

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Emanuela Cunha de Oliveira

Desenvolvimento de método de extração por ponteiros descartáveis (DPX) de cocaína e benzoilecgonina em amostra de cabelo

Florianópolis

2022

Emanuela Cunha de Oliveira

Desenvolvimento de método de extração por ponteiros descartáveis (DPX) de cocaína e benzoilecgonina em amostra de cabelo

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.
Orientador: Prof. Dra. Camila Marchioni.

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

de Oliveira, Emanuela Cunha

Avaliação da extração em ponteiras descartáveis (DPX) de cocaína e benzoilecgonina em amostra de cabelo / Emanuela Cunha de Oliveira ; orientador, Camila Marchioni, 2022.

42 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. DPX. 3. Cocaína. 4. Benzoilecgonina. 5. Análise em cabelo. I. Marchioni, Camila. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. III. Título.

Este trabalho é dedicado à minha mãe Solange Martinha Cunha,
por sempre lutar por mim e nunca ter me deixado desistir.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente não citarei nomes, pois corro o risco de não me recordar do nome de todos os envolvidos ao decorrer da caminhada de realização deste trabalho.

A toda a equipe de pesquisa do Laboratório de Pesquisas Toxicológicas por todo o apoio na realização dos experimentos.

A minha orientadora por me proporcionar todo o auxílio necessário para a elaboração deste trabalho.

A todos os professores do curso que através de todo o ensinamento contribuíram para que hoje eu possa estar concluindo este trabalho.

A Polícia Científica de Santa Catarina, por firmar parceria com a Universidade em busca de novas técnicas para aperfeiçoamento de suas análises.

Aos familiares e amigos, por todo o apoio e pela ajuda, que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus pais e irmãos, que me incentivaram nos momentos difíceis e compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho.

RESUMO

As drogas de abuso estão diretamente relacionadas a crimes, apesar de as restrições e leis definidas ao seu uso. O uso da cocaína (COC), um alcaloide estimulante do sistema nervoso central, é um grande problema na sociedade brasileira. O número de usuários de COC cresce gradativamente, o que demanda exames toxicológicos com aplicação forense. A toxicologia forense é a ciência responsável por averiguar se há ou não a presença de drogas lícitas ou ilícitas em amostras biológicas que possam ter contribuído para um ato criminoso. Para a análise toxicológica forense, muitas vezes, as amostras convencionais, como sangue e urina, não estão em condições viáveis de análise, o que leva a necessidade de utilização de amostras não convencionais, como o cabelo. Essa matriz apresenta uma longa janela de detecção, entretanto é uma amostra complexa, demanda um adequado procedimento de preparo de amostra. O método de extração deve ser eficiente, prático, rápido, barato e produzir o menor volume possível de resíduos químicos. A extração em ponteiras descartáveis (DPX) promete cumprir todos esses requisitos, sendo um método de extração em fase sólida que utiliza uma ponteira contendo a fase sortiva entre dois filtros. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um método de extração por DPX dos analitos COC e benzoilecgonina (BE) em amostra de cabelo e análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD). A metodologia consistiu primeiramente na coleta das amostras preferencialmente a partir da região do vértice posterior da cabeça, o mais próximo possível do couro cabeludo. Na próxima etapa, as amostras passaram pelos procedimentos de lavagem, fragmentação e digestão. Em seguida, foram submetidas à extração com as ponteiras DPX onde foram avaliados: no condicionamento da fase sortiva, o pH; na aplicação da amostra, novamente o pH e o tempo de equilíbrio; na lavagem, diferentes sequências de solventes; e na eluição o tempo de equilíbrio e a solução eluente. O produto da extração foi analisado por cromatografia empregando CLAE-DAD. Após a avaliação de cada parâmetro de forma univariada, as porcentagens de recuperação dos analitos foram aproximadamente 83% de COC e 79% de BE. Foi desenvolvido um método de preparo da amostra de cabelo para análise de COC e BE eficiente, prático, rápido, barato, com produção de menor volume de resíduos químicos, em comparação com a Extração em Fase Sólida (EFS) e com uma porcentagem satisfatória de recuperação, possibilitando, após a validação, a aplicação na área forense.

Palavras-chave: DPX, EFS, CLAE-DAD, cocaína, benzoilecgonina, cabelo e forense.

ABSTRACT

Drugs of abuse are directly related to crimes despite restrictions on use and defined laws. The use of cocaine (COC), an alkaloid stimulant of the central nervous system, is a major problem in Brazilian society. The number of COC users grows gradually, demanding toxicological tests with forensic application. Forensic toxicology is the science responsible for ascertaining whether or not legal or illegal drugs exist in biological samples that may have contributed to a criminal act. For forensic toxicological analysis, conventional samples, such as blood and urine, are not often in viable conditions for analysis, which leads to the need to use unconventional samples, such as hair. This matrix has a long detection window. However, as it is a complex sample, it demands an adequate sample preparation procedure. The extraction method must be efficient, practical, fast, cheap, and produce the smallest possible volume of chemical residues. Disposable tip extraction (DPX) promises to fulfill all these requirements, being a solid-phase extraction method that uses a tip containing the sorptive phase between two filters. Given the above, the objective of this work was to develop a method of DPX extraction of COC and benzoylecgonine (BE) analytes in hair samples and analysis by high-performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD). The methodology consisted primarily of collecting samples preferably, from the posterior region of the head, as close as possible to the scalp. In the next step, the samples went through the washing, fragmentation, and digestion procedures. Then, they were subjected to extraction with DPX tips where they were evaluated: in the conditioning of the sorption phase, the pH; in the application of the sample, the pH and the equilibrium time; in the washing, a different sequence of solvents; and in the elution the equilibrium time and the eluent solution. The extraction product was analyzed by chromatography using HPLC-DAD. After univariate evaluation of each parameter, the percentages of analyte recovery were approximately 83% COC and 79% BE. Therefore an efficient, practical, fast, inexpensive method of preparing the hair sample for COC and BE analysis was developed, with the production of a smaller volume of chemical residues, compared to Solid Phase Extractions (SPE), and with a satisfactory percentage of recovery, allowing, after validation, the application in the forensic area.

Keywords: DPX. SPE. HPLC-DAD. Cocaine. Benzoylecgonine. Hair. Forensic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Produtos de biotransformação da cocaína	14
Figura 2 – Diagrama das etapas da DPX	19
Figura 3 – Fluxograma de pré-preparo da amostra.....	24
Figura 4 – Método de extração de COC e BE da matriz cabelo em cartuchos de EFS (DSC-MCAX 300 mg, 3 mL Sigma Aldrich®)	25
Figura 5 – Adaptação inicial do método dos cartuchos de EFS para aplicação nas ponteiros DPX.....	30
Figura 6 – Cromatograma inicial método dos cartuchos de EFS adaptado para extração por DPX	30
Figura 7 – Avaliação da influência da solução eluente na recuperação de COC e BE na etapa de eluição.....	32
Figura 8 – Avaliação da influência do tempo de equilíbrio na recuperação de COC e BE na etapa de aplicação da amostra	33
Figura 9 – Avaliação da influência do tempo de equilíbrio na recuperação de COC e BE na etapa de eluição.....	33
Figura 10 – Avaliação da influência das soluções de lavagem na recuperação de COC e BE na etapa de lavagem.....	34
Figura 11 – Avaliação da influência do pH na recuperação de COC e BE durante a etapa de condicionamento e aplicação da amostra.....	35
Figura 12 – Método final para extração de COC e BE de amostras de cabelo por DPX.....	36
Figura 13 – Cromatograma final da extração de COC e BE por DPX	37
Figura 14 – Avaliação da solução eluente.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Técnicas de preparo da amostra de cabelo para análise de COC e produtos de biotransformação	18
Tabela 2 – Fatores avaliados na DPX	27
Tabela 3 – Quantidade de soluções utilizadas EFS x DPX.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BE – Benzoilecgonina

CLAEC-DAD - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector por Arranjo de Diodos

CEPSH/UFSC - Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina

COC – Cocaína

COMT - Catecol-O-Metil Transferase

EFS – Extração em Fase Sólida

EUA - Estados Unidos Da America

H₂O - Água

HCl – Ácido Clorídrico

MAO - Monoaminoxidase

MEFL - FO - Microextração em Fase Líquida com Fibra Oca

MEFS - HS - Microextração em Fase Sólida Headspace

MEL - Microextração em Fase Líquida

MEFS - Microextração em Fase Sólida

NH₄OH - Hidróxido de Amônio

PI – Padrão interno

PC/SC – Polícia Científica de Santa Catarina

SNC – Sistema Nervoso Central

UNODC – do inglês United Nation Office on Drug and Crime

UV - Ultravioleta CG-MS - Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas;

LISTA DE SÍMBOLOS

μL - Micro litro

® - Marca Registrada

© - do inglês Copyright

% - Percentual

mL - Mililitro

n° - Número

cm - Centímetro

ng - Nanograma

mg - Miligrama

μg - Micrograma

rpm - Rotações por Minuto

v - Volume

°C - Graus Celsio

s - Segundos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	COCAÍNA.....	13
1.2	AMOSTRAS NÃO CONVENCIONAIS: CABELO	16
1.3	MÉTODOS ANALÍTICOS PARA ANÁLISE DE COC E BE.....	17
2	OBJETIVOS	21
2.1	OBJETIVO GERAL	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3	MATERIAIS E MÉTODO.....	22
3.1	Padrões, reagentes e soluções.....	22
3.2	INSTRUMENTAL	22
3.3	AMOSTRA	22
3.4	PRÉ-PREPARO DA AMOSTRA	23
3.5	Preparo da amostra por DPX.....	24
3.6	Condições cromatográficas	28
3.7	RECUPERAÇÃO	28
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	29
4.1	PRÉ-PREPARO DA AMOSTRA	29
4.2	preparo da amostra por DPX.....	29
4.2.1	Avaliação dos parâmetros da DPX	31
4.2.1.1	<i>Avaliação da solução eluente.....</i>	<i>31</i>
4.2.1.2	<i>Avaliação do tempo de equilíbrio.....</i>	<i>32</i>
4.2.1.3	<i>Avaliação dos solventes de lavagem.....</i>	<i>34</i>
4.2.1.4	<i>Avaliação do pH.....</i>	<i>35</i>
4.3	comparação da técnica de dpx e efs.....	37
5	CONCLUSÃO.....	40
	REFERÊNCIAS.....	41

1 INTRODUÇÃO

1.1 COCAÍNA

A cocaína (COC) é um alcaloide estimulante do sistema nervoso central (SNC) e anestésico local. É extraído das folhas de uma planta nativa da América do Sul, a *Erythroxylon coca*, conhecida como coca ou epadu (nome dado pelos índios brasileiros) (CEBRID, 2012).

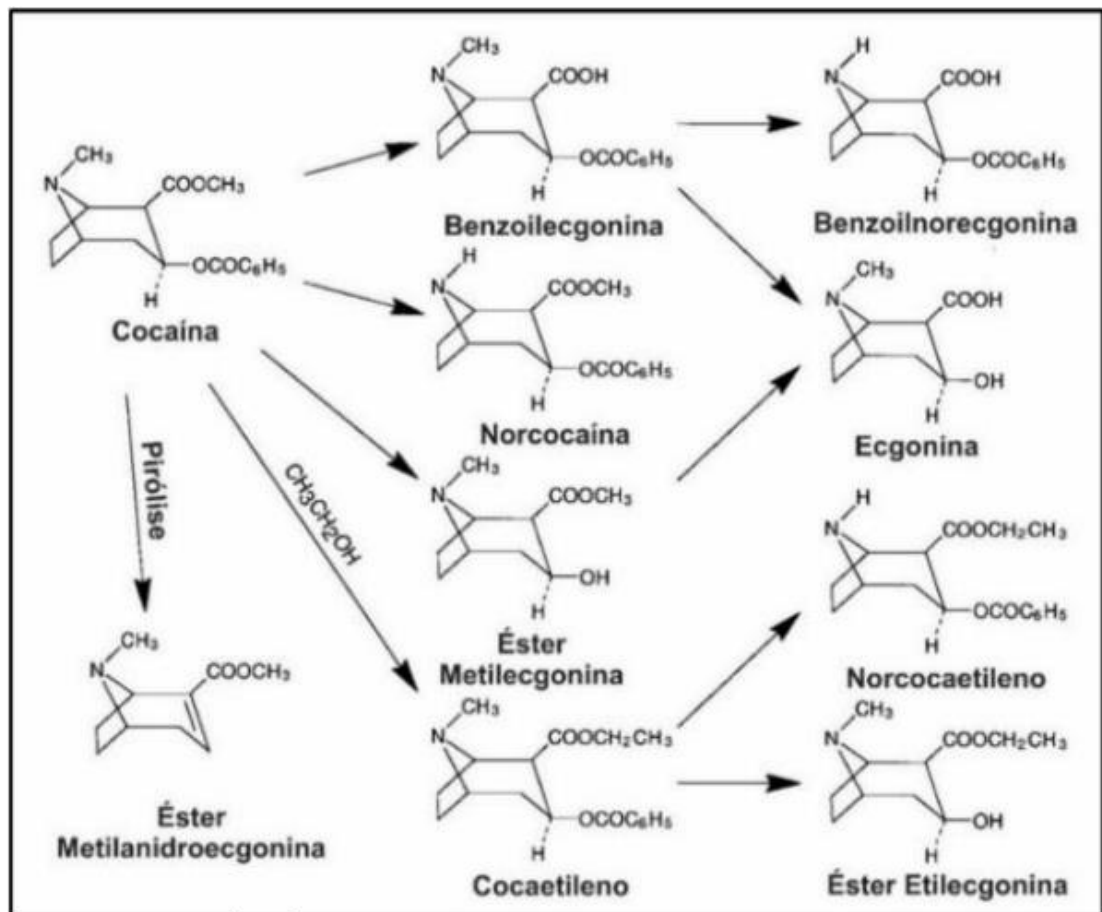
Antes mesmo da COC ser isolada da planta *Erythroxylon coca*, as folhas eram utilizadas principalmente na forma de chá e também mascadas, hábito ainda presente na cultura de povos andinos (CEBRID, 2012). Atualmente, é considerada uma droga de abuso, consumida, principalmente, em duas formas: (1) como cloridrato de COC, sal sólido cristalino e branco, em pó, que pode ser aspirado, ingerido ou injetado; ou, (2) na forma de pasta base (crack), que pode ser fumado (JAGERDEO; ABDEL-REHIM, 2009).

A COC é bem absorvida por todas as vias de administração, mas a biodisponibilidade é variável. Por via oral ou intranasal, 60 a 80% da COC é absorvida. Após a administração oral, a COC é absorvida em cerca de 30 minutos, atingindo uma concentração máxima entre 50-90 minutos (MANTOVANI *et al.*, 2015). Por inalação, a absorção pode variar de 20% a 60%, estando a variabilidade relacionada à vasoconstrição secundária. Por via nasal, os efeitos são evidentes em 3 minutos depois da administração e duram de 30 a 60 minutos, sendo o pico de concentração plasmática em torno de 15 minutos. O início de ação para a COC fumada é de 7 a 10 segundos, enquanto por via injetável é de 30 a 45 segundos, contudo, em ambas as vias, é necessário 3 a 5 minutos para se alcançar o pico plasmático. Após entrada na corrente circulatória, a COC é rapidamente distribuída pelos tecidos, sobretudo cérebro, baço, rins, pulmão, coração, músculo, fígado, pelos e cabelo. No indivíduo saudável, a COC apresenta volume de distribuição entre 1 a 3 L/Kg, depuração de 2,10 L/minuto e meia-vida de eliminação entre 0,5 a 4,0 horas (dependendo do padrão do consumo) (MANTOVANI *et al.*, 2015; QUENTAL, 2015).

Após sua absorção, a COC é biotransformada, pelas enzimas monoaminoxidase (MAO) e catecol-O-Metil Transferase (COMT), em benzoilecgonina (BE), sendo esse o produto de biotransformação em maior quantidade. Por reações de hidrólise a cocaína é biotransformada em ecgonina-metil-éster. A COC pode ainda ser desmetilada e convertida em norcocaína. Na presença de álcool, ocorre a transesterificação da COC a um produto de biotransformação ativo, o cocaetileno, este composto formado é mais tóxico do que a própria

COC e apresenta uma meia-vida de eliminação mais prolongada (Figura 1). Todos os produtos de biotransformação são excretados principalmente na urina, e em menor porcentagem pelas glândulas sebáceas e sudoríparas (DRUGBANK, 2018).

Figura 1 – Produtos de biotransformação da cocaína.



Fonte: Cruz, (2018).

Os efeitos ocasionados pela COC no SNC são devidos, principalmente, ao fato desta substância inibir a recaptação neuronal e estimular a liberação de dopamina, noradrenalina e serotonina, ocasionando assim a elevação da concentração na fenda sináptica desses neurotransmissores, o que leva a sensação de euforia (CARVALHO J. C, 2011).

Nos primórdios, ao ser quimicamente isolada, a COC foi utilizada em muitas preparações como anestésico local, principalmente ocular, e até mesmo como bebidas tônicas por seu potencial estimulante. Entretanto, com o decorrer do tempo, e a evolução das pesquisas, foi constatado que a COC apresenta o potencial de causar dependência (FERREIRA; MARTINI, 2001).

Somente na segunda década do século XX que começaram a surgir regulamentações e leis restritivas à COC. Em 1912, com a Convenção Internacional do Ópio, assinada em Haia, foi reconhecida a importância das drogas para as finalidades médicas e científicas, porém destacando também o risco de dependência à droga para população a qual deveria ser protegida. Em 1914, nos Estados Unidos, a Harrison Act passou a prever imposto especial sobre todos que produziam, importavam, fabricavam, negociavam, dispensavam, vendiam ou distribuíam ópio ou folhas de coca, seus sais derivados ou preparações. No Brasil, cerca de sete anos depois, foi promulgado o Decreto-lei Federal nº 4.294 de 6 de julho de 1921, que estabeleceu penalidades para os contraventores na venda de COC, ópio, morfina e seus derivados, tornando-a menos disponível para a população em geral (FERREIRA; MARTINI, 2001; CARVALHO V. M., 2011).

Mesmo com todas as restrições e leis, ainda o uso de COC é um grande problema na sociedade. Estima-se que, na América do Sul, 2,8 milhões de pessoas, ou quase 1% da população de 15 a 64 anos, eram usuários de COC no ano de 2018. Com quase 1,5 milhão de usuários de COC e crack no ano de 2019, o Brasil é o maior mercado de COC da América do Sul (UNODC, 2021).

No ano de 2015, no Brasil, o número de usuários de COC na população de 12 a 65 anos foi 0,9% da população e o número de usuários de crack e similares foi 0,3%. Na região Sul do Brasil, o número de usuários que consumiram algum tipo de substância ilícita foi 2,9% da população de 12 a 65 anos segundo pesquisa realizada por Bastos *et al.* (2017).

Neste contexto, um estudo realizado por Andreuccetti *et al.* (2018), avaliou a presença de drogas no sangue de pacientes vítimas de mortes súbitas através do ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Neste estudo, foi demonstrado que em 21,9% dos casos de mortes súbitas, inesperadas ou violentas entre junho de 2014 e dezembro de 2015, na cidade de São Paulo, havia uso de COC momentos antes do óbito. Esta porcentagem foi superada apenas pelo álcool, que estava correlacionado com 30,1% dos óbitos.

Conhecendo o impacto que a COC causa na sociedade, especialmente, sua relação com a violência, leva-se à necessidade de um acompanhamento de usuários em reabilitação e sua detecção em amostras biológicas de vítimas de mortes súbitas, inesperadas ou violentas. Para isso, métodos rápidos, fáceis e confiáveis são necessários para a detecção e/ou quantificação da COC e seu principal produto de biotransformação, BE, em matrizes biológicas (GUMUS *et al.*, 2016).

1.2 AMOSTRAS NÃO CONVENCIONAIS: CABELO

Ainda hoje as matrizes biológicas mais utilizadas são o sangue e a urina. Entretanto, estas amostras se limitam à detecção de exposições recentes. A amostra biológica cabelo está ganhando espaço uma vez que apresenta potencial para análise de uma janela de detecção mais ampla, permitindo uma coleta não invasiva, fácil armazenamento da amostra por tempo indeterminado e sem precisar controle de temperatura. Além do fato de poder ser efetuada uma segunda coleta da amostra similar à primeira para posterior análise (DOMINGUES, 2015).

Uma outra vantagem que chama atenção nessa amostra biológica é a taxa de crescimento do cabelo é de aproximadamente 1 cm por mês, assim o comprimento da seção do cabelo deve ser definido em conformidade com o período que se pretende avaliar (KINTZ *et al.*, 2008).

No decorrer das décadas de 60 e 70 o cabelo era utilizado para avaliar a exposição a metais, como arsênio, chumbo e mercúrio, porém, neste período, os métodos analíticos disponíveis não permitiam a análise de substâncias orgânicas, como as drogas de abuso (LANDIM; LANDIM; MARQUES, 2019; GORDO, 2013).

A maior parte das drogas de abuso são depositadas na matriz capilar. A impregnação das substâncias na matriz, se dá por mecanismos endógenos, como pela corrente sanguínea durante o crescimento do cabelo e das secreções de glândulas sebáceas e sudoríparas, e por mecanismos exógenos, como pela fumaça quando fumada. Assim, é importante compreender que as interpretações das concentrações dos analitos no cabelo tem algumas limitações, já que a incorporação de substâncias apresenta variações relacionadas à solubilidade lipídica da molécula, gradiente de pH entre o plasma e a célula, afinidade por melanina, taxa de crescimento, etnia e tratamentos cosméticos (LANDIM; LANDIM; MARQUES, 2019; GORDO, 2013).

A característica do cabelo de incorporar contaminantes por via exógena, mesmo o indivíduo não sendo usuário, porém convivendo com usuário que faça uso do crack, por exemplo que é fumado, poderia levar a um possível resultado falso positivo (BACIU *et al.*, 2015). Por essa característica da amostra, é que se faz necessário a etapa de lavagem do cabelo para garantir que contaminantes externos não interfiram nos resultados.

Em estudos *post mortem*, as análises na matriz cabelo revelaram ser um método que possibilita a obtenção de forma precisa do histórico de consumo de substâncias por semanas ou

meses antes da morte. Ainda havendo a possibilidade de ser usado mesmo quando em estado avançado de decomposição e putrefação (PETERSON *et al.*, 2009).

Na análise toxicológica deve-se incluir, além da COC, também um de seus produtos de biotransformação como a BE, cocaetileno ou norcocaína. Para detecção e quantificação de COC em amostra de cabelo e pelos, a Sociedade Brasileira de Toxicologia (SBTox) preconiza que um resultado só será considerado detectado na triagem de COC a partir da concentração de 0,5 ng/mg e para confirmação o valor de corte recomendado é $\leq 0,5$ ng/mg de COC e $\leq 0,05$ ng/mg de algum de seus produtos de biotransformação. Para diferenciar o uso de COC fumada das outras formas deve-se analisar seu produto de biotransformação anidroecgonina metil éster (SBTox, 2015).

1.3 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA ANÁLISE DE COC E BE

O preparo de amostra biológica é parte crucial do procedimento analítico. Essa etapa caracteriza-se pelo processo que visa isolar o analito de interesse a partir da matriz, minimizando e eliminando os interferentes (endógenos e exógenos). Além disso, propicia a concentração do analito, sendo um processo geralmente indispensável para o emprego de técnicas de detecção e quantificação das substâncias (BORDIN, 2015).

As técnicas de preparo de amostra mais utilizadas para análise de COC e seus produtos de biotransformação são: extração em fase sólida (EFS) e técnicas miniaturizadas de extração em fase sólida, como a microextração em fase sólida (MEFS). A EFS é baseada no princípio de separação à base de afinidade, pelo processo de adsorção, consistindo em uma separação líquido-sólido. As etapas dessa técnica incluem: (1) condicionamento, (2) retenção dos analitos do fluido biológico no sorvente, (3) remoção de interferentes e (4) eluição e coleta dos analitos (BORDIN, 2015). É importante lembrar que quando a amostra é sólida, como por exemplo a matriz cabelo, primeiramente ela passará pelas etapas de limpeza, fragmentação e digestão.

As técnicas miniaturizadas têm sido desenvolvidas visando a utilização mínima de solventes orgânicos, fases sortivas e amostras biológicas. Neste sentido, em 1990, foi desenvolvida a microextração em fase sólida (MEFS) por Arthur e Pawliszyn. Outras técnicas miniaturizadas foram ainda propostas, como a extração em ponteira descartável (DPX, do inglês Disposable Pipette Extraction).

A cromatografia gasosa é definida como um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura que se distribui em duas fases intimamente conectadas: a fase

estacionária contida na coluna e a fase móvel, denominada gás de arraste, que percorre pela coluna, contendo o analito. Na Tabela 1, são descritos alguns exemplos de técnicas de preparo da amostra de cabelo para análise de COC e produtos de biotransformação.

Tabela 1 - Técnicas de preparo da amostra de cabelo para análise de COC e produtos de biotransformação

Analitos	Amostra	Descrição do Método		LOQ	Referência
		Extração	Sistema de Detecção		
Cocaína	Cabelo	EFS	CLAE-DAD	0,36 µg/mL	Cruz (2018)
Benzoilecgonina				0,38 µg/mL	
Cocaína e Benzoilecgonina				> 0,1-0,03 ng/mg	
Cocaína e metabólitos		MEFS		0,2 ng/mg	Aleksa <i>et al</i> (2012)
Cocaína		MEFS - HS	CG-EM	0,01-0,012 ng/mg	Merola <i>et al</i> (2010)
Cocaína		MEL		0,5 ng/mg	Pego <i>et al</i> (2017)
Benzoilecgonina				0,05 ng/mg	
Cocaína		MEFL - FO		0,1 ng/mg	Scanferla <i>et al</i> (2021)
Benzoilecgonina				0,05 ng/mg	

Onde: CG-EM - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas; MEFL - FO - Microextração em fase líquida com fibra oca; CLAE-DAD - Cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de diodos; MEFS - HS - Microextração em fase sólida headspace; MEL - Microextração em fase líquida; EFS - Extração em fase sólida; MEFS - Microextração em fase sólida.

A DPX é uma alternativa de método de extração em fase sólida. Quando comparada aos cartuchos de SPE, a extração em ponteiros DPX é de maior praticidade por dispensar o uso de vácuo. Além de ser uma técnica simples, rápida e eficiente, a DPX necessita de pequenas

quantidades de amostra e solvente orgânico, apresentando boa recuperação e possibilidade de automatização (OLIVEIRA; LANÇAS, 2018).

As ponteiros de DPX apresentam o sorvente disperso em seu interior delimitado por um filtro inferior, que permite fluxo de fluídos para ambos os sentidos, e outro superior que funciona como barreira impedindo a passagem de qualquer material fluido ou sólido, permitindo o uso de pipetadores ou seringas. A fase extratora é condicionada com um solvente apropriado para ativação dos sítios de ligações. Após o condicionamento, a amostra líquida (ou extrato) é aspirada para o interior da ponteira e misturada à fase extratora por meio da entrada de ar, resultando em uma completa mistura da amostra com a fase extratora. Seguida de uma etapa de lavagem que também é realizada por meio da entrada de ar na ponteira juntamente com os solventes. Finalmente o solvente de eluição é aspirado para o interior da ponteira, seguido da aspiração de ar e eluição dos analitos (PINTO; QUEIROZ, 2015).

Figura 2 – Diagrama das etapas da DPX.



Fonte: Adaptado de DPX Technologies - TECHNOLOGY OVERVIEW - Bind-Wash-Elute Workflow (2019).

Após o preparo da amostra, os analitos são detectados e quantificados através da análise instrumental. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), consiste na separação dos compostos através da interação com a fase móvel e a fase estacionária. Após a separação cromatográfica, os analitos são identificados no detector. O Detector de Arranjo de Diodos (DAD) possui a capacidade de realizar análise em diversos comprimentos de onda

simultaneamente, permitindo selecionar o comprimento de onda em que o analito tem melhor resposta analítica (LATORRE, 2013).

Com o desenvolvimento da pesquisa a hipótese testada foi de que a DPX seja uma técnica eficiente, com boa recuperação, barata e utilizando pequenas quantidades de sorvente, solventes e amostra biológica. Presume-se ainda que a extração por DPX, devido a fase sortiva não estar compactada no interior da ponteira, portanto, apresentando maior superfície de contato, terá maior facilidade de interação com os analitos, levando a uma melhor recuperação quando comparado à EFS.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método de extração por ponteiros descartáveis (DPX) de cocaína e benzoilecgonina em amostra de cabelo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as etapas de condicionamento, aplicação da amostra, lavagem e eluição do procedimento de extração de COC e BE por DPX em cabelo.
- Determinar a porcentagem de recuperação da extração de COC e BE realizada em DPX.
- Comparar a porcentagem de recuperação da extração de COC e BE por DPX e EFS previamente validado no laboratório.

3 MATERIAIS E MÉTODO

3.1 PADRÕES, REAGENTES E SOLUÇÕES

Para a execução da pesquisa foram utilizados padrão de COC (1 mg/mL) e de BE (1 mg/mL), obtidos da Cerilliant Corporation® (Texas, EUA) e da Polícia Federal (Brasil), respectivamente. Como padrão interno (PI) foi utilizado a articaína 4%, obtida da empresa Nova DFL® (Rio de Janeiro, Brasil). Os reagentes utilizados foram: Acetato de Amônio procedente da Sigma Aldrich® (Missouri, EUA); Acetonitrila da Tedia® (Fairfield, EUA); Ácido Acético glacial UV/CLAE fornecido pela Dinâmica® (São Paulo, Brasil); Ácido Clorídrico supra puro, Clorofórmio P.A. ACS, Diclorometano P.A. e Fosfato de Potássio Dibásico todos fornecidos pela Vetec® (Rio de Janeiro, Brasil); Fosfato de Potássio Monobásico da Dinâmica® (São Paulo, Brasil); Hidróxido de Amônio fornecido pela Êxodo Científica® (São Paulo, Brasil); Hidróxido de Sódio da Vetec® (Rio de Janeiro, Brasil); Isopropanol P.A. ACS da Dinâmica® (São Paulo, Brasil); Metanol LiChrosolv® da Merck® (Darmstadt, Alemanha); e Tween 80 da Splabor® (São Paulo, Brasil). Todas as soluções de trabalho foram preparadas com água tipo 1, com exceção dos padrões que foram diluídos em acetonitrila.

3.2 INSTRUMENTAL

Foram utilizados na etapa pré-cromatográfica: banho ultrassom da Unique® (São Paulo, Brasil), centrífuga da Datamed® (São Paulo, Brasil), concentrador de amostra miVac, Genevac®, (Ipswich, Reino Unido) e estufa da empresa Binder® (BadenWürttemberg, Alemanha). Foram utilizadas as ponteiras de extração descartáveis da empresa DPX Technologies® de 1mL com fase sortiva composta por grupos sulfônicos de troca catiônica (DPX-SCX) (Columbia, Estados Unidos) e micropipeta de volume variável de 100 a 1000 µL. Para a análise cromatográfica foi utilizado o Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, modelo Finnigan Surveyor da empresa Thermo SCIENTIFIC® (Massachusetts, EUA), composto por amostrador automático (Surveyor Autosampler Plus), bomba quaternária (Surveyor LC Pump Plus) e detector de arranjos de diodos (Surveyor PDA Plus Detector).

3.3 AMOSTRA

Para a realização da avaliação da DPX foram utilizadas amostras brancas de cabelo (isentas dos analitos) enriquecidas com os padrões de COC e BE na concentração de 50 µg/mL.

Conforme as recomendações da SBTox (2015), as amostras de cabelo foram coletadas preferencialmente a partir da região do vértice posterior da cabeça, o mais próximo possível do couro cabeludo. Essa região apresenta menor variação na taxa de crescimento. A coleta foi realizada por profissional devidamente treinado, perante o consentimento do doador. As amostras foram armazenadas em envelopes de papel a temperatura ambiente e identificadas apenas com a data da coleta, para preservação da identidade do doador.

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC) e aprovado sob o protocolo de número 42155115.5.0000.012.

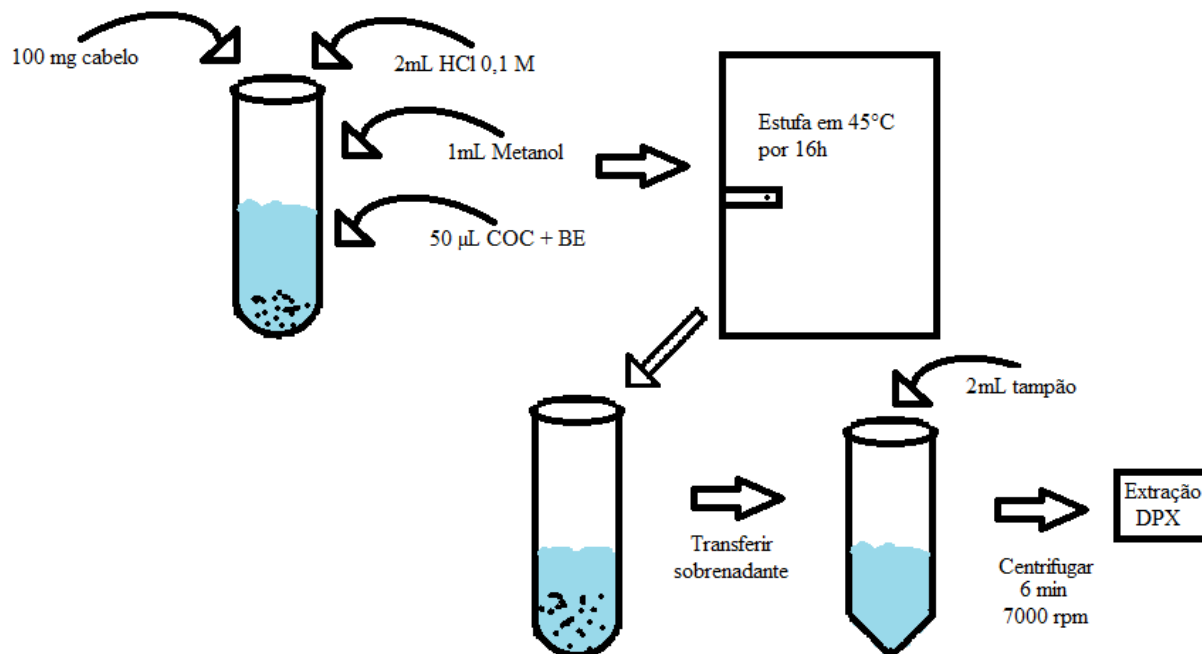
3.4 PRÉ-PREPARO DA AMOSTRA

Baseado no protocolo de Cruz (2018), com pequenas modificações, o preparo da amostra se deu da seguinte forma: as amostras de cabelo foram lavadas empregando surfactante Tween 80 a 0,1 % e mantidas em banho de ultrassom por 5 min, seguida de sucessivas lavagens com água do tipo 1, até a retirada do tensoativo. Na sequência, foi adicionado às amostras diclorometano, submetendo-as novamente ao banho de ultrassom por 5 minutos. Após sucessivos enxágues com água do tipo 1, as amostras foram submetidas à secagem em temperatura ambiente sobre papel filtro.

Após a secagem, a amostra foi fragmentada com auxílio de um aparador de pelos, diferindo de protocolos anteriores que utilizavam a tesoura. As amostras de cabelo foram seccionadas em pequenos fragmentos com cerca de 1 mm, dentro de uma placa de petri sobre papel filtro, e posteriormente macerados em gral e pistilo de vidro.

A etapa final de preparo da amostra, consistiu no processo de digestão em tubo de ensaio com capacidade de 10 mL. Foi adicionado 100 mg de cabelo previamente fragmentado, 1 mL de HCl 0,1 M, 1 mL de metanol e 50 µL de solução de COC e BE na concentração de 50 µg/mL. O sistema foi mantido em estufa a 45°C por 16 horas, após esse período o sobrenadante foi transferido para tubo de fundo cônico do tipo falcon e foram adicionados 2 mL de tampão fosfato pH 2,5, finalizando com centrifugação por 6 minutos a 7000 rpm para sedimentação de possíveis fragmentos de cabelo remanescentes no sobrenadante (Figura 3).

Figura 3 – Fluxograma de pré-preparo da amostra.

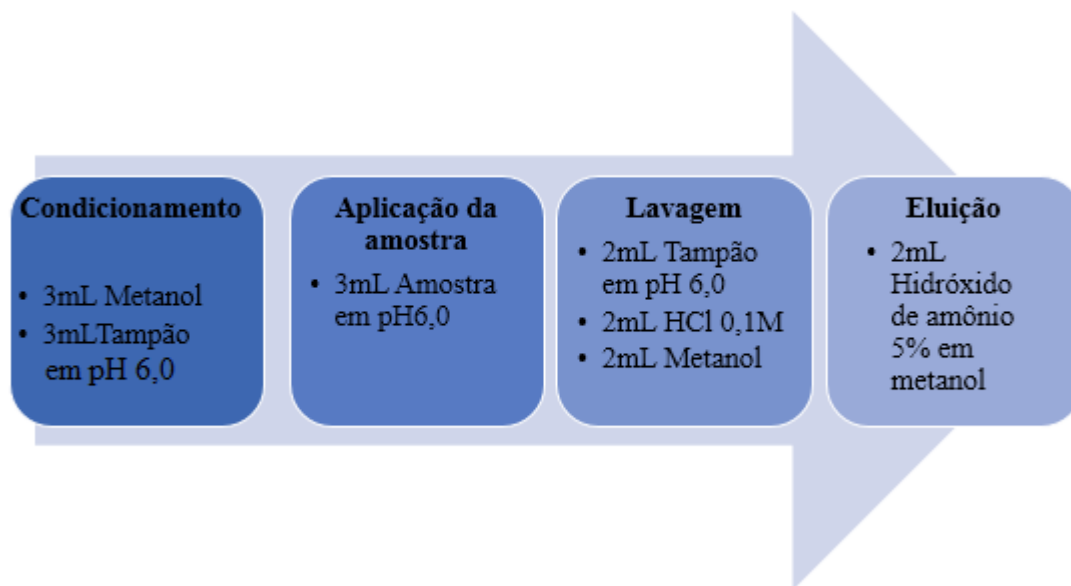


Fonte: A autora (2022).

3.5 PREPARO DA AMOSTRA POR DPX

O procedimento inicial avaliado na DPX teve como premissa o método de extração em cartuchos de EFS (Figura 4) de COC e BE da matriz cabelo validado previamente por Cruz (2018). Para a realização da extração com os cartuchos de EFS é necessário acoplá-los em um sistema Manifold ligado a uma bomba de vácuo. O procedimento consiste em adicionar as soluções no cartucho, já acoplado no sistema à vácuo, e com o auxílio da válvula controlar o fluxo de passagem da solução pela fase extratora. É um procedimento que exige habilidade do analista, particularmente, quando se faz mais de uma extração ao mesmo tempo. Requer um volume consideravelmente maior de soluções e maior tempo de execução quando comparado à DPX.

Figura 4 - Método de extração de COC e BE da matriz cabelo em cartuchos de EFS (DSC-MCAX 300 mg, 3 mL Sigma Aldrich®) (Cruz, 2018)



Fonte: A autora (2022).

A extração de COC e BE da matriz cabelo foi realizada empregando DPX. As ponteiros são constituídas de fase sortiva com grupos sulfônicos de troca catiônica (DPX-SCX).

Para avaliação inicial da extração DPX, foram aplicadas as mesmas soluções utilizadas para a extração por EFS conforme avaliado por Cruz (2018). O objetivo foi inferir se os resultados seriam semelhantes aos obtidos com a técnica clássica, mantidas as devidas proporções de volume.

Inicialmente a fase extratora foi condicionada com uma sequência de solventes apropriados para ativação dos sítios de ligações. Após o condicionamento, a amostra pré-preparada (extrato) foi aspirada para o interior da ponteira e misturada à fase extratora por meio da entrada de ar, resultando em uma completa mistura da amostra com a fase extratora. Seguida de uma etapa de lavagem que também foi realizada por meio da aspiração de ar na ponteira juntamente com cada um dos solventes. Finalmente o solvente de eluição foi aspirado para o interior da ponteira, seguido da entrada de ar e dessorção dos analitos (PINTO; QUEIROZ, 2015).

Em cada uma das etapas da extração, foram avaliados, de forma univariada, diferentes parâmetros: primeiramente no condicionamento da fase sortiva foi avaliado o pH (6, 3 e 2,5). Para aplicação da amostra foram avaliados o pH (6, 3 e 2,5) e o tempo de equilíbrio (15, 30 e

45 segundos). Na lavagem foi avaliada diferentes sequências de solventes ([1] tampão fosfato pH 6, seguido de HCl, seguido de metanol, [2] tampão fosfato pH 6, seguido de metanol, [3] H₂O, seguido de metanol e [4] HCl, seguido de metanol). Para a etapa de eluição foram avaliados o tempo de equilíbrio (15, 30 e 45 segundos) e a solução eluente ([1] hidróxido de amônio 5% em metanol e [2] diclorometano:isopropanol:hidróxido de amônio 5% em metanol 78:20:2 v/v/v) (Tabela 2). Após o procedimento de extração em ponteira DPX, o eluato obtido foi evaporado a 45°C em concentrador a vácuo para posterior análise quantitativa empregando CLAE-DAD.

Tabela 2 – Fatores avaliados na DPX.

Etapa	Tempo	Soluções e/ou pH	
Condicionamento	30s	Metanol ↓ Tampão pH 6,0 (sequencial)	
		Metanol ↓ Tampão pH 3,0 (sequencial)	
		Metanol ↓ Tampão pH 2,5 (sequencial)	
Aplicação da amostra	15s	pH 6,0	
	30s		
	45s		
	15s		
Lavagem	30s	pH 3,0 pH 2,5	
		Tampão pH 6,0 ↓ HCl 0,1M ↓ Metanol (sequencial)	
		Tampão pH 6,0 ↓ Metanol (sequencial)	
		H ₂ O ↓ Metanol (sequencial)	
		HCl 0,1M ↓ Metanol (sequencial)	
		15s	NH ₄ OH 5% em Metanol
		30s	
45s			
Eluição	30s	CH ₂ Cl ₂ / Isopropanol/ NH ₄ OH 5% em Metanol (78:20:2)	

Fonte: A autora (2022).

3.6 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

O produto da extração foi analisado por cromatografia, empregando CLAE-DAD. Foi utilizado uma coluna C18 (250 mm de comprimento x 4,6 mm de diâmetro x partículas de 5 µm). No sistema cromatográfico o volume de injeção foi fixado em 25 µL.

A fase móvel foi composta por: (A) Acetato de amônio 0,01 M pH 3,5 e (B) Acetonitrila. A corrida cromatográfica foi realizada em modo de eluição em gradiente, iniciando com 87%A: 13%B (v/v) e finalizando com 20%A: 80%B (v/v). O tempo total de corrida foi de 13 minutos, com fluxo da fase móvel de 0,6 mL/min. A detecção DAD foi operada em comprimento de onda de 240 nm. As condições cromatográficas utilizadas foram as mesmas já validadas em trabalho anterior no laboratório (Cruz, 2018).

3.7 RECUPERAÇÃO

Para avaliação da técnica DPX foi considerado a porcentagem de recuperação de cada analito. A recuperação pode ser obtida quando se trata de métodos que passam por pelo menos uma etapa de extração, como é o caso (UNODC, 2014).

A realização do cálculo de recuperação foi feito com amostras de cabelo enriquecidas com padrões de COC e BE (A1), na concentração de 50 µg/mL. As amostras passaram pela etapa de extração em seguida foi adicionado PI na concentração de 5µg/mL (A2). Concomitantemente, foram analisadas soluções na mesma concentração aplicadas nas amostras, porém, sem passar pelo processo de extração COC e BE (A3) e PI (A4). Após as análises o cálculo de recuperação foi realizado como demonstrado na equação (1).

$$\text{Recuperação \%} = \frac{A1/A2}{A3/A4} \times 100 \quad (1)$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

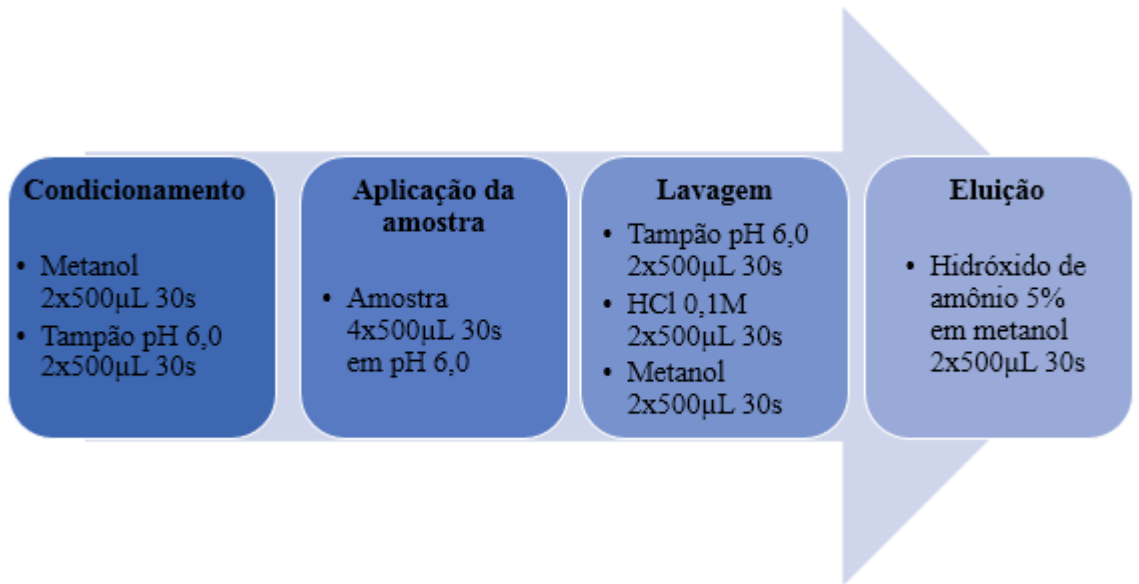
4.1 PRÉ-PREPARO DA AMOSTRA

Durante o pré-preparo da amostra, para obter mais agilidade no processo de fragmentação do cabelo e maior homogeneidade dos fragmentos, a tesoura foi substituída por um aparador de pelo elétrico comum. Foi observado que com a tesoura são necessárias mais experiência e habilidade do analista para obter os fragmentos com cerca de 1mm, assim a substituição pelo aparador elétrico permitiu um processo mais rápido, com menos perda da amostra e redução do erro.

4.2 PREPARO DA AMOSTRA POR DPX

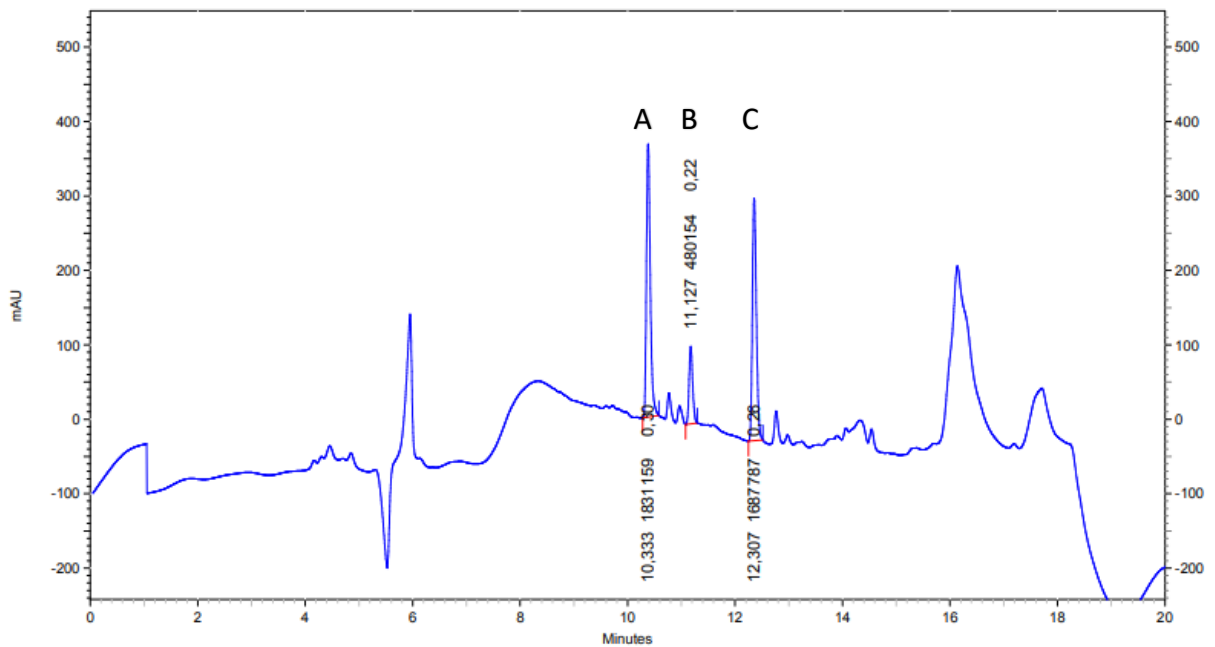
Visto a necessidade de maior habilidade do analista, tempo e quantidade de soluções para a realização da extração em cartuchos de EFS inicialmente adaptou-se o método para as especificações da DPX (Figura 5), buscando um procedimento mais simples e rápido. Para a extração em ponteiros DPX, basta acoplar a ponteira em uma micropipeta ou uma seringa. O procedimento é simples e consiste em aspirar as soluções permitindo a entrada de ar para que haja completo contato da solução com a fase sortiva livre contida na ponteira. Após o tempo de equilíbrio determinado, a solução é dispensada. Essa extração prévia apresentou recuperação de aproximadamente 30% BE e 34% COC. O cromatograma desta extração está demonstrado na Figura 6.

Figura 5 – Adaptação inicial do método dos cartuchos de EFS para aplicação nas ponteiros DPX.



Fonte: A autora (2022).

Figura 6 – Cromatograma inicial método dos cartuchos de EFS adaptado para extração por DPX.



Onde: A – Benzoilecgonina. B – Articaína. C – Cocaína.

4.2.1 Avaliação dos parâmetros da DPX

Após as avaliações prévias do método em ponteiras DPX foram analisados diferentes parâmetros, como descrito no item 3.5.

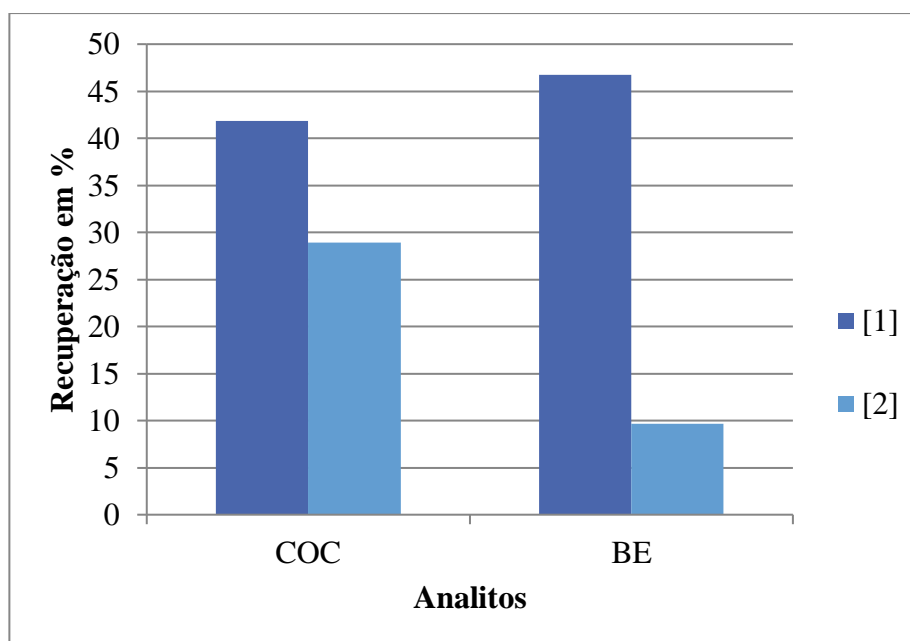
A etapa de condicionamento é questionável por alguns autores como Ellison; Brewer; Morgan, (2009) E Hongxia *et al*, (2010) que apresentam as extrações em DPX sem a realização desta etapa. Porém, o condicionamento tem a função de ativar os sítios de ligação da fase extrativa e assim interagir com mais facilidade com os analitos da amostra (PINTO; QUEIROZ, 2015). Geralmente, é utilizado um solvente orgânico e uma solução aquosa. Para este estudo da DPX foram utilizados o metanol como o solvente orgânico e o tampão fosfato (em diferentes pHs) como a solução aquosa já utilizados previamente na EFS. A discussão do pH do tampão na fase de condicionamento será discutida a seguir em conjunto com o pH da amostra.

4.2.1.1 Avaliação da solução eluente

A etapa de eluição visa dessorver o analito de interesse que está ligado na fase extratora. Para isso, é necessário a escolha de uma solução eluente adequada que dessorva preferencialmente o analito a ser analisado. Neste contexto foram analisadas duas soluções previamente elencadas em outros estudos envolvendo os analitos COC e BE: hidróxido de amônio 5% em metanol (FERNÁNDEZ *et al*, 2014; CRUZ, 2018) e diclorometano:isopropanol:hidróxido de amônio 5% em metanol 78:20:2, v/v/v (ELLISON; BREWER; MORGAN, 2009; BORDIN, 2015).

Dentre os eluentes avaliados, o hidróxido de amônio 5% em metanol foi o mais eficiente, como demonstrado na Figura 7, o que já era esperado pois durante o procedimento de eluição com diclorometano:isopropanol:hidróxido de amônio 5% em metanol 78:20:2, v/v/v, houveram problemas técnicos práticos em que o eluente não se manteve retido na ponteira. Ressalta-se ainda que a utilização de hidróxido de amônio teve a intenção de tornar o meio básico e assim deixar os analitos, preferencialmente, na forma não ionizada. O que, neste caso, favorece a dessorção dos mesmos.

Figura 7 - Avaliação da influência da solução eluente na recuperação de COC e BE na etapa de eluição.



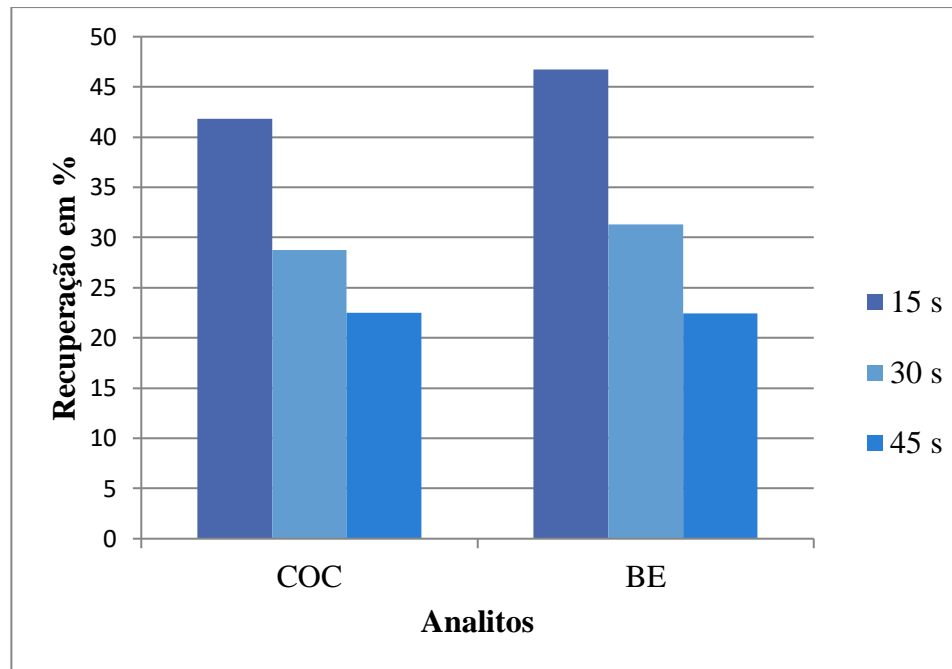
Fonte: A autora (2022).

4.2.1.2 Avaliação do tempo de equilíbrio

A eficiência da extração da DPX está respaldada no equilíbrio de sorção, ou seja, no tempo de contato do analito de interesse com a fase extratora, que influencia na retenção do analito. Enquanto que o equilíbrio de dessorção consiste na liberação deste analito da fase extratora. Dessa forma diferentes tempos (15, 30 e 45 segundos) foram analisados nas etapas de aplicação da amostra e dessorção dos analitos (ELLISON; BREWER; MORGAN, 2009; PINTO; QUEIROZ, 2015; BORDIN *et al.*, 2015).

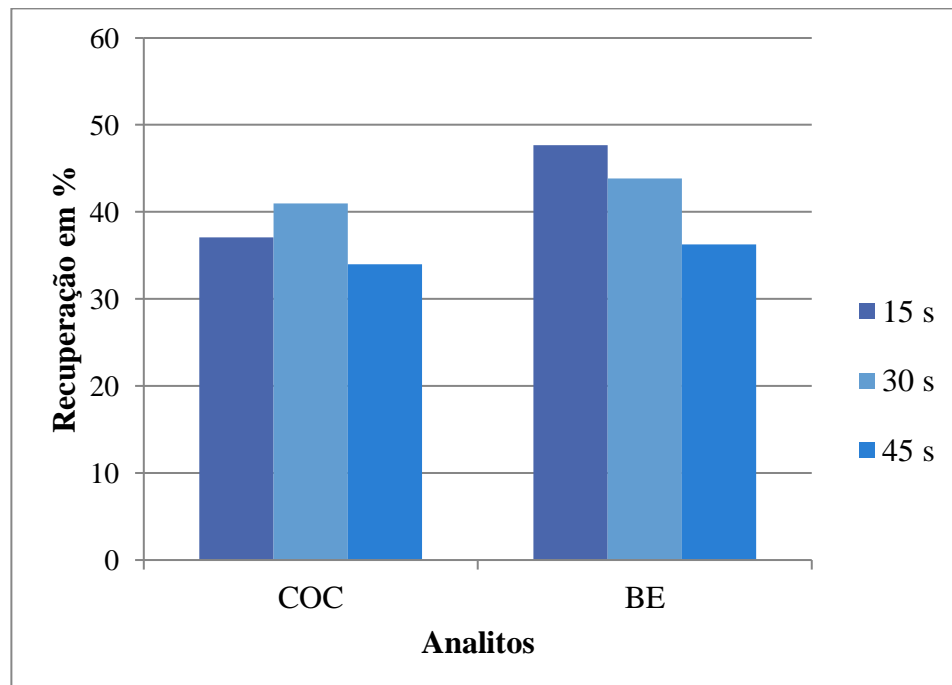
Na etapa de aplicação da amostra foi observado uma boa recuperação dos analitos no tempo de 15 segundos (Figura 8). Enquanto que na etapa de dessorção houve uma pequena diferença nas recuperações de COC e BE nos tempos de 15 e 30 segundos (Figura 9). No entanto, o tempo de 30 segundos foi o escolhido por apresentar a melhor recuperação para COC, uma vez que esta tem repetidamente apresentado uma menor recuperação em comparação com a BE.

Figura 8 - Avaliação da influência do tempo de equilíbrio na recuperação de COC e BE na etapa de aplicação da amostra.



Fonte: A autora (2022).

Figura 9 - Avaliação da influência do tempo de equilíbrio na recuperação de COC e BE na etapa de eluição.



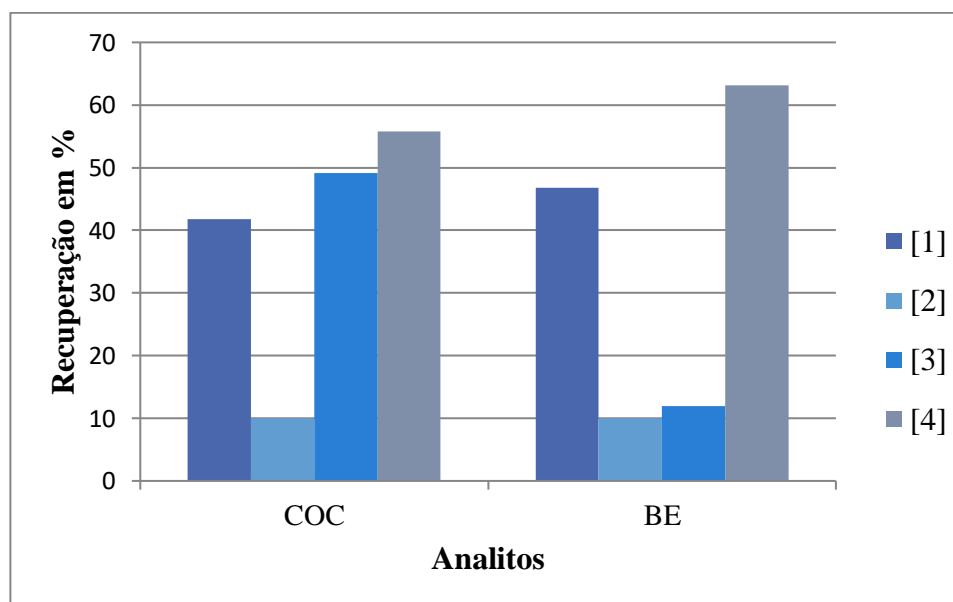
Fonte: A autora (2022).

4.2.1.3 Avaliação dos solventes de lavagem

Na etapa de lavagem o objetivo é reduzir a presença de interferentes da amostra usando soluções que permitam a remoção dos compostos indesejáveis sem perda significativa dos analitos de interesse. A escolha do solvente de lavagem é feita com base no tipo/natureza química do sorvente, na natureza do analito de interesse e nos interferentes possivelmente presentes na matriz (PINTO; QUEIROZ, 2015; JANICKA; KOT-WASIK; NAMIESMIK, 2010).

Sabe-se que soluções aquosas e ácidas removem adequadamente interferentes hidrofílicos ácidos. O meio ácido proporciona também um bloqueio da dessorção de analitos básicos de interesse. Por outro lado, a solução metanólica remove com eficiência interferentes hidrofóbicos (CATÁLOGO DO EFS, 2013). Diante destas informações, optou-se por avaliar quatro diferentes sequências de soluções: [1] tampão fosfato pH 6 → HCl → metanol; [2] tampão fosfato pH 6 → metanol; [3] H₂O → metanol; [4] HCl → metanol. O conjunto que apresentou maior recuperação dos analitos foi o 4 (Figura 10).

Figura 10 – Avaliação da influência das soluções de lavagem na recuperação de COC e BE na etapa de lavagem.



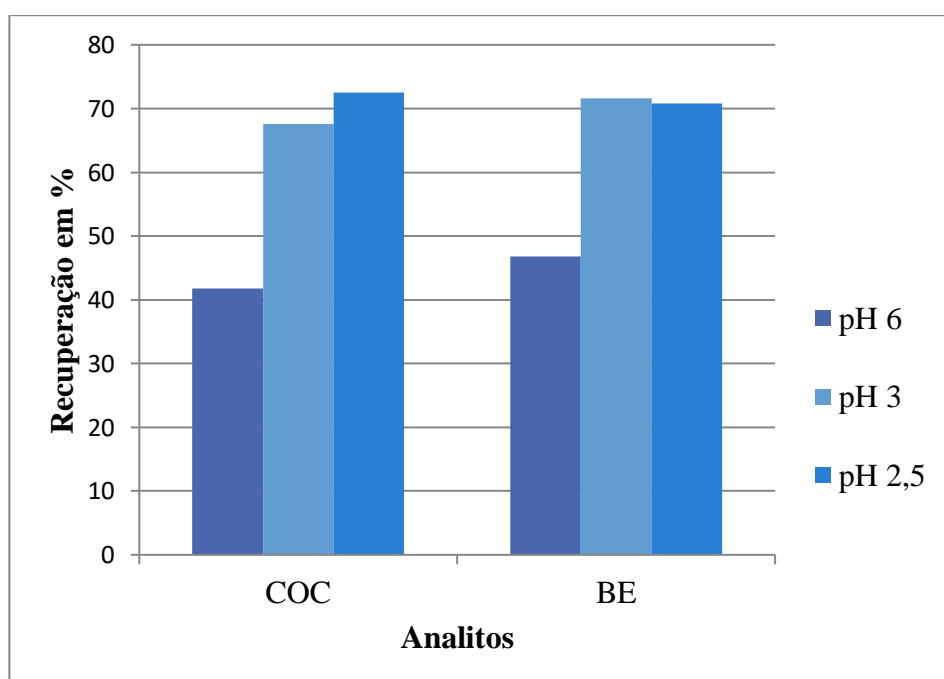
Fonte: A autora (2022).

4.2.1.4 Avaliação do pH

A variável pH é de extrema importância, considerando a utilização da fase sortiva com grupos sulfônicos de troca catiônica e o caráter anfótero da BE e básico da COC. Assim, os analitos de interesse devem se apresentar em sua forma ionizada, o que ocorre quando encontram-se em meio ácido, para favorecer a extração. Foram avaliados os pHs 6,0, 3,0 e 2,5, sendo observado que a condição mais favorável foi pH 2,5 para extração da COC (Figura 11), isso indica que quanto mais ácido o meio mais favorável para a extração. Para a extração da BE não foi observada diferença significativa entre os pHs 3,0 e 2,5, sendo assim, optou-se por seguir com o pH 2,5.

Cabe ressaltar que é importante manter o mesmo pH para a solução tampão na etapa de condicionamento e aplicação da amostra (WATSON; RAYNIE, 2014). Caso as soluções apresentem pHs diferentes essa diferença resultaria na porção inicial da amostra experimentando um ambiente de extração diferente das porções seguintes da amostra, o que afetaria as características de retenção e resultaria em uma baixa recuperação dos analitos (WATSON; RAYNIE, 2014; CRUZ, 2018). Desta forma, na etapa de condicionamento foi utilizado o tampão fosfato em pH 2,5.

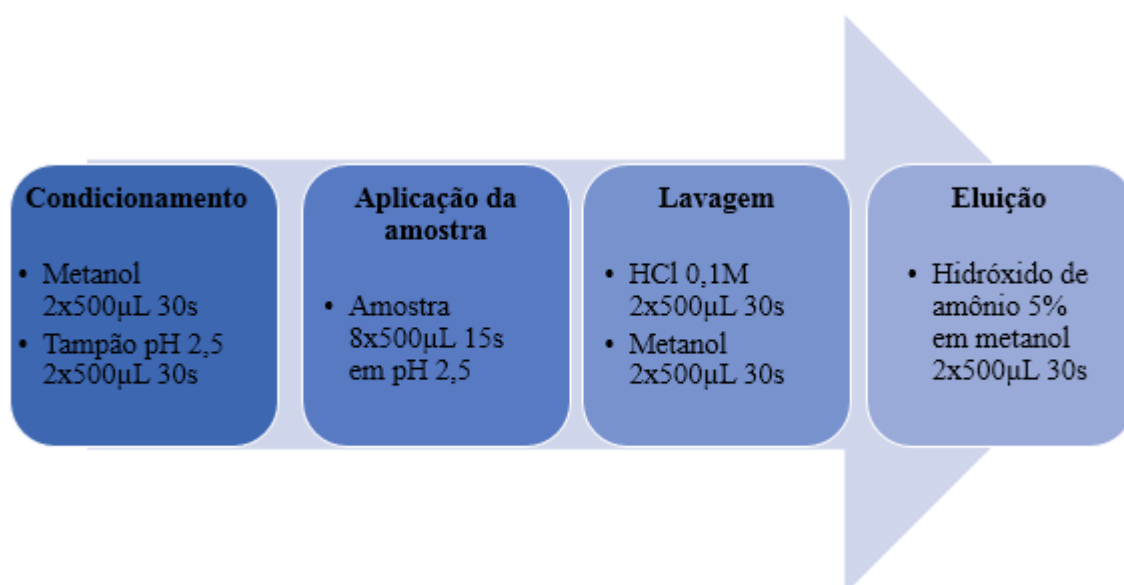
Figura 11 - Avaliação da influência do pH na recuperação de COC e BE durante a etapa de condicionamento e aplicação da amostra.



Fonte: A autora (2022).

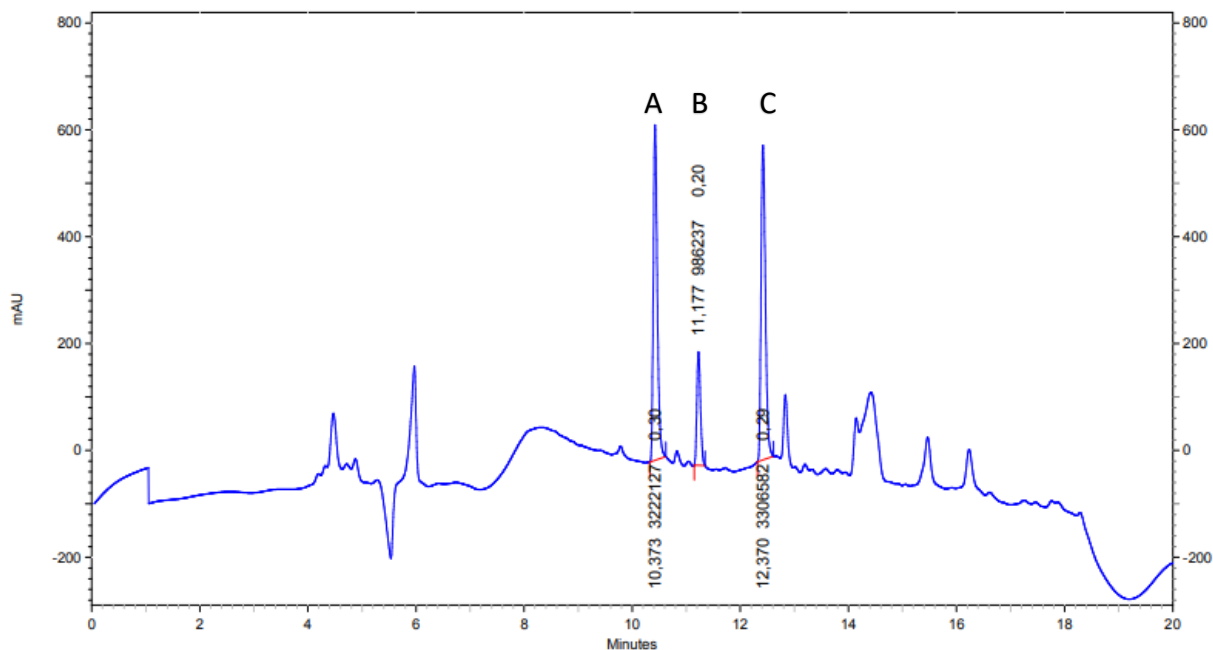
Uma vez finalizado o processo de avaliação da extração de COC e BE em amostras de cabelo empregando DPX, o método final obtido foi: condicionamento da fase sortiva com 2 ciclos de 500µL metanol por 30s, seguido de 2 ciclos de 500µL de tampão fosfato pH2,5 por 30s. A aplicação da amostra foi feita em 8 ciclos de 500µL com tempo de equilíbrio de 15s; a lavagem ocorreu com 2 ciclos de 500µL HCl 0,1M por 30s seguido de 2 ciclos de 500µL metanol por 30s. Por fim a eluição foi definida com 2 ciclos de 500µL hidróxido de amônio 5% em metanol por 30s (Figura 12). O cromatograma da análise da amostra de cabelo enriquecida com solução de COC e BE na concentração de 50µg/mL extraída pela técnica final e DPX está representado na Figura 13.

Figura 12 – Método final para extração de COC e BE de amostras de cabelo por DPX.



Fonte: A autora (2022).

Figura 13 – Cromatograma final da extração de COC e BE por DPX.

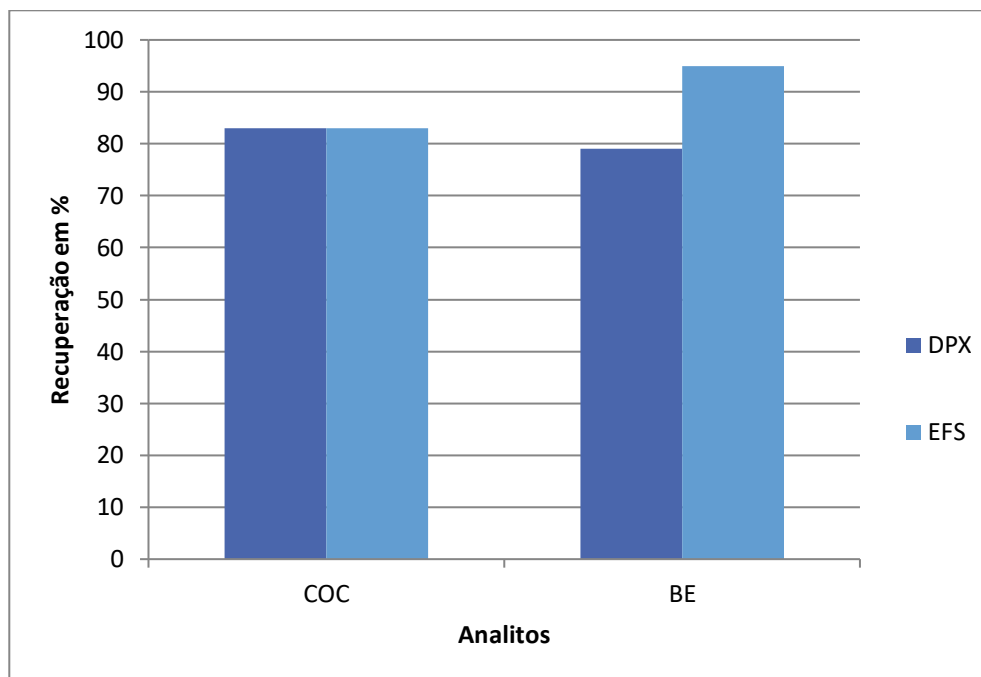


Onde: A – Benzoilecgonina. B – Articaína. C – Cocaína.

4.3 COMPARAÇÃO DA TÉCNICA DE DPX E EFS

O método de extração por DPX dos analitos COC e BE em amostra de cabelo se mostrou promissor ao fornecer bons percentuais de recuperação dos analitos, sendo aproximadamente 83% de recuperação para COC e 79% para BE. No método EFS realizado por Cruz (2018) foram obtidos os seguintes percentuais de recuperação: 83% e 95% para COC e BE, respectivamente (Figura 14). Portanto, as porcentagens de recuperação de ambos os métodos foram semelhantes.

Figura 14 – Comparação da porcentagem de recuperação DPX x EFS.



Fonte: A autora (2022).

A técnica de DPX apresenta as vantagens de ser prática, rápida e produzir menor volume de resíduos químicos. Foi observado uma economia de 60% de metanol, 57% de tampão fosfato, 50% de HCl e 50% de hidróxido de amônio 5% em metanol (Tabela 3).

É preciso ressaltar que a diferença de 1mL a mais no volume das amostras utilizadas na DPX após digestão do cabelo se dá pelo fato do produto da digestão não passar pela etapa de secagem após a digestão. Assim, a amostra de cabelo passa pelo processo de digestão e é diretamente introduzida na DPX. Diferentemente do método da EFS, o qual a amostra passa por uma secagem de 45 min, para que ocorra a evaporação de 1mL referente ao metanol adicionado na digestão. Desta forma, a DPX também permitiu um pré-preparo da amostra mais rápido. Cabe ressaltar ainda que a quantidade de amostra utilizada para digestão não diferiu entre as técnicas de DPX e EFS.

Tabela 3 – Comparação da técnica EFS (Cruz, 2018) x DPX.

	Variáveis	EFS*	DPX
	Metanol	5mL	2mL
Volume de soluções (mL)	Tampão fosfato	7mL	3mL
	HCl	2mL	1mL
	Hidróxido de amônio 5% em metanol	2mL	1mL
Amostra	Massa de cabelo inicial (para etapa de digestão)	100 mg	100 mg
	Volume de amostra para extração (pré-processada)	3 mL	4 mL

Fonte: A autora (2022).

*Dados de Cruz, (2018).

5 CONCLUSÃO

A avaliação da técnica de DPX para a extração de COC e BE em amostra de cabelo permitiu a obtenção de um método que, até o presente momento, mostrou-se viável, eficiente, rápido, com adequada recuperação dos analitos de interesse, e apresentou-se como uma alternativa mais ecológica visto a redução na produção de resíduos químicos.

Ao ser comparada com a técnica de EFS validada por Cruz (2018), a DPX se mostrou promissora, uma vez que alcança valores semelhantes de recuperações para COC e BE, mostrando ainda algumas vantagens, tais como: menor utilização de solventes orgânicos, dispensa de uso de sistema à vácuo e possibilidade de suprimir a etapa de secagem após a extração.

Possivelmente com mais aprimoramento a DPX pode-se tornar tão eficiente quanto a EFS ou até mesmo superá-la. Como citado, é uma técnica que dispensa a utilização de sistema à vácuo, além da questão custo-benefício, já que é possível realizar a montagem das pipetas de DPX *in-house*, utilizando ponteiros comuns de micropipetas, filtros adaptados e fase sortiva. Há ainda a possibilidade de se avaliar novas fases sortivas mais baratas, seletivas e reutilizáveis.

Como etapa futura, é necessário a validação do método de DPX avaliado neste trabalho e aplicação em amostras reais. Desta forma, a técnica poderá contribuir para a rotina de análises toxicológicas forense da Polícia Científica de Santa Catarina, auxiliando no esclarecimento da causa de crimes. Além disso, poderia ser útil também para análise de cabelo em pacientes em programas de reabilitação que queiram reintegração na sociedade ou para análise toxicológica para emissão da primeira carteira nacional de habilitação ou renovação nas categorias C, D ou E (profissional).

REFERÊNCIAS

- ALEKSA, K. *et al.* Simultaneous detection of seventeen drugs of abuse and metabolites in hair using solid phase micro extraction (SPME) with GC/MS. **Forensic Sci Int.** v. 218, p. 31–36. (2012).
- ALVES, M.N.R. *et al.* Determination of cocaine and metabolites in hair by columnswitching LC-MS-MS analysis. **Anal Bioanal Chem.** v. 405, p. 299–306. (2013).
- ANDREUCCETTI, G. *et al.* Alcohol in combination with illicit drugs among fatal injuries in Sao Paulo, Brazil: An epidemiological study on the association between acute substance use and injury. **Injury** v. 49, Issue 12, p. 2186-2192, Dec. (2018).
- ARTHUR, C.L. *et al.* Environmental Analysis of Organic Compounds in Water Using Solid Phase Micro Extraction. **Journal of High Resolution Chromatography**, vol 15, p. 721-744, Nov. (1992).
- BACIU, T. *et al.* Recent trends in analytical methods and separation techniques for drugs of abuse in hair. **Analytica Chimica Acta**, v. 856, p. 1-26. (2015). DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2014.06.051>.
- BASTOS, F.I.P.M. *et al.* (Org.). **III Levantamento Nacional sobre o uso de drogas pela população brasileira.** Rio de Janeiro: FIOCRUZ/ICICT, p. 528. (2017).
- BORDIN, D.C.M. *et al.* Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 2, p.125-143, (2015). Editora Cubo Multimedia. DOI: <http://dx.doi.org/10.4322/sc.2015.022>.
- CARVALHO, J.C. **A produção de leis e normas sobre drogas no Brasil: a governamentalidade da criminalização.** Anais do XXVI Simpósio Nacional de História – ANPUH - São Paulo, julho (2011).
- CARVALHO, V.M. **Redistribuição da cocaína e sua influência na neuroquímica post mortem.** Tese de Doutorado, (2011), p. 181. Faculdade de ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
- CEBRID, Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas. **Livreto Informativo sobre Drogas Psicotrópicas.** (2012). Disponível em: <https://www.cebrid.com.br/wp-content/uploads/2012/12/Livreto-Informativo-sobre-Drogas-Psicotr%C3%B3picas.pdf>. Acesso em: 16 de março de 2021.
- CRUZ, A.C.H. **Determinação de cocaína e seu produto de biotransformação, benzoilecgonina, em amostras de cabelo: desenvolvimento, validação e aplicação de método.** Dissertação de Mestrado, p. 93. (2018). Curso de Farmacologia, Departamento de Patologia, UFSC, Florianópolis.

DOMINGUES, M.I.S. **Análise de cabelo – procedimentos e aplicações**. Dissertação de Mestrado, p. 53. (2015). Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa.

DPX Technologies - **Technology Overview - Bind-Wash-Elute Workflow**. (2019). Disponível em: <https://dpxtechnologies.com/>. Acesso em: 1 de maio de 2021.

ELLISON S.T, BREWER W.E, MORGAN S.L. Comprehensive Analysis of Drugs of Abuse in Urine Using Disposable Pipette Extraction. **Journal of Analytical Toxicology**. v, 33, p 356-365. September (2009). <http://jat.oxfordjournals.org/content/33/7/356.short>

FERNÁNDEZ, P. et al. Use of high performance liquid chromatography for the determination of cocaine and benzoylecgonine in human hair. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, [s.l.], v. 26, n. 12, p.2003-2012, jan. 2003. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1081/jlc-120021767>.

FERREIRA, P.E.M; MARTINI, R.K. Cocaína: lendas, história e abuso. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, Porto Alegre, v. 2, n. 23, p. 96-99. jan (2001).

GORDO, J.M.O. **O cabelo como amostra biológica em toxicologia forense: colheita, análise e áreas de aplicação**. Dissertação de Mestrado, p.87. (2013). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Fernando Pessoa.

GUMUS *et al.*, Determination of Cocaine and Benzoylecgonine in Biological Matrices by HPLC and LC-MS/MS. **Jotcsa**. v. 3 (3), p. 535-550. (2016).

JAGERDEO, E; ABDEL-REHIM, M. Screening of Cocaine and Its Metabolites in Human Urine Samples by Direct Analysis in Real-Time Source Coupled to Time-ofFlight Mass Spectrometry After Online Preconcentration Utilizing Microextraction by Packed Sorbent. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 20, p. 891. (2009).

KINTZ, P; VILLAIN, M; CIRIMELE, V. Chemical abuse in the elderly: evidence from hair analysis. In: **Therapeutic drug monitoring**. LWW p. 207-211. (2008).

LANDIM, B.L.S; LANDIM, D.O.S; MARQUES, A.E.F. O cabelo como amostra biológica em toxicologia forense: uma revisão integrativa. **Revista UNILUS Ensino e Pesquisa** v. 16, n. 45. Out/Dez (2019). ISSN 2318-2083 (eletrônico).

LATORRE, C.A.L. **Utilização da cromatografia líquida de alta eficiência na determinação de aminas biogênicas como ferramenta para a avaliação da qualidade da carne de aves**. Tese de Doutorado, p. 148. (2013). Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense.

MANTOVANI, C. D. C.; PEGO, A. M. F. e YONAMINE, M. Cocaína. In: Dinis Oliveira, R. J.; Carvalho, F. D. e Bastos, M. D. L. (eds.). **Toxicologia Forense**. Lisboa, Pactor, p. 217-228. (2015).

MEROLA, G. *et al.* Determination of different recreational drugs in hair by HS-SPME and GC/MS. **Anal Bioanal Chem**. v. 397, p. 2987–2995. (2010).

OLIVEIRA, T.C; LANÇAS, F.M. Extração de pesticidas em amostras de alimentos através de sorção em ponteiros descartáveis. **Scientia Chromatographica**. v. 10 (4), p. 243-255. (2018). Instituto Internacional de Cromatografia.

PEGO A.M.F. *et al.* Determination of cocaine and its derivatives in hair samples by liquid phase microextraction (LPME) and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). **Forensic Science International**. v. 274, p. 83-90. May (2017).

PETERSON, S; CORDERO, R; STEARNS, E. Chronic drug use confirmed by hair analysis: Its role in understanding both the medical cause of death and the circumstances surrounding the death. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, v. 16, p. 143-147. (2009).

PINTO, M.A.L; QUEIROZ, M.E.C. Extração em ponteiros descartáveis: fundamentos teóricos e aplicações. **Scientia Chromatographica**. v. 7(2), p. 101-108. (2015). Instituto Internacional de Cromatografia.

QUENTAL, A.R.P.S. **Análise toxicológica da cocaína e dos seus metabolitos em contexto forense**. Dissertação de Mestrado, p.88. (2015). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Fernando Pessoa.

SCANFERLA, D.T.P. *et al.* Highly Selective Hf-Lpme-Gc-Ms For Cocaine And Biotransformation Products In Human Hair To Monitor Drug Addicts. **Quim. Nova**, v. XY, nº. 00, p. 1-8. (2021). DOI: 10.21577/0100-4042.20170737.

SBTox, Sociedade Brasileira de Toxicologia. Diretrizes sobre o Exame de Substâncias Psicoativas em Cabelos e Pelos: Coleta e Análise. **SBTox Diretrizes Técnicas**. Versão 2 - atualizada e corrigida em Dez (2015).

UNODC, United Nations Office on Drugs and Crime. **Guidelines for Testing Drugs under International Control in Hair, Sweat and Oral Fluid**: Manual for Use by National Drug Analysis Laboratories. Viena, p. 96. (2014).

UNODC, United Nations Office on Drugs and Crime. **DRUG USE AND HEALTH CONSEQUENCES**. World Drug Report 2021. United Nations publication, p. 52. (2021).

WATSON, D.W; RAYNIE, D.E. Understanding and Improving Solid-Phase Extraction. **Chromatography Online**, Estados Unidos, v. 32, n. 12, p.908-915, dez. 2014. Disponível em: <<http://www.chromatographyonline.com/understanding-and-improving-solid-phase-extraction-1?pageID=3>>. Acesso em: 16 jul. 2019.