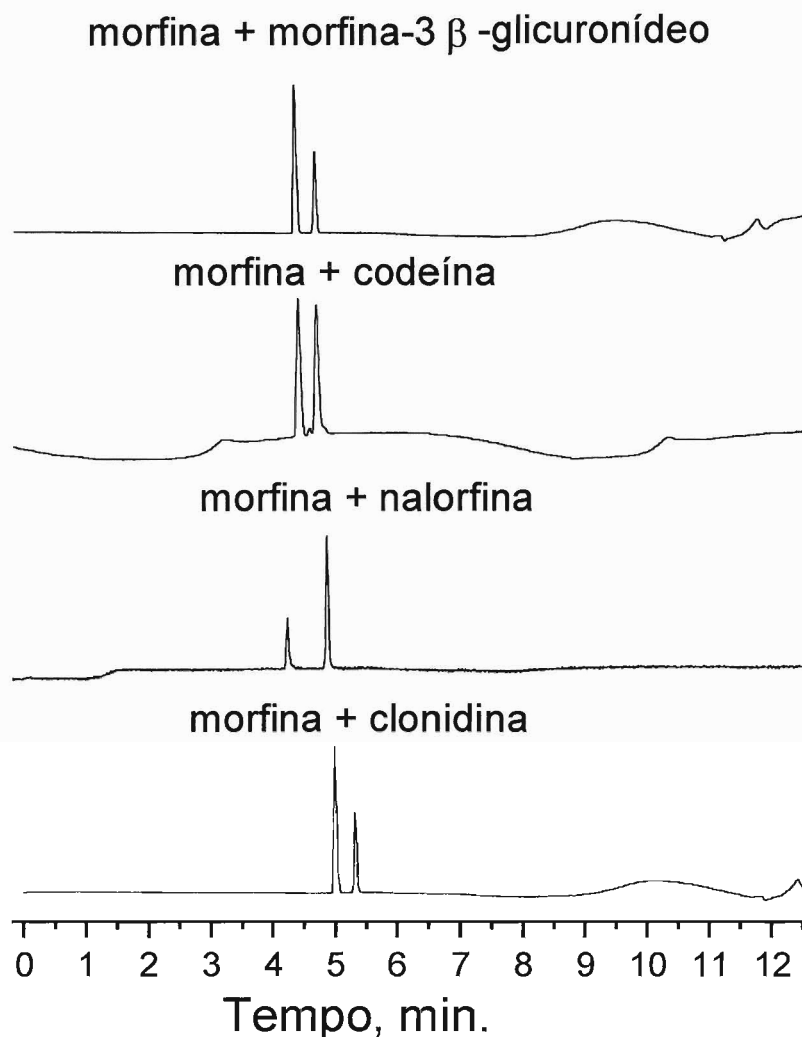


Figura 6.4 – Eletroferogramas obtidos para a análise da seletividade do método. Condições analíticas: eletrólito de corrida tampão fostato 20 mmol/L, pH 2,5; injeção da amostra 5 s/5 kV; 25 KV durante a corrida, detecção em 200 nm; 25 °C de temperatura.

6.3 – Conclusões

- A validação do método proposto para a determinação de morfina em amostras de cabelo apresentou boa linearidade ($R > 0,99$), valores de limite de detecção e quantificação para morfina da ordem de 0,064 mg/L e 0,214 mg/L respectivamente; com precisão e exatidão adequadas (erro relativo $< 20\%$); valores de recuperação da ordem de 81,19 % e seletividade única.

LCE

Laboratório de Cromatografia e Eletroforese Capilar

CAPÍTULO 7

Capítulo 7 – Aplicação do método de desenvolvido e validado

7.1 – Introdução

Após a validação do procedimento de extração do procedimento de análise desenvolvido este foi aplicado a um grupo de amostras reais. Para a quantificação de morfina nas amostras de cabelo selecionadas para o estudo foi empregado o método de padronização externa. Na construção dos gráficos de calibração foram empregados amostras de cabelo de indivíduos não usuários de opióides, fortificados com uma solução padrão de morfina em 5 níveis de concentração. A identificação do pico referente à morfina nas amostras de cabelo analisados foi feita através de dois parâmetros: similaridade espectral da ordem de 99,9 %, quando comparados com o espectro obtido para a amostra analisada e o espectro referente à morfina padrão. E com relação ao tempo de migração para a morfina , que varia de 4,0 a 5 min dependendo das características físicas do cabelo analisado (textura, tratamentos cosméticos aplicados e coloração).

Na Tabela 7.1 são mostrados os resultados obtidos para a análise de 96 amostras de cabelo de 35 pacientes. As amostras de cabelo foram coletadas por um período de 3 meses consecutivos, uma amostra a cada mês para estudos de dosagem terapêutica desenvolvido pelo Grupo da Dor do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HC – FMUSP). As amostras foram identificadas por siglas que correspondem ao nome de cada um dos pacientes. Na Figura 7.1 é mostrado um eletroferograma de uma das amostras analisadas. No anexo 1 são mostrados os eletroferogramas das amostras analisadas correspondentes ao primeiro mês de coleta.

Capítulo 7 - Aplicação do método desenvolvido e validado

As amostras foram extraídas utilizando-se o esquema de extração mostrado na Figura 6.2 do Capítulo 6. Os extratos obtidos foram analisados via FSCE utilizando-se como eletrólito de corrida o tampão fosfato 20 mmol/L, pH 2,4; injeção eletrocínética da amostra (5 s/5 kV), 25 kV durante a corrida, detecção em 200 nm, 25°C de temperatura. As análises foram feitas utilizando-se uma coluna capilar de 75 μ m de diâmetro interno e 40 cm de L_{ef} e 47 cm de L_t .

Tabela 7.1 – Valores de concentração de morfina encontrados nas amostras de cabelo analisadas

Lote	sigla	ng de morfina/mg de cabelo	Desvio padrão	CV (%)
Lote 1	ACM	1,3	0,06	4,5
	AMP	3,0	0,18	6,0
	JS	9,8	0,34	3,5
	LCCS	4,3	0,12	2,8
	OHP	3,3	0,12	3,6
	AO	2,4	0,13	5,3
	VVR	5,1	0,12	2,4
	VP	1,3	0,04	3,2
Lote 2	AP	4,2	0,15	3,6
	BSF	4,3	0,18	4,2
	CR	5,7	0,24	4,2
	MPAS	4,3	0,13	3,0
	TDBGM	2,5	0,27	10,8
Lote 3	AMFS	4,4	0,14	3,2
	AMP	4,2	0,10	2,4
	BSF	4,7	0,22	4,7
	JS	11,0	0,08	0,7
	LCCS	5,5	0,12	2,2
	OHP	4,5	0,30	6,6
	AO	3,6	0,13	3,6
	PLM	4,4	0,22	5,0
Lote 4	AFA	4,3	0,12	2,8
	VDP	2,5	0,09	3,7
	VP	2,6	0,10	3,9
	RUD	0,9	0,04	4,4
	MSO	1,3	0,06	4,8
Lote 5	FCL	4,6	0,07	1,5
	JANC	11,5	0,09	0,8
	MPAS	0,9	0,03	3,4
	MCCS	6,4	0,24	3,8
	SM	1,8	0,06	3,3
	SSP	5,1	0,25	4,9
	VVR	6,2	0,14	2,3
Lote 6	AMP	4,7	0,08	1,7
	AP	6,3	0,12	1,9
	MBSS	3,5	0,07	2,0

Capítulo 7 - Aplicação do método desenvolvido e validado

	ZCF	5,3	0,11	2,1
	AMFS	5,6	0,14	2,5
	AO	4,8	0,20	4,1
	SRM	3,6	0,24	6,6
Lote 7	ACM	3,8	0,06	1,6
	AVS	10,3	0,25	2,4
	GSS	0,1	0,00	4,0
	JS	14,3	0,12	0,8
	JANC	18,4	0,34	1,8
	JGS	3,5	0,08	2,3
	LCCS	8,8	0,24	2,7
	ROD	2,7	0,12	4,4
	RF	3,9	0,04	1,0
Lote 8	BSF	7,0	0,10	1,4
	CAA	1,8	0,03	1,6
	JSR	0,3	0,00	0,7
	JMS	3,1	0,01	0,3
	OHP	5,7	0,12	2,1
	PLM	5,6	0,09	1,6
	RUD	1,4	0,06	4,3
	VP	3,8	0,13	3,4
	ZCF	6,4	0,12	1,9
Lote 9	AMFS	9,6	0,12	1,2
	CR	7,6	0,10	1,3
	FCL	5,8	0,15	2,6
	MPAS	1,4	0,07	5,1
	MBSS	4,3	0,13	3,0
	MCCS	7,6	0,09	1,2
	SSP	5,1	0,05	1,0
	VVR	8,3	0,10	1,2
Lote 10	MSO	2,4	0,12	5,0
	SEM	4,5	0,15	3,3
	MCCS	11,2	0,10	0,9
	JANC	19,8	0,09	0,5
Lote 11	AVS	10,3	0,11	1,1
	CAA	1,9	0,10	5,3
	JSR	1,6	0,09	5,8
	JGS	3,6	0,08	2,2
	LNV	1,6	0,05	3,2
	MBSS	5,5	0,12	2,2

Capítulo 7 - Aplicação do método desenvolvido e validado

	ROD	17,5	0,13	0,7
	RF	5,1	0,13	2,6
	ZCF	7,6	0,12	1,6
Lote 12	JMS	4,3	0,12	2,8
	SSP	5,1	0,18	3,5
Lote 13	ARS	4,7	0,12	2,5
	ACM	5,3	0,10	1,9
	AFA	5,5	0,14	2,6
	CR	8,6	0,08	0,9
	JGS	5,7	0,09	1,6
	RF	5,9	0,08	1,4
Lote 14	PLM	7,2	0,12	1,7
	TDBGM	3,7	0,09	2,4
Lote 15	AVS	15,4	0,25	1,6
	SM	5,2	0,09	1,7
Lote 16	GSS	0,4	0,00	0,5
	ROD	21,2	1,03	4,9
	VDP	4,5	0,15	3,3
Lote 17	JSR	2,8	0,08	2,9
	JMS	6,6	0,07	1,1
Lote 18	SM	11,6	0,12	1,0
	VDP	5,7	0,10	1,7
Lote 19	CAA	2,2	0,03	1,4
	FCL	6,1	0,10	1,6
	TDBGM	4,9	0,07	1,4

- Os resultados apresentados representam uma média de 4 replicatas de injeção de cada extrato analisado.

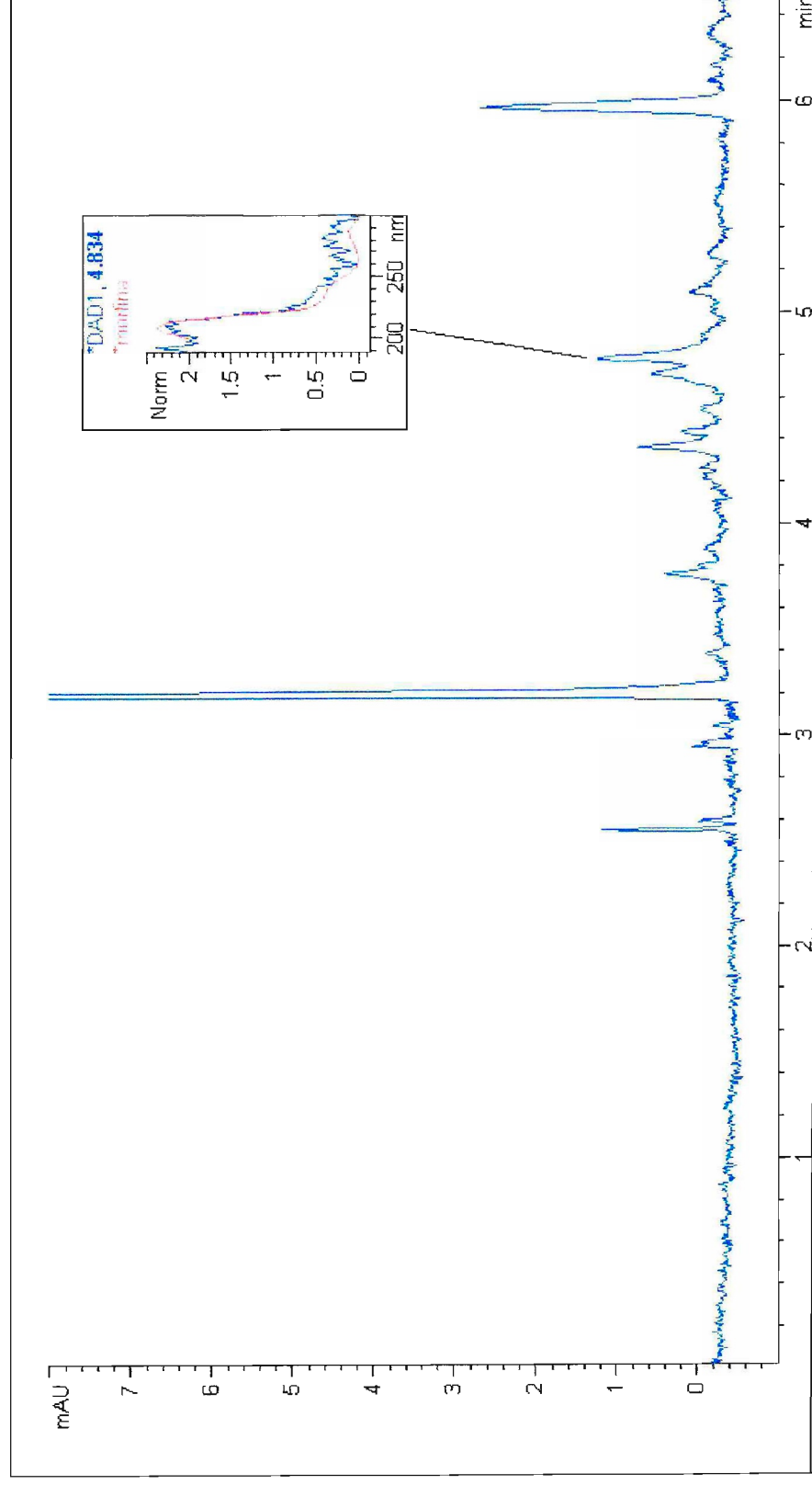


Figura 7.1 – Eletroferograma do extrato de cabelo de JANC mostrando o espectro UV do pico referente à morfina obtido em linha durante a realização da análise comparado com o espectro referente à morfina padrão que foi adquirido nas mesmas condições analíticas instrumentais do extrato de cabelo analisado. Eletrólito de corrida: tampão fosfato 20 mmol/L, pH 2,5; injeção 5 s/5 kV, 25 kV durante a análise; detecção em 200 nm e 25°C de temperatura

7.2 – Avaliação dos resultados obtidos com base nas informações clínicas disponíveis

Foram fornecidas informações à respeito da idade, peso, cor de cabelo, dosagem de morfina auto-administrada de cada paciente cujo cabelo foi coletado e analisado para verificação da relação entre dosagem terapêutica administrada e a concentração de morfina determinada no cabelo (“taxa de metabolização”). Estas informações foram sumarizadas na Tabela 7.2.

Tabela 7.2 – Informações clínicas disponíveis dos pacientes cujas amostras de cabelo foram analisadas

pacientes	cor de cabelo	morfina no cabelo(mg)	dosagem autoadminstrada (mg)	Taxa de metabolização
9-BSF	0	2,31	100,0	0,02
9-BSF	0	1,74	92,0	0,02
9-BSF	0	1,73	100,0	0,02
8-VP-	0	1,29	56,0	0,02
8-VP-	0	0,74	56,0	0,01
8-VP-	0	0,66	56,0	0,01
7-OA	0	0,74	60,2	0,01
7-OA	0	0,79	42,0	0,02
7-OA	0	0,65	42,0	0,02
6-ACM	1	1,54	47,0	0,03
6-ACM	1	0,71	42,0	0,02
6-ACM	1	0,19	50,0	0,00
5-AMP	2	1,13	51,2	0,02
5-AMP	2	1,25	75,2	0,02
5-AMP	2	0,36	70,4	0,01
4-LCCS	3	0,56	88,0	0,01
4-LCCS	3	0,06	15,0	0,00
4-LCCS	3	0,64	81,0	0,01
3-VVR	3	1,54	88,0	0,02
3-VVR	3	0,21	15,0	0,01
3-VVR	3	1,46	81,0	0,02
35-JSR	3	1,13	46,0	0,02
35-JSR	3	0,88	48,0	0,02
35-JSR	3	0,32	47,0	0,01
34-CAA	3	0,82	24,6	0,03
34-CAA	3	0,77	37,6	0,02
34-CAA	3	0,85	42,0	0,02
33JMS	3	0,68	75,2	0,01
33JMS	3	0,91	73,6	0,01
33JMS	3	0,83	40,0	0,02
32GSS	3	0,21	76,8	0,00
32GSS	3	0,71	72,0	0,01
32GSS	3	0,78	76,8	0,01
31JGS	3	0,68	80,0	0,01
31JGS	3	0,20	73,6	0,00
31JGS	3	2,97	78,4	0,04
30AVS	3	0,58	42,0	0,01
30AVS	3	0,23	35,0	0,01
30AVS	3	1,08	42,0	0,03
2-OHP	3	0,86	46,0	0,02
2-OHP	3	0,95	39,2	0,02
2-OHP	3	0,41	35,0	0,01
29-RD	3	0,63	47,0	0,01
29-RD	3	0,65	36,0	0,02
29-RD	3	1,05	45,0	0,02
28-RF	3	0,93	92,0	0,01
28-RF	3	0,76	84,0	0,01
28-RF	3	0,57	90,0	0,01
27-ZCP	3	0,01	52,0	0,00
27-ZCP	3	0,77	96,0	0,01

Capítulo 7 - Aplicação do método desenvolvido e validado

27-ZCP	3	0,72	92,0	0,01
26-MBSS	4	0,14	38,4	0,00
26-MBSS	4	0,87	38,4	0,02
26-MBSS	4	1,32	38,4	0,03
25-SSP	4	0,80	53,4	0,02
25-SSP	4	0,94	57,6	0,02
25-SSP	4	2,14	56,4	0,04
24-FCL	4	0,28	0,0	#DIV/0!
24-FCL	4	0,13	0,4	0,33
24-FCL	4	0,29	0,0	#DIV/0!
23-SM	4	0,95	84,0	0,01
23-SM	4	0,04	94,0	0,00
23-SM	4	0,54	100,0	0,01
22-MCCS	4	0,64	40,8	0,02
22-MCCS	4	0,48	48,0	0,01
22-MCCS	4	0,65	52,8	0,01
21MSO	4	0,37	5,0	0,07
21MSO	4	0,58	18,0	0,03
21MSO	4	0,36	48,0	0,01
20-AFA	4	0,14	23,4	0,01
20-AFA	4	0,77	24,6	0,03
20-AFA	4	2,76	25,2	0,11
10-TD	5	0,50	18,0	0,03
10-TD	5	0,86	18,4	0,05
10-TD	5	0,19	18,0	0,01
1-JS	5	0,38	50,4	0,01
1-JS	5	0,79	33,6	0,02
1-JS	5	0,98	53,2	0,02
19-JANC	5	0,55	82,8	0,01
19-JANC	5	0,69	72,0	0,01
19-JANC	5	0,84	72,0	0,01
18-VDP	5	0,20	94,0	0,00
18-VDP	5	0,63	68,8	0,01
18-VDP	5	0,70	77,4	0,01
17-RD	5	0,45	100,0	0,00
17-RD	5	0,65	96,0	0,01
17-RD	5	0,39	70,0	0,01
16-AMFS-	5	0,76	90,0	0,01
16-AMFS-	5	0,94	84,0	0,01
16-AMFS-	5	0,54	54,0	0,01
15-SRM	5	1,44	47,0	0,03
15-SRM	5	0,84	58,8	0,01
15-SRM	5	0,93	58,8	0,02
14-PLM	5	0,84	49,0	0,02
14-PLM	5	1,13	45,5	0,02
14-PLM	5	1,64	45,0	0,04
13-AP	5	0,66	58,8	0,01
13-AP	5	1,74	75,6	0,02
13-AP	5	0,27	52,8	0,01
12CR	5	0,86	80,0	0,01
12CR	5	1,68	80,0	0,02
12CR	5	0,52	75,2	0,01
11-MAPAS	5	0,68	75,2	0,01
11-MAPAS	5	0,91	75,2	0,01
11-MAPAS	5	0,53	75,2	0,01

Capítulo 7 - Aplicação do método desenvolvido e validado

Os valores discriminados para a coloração dos cabelos referem-se a: 0 são cabelos tingidos, 1 são os cabelos de coloração branca, 2 são os cabelos de coloração cinza (grisalhos), 3 são os cabelos de coloração loira, 4 refere-se ao cabelos de coloração marrom ou castanha e 5 aos cabelos de coloração preta. A seguir são mostrados alguns gráficos correlacionando-se a dosagem de morfina encontrada no cabelo com a dosagem de morfina auto-administrada.

Correlação 0,01

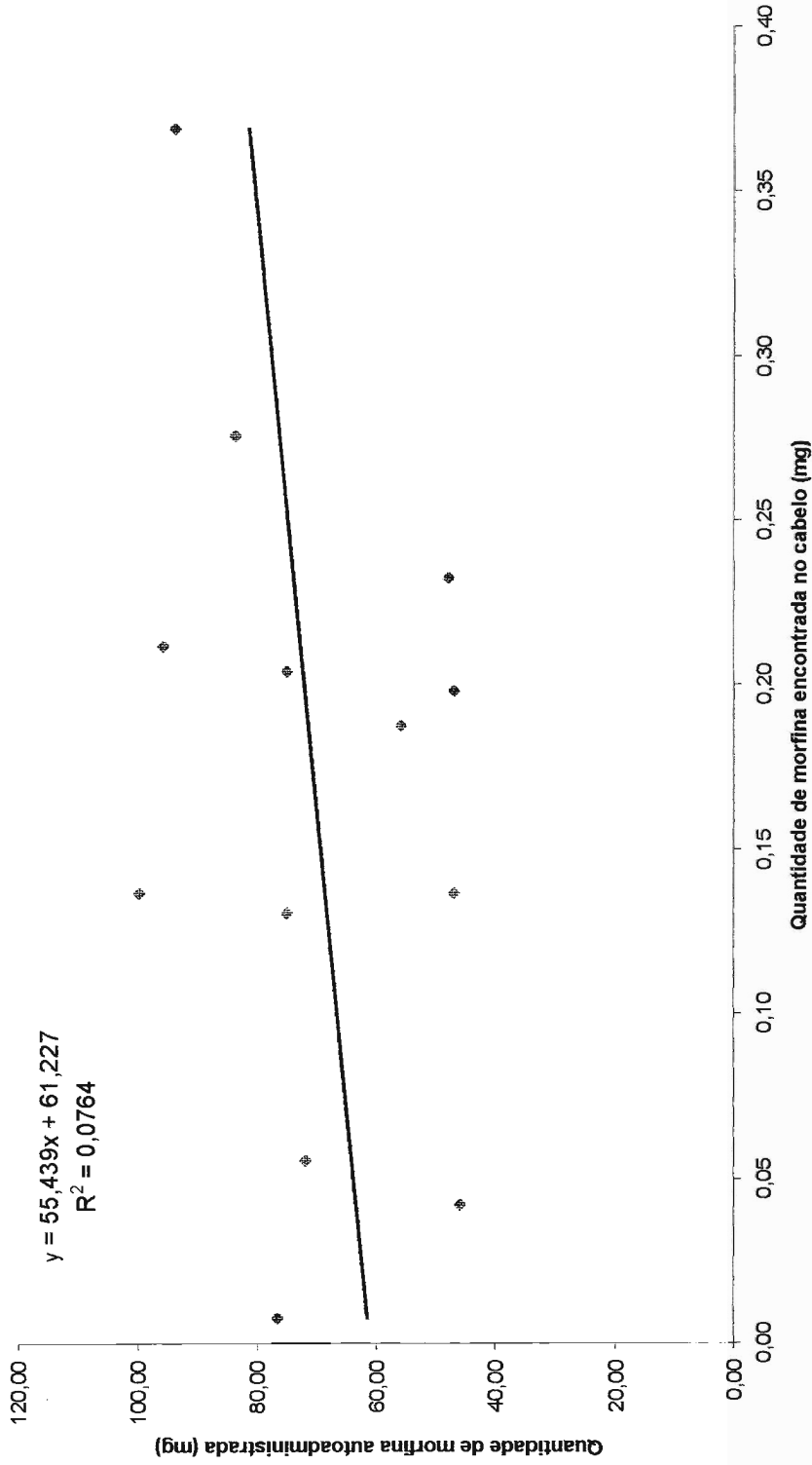


Figura 7.2 – Gráfico de correlação para morfina encontrada no cabelo vs dosagem de morfina autoadministrada. Pacientes foram agrupados para a taxa de metabolização 0,01.

Quantidade de morfina presente no cabelo/quantidade de morfina autoadministrada = 0,03

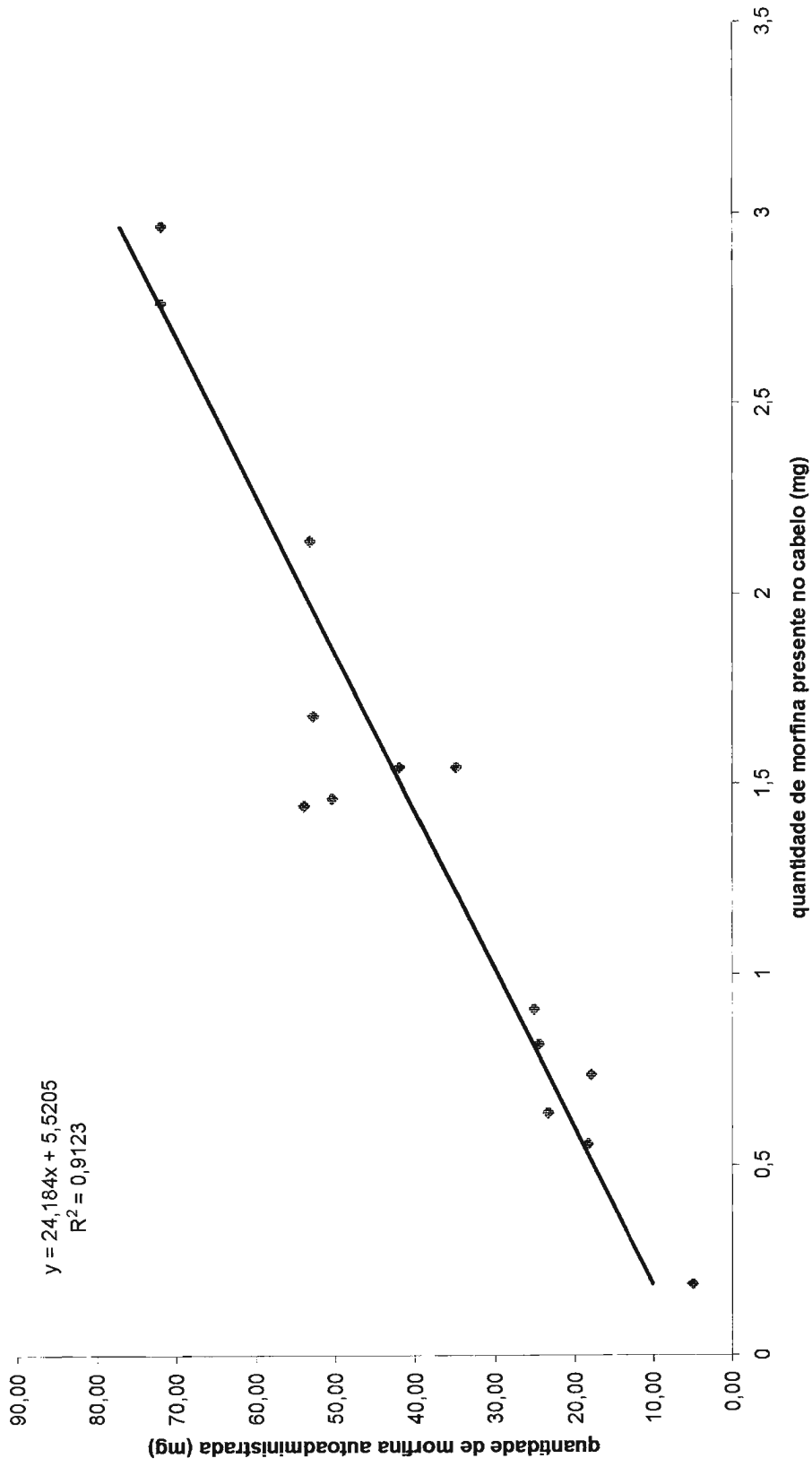


Figura 7.3 - Gráfico de correlação para morfina encontrada no cabelo vs dosagem de morfina auto-administrada. Pacientes foram agrupados para a taxa de metabolização 0,03.

Capítulo 7 - Aplicação do método desenvolvido e validado

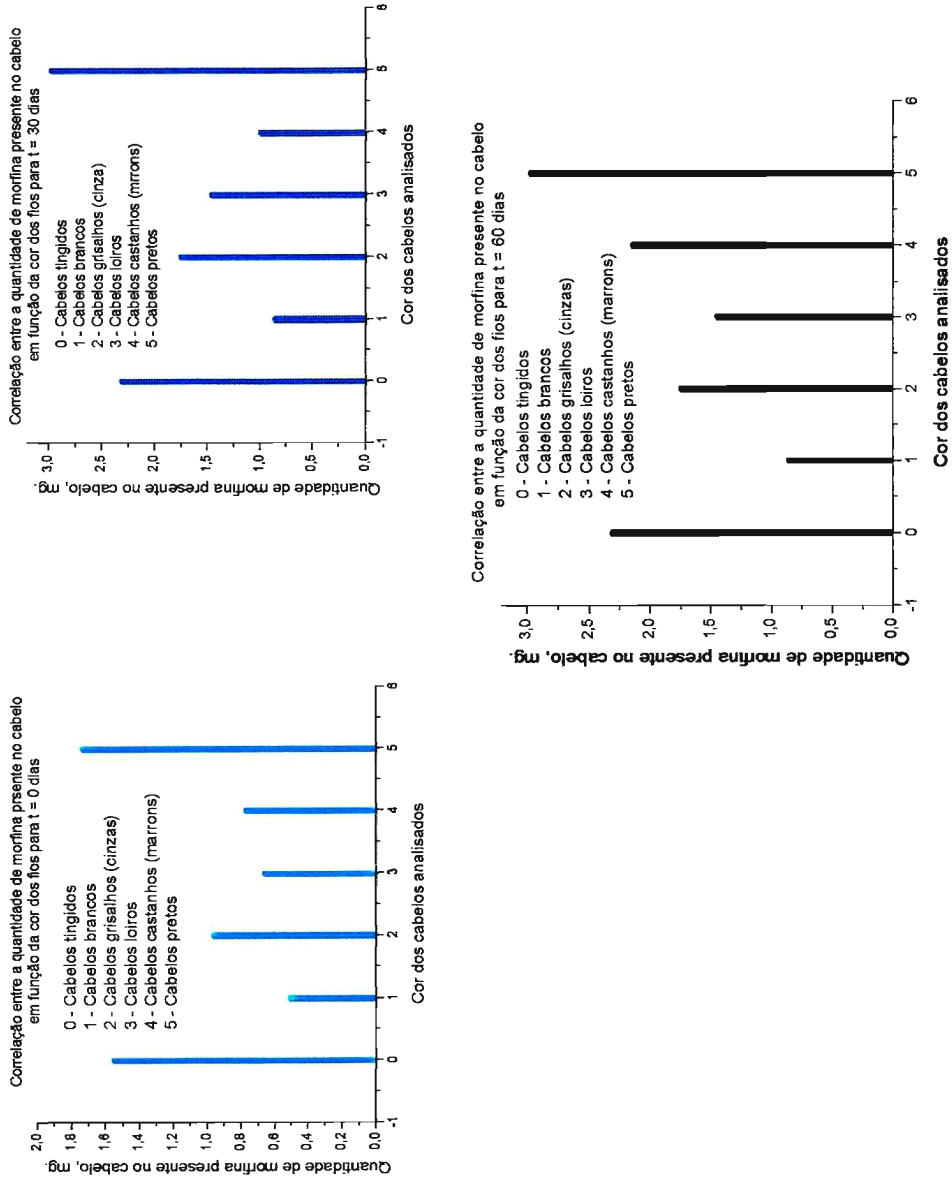


Figura 7.4 – Distribuição quantidade de morfina encontrada no cabelo (mg) com a coloração dos cabelos analisados.

Capítulo 7 - Aplicação do método desenvolvido e validado

Os gráficos apresentados nas Figuras 7.2 e 7.3 mostram que é possível a realização de estudos de ajuste de dosagem terapêutica através da correlação entre a quantidade de morfina presente no cabelo e a dosagem de morfina que os pacientes receberam no período em que foram feitas as amostragens. Constatou-se que os cabelos de coloração escura (pretos e castanhos) acumulam mais morfina do que os cabelos claros confirmando teorias citadas na literatura que sugerem que as drogas se agregam à estrutura capilar através da melanina. Através dos gráficos mostrados nas Figuras 7.2 e 7.3 pode-se inferir também que estudos de farmacodinâmica podem ser desenvolvidos utilizando-se o cabelo como matriz. Outros estudos de interpretação clínica ainda estão sendo avaliados e envolvem estudos muito criteriosos.

7.3 – Conclusões

- O método desenvolvido foi aplicado com sucesso na determinação de morfina em uma gama variada de amostras de cabelo.
- Estudos de disposição cinética de fármacos são passíveis de realização utilizando-se o cabelo como matriz analítica alternativa.

LCE

Laboratório de Cromatografia e Eletroforese Capilar

CAPÍTULO 8

8 – Eletrocromatografia capilar (CEC) e análise de opiáceos

Eletrocromatografia (CEC, do inglês capillary electrochromatography) é o termo utilizado para se referir às separações que são conduzidas em tubos de sílica fundida empacotados com diferentes fases estacionárias.

Na eletrocromatografia capilar, a separação ocorre através da partição do soluto entre o eletrólito condutor (fase móvel) e uma fase estacionária, geralmente do mesmo tipo daquela utilizada em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), embora neste caso a fase móvel é bombeada eletricamente por ação do fluxo eletrosmótico e não por pressão, como em cromatografia líquida. O uso do fluxo eletrosmótico para bombeamento da fase móvel em cromatografia líquida de alta eficiência foi discutido pela primeira vez por Pretorius e colaboradores¹²⁸. Uma das dificuldades que retardou o desenvolvimento desta técnica foi o preparo e a operação com colunas capilares empacotadas. Em 1981 Jorgensem e Luckas¹²⁹ descreveram a separação de 9-metil-antraceno em perileno uma coluna de 170 µm de diâmetro interno empacotada com material de fase-reversa de 10 µm de diâmetro. O solvente utilizado como fase móvel foi acetonitrila e embora uma separação com resolução relativamente baixa (~ 60000 pratos/m) provaram o uso de fluxo eletrosmótico em uma coluna capilar empacotada. Mas foi a partir de 1987 com a publicação de um trabalho com forte embasamento teórico e prático por Knox e Grant^{130, 131} que um número cada vez maior de pesquisadores passaram a ter um maior interesse pela técnica e cada vez mais vários trabalhos passaram a ser publicados mostrando diferentes aplicações da

¹²⁸ V. Pretorius; B. J. Hopkins; J. D. Schieke, *J. Chromatogr.*, 99 (1974), 23.

¹²⁹ J. Jorgensen e Luckacs; *J. Chromatogr.*, 218 (1981), 209.

¹³⁰ J. H Knox; I. H. Grant, *Chromatographia*, 24 (1987), 135.

¹³¹ J. H Knox; I. H. Grant, *Chromatographia*, 32 (1991), 317.

CEC como uma técnica de separação alternativa para matrizes de diferentes características químicas.

A eletrocromatografia capilar reúne várias das vantagens de uma técnica de separação minituarizada, incluindo o baixo consumo de solventes, pequeno volume de amostra, boa sensibilidade de massa, alta eficiência de coluna e baixo custo operacional.

Pode-se utilizar como fase estacionária partículas com diâmetros menores que as utilizadas em HPLC, da ordem de 1 μm ou menor, o que promove um ganho de eficiência de separação. Como o fluxo de fase móvel é induzido pelo campo elétrico, não há queda de pressão ao longo da coluna devido às partículas do recheio, outra vantagem em relação à HPLC.

Finalmente, a instrumentação usada em CEC é essencialmente a mesma utilizada em eletroforese capilar convencional.

Desde de que não ocorra uma pressão de retorno é possível o uso de fases estacionárias com partículas de diâmetros diminutos de 1 e 2 μm de diâmetro. Outra vantagem é o fluxo da fase móvel, que sendo dirigido pela tensão que é aplicada no capilar proporciona separações com muito maior eficiência.

8.1 – Alguns aspectos operacionais da CEC

Em CEC, as separações são geralmente conduzidas em um tampão formado por uma fase aquosa combinados com um solvente orgânico, geralmente metanol ou acetonitrila.

Ao contrário da HPLC ou μLC , o uso de partículas tão diminutas em CEC só é possível devido ao fluxo eletrosmótico (EOF), pois uma vez que a

formação do fluxo é induzida pelo campo elétrico, não há queda de pressão ao longo do capilar. Dessa forma, o uso de partículas com cerca de 0,5 μm em colunas com 250 mm não chega a ser problemático como na técnica de HPLC¹³².

Assim como em FSCE, o EOF em CEC origina-se a partir da dupla camada elétrica que se forma devido à ionização dos grupos silanóis em contato com um eletrólito que preenche a coluna capilar sob a ação do campo elétrico aplicado.

A Figura 8.1¹³³ representa um capilar de sílica fundida preenchido com uma fase estacionária do tipo octadecilsílica que possui grupamentos eletronegativos em sua estrutura (silanóis residuais).

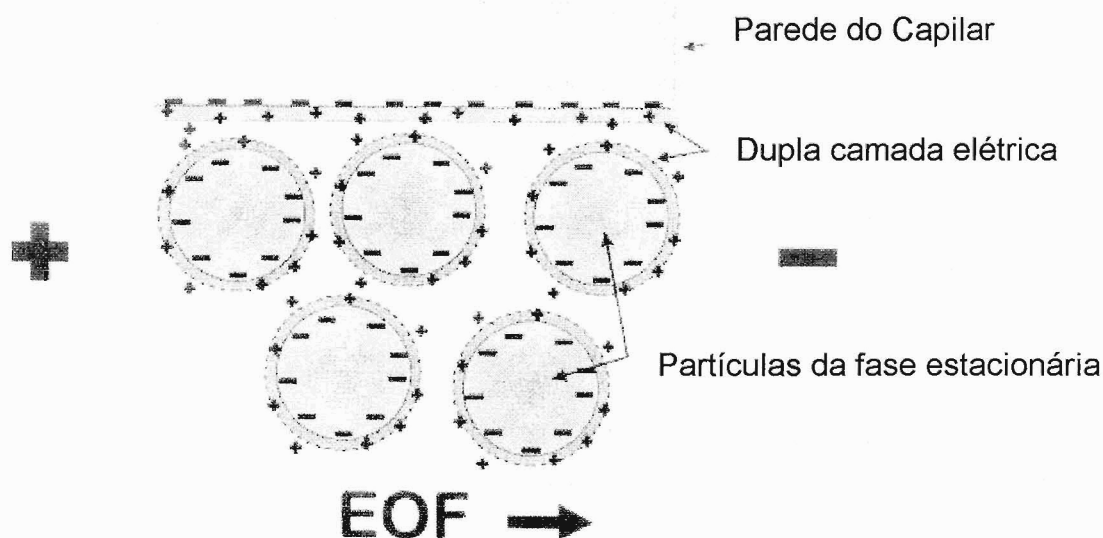


Figura 8.1 – Representação esquemática da origem do fluxo eletrosmótico (EOF) num capilar de sílica fundida com uma fase estacionária com grupos ionizáveis.

¹³² K. D. Bartle; P. Mayers, *J. Chromatogr. A*, 916 (2001), 3.

¹³³ M. M. Dittmann; G. P. Rozing; *J. Chromatogr. A*, 744 (1996), 63.

Na Figura 8.1 está representado o caso de uma coluna preenchida com um eletrólito, cujo valor de pH permite que os grupamentos das partículas da fase estacionária sejam ionizados e que com a aplicação de um campo elétrico há a formação do EOF, fazendo com que os analitos presentes no meio sejam carregados até o pólo de carga oposta sob a ação do EOF.

8.2 – Instrumentação

Qualquer equipamento utilizado para CE pode ser utilizado para a realização de análise por CEC. Porém, como é mostrado na literatura¹³⁴ há a necessidade de se pressurizar os recipientes contendo o eletrólito de corrida com cerca de 5 a 10 Bar. Esta necessidade advém do fato que um dos maiores problemas encontrados na utilização do EOF em colunas capilares recheadas que é a formação de bolhas no sistema. A origem da formação destas bolhas ainda não está completamente entendida, porém, sabe-se que é de fundamental importância que estas sejam suprimidas para a manutenção da corrente elétrica para que as análises em CEC sejam realizadas.

8.2.2 – Desenvolvimento de método utilizando CEC

A) Cuidados a serem tomados com colunas CEC antes de seu uso:

- 1 - Antes de a coluna ser instalada no Capilar deve-se verificar se há falhas e/ou partes secas na camada recheada da coluna. A coluna não deve apresentar falhas na camada recheada, especialmente próximo à frita presente na saída da coluna (outlet).
- 2 - Montar um sistema utilizando uma bomba de HPLC para condicionamento da coluna e eventuais trocas de fase móvel. São necessárias durante estas

operações o uso de altas pressões porém não superiores a 60 Bar. E antes de conectar a coluna à bomba deve-se verificar se todo o sistema da bomba esteja preenchido com o solvente desejado.

3 – Deve-se iniciar a aplicação da pressão lentamente para evitar impactos na camada recheada. Da mesma forma, a queda da pressão deve ser feita de forma gradativa.

B) Procedimentos de condicionamento e uso da coluna CEC no equipamento

CE

1 – Aplicar uma pressão de 12 Bar no *inlet* (entrada da coluna) durante 15 min e depois 12 Bar no *outlet* (saída da coluna) durante 15 minutos também.

2 – Aplicar 12 bar no inlet até que a linha de base esteja estável.

3 – Aplicar + 5kV até que a linha base e corrente estejam estáveis (variação da corrente não deve ser maior que 0,3 μ A). Uma vez estável, deve-se aumentar a tensão de 5 em 5 kV até atingir a substituir desejada.

4 – Deixar a coluna sob ação da substituir desejada durante 15 minutos.

C) Teste para coluna:

Como sugestão para teste inicial de uma coluna CEC o procedimento descrito por Dittmann e Rozing¹³⁵ é uma sugestão de guia a ser utilizado.

8. 3 – Resultados preliminares obtidos utilizando-se colunas CEC

A seguir serão mostrados alguns dos resultados obtidos utilizando colunas comerciais CEC adquiridas junto à Unimicro Technologies, colunas da marca Electropack. Na Tabela 8.1 as condições experimentais e demais

¹³⁴ N. W. Smith; M. B. Evans; *Chromatographia*, 38 (1994), 649.

¹³⁵ M. M. Dittmann; G. P. Rozing *in Theory and Practice of Capillary Electrochromatography*, Chapter 5 – *Handbok of Capillary Electrophoresis*; J. P. Landers; Second Edition; CRC Press; 1997, Boca Raton.

parâmetros químicos utilizados para os testes preliminares com as colunas CEC utilizadas são mostras.

Tabela 8.1 – Condições analíticas exploradas para o teste de colunas CEC

Equipamento	Agilent CE com software de aquisição de dados Chemstation
Colunas	EP75-30-3-C ₁₈ *
Fase móvel	1 (25 mmol/L trisHCl, pH 8,0):4 Acetonitrila
Amostra	Solução 100 mg/L constituída por tiouréia, antraceno, naftaleno, benzaldeído e álcool benzílico
Tensão Aplicada	25 e 30 kV
Detecção	200 nm
Injeção	2 s/5 kV
Temperatura	20°C

*Coluna CEC de 75 µm de i.d, 30 cm de comprimento de coluna empacotada com partículas de 3 µm de diâmetro, material C₁₈

Nas Figuras 8.2 e 8.3 são mostrados os resultados obtidos para os testes preliminares.

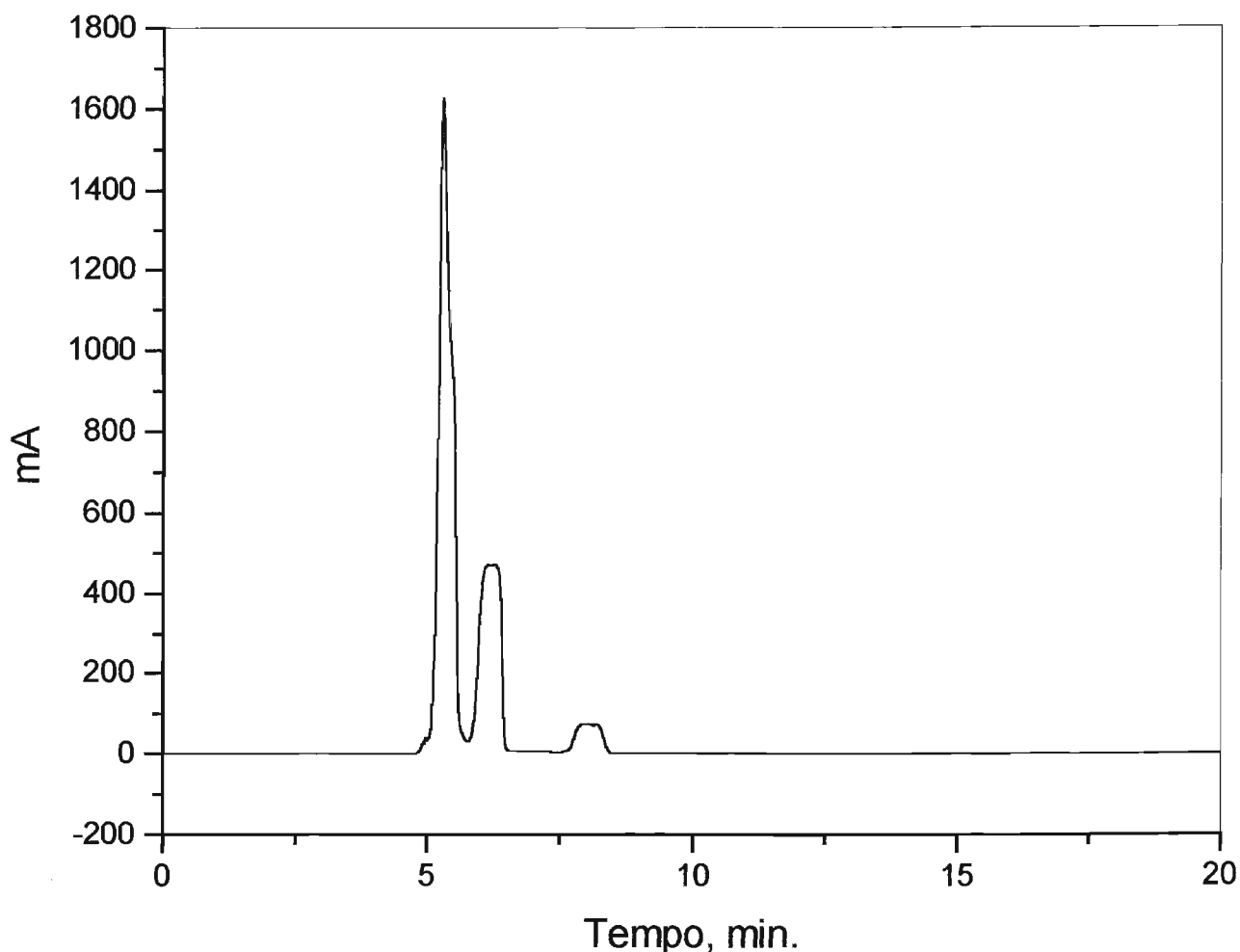


Figura 8.2 – Eletrocromatograma obtido para a mistura teste 100 mg/L discriminada na Tabela 8.1 utilizando-se coluna CEC EP-75-30-3-C₁₈ ; fase móvel 1:4 (v/v de 25 mmol/L TrisHCl, pH 8,0 + Acetonitrila), injeção da amostra 2 seg/5 kV, substituir 25 kV, 200 nm, 20°C de temperatura.

Através da Figura 8.1 verifica-se que a concentração da mostra estava muito alta, foi feita uma diluição desta amostra e ela foi novamente injetada na coluna utilizando-se a mesma fase estacionária e variando-se apenas a tensão aplicada durante a corrida. Na Figura 8.2 são mostrados os resultados obtidos.

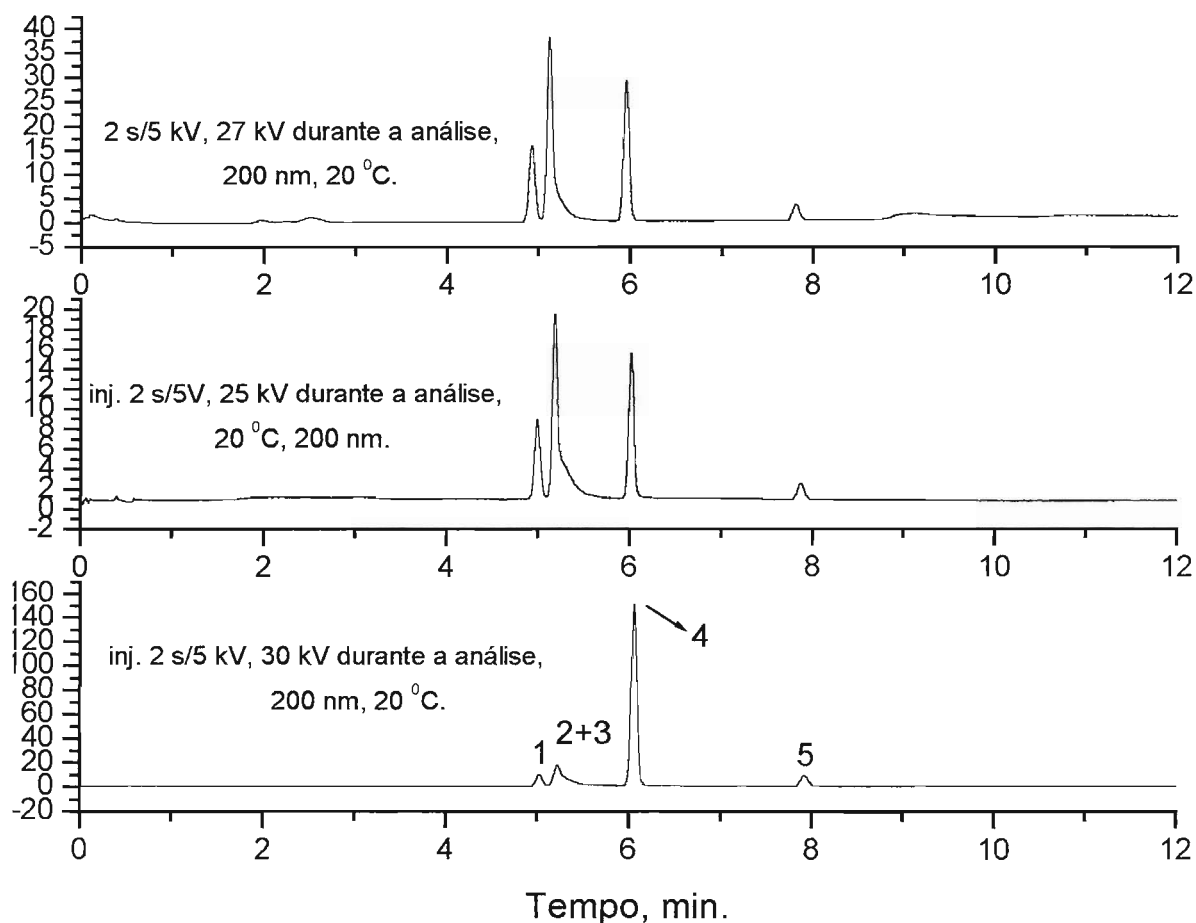
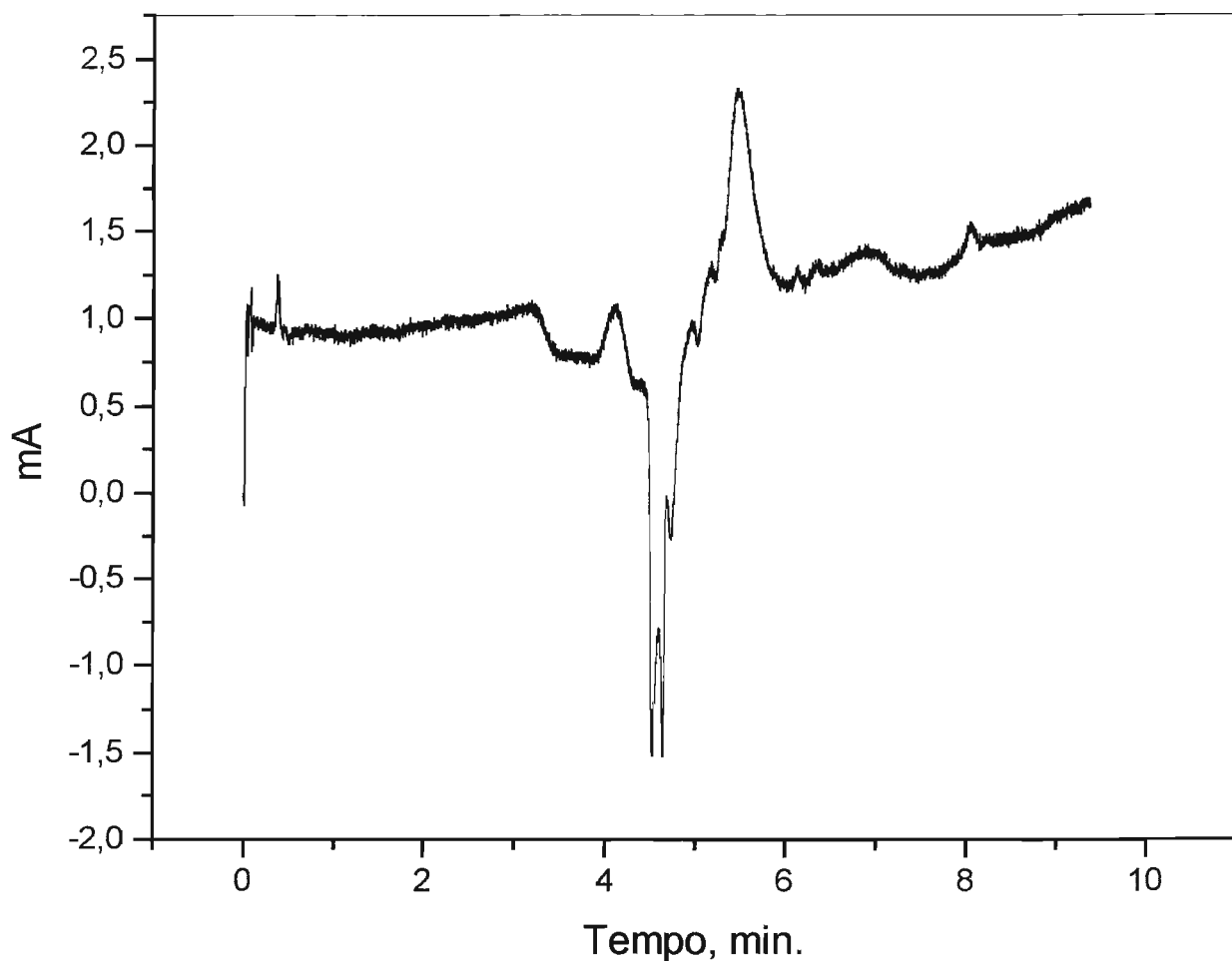


Figura 8.3 – Eletrocromatogramas obtidos utilizando-se a coluna CEC EP-75-30-3-C₁₈. Os picos referem-se a: 1) tiouréia; 2+3)benzaldeído+álcool benzílico; 4)naftaleno e 5) Antraceno. As condições analíticas relativas à injeção de amostra, substituir aplicada durante a análise , comprimento de onda de detecção e temperatura encontram-se dentro da Figura.

Os picos foram identificados por adição de padrão e comparação de espectros feitos durante as análises. Não foi possível a separação dos picos 2 e 3 relativos ao benzaldeído e álcool benzílico. Na Figura 8.3 é mostrado o

eletrocromatograma obtido para a mistura de padrões *mix seven* 50 mg/L diluída na mesma fase móvel utilizada para os experimentos anteriores.



**Figura 8.4 – Eletrocromatograma obtido para a mistura de padrões *mix A* .
Condições de análise: inj. 2 s/5 kV, 25 kV durante a análise, 200 nm, 20°C de
temperatura.**

Através da Figura 8.3 pode-se afirmar que não foi obtido um resultado positivo utilizando-se a fase móvel constituída por tampão 25 mmol/L TrisHCl, pH 8,0 + acetonitrila (1:4, v/v) para a análise da mistura de padrões *mix seven* 50 mg/L. A fim de se obter uma separação CEC para esta mistura de padrões foi

feita um novo condicionamento da coluna com uma nova fase móvel constituída por 20mmol/L de tampão fosfato pH 2,5 + acetonitrila (1:1, v/v). O experimento foi realizado utilizando-se as mesmas condições experimentais descritas na Figura 8.3, porém novamente não foi alcançado nenhum resultado, pois a coluna quebrou. Estas colunas são muito frágeis, durante o processo de condicionamento aplicando-se pressão externa a coluna rompeu-se.

Jong-Tae Lim e colaboradores¹³⁶ mostraram a separação de uma mistura formada por 6 opiáceos (morfina, hidromorfona, nalorfina, codeína, oxycodona e diacetilmorfina); utilizando como fase móvel 10mmol/L tris, pH 8,3 /5mmol/L SDS/20% de acetonitrila coluna CEC ODS, com partículas de 1,5 µm. Com base nos resultados obtidos por Lim e colaboradores³⁵ verifica-se a viabilidade do emprego da técnica CEC para a separação de misturas de opiáceos.

8.4 – Conclusões

Através dos resultados apresentados pode-se inferir que:

- A técnica CEC pode ser aplicada como técnica de separação e identificação de diferentes matrizes analíticas.
- A CEC ainda é uma metodologia nova que cada vez mais vem sendo estudada e entendida merecendo um estudo mais criterioso.

¹³⁶ Jong-Tae Lim; R. N. Zare; C. G. Bailley; D. J. Rakestraw; C. Yan; *Electrophoresis*, 21 (2000), 737.

**L
M
C
E**

Laboratório de Cromatografia e Eletroforese Capilar

CAPÍTULO 9

9 - Conclusões gerais e perspectivas futuras

9.1 - Conclusões gerais

A eletroforese capilar (CE), no modo FSCE utilizado no presente trabalho mostrou ser uma técnica alternativa bastante atrativa e viável para a análise de fármacos/drogas de abuso em cabelo, com tempos de análise reduzidos comparando-se às técnicas de HPLC e GC-GC/MS que são rotineiramente aplicadas neste tipo de análise.

A metodologia desenvolvida para a determinação dos principais opióides utilizados em clínica médica a partir do cabelo e, validada especificamente para morfina, apresentou boa linearidade ($R > 0,99$), valores de limite de detecção e quantificação da ordem de 0,064 mg/L (ou 0,12 ng de morfina/mg de cabelo) e 0,214 mg/L (ou 0,37 ng de morfina/mg de cabelo) respectivamente, precisão e exatidão adequadas (erro relativo $< 20\%$), valores de recuperação média de 81,9% e seletividade apropriada e especificidade única, testada para 4 principais interferentes. O nível de morfina nas amostras de cabelo provenientes de pacientes selecionados (Grupo da Dor do Hospital das clínicas da Universidade de São Paulo – HCFMUSP) variou de 1,3 a 18,4 ng de morfina/mg de cabelo.

Além disso, foram otimizadas 2 separações de misturas de opióides: uma envolvendo os principais opióides utilizados em clínica médica e outra contendo esses mesmos opióides acrescida de seus metabólitos. A primeira mistura de padrões foi separada utilizando-se tampão fosfato 20 mmol/L, pH 2,5. A Segunda mistura de padrões foi separada utilizando-se tampão fosfato 60 mmol/L, pH 2,5 contendo 8 mmol/L β -ciclodextrina e 4 % de metanol.

Capítulo 9 - Conclusões Gerais e perspectivas Futuras

O método validado foi aplicado com sucesso a uma gama variada de amostras reais.

Os resultados aqui apresentados sugerem que a realização de estudos de para a verificação do uso de drogas de abuso utilizando-se o cabelo como matriz analítica alternativa podem ser viáveis.

9.2 – Perspectivas Futuras

Seria interessante aplicar a metodologia de análise desenvolvida neste trabalho a amostras de cabelo de diferentes procedências, não só do ambiente clínico.

A metodologia FSCE-CD desenvolvida para a análise de diferentes classes de opióides pode ser validada.

Seria interessante também o desenvolvimento de uma metodologia CE para a análise de outras classes de fármacos/drogas de abuso utilizando-se outras matrizes alternativas como suor, lágrima entre outros.

**L
/ C
E**

Laboratório de Cromatografia e Eletroforese Capilar

ANEXO 1

