



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

Trabalho de Conclusão de Curso  
Bacharelado em Química

**Emprego do método Quechers na  
extração de drogas de interesse forense  
em urina humana**

Leandro Soares Alves Pereira

Belo Horizonte  
Dezembro de 2010



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Exatas – Departamento de Química**  
**MONOGRAFIA DE BACHARELADO**

**EMPREGO DO MÉTODO QUECHERS NA EXTRAÇÃO DE  
DROGAS DE INTERESSE FORENSE EM URINA HUMANA**

**LEANDRO SOARES ALVES PEREIRA**

**Belo Horizonte**

**2009**

**LEANDRO SOARES ALVES PEREIRA**

**Emprego do Método QuEChERS para extração de drogas de  
interesse forense em urina humana**

**Monografia apresentada à  
disciplina Trabalho de Conclusão de  
Curso II como requisito parcial à  
conclusão do curso de Bacharelado  
em Química, Departamento de  
Química, Instituto de Ciências Exatas,  
Universidade Federal de Minas Gerais**

**Orientador: Profa. Dra. Clésia Cristina Nascentes**

**Co-orientador: Msc. Elisângela Jaqueline Magalhães**

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, que me apoiou e sustentou emocionalmente durante esse trabalho, especialmente a Ana.

À professora Clésia, que tornou possível esse trabalho, auxiliando cada decisão para que o trabalho se desenvolvesse da melhor maneira possível.

À Elisângela Jaqueline pela ajuda no trabalho e todo o conhecimento que me passou.

À Lucia Auler por disponibilizar seu laboratório para as análises e pela ajuda em cada dificuldade que passei no trabalho, além de todo o conhecimento de cromatografia que me passou.

Ao professor Rodinei e seus alunos por me acolherem no laboratório se mostrando sempre disponíveis a ajudar.

A todos que me ajudaram com dicas para o trabalho e disponibilizando amostra para eu trabalhar.

A meus amigos da faculdade, do Centro Espírita Arcanjo Miguel, da rede Chromos e, principalmente, aqueles que o são pelo tempo de convívio.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vii
RESUMO	viii
1. Introdução	1
2. Revisão bibliográfica	2
2.1 Metanfetamina	2
2.2 Fluido biológico – Urina	6
2.3 Método de extração – QuEChERS	7
2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	8
2.4.1 Fases estacionárias	10
2.4.2 Fase móvel	10
2.4.3 Reservatório de fase móvel	11
2.4.4 Bomba de alta pressão	11
2.4.5 Injetor	11
2.4.6 Colunas	12
2.4.7 Detectores	13
2.4.8 Detector por absorbância no ultravioleta-visível (UV-Vis)	13
3. Objetivo	16
3.1 Objetivos específicos	16
4. Materiais e Métodos	17
4.1 Reagentes	17
4.2 Equipamentos	17
4.3 Coleta de amostras	18
4.4 Procedimentos	18
4.4.1 Preparo de soluções	18
5. Resultados e discussão	22
5.1 Otimização das condições cromatográficas	22
6. Conclusão	31
7. Referencias Bibliográficas	32

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da Metanfetamina	2
Figura 2 – Estrutura da Efedrina	2
Figura 3 – Cristais de cloridrato de metanfetamina ( <i>ice</i> ), comprimidos ( <i>speed</i> ), e pó ( <i>meth</i> )	4
Figura 4 – Número de laboratórios clandestinos, reportados à UNODC, de produção de estimulantes tipo anfetamina no mundo, de 2000 a 2008	5
Figura 5 – Esquema metabólico para metanfetamina	6
Figura 6 – Esquema de um cromatógrafo CLAE	9
Figura 7 – Esquema de um espectrômetro UV-Vis	14
Figura 8 – Esquemas de espectrômetros UV-Vis com monocromador e de arranjo de diodos	15
Figura 9 – Espectros de absorção molecular da metanfetamina e da efedrina	22
Figura 10 - Cromatogramas de solução de metanfetamina e efedrina em urina, nos comprimentos de onda de 285 nm e 257 nm, com proporção de fase móvel 35:65	23
Figura 11 – Cromatogramas de solução de metanfetamina e efedrina em acetonitrila, nos comprimentos de onda de 285 nm e 257 nm, com proporção de fase móvel 40:60	23
Figura 12 – Cromatogramas de solução de metanfetamina e efedrina em urina, nos comprimentos de onda de 285 nm e 257 nm, com proporção de fase móvel 40:60	24
Figura 13 – Gráfico de Pareto para a análise por planejamento fatorial $2^{5-2}$	26
Figura 14 – Superfície de resposta obtida no planejamento composto central para otimização das variáveis volume de solvente extrator e massa de $MgSO_4$ .	27
Figura 15 – Gráfico da curva de calibração	28

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial fracionário para otimização do método QuEChERS para extração de metanfetamina de urina.	20
Tabela 2 – Planejamento composto central utilizado para obtenção das condições ótimas para extração de metanfetamina de amostras de urina	21
Tabela 3 – Planejamento Fatorial Fracionário para otimização do método QuEChERS (n =3)	25
Tabela 4 – Parâmetros da curva de calibração	29
Tabela 5 – Intervalo de confiança de concentrações extraídas, fator de recuperação e RSD de urinas fortificadas com 100, 400 e 800 $\mu\text{g.L}^{-1}$	30

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

QuEChERS – *Quick, Easy, Cheap, Efficient, Rugged, Safe*

MDMA – 3,4-metilenodioximetanfetamina

MDA – 3,4-metilenodioxianfetamina

MDEA – 3,4-metilenodioxietilanfetamina

EUA – Estados Unidos da América

UNODC – United Nations Office on Drugs and Crimes

PSA – Amina primária-secundária

dSPE – Extração em fase sólida dispersiva

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

UV-Vis – radiação ultravioleta-visível

CLAE-UV – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por absorção na região do ultravioleta-visível

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

RSD – Desvio Padrão Relativo



## RESUMO

O uso de drogas de abuso é uma situação cada vez mais comum o que demanda grande atenção de laboratórios forenses, para fazer análises confiáveis e rápidas.

Para realizar essas análises em matrizes biológicas é necessário fazer extração dos analitos.

Neste trabalho foi desenvolvido um método para a determinação de metanfetamina em amostras de urina empregando o método QuEChERS para extração e a cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV para quantificação. Inicialmente, as condições cromatográficas foram otimizadas, sendo estabelecido como fase móvel 40% de solução aquosa de acetato de amônio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  e 60% de acetonitrila, e os comprimentos de onda para determinação da metanfetamina e da efedrina, empregada como padrão interno, que foram de 285 e 257 nm, respectivamente.

Numa segunda etapa, o método QuEChERS foi otimizado, avaliando-se a composição do solvente extrator, o volume de solvente extrator, a massa de  $\text{MgSO}_4$ , o modo de agitação e o uso de dSPE para *clean up*. As condições ótimas foram: solução de 1% de  $\text{NH}_3$  em acetonitrila como solvente extrator, o uso de 1 mL de solvente na extração, o uso de 1 g de  $\text{MgSO}_4$ , agitação em vortex e uso de dSPE.

Os parâmetros de mérito do método otimizado, referentes à curva de calibração por regressão linear, foram: LD =  $35,9 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ , LQ =  $109 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ , precisão de 3,8% e fatores de recuperação maiores que 60%.

## 1. Introdução

A metanfetamina é um alcalóide da classe das anfetaminas, sintetizado a partir da efedrina, que tem sido amplamente utilizado como droga de abuso, devido ao seu efeito estimulante e alucinógeno. <sup>[1]</sup> A metanfetamina é classificada como droga de alto poder abusivo <sup>[2]</sup> e, por isso, sua determinação, assim como de outras drogas de abuso, é de grande interesse para a toxicologia forense. <sup>[3]</sup> Com isso, o desenvolvimento de métodos de análise para quantificar esse tipo de compostos é extremamente importante.

Essas análises utilizam matrizes biológicas complexas que geralmente precisam de pré-tratamento. Neste contexto, procedimentos de extração são normalmente utilizados para determinação de constituintes orgânicos em amostras complexas, visando extrair da matriz os compostos de interesse e eliminando grande parte dos constituintes que possam interferir na análise. Contudo, um método analítico para toxicologia forense deve ser rápido, simples e apresentar alta confiabilidade e precisão na determinação de drogas <sup>[3]</sup>, de modo que o método de extração deve se enquadrar nos mesmos princípios. O método de extração QuEChERS, que tem sido amplamente utilizado para análises de pesticidas <sup>[4-7]</sup>, apresenta esses princípios, porém, é necessário estudar seu emprego na extração de drogas de interesse forense em matrizes biológicas, já que pouco se encontra na literatura relatando esses estudos.

A cromatografia líquida de alta eficiência tem sido muito utilizada para análises quantitativas de fins forenses, principalmente para analitos que apresentem baixa volatilidade e que não são termicamente estáveis, que não podem ser analisados por cromatografia gasosa, sendo, portanto, adequada para este estudo.

## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1 Metanfetamina<sup>[1-3,8-14]</sup>

A metanfetamina (figura 1) é um composto sintetizado, geralmente, por desidratação da efedrina (figura 2), sendo o mais comum da classe das anfetaminas para uso abusivo.<sup>[2]</sup> É utilizada também para síntese de outras anfetaminas como anfetamina, 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA), 3,4-metilenodioxietilamfetamina (MDEA).<sup>[8]</sup> Essas drogas são classificadas como de alto poder abusivo devido a seus efeitos estimulantes e alucinógenos, que aumentam a capacidade de comunicação, entendimento e empatia.<sup>[1-2]</sup>

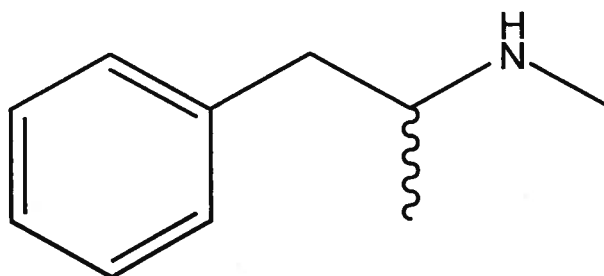


Figura 1 – Estrutura da Metanfetamina

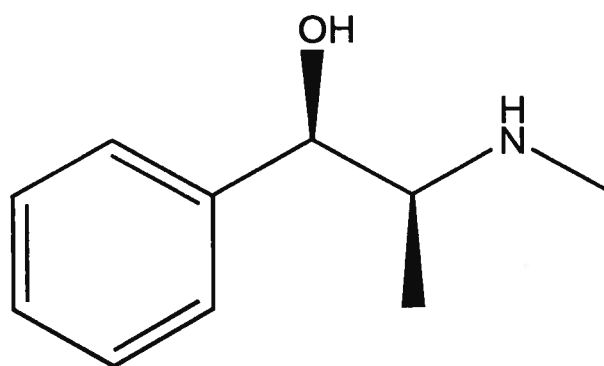


Figura 2 – Estrutura da Efedrina

Devido ao centro quiral presente em sua estrutura, a metanfetamina apresenta dois isômeros opticamente ativos, sendo que o isômero D-(+)-metanfetamina é mais utilizado como droga de abuso por apresentar maior efeito sobre o sistema nervoso central.<sup>[8]</sup>

A metanfetamina atua no sistema nervoso central de três modos: 1) aumentando a taxa de liberação de dopamina, serotonina e noradrenalina; 2) bloqueando a recapturação destes neurotransmissores pelas proteínas transportadoras e 3) inibindo a ação da monoaminoxidase, enzima que metaboliza as monoaminas (dopamina, serotonina e noradrenalina). Assim, mantém-se alta concentração destes neurotransmissores na fenda sináptica <sup>[9]</sup>. Como efeito desse mecanismo, ocorre a diminuição do cansaço, sono e apetite, aumento do estado de alerta, agitação, autoconfiança, sensação de bem-estar, aumento da frequência cardíaca e pressão sanguínea. Em uso crônico causa alucinação, distúrbios no sono, agressividade, surtos psicóticos e em casos de *overdose* pode ocorrer hipertermia, arritmia cardíaca, convulsões, colapso circulatório, hemorragia encefálica, coma e morte. <sup>[9-10]</sup>

Sintetizada pela primeira vez no final da década de 1910 e utilizada a partir da década de 1930 como medicamento, a metanfetamina foi indicada como comprimidos ou ampolas, em baixa concentração e sob receita médica, para tratamento de déficit de atenção, narcolepsia, obesidade mórbida, além de estar presente em descongestionantes nasais.

Durante a segunda guerra mundial, foi utilizada para diminuir o cansaço e aumentar a atenção dos soldados. <sup>[11]</sup> Após a guerra, devido à grande quantidade de comprimidos excedentes, ocorreram "epidemias" de consumo da droga pela população, no Japão e Estados Unidos, devido a seus efeitos estimulantes.

A partir da década de 1990, passou a ser encontrada na forma de cristais de cloridrato de metanfetamina, que são fumados, levando ao efeito mais forte e rapidamente. Essa droga passou a ser conhecida como *ice* e chegou a ser consumida nos EUA em níveis alarmantes.

No Brasil, foi comercializado um medicamento a base de metanfetamina sob o nome de Pervitin<sup>®</sup>, que foi muito consumido entre estudantes na década de 50, que o utilizavam para aumentar a disposição para estudar. <sup>[12]</sup>

Contudo, devido à tolerância do organismo (a dose necessária era cada vez maior) e ao fato de causar dependência, a partir de 1970, a metanfetamina foi proibida em vários países, inclusive no Brasil, onde este composto é controlado, segundo a lista A3 (substâncias psicotrópicas) da resolução nº 480, de 23 de setembro de 1999 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. <sup>[13]</sup> Apesar disso, o

produto ainda é facilmente encontrado, ilegalmente, no território nacional, devido ao tráfico com países vizinhos, onde o medicamento é permitido.

Conhecida como *meth*, *ice*, *speed* e *crystal*, a metanfetamina. Encontrada em forma de pó, comprimidos e cristais (figura 3), tem sido utilizada como droga de abuso, sendo inalada (fumada), injetada, ingerida ou aspirada (cheirada). Seu efeito, quando fumada ou inalada é tão intenso quanto ao da cocaína e mais duradouro, tornando-a mais atraente aos usuários. Por ser de produção fácil, feito em laboratórios clandestinos, com precursores acessíveis, é uma droga barata, o que favoreceu a sua difusão pelo mundo, sendo considerada hoje uma das drogas mais utilizadas no mundo, ao lado da maconha. Além do uso como droga recreativa, é comumente utilizada no Brasil na forma de comprimidos, conhecidos como rebite ou bolinha, por motoristas que precisam dirigir a noite, por estudantes e em academias, por aumentar a capacidade física e para emagrecimento. [9]



Figura 3 – Cristais de cloridrato de metanfetamina (*ice*), em A, comprimidos (*speed*), em B, e pó (*meth*), em C.

A produção descontrolada de metanfetamina em laboratórios clandestinos por todo o mundo é citada pelo UNODC (United Nations Office on Drugs and Crimes) como preocupante, pois foi relatado que em 2008 ocorreu um aumento de 20% no número de laboratórios clandestinos de produção de anfetaminas em relação ao ano anterior, sendo incluídos alguns países que até então não tinham casos desse tipo, como Brasil, Argentina, Guatemala, Irã e Sri Lanka. Os dados apresentados na figura 4 mostram o registro de laboratórios de produção de estimulantes do tipo anfetamina, de 1999 a 2008, mostrando, também, que o grupo das metanfetaminas é responsável pela maior parte dos laboratórios. [12]

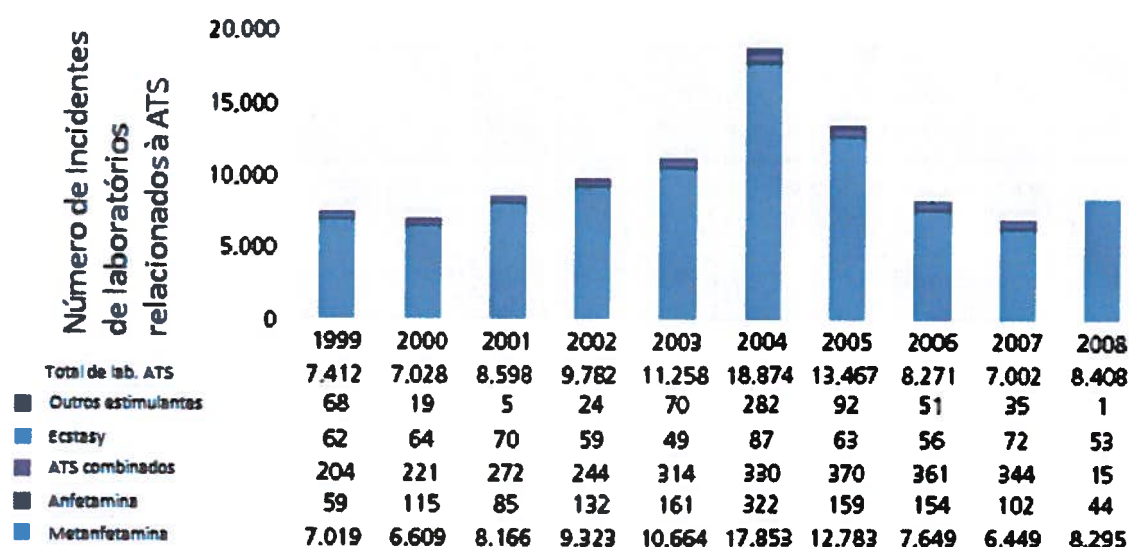


Figura 4 – Número de laboratórios clandestinos, reportados à UNODC, de produção de estimulantes tipo anfetamina no mundo, de 2000 a 2008. Fonte: UNODC World Drug Report 2010

O uso de anfetaminas aumentou significativamente a partir da década de 1990 e é responsável por grande parte dos tratamentos de recuperação contra drogas em todo mundo, sendo que 12% das pessoas que buscam tratamento contra drogas nas Américas, são usuários de anfetaminas. Na Ásia, região com maior incidência de abuso dessas drogas, a parcela de tratamentos devido ao uso de anfetaminas ultrapassa 50% em alguns países, como Japão, Tailândia e Filipinas, entre outros. [12]

O metabolismo dessa droga é conhecido (Figura 5), sendo que 90% da metanfetamina é excretada pela urina em até 24 horas, mais de 43% na forma inicial, 15% como p-hidroximetanfetamina e de 4% a 7% como anfetamina, que é metabolizada em ácido benzóico, fenilacetona, ácido hipúrico (ácido

benzoilaminoacético), p-hidroxianfetamina e norefedrina, que também podem ser encontrados na urina. [8,14]

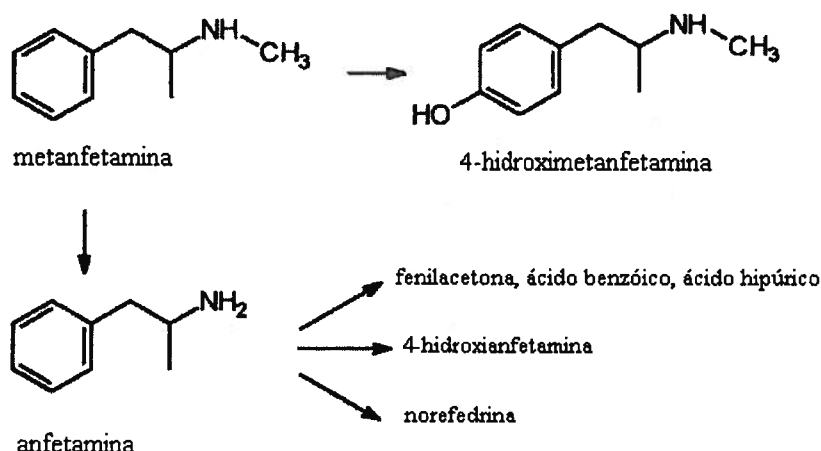


Figura 5 – Esquema metabólico para metanfetamina. Fonte: Forensic Science International 96 (1998) 61–70

Para controle de metanfetamina em urina, é considerado como critério quantitativo para resultado positivo a concentração de  $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de metanfetamina. A metanfetamina também pode ser monitorada em outras matrizes biológicas como soro, saliva, cabelo e unhas, porém, a concentração é menor, sendo que para cabelo essa concentração é da ordem de  $\text{ng.mg}^{-1}$  em casos de abuso crônico. [8]

## 2.2 Fluido biológico – Urina

Com o aumento do abuso de drogas, análises toxicológicas tem se tornado extremamente necessárias para o controle do uso de drogas, pelos órgãos de segurança ou por centros de tratamento. Contudo, essas análises são feitas em matrizes biológicas comumente complexas.

A urina é uma das matrizes biológicas mais utilizadas pela sua facilidade de coleta, a possibilidade de não se fazer pré-tratamentos, levando a baixos custos na análise. Além disso, apresenta altas concentrações de substâncias tóxicas, já que é a principal via de excreção de compostos estranhos ao organismo e possíveis metabólitos. Porém, esses compostos são excretados rapidamente, de modo que a urina é recomendada para análises em que o uso da droga tenha ocorrido em até 4 dias antes da coleta da amostra e deve-se coletar a primeira urina do dia para garantir maior concentração dos compostos de interesse.

### 2.3 Método de extração – QuEChERS [4-7,15-16]

Os métodos de extração são empregados pela necessidade de tornar os analitos mais disponíveis e com isso permitir resultados mais confiáveis nas análises, além de poder pré-concentrar o analito nesse processo, o que muitas vezes é vantajoso ou até necessário.

A extração por partição líquido-líquido é um método tradicional de extração no qual os analitos são separados entre líquidos imiscíveis por diferença de afinidade dos compostos por cada fase, polar ou apolar. Para aumentar a eficiência desse método, utilizam-se separações consecutivas, adicionando compostos ao sistema para aumentar o coeficiente de partição do analito. Por exemplo, sais de alto caráter iônico são usados para aumentar a força iônica da fase polar, forçando a migração de compostos menos polares para a fase orgânica, fenômeno conhecido como *salting out*.

Contudo, extrações líquido-líquido são trabalhosas e requerem grandes quantidades de solventes, aumentando o custo e a quantidade de resíduos gerados, principalmente solventes orgânicos, geralmente tóxicos e inflamáveis. Devido a esses fatores, essa forma de extração tem sido menos utilizada, gerando uma demanda por novos métodos de extração.

O método de extração QuEChERS, desenvolvido por Anastassiades *et al.*<sup>[4]</sup> em 2003 para a extração de pesticidas em frutas e vegetais, é um método simples de extração, que busca atender as exigências de um método viável para uso de rotina: rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*). Apesar de se basear na partição líquido-líquido, o método utiliza um solvente miscível em água, a acetonitrila. Isso facilita a migração dos analitos para o solvente orgânico. Em seguida, adiciona-se sulfato de magnésio, um agente secante, e NaCl, sal de elevado caráter iônico, para aumentar a força iônica e, assim, fazer a partição das fases e forçar a migração dos analitos para a fase orgânica, devido ao efeito *salting out*. Dessa forma, após centrifugar o sistema, têm-se as fases bem separadas, com os analitos na fase orgânica, que é o sobrenadante. Este é transferido para um tubo contendo sulfato de magnésio e amina primária-secundária (PSA) adsorvente, que atua como um composto para



extração em fase sólida dispersiva (dSPE), para remover água e possíveis interferentes da matriz (*clean up*). Após agitação e centrifugação, o sobrenadante é injetado no cromatógrafo.

O método descrito por Anastassiades consiste em adicionar 10 mL de acetonitrila a 10 g de amostra sólida, agitar vigorosamente por 1 minuto. Em seguida, adiciona-se 1 g de cloreto de sódio e 4 g de sulfato de magnésio para que ocorra a partição líquido-líquido. Agita-se a mistura vigorosamente por 1 minuto, centrifuga-se por 5 minutos a 3000 rpm, e retira-se o sobrenadante, colocando-o em um tubo contendo 25 mg de PSA adsorvente, um componente de extração em fase sólida dispersiva, e 125 mg de MgSO<sub>4</sub>. Agita-se manualmente por 1 minuto e centrifuga-se por 5 minutos a 3000 rpm. Assim, tem-se o extrato adequado para introdução no cromatógrafo líquido.

O método é considerado rápido, pois em 30 minutos é possível que um único operador faça a extração de 6 a 12 amostras; fácil de realizar, pois consiste de mistura de reagentes, agitação e centrifugação, procedimentos comuns em um laboratório; econômico, tanto na implementação em um laboratório quanto na rotina, visto que os equipamentos necessários e reagentes são baratos e comuns; efetivo, apresentando percentuais de recuperação maiores que 85% para diversos compostos; robusto, sendo transferido com sucesso entre laboratórios; seguro, pois utiliza acetonitrila como solvente, que, apesar de ser tóxico e teratogênico, é menos prejudicial à saúde, já que é menos inalado devido a seu ponto de ebulição elevado, se comparado com outros solventes orgânicos. [5,15]

Após sua publicação, modificações do método QuEChERS foram propostas de modo a ampliar a gama de compostos a serem extraídos eficientemente e permitir extração em diferentes matrizes.

## **2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência [17-18]**

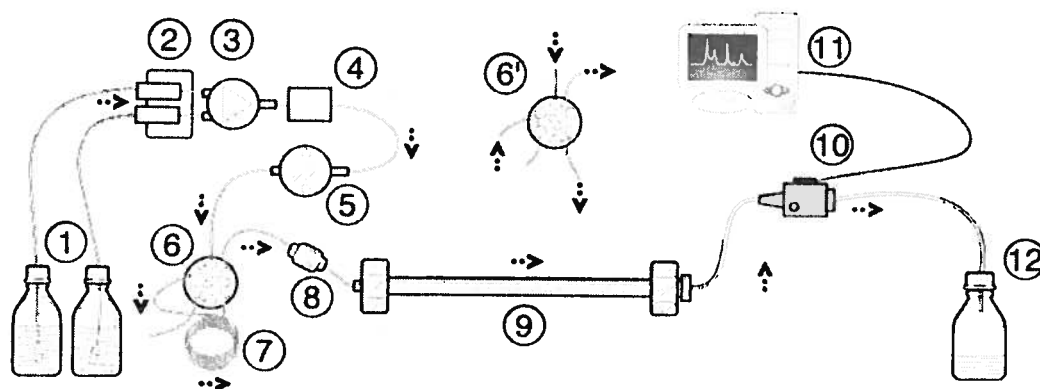
As separações cromatográficas têm seu início atribuído a Mikhael Semenovich Tswett, em 1906, quando publicou dois trabalhos, descrevendo sua pesquisa na qual separou componentes de extrato de folhas utilizando sólidos finamente divididos em uma coluna de vidro, arrastando os componentes com éter de petróleo. Como os experimentos de Tswett envolviam compostos coloridos, a separação recebeu o nome de Cromatografia, uma palavra de origem grega que

significa escrita de cores. Contudo, dados relatam o uso de processos semelhantes desde a antiguidade.<sup>[19]</sup>

Porém, apenas na década de 1930 a cromatografia passou a ser utilizada com maior importância, quando Kuhn e Lederer aperfeiçoaram a técnica em coluna. Martin e Syngge também tiveram contribuição importante à cromatografia com trabalho publicado em 1941, descrevendo a cromatografia de partição líquido-líquido, que lhes rendeu o prêmio Nobel. Nesse trabalho, descreveram também métodos cromatográficos que poderiam ser desenvolvidos utilizando pressurização do eluente. Esses métodos são a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida de alta eficiência.

A cromatografia se baseia na separação de compostos que percorrem a fase estacionária, enquanto a fase móvel, elui por esta arrastando os componentes da amostra. A separação ocorre pela diferença de interação dos analitos entre a fase móvel e a fase estacionária. Essa separação ocorre de diferentes formas, dependendo do tipo de fase estacionária utilizada na coluna.

Os equipamentos para CLAE, cromatografia líquida de alta eficiência, ou HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*, consistem de sistemas, que podem ser completamente automatizados, compostos por reservatório de fase móvel, bomba de alta pressão, injetor, coluna cromatográfica, detector e sistema de aquisição de dados, como mostrado na figura 6. Em sistemas mais sofisticados outros módulos podem estar acoplados ao sistema como forno para coluna e coletor de fração.



- 1) Reservatório de fase móvel; 2) Degaseificador; 3) Válvula de gradiente; 4) Câmara de mistura de fase móvel;
- 5) Bombas de alta pressão; 6) Válvula de injeção em posição de injeção; 6') Válvula de injeção em posição de carregamento; 7) Alça de injeção; 8) Coluna de guarda; 9) Coluna analítica; 10) Detector; 11) Estação de tratamento de dados; 12) Descarte

Figura 6 – Esquema de um cromatógrafo CLAE

### **2.4.1 Fases estacionárias**

A fase estacionária de uma coluna é selecionada de acordo com a técnica a ser utilizada. As técnicas utilizadas em CLAE são:

1. Cromatografia por adsorção
2. Cromatografia por partição
3. Cromatografia com fase quimicamente ligada
4. Cromatografia quiral
5. Cromatografia por troca iônica
6. Cromatografia por bioafinidade
7. Cromatografia por exclusão

Em sistemas de adsorção, incluindo cromatografia com fase quimicamente ligada, há subdivisão em fase normal e fase reversa.

O modo de fase normal consiste de uma coluna com fase estacionária polar e a força da fase móvel aumenta com o aumento da polaridade. Assim, compostos pouco polares ou apolares tem menor tempo de retenção enquanto compostos polares são retidos mais fortemente.

O modo de fase reversa opera de forma oposta, sendo a fase estacionária da coluna apolar e, conseqüentemente, a força da fase móvel aumenta com a diminuição da polaridade. Assim, compostos polares são fracamente retidos enquanto compostos pouco polares tem maior tempo de retenção.

### **2.4.2 Fase móvel**

A fase móvel em CLAE deve ser um líquido que possa arrastar a amostra pela coluna, permitindo a separação dos componentes da amostra na fase estacionária. Dessa forma, para cada tipo de análise deve-se estudar a fase móvel de acordo com os analitos e a fase estacionária.

A fase móvel pode ser constituída por um solvente ou uma mistura de solventes, podendo-se utilizar soluções salinas e tampões. Assim, podem-se estudar

diferentes fases móveis para melhorar a separação dos compostos de interesse, utilizando diferentes fases móveis e diferentes proporções de suas composições.

#### **2.4.3 Reservatório de fase móvel**

O reservatório da fase móvel armazena a fase móvel durante o processo cromatográfico. Possui um filtro no tubo de captação para reter partículas que possam obstruir a linha de fluxo. É recomendado, porém, a filtragem da fase móvel antes de ser colocada no reservatório, em filtros de porosidade menor que o tamanho das partículas presentes na coluna. Com a mesma finalidade, devem-se remover gases solubilizados na fase móvel, podendo-se fazer isso externamente, em um banho de ultrassom com vácuo, ou internamente ao sistema, com um módulo degaseificador.

#### **2.4.4 Bomba de alta pressão**

A bomba de alta pressão tem finalidade de manter o fluxo de fase móvel constante na coluna cromatográfica, exercendo pressão suficiente para que a fase móvel vença a pressão das partículas da coluna devido ao empacotamento. Com isso, é possível a realização de separações cromatográficas em tempos pequenos, que não poderiam ser atingidos em cromatografia líquida clássica.

Em um sistema cromatográfico, pode-se utilizar mais de uma bomba de alta pressão, podendo-se, assim, utilizar mais de uma fase móvel, o que possibilita a eluição por gradiente de fase móvel, ou simplesmente a mistura de fases móveis dentro do sistema, em modo isocrático.

#### **2.4.5 Injetor**

O sistema de injeção em CLAE deve fornecer injeções reprodutíveis e, para isso, possui uma alça de amostragem, de volume definido, em uma conexão de válvula de seis canais, chamada válvula de amostragem. A válvula, em posição de carregamento, permite a injeção da amostra na alça de amostragem. Assim, injeta-se um volume maior que o volume da alça, lavando-a e garantindo que o volume que será injetado na coluna seja definido. A injeção na válvula pode ser feita

manualmente, com uma seringa, ou por um amostrador automático. O excesso de amostra injetada sai por um canal diretamente ao descarte e a fase móvel passa diretamente da bomba para a coluna. Ao colocar a válvula em posição de injeção, a fase móvel passa pela alça de injeção e arrasta a amostra para a coluna.

#### **2.4.6 Colunas**

Os sistemas CLAE podem utilizar até três tipos de colunas: coluna de saturação, coluna de guarda e coluna de separação, sendo que as duas primeiras são utilizadas para proteger a coluna de separação, visando maior tempo de utilização desta e maior reprodutibilidade, sendo, portanto, de uso facultativo.

A coluna de saturação consiste de uma coluna com a mesma fase estacionária que a coluna de separação e tem por finalidade saturar a fase móvel com a fase estacionária, evitando que a fase estacionária da coluna de separação seja destruída. Esse tipo de coluna é necessário para colunas de fase estacionária líquida, porém, com o uso de colunas de separação de fase quimicamente ligadas, a coluna de saturação não é necessária.

A coluna de guarda é uma coluna de fase estacionária igual ou semelhante a da coluna de separação que visa evitar que impurezas e compostos fiquem fortemente retidos na coluna de separação, sendo, portanto, colocada logo antes desta. Essas colunas são indicadas especialmente para trabalhos com matrizes complexas, como fluidos biológicos.

A coluna de separação é uma parte de extrema importância para o cromatógrafo, visto que nela se processa a função do instrumento. A coluna de separação escolhida para um trabalho leva em conta o comprimento e diâmetro interno da coluna, o tamanho das partículas do recheio e o tipo de fase estacionária, de acordo com a técnica.

A utilização de um forno para a coluna é recomendado para evitar variações da eficiência devido à temperatura, porém, não há relação direta entre a temperatura e melhora na eficiência, devendo ser analisada para cada situação, dependendo da matriz, da coluna e da fase móvel.

### **2.4.7 Detectores**

A cromatografia é uma técnica de separação que necessita de uma técnica para identificação posterior, de forma que é possível usar várias técnicas para esse fim, desde que esta permita o monitoramento constante de uma propriedade física ou físico-química do eluído. O detector é escolhido em função da finalidade do instrumento, buscando alta seletividade, detectabilidade e linha de base estável.

Os detectores mais utilizados atualmente são:

- 1) Detector por absorbância no ultravioleta-visível (UV-Vis)
- 2) Detector por fluorescência
- 3) Detector por índice de refração
- 4) Detector por espalhamento de luz
- 5) Detector eletroquímico
- 6) Detector por espectrometria de massas

Neste trabalho detalharemos apenas o detector por absorbância na região do UV-Vis, que foi aqui empregado.

### **2.4.8 Detector por absorbância no ultravioleta-visível (UV-Vis)**

Os detectores UV-Vis são os mais empregados em sistemas de CLAE, sendo chamados CLAE-UV, por serem relativamente baratos, de fácil manutenção e eficientes para grande parte das análises. Usando sistema de comprimento de onda variável ou sistemas de detecção por arranjo de diodo, os detectores UV-Vis não são utilizados apenas quando: (i) os analítos não absorvem satisfatoriamente na região UV-Vis do espectro; (ii) as concentrações são baixas para detecção UV-Vis; (iii) amostra com interferência importante na região UV-Vis; (iv) há necessidade de informações estruturais do analito.

O funcionamento de um detector UV-Vis se baseia na absorção de radiação com comprimentos de onda na região do ultravioleta-visível por compostos presentes em uma solução. Essa absorção é descrita pela lei de Lambert-Beer, que propõe que a absorbância  $A$  é proporcional à concentração  $c$  do cromóforo na

solução, ao caminho óptico  $b$  da cela de absorção, e ao coeficiente de absorvidade molar do soluto,  $\epsilon$ . Essa relação é descrita pela equação  $A = \epsilon bc$ , de forma que a absorção apresenta uma relação linear com a concentração do analito.

A absorbância é a razão entre a transmitância de um feixe de radiação que atravessa a amostra e de um feixe de radiação que atravessa um sistema de referência, sendo essas transmitâncias medidas como intensidade dos feixes transmitidos.

$A = \frac{T}{T_0} = \log\left(\frac{I}{I_0}\right)$ . A fonte de radiação, que pode ser composta por uma lâmpada de deutério, para radiação UV, e uma lâmpada de tungstênio, para radiação visível, emite a radiação como um contínuo. Essa radiação é incidida sobre fendas, espelhos e lentes para colimar e focalizar o feixe em uma grade de difração, separando assim os comprimentos de onda, fazendo com que apenas o comprimento de onda de interesse atravessasse as celas de absorção, tanto de referência como de amostra. Com isso, tem-se como sinal analítico a intensidade da radiação do comprimento de onda desejado. Um esquema de espectrofotômetro UV-Vis é mostrado na Figura 7.

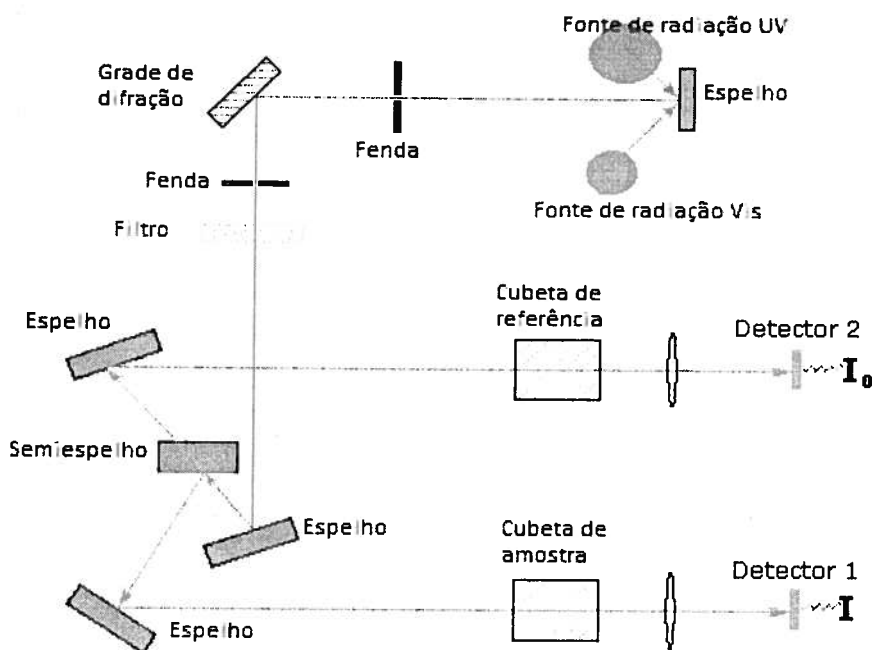


Figura 7 – Esquema de um espectrômetro UV-Vis.

Sistemas mais sofisticados de detecção UV-Vis tem empregado detectores por arranjo de diodo, que permitem que a radiação contínua emitida pela fonte seja incidida na amostra antes de ser difratada, e depois incidida em fotodiodos

arranjados em posição que permita a captação de feixes com comprimentos de onda separados. Assim, todo o espectro UV-Vis pode ser monitorado simultaneamente. Um esquema simplificado de um espectrômetro UV-Vis monocromado e de um espectrômetro UV-Vis com detector de arranjo de diodo são mostrados na figura 8.

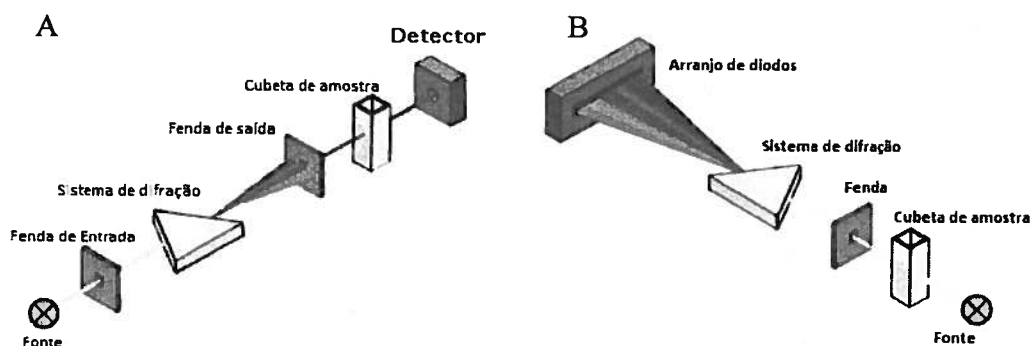


Figura 8 – Esquemas de espectrômetro UV-Vis com monocromador (A) e de arranjo de diodo (B)

Nos sistemas de CLAE, a medida de intensidade é feita em células com pequenos tubos ligados à coluna cromatográfica, de modo que o detector não retenha o eluído e permita a medida em fluxo, produzindo cromatogramas para um determinado comprimento de onda, e, no caso de detector com arranjo de diodo, é atribuído um espectro UV-Vis a cada tempo de retenção, o que permite a confirmação de um composto por comparação.



### **3. Objetivo**

Este trabalho de conclusão de curso foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o método QuEChERS para extração de metanfetamina em urina humana para posterior quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por absorção molecular na região ultravioleta-visível (CLAE-UV).

#### **3.1 Objetivos específicos**

- Otimizar as condições cromatográficas para detecção e quantificação de metanfetamina por CLAE-UV.
- Otimizar e aplicar o método de extração QuEChERS para quantificação de metanfetamina em urina humana.
- Validar o método determinando-se: faixa linear, limite de detecção e quantificação, precisão e exatidão.

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1 Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho foram:

- Metanol HPLC Grade – Merck, Darmstadt, Germany.
- Acetonitrila HPLC Grade – Merck, Darmstadt, Germany.
- Cloridrato de efedrina – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Acetato de amônio – Fmaia Gold, Cotia, SP, Brasil
- Hidróxido de Amônio P.A. - A.C.S. Synth, Diadema, SP
- Sulfato de magnésio – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Cloreto de sódio – Synth, Diadema, Brasil
- Comprimidos de metanfetamina – fornecido pelo Instituto de Criminalística de Minas Gerais
- Amina primária-secundária (PSA) dispersiva, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA.
- Água Milli-Q - Millipore DirectQ 3, France

### 4.2 Equipamentos

As análises foram realizadas no laboratório de cromatografia líquida de CDTN (centro de desenvolvimento de tecnologia nuclear), utilizando o cromatógrafo Shimadzu, da série *Prominence*, composto por degaseificador (DGU-20As), 2 bombas de pistão duplo (LC-6AD), auto-amostrador (SIL-20A), forno de coluna com injetor manual (CTO-20A), detector UV-Vis com arranjo de diodo (SPD-M20A) e comunicador de sistema (CBM-20A). A coluna utilizada foi Supelco Discovery<sup>®</sup> HS F5, 150 x 2.1 mm, com partículas de 3 µm. O tratamento de dados foi realizado empregando o programa Shimadzu LC-Solutions<sup>®</sup>. Foram utilizados também uma balança analítica Shimadzu modelo AX 200, (Filipinas), banho de ultrassom Unique modelo Ultra Cleaner 1400A (Brasil); agitador vortex Phoenix modelo AP 56, (Araraquara, Brasil) e uma centrífuga FANEM modelo Baby II (São Paulo, Brasil).

### 4.3 Coleta de amostras

Foram coletadas amostras de urina de 29 voluntários do departamento de química do instituto de ciências exatas (ICEx) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), de ambos os sexos, com idade entre 18 e 35, sadios, auto-declarados como não usuários de metanfetamina e efedrina ou medicamentos que contenham esses compostos. Após a coleta foi feito um *pool* das amostras, que foi armazenado sob refrigeração em freezer. Esse *pool* foi utilizado em todos os experimentos do trabalho.

### 4.4 Procedimentos

#### 4.4.1 Preparo de soluções

As soluções de metanfetamina foram preparadas por diluições de uma solução estoque de  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , sendo esta preparada por diluição, em acetonitrila, de uma solução de  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Essa solução foi preparada dissolvendo-se 0,01261 g de uma amostra de metanfetamina em 10 mL de metanol. A amostra de metanfetamina, cedida pelo Instituto de Criminalística de Minas Gerais, possui pureza de 80%.

As soluções de efedrina foram preparadas por diluições de uma solução estoque de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , sendo esta preparada por diluição, em acetonitrila, de uma solução padrão de  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Essa solução foi preparada dissolvendo-se 0,01205 g de cloridrato de efedrina em 10 mL de metanol.

Todas as soluções e amostras foram filtradas em filtros Millipore Millex® (São Paulo, Brasil) de porosidade  $0,45 \mu\text{m}$ .

O componente A da fase móvel, solução aquosa de acetato de amônio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  foi preparado semanalmente e filtrado a vácuo com filtro Millipore de  $0,45 \mu\text{m}$ , diariamente. O componente B da fase móvel, acetonitrila, também foi filtrado diariamente.

#### **4.4.2 Otimização das condições cromatográficas - CLAE-UV**

As análises foram feitas segundo o método de adição de padrão interno, em que um composto de características semelhantes às do analito é adicionado em concentração fixa e conhecida em todas as soluções (brancos, padrões e amostras). Assim, o sinal do analito é relacionado ao sinal do padrão interno, reduzindo erros referentes à manipulação da amostra, injeção desta e desvios de medida ocorridos no instrumento. Porém, o composto utilizado como padrão interno deve estar ausente na amostra. Para este trabalho, utilizou-se efedrina como padrão interno em concentração de  $5 \text{ mg.L}^{-1}$ .

As condições cromatográficas foram otimizadas variando-se a fase móvel, componentes e proporção, e os comprimentos de onda monitorados. O mecanismo de separação utilizado foi partição em coluna de fase quimicamente ligada, em modo de fase reversa. Para essa otimização, utilizou-se soluções contendo  $500 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  de metanfetamina e  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  de efedrina em acetonitrila. Buscaram-se condições cromatográficas que conduzissem a boa resolução entre os picos do analito e do padrão interno, boa simetria dos picos, menor tempo de retenção e linha de base estável.

Após a definição das condições cromatográficas foram injetadas soluções, em acetonitrila, de metanfetamina  $1,0 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  e de efedrina  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  e uma solução contendo ambos os compostos nas mesmas concentrações, além de uma solução, contendo ambos os compostos, em urina. Assim, identificaram-se os tempos de retenção de cada analito e, com isso, obtiveram-se os espectros de absorção molecular dos compostos.

#### **4.4.3 Otimização do método de QuEChERS**

O método QuEChERS foi empregado com algumas modificações devido à natureza líquida da matriz. Por ser uma aplicação ainda não descrita na literatura, avaliou-se 5 parâmetros através de planejamento fatorial fracionário  $2^{5-2}$ . Os parâmetros avaliados foram: composição do solvente extrator, volume do solvente extrator, utilização de extração em fase sólida dispersiva (dSPE), massa de  $\text{MgSO}_4$

e modo de agitação. Na tabela 1 se encontram os níveis avaliados para cada uma das variáveis.

Tabela 1 – Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial fracionário para otimização do método QuEChERS para extração de metanfetamina em urina.

Parâmetro	Nível baixo (-1)	Nível alto (+1)
Solvente extrator	Acetonitrila	1% amônia em acetonitrila
Volume do extrator	2,5 mL	5,0 mL
dSPE	Não	Sim
Massa MgSO <sub>4</sub>	1,5 g	3,0 g
Agitação	Vórtex	Ultrassom

A extração foi feita da seguinte forma:

Em um tubo de centrifuga contendo 5,0 mL de um *pool* de urina fortificada com 500 µg.L<sup>-1</sup> de metanfetamina e 5 mg.L<sup>-1</sup> de efedrina como padrão interno, adicionou-se o volume (2,5 ou 5,0 mL) do solvente extrator (acetonitrila ou solução 1% de amônia em acetonitrila). Agitou-se utilizando-se vórtex ou ultrassom por 1 minuto. Adicionou-se 0,5 g de NaCl e a massa de MgSO<sub>4</sub> (1,5 ou 3,0 g) e agitou-se manualmente por 1 minuto. Centrifugou-se por 5 minutos a 3000 rpm. Nos experimentos em que não se utilizou a extração por fase sólida dispersiva, o sobrenadante foi coletado para injeção no cromatógrafo.

Nos experimentos em que se utilizou extração por fase sólida dispersiva, retirou-se 1,7 mL do sobrenadante, já que esse foi o volume máximo obtido para os experimentos em que se utilizam 2,5 mL de solvente extrator, e transferiu-se para um tubo de centrifuga contendo 100 mg de PSA (dSPE), agitando-se manualmente por 1 minuto e, posteriormente, centrifugando por 5 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi coletado para injeção no cromatógrafo.

Cada experimento foi realizado em triplicata.

Preparou-se 4 tipos de branco: urina não-fortificada, utilizando dSPE; urina não-fortificada, não utilizando dSPE; solução de metanfetamina 500 µg.L<sup>-1</sup> em acetonitrila, utilizando dSPE; solução de metanfetamina 500 µg.L<sup>-1</sup> em acetonitrila, não utilizando dSPE. O procedimento de preparação dos brancos foi feito como descrito anteriormente, utilizando 5,0 mL de solvente extrator, solução 1% de amônia em acetonitrila, agitação por ultrassom e 1,5 g de MgSO<sub>4</sub>.

Os resultados desse planejamento foram tratados e, com isso, fixaram-se as variáveis qualitativas e avaliaram-se variações das variáveis quantitativas, em

valores favoráveis ao sinal analítico no extrato, para a obtenção de uma superfície de resposta.

O planejamento dos experimentos para obtenção do modelo de superfície de resposta foi feito de modo que a extração foi realizada, como descrito anteriormente, mantendo-se fixos o modo de agitação em vórtex, a solução 1% de  $\text{NH}_3$  em acetonitrila como solvente extrator e o uso de dSPE. O volume de solvente extrator e a massa de  $\text{MgSO}_4$  foram variados de acordo com a tabela 2.

Tabela 2 – Planejamento composto central utilizado para obtenção das condições ótimas para extração de metanfetamina de amostras de urina

Experimento	Volume de solvente (mL)	Massa de $\text{MgSO}_4$ (g)
1	1	1
2	3	1
3	1	2
4	3	2
5	0,6	1,5
6	3,4	1,5
7	2	0,795
8	2	2,205
9	2	1,5
10	2	1,5
11	2	1,5

#### 4.4.4. Avaliação de alguns parâmetros de desempenho do método

Nas condições otimizadas para a extração, fez-se a avaliação de alguns parâmetros de desempenho do método de extração: faixa linear de trabalho, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão.<sup>[20]</sup>

Preparou-se uma curva analítica por adição de padrão interno com soluções, em extrato, de concentração 0, 100, 250, 500, 750 e 1000  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de metanfetamina e 5  $\text{mg.L}^{-1}$  de efedrina como padrão interno. As soluções foram preparadas em duplicata, com exceção do branco, o qual foram preparados 10 extratos.

Para avaliar precisão e exatidão, prepararam-se extratos de urina fortificada nas concentrações de 100, 400 e 800  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , em triplicata.

## 5. Resultados e discussão

### 5.1 Otimização das condições cromatográficas

Após a obtenção dos espectros de absorção molecular da metanfetamina e da efedrina (Figura 9) utilizando fase móvel 40:60, verificou-se que os comprimentos de onda de maior sensibilidade eram 285 nm, para monitorar metanfetamina, e 257 nm, para monitorar efedrina. O sinal analítico utilizado foi a razão da área de metanfetamina a 285 nm pela área de efedrina a 257 nm.

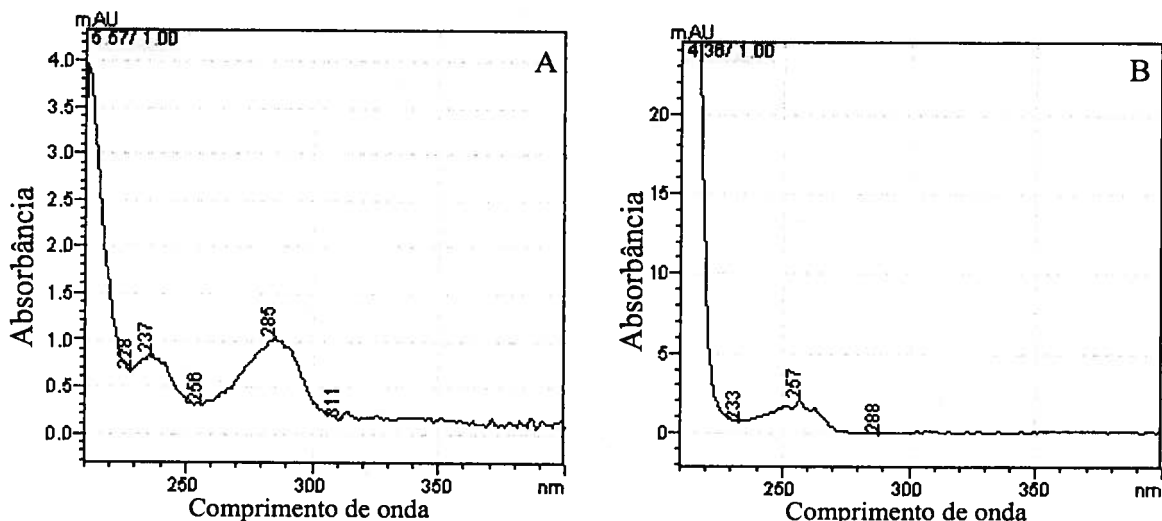


Figura 9 – Espectros de absorção molecular da metanfetamina em A e de efedrina em B.

Um dos componentes da fase móvel foi uma solução aquosa de acetato de amônio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , para manter o pH da fase móvel abaixo do pKa da metanfetamina e, assim, evitar sua forma descarregada. Dessa maneira, a polaridade da molécula é maior e faz com que ela seja retida por menor tempo na coluna. O outro componente da fase móvel, acetonitrila, foi escolhido por ser o solvente utilizado na preparação das soluções e na extração.

O fluxo de fase móvel utilizado foi  $0,2 \text{ mL}$  por minuto, devido às propriedades da coluna utilizada.

A proporção dos componentes foi estudada visando a separação significativa dos tempos de retenção dos analitos e do tempo morto, sem que isso provocasse grande alargamento dos picos. Assim, estudou-se proporções de acetato de amônio:acetonitrila de 35:65, 40:60, 45:55 e 50:50.

Na proporção de 35:65 a separação dos picos referentes aos analitos foi satisfatória, porém, quando injetada a amostra, os picos foram sobrepostos pelo pico da amostra (figura 10).

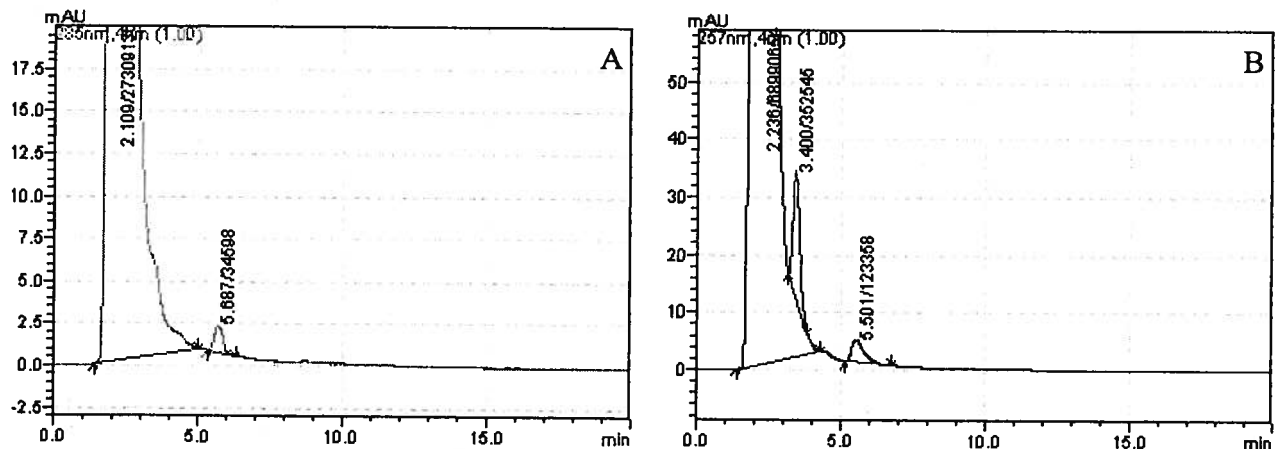


Figura 10 - Cromatogramas de solução de metanfetamina e efedrina em urina, nos comprimentos de onda de 285 nm, em A, e 257 nm, em B, com fase móvel 35:65.

Na proporção de 40:60, os picos dos analitos tiveram boa resolução e não foram sobrepostos ao pico da amostra. Dessa forma, essa proporção dos componentes da fase móvel foi utilizada nas análises.

A fase móvel utilizada para as análises foi 40% de Solução de acetato de amônio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ; 60% de Acetonitrila em fluxo de  $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ .

O tempo de retenção da metanfetamina, nas condições cromatográficas utilizadas foi de 5,7 minutos, como mostrado nas figuras 11 e 12, e o tempo de retenção da efedrina é de aproximadamente 4,4 minutos. Pelo software do equipamento, o tempo de retenção foi aceito com janela de 5%.

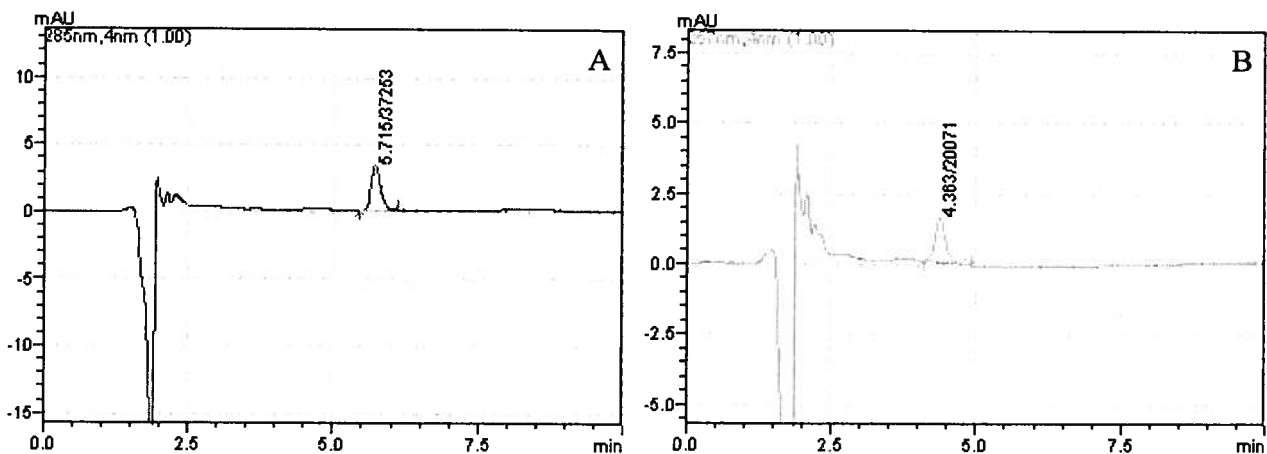


Figura 11 - Cromatogramas de solução de metanfetamina e efedrina em acetonitrila, nos comprimentos de onda de 285 nm, em A, e 257 nm, em B, com fase móvel 40:60.



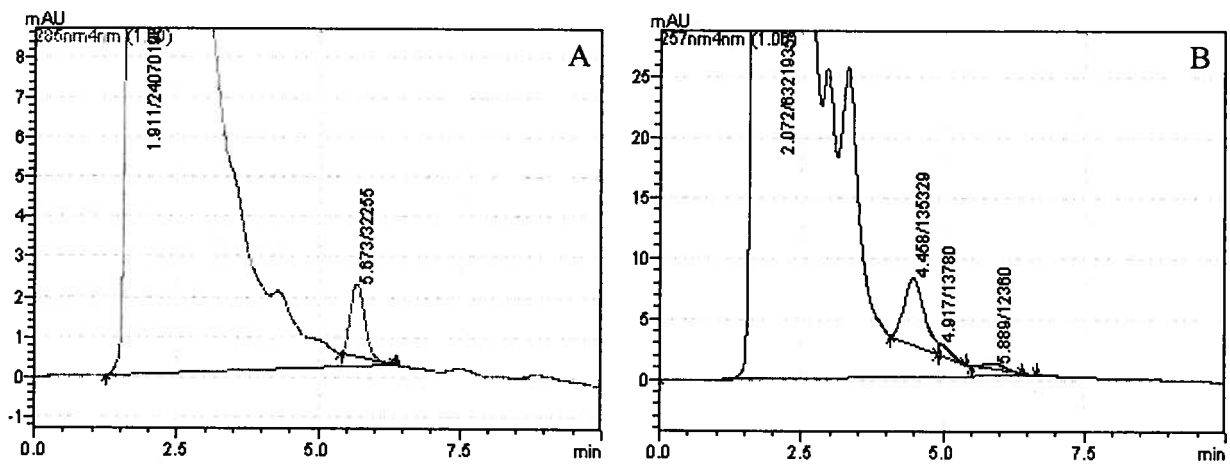


Figura 12 – Cromatogramas de solução de metanfetamina e efedrina em urina, nos comprimentos de onda de 285 nm, à esquerda, e 257 nm, à direita, com fase móvel 40:60.

## 5.2. Otimização do método de QuEChERS

Os resultados obtidos no planejamento fatorial fracionário realizado para triagem de variáveis na otimização do método de QuEChERS podem ser visualizados na tabela 3.

Tabela 3 – Planejamento Fatorial Fracionário para otimização do método QuEChERS (n =3)

Exp.	Solvente	Volume	dSPE	Massa MgSO <sub>4</sub>	Agitação	$A_{\text{metanf}}/A_{\text{ef}}$ *
1	-	-	-	+	+	0,042 ± 0,002
2	-	-	+	+	-	0,084 ± 0,001
3	-	+	-	-	+	0,043 ± 0,001
4	-	+	+	-	-	0,019 ± 0,002
5	+	-	-	-	-	0,086 ± 0,004
6	+	-	+	-	+	0,110 ± 0,002
7	+	+	-	+	-	0,038 ± 0,001
8	+	+	+	+	+	0,017 ± 0,001

\* Média ± desvio padrão

Os resultados obtidos na análise do planejamento fatorial fracionário foram tratados no software Statistica® e com os resultados, indicados pelo gráfico de Pareto (figura 13), conclui-se que todas as variáveis avaliadas são significativas para o modelo do sistema de extração.

Observou-se que a variável mais importante é o volume de solvente extrator, que quanto menor, produz maior resposta (efeito negativo), devido ao maior fator de pré-concentração. Com relação à massa de MgSO<sub>4</sub>, os melhores resultados também foram obtidos com para massas menores (efeito negativo). Pode-se verificar também que a utilização do processo de *clean up* com dSPE melhorou o resultado (efeito positivo), pois pode produzir um extrato mais limpo, diminuindo a quantidade de componentes que podem interferir na análise cromatográfica. Em relação à composição do solvente extrator, o efeito foi significativo e positivo, indicando que a adição de 1% de hidróxido de amônio à acetonitrila melhora a extração. Isso se deve ao fato da metanfetamina ser um composto básico, pka = 10,38, e com a adição de hidróxido de amônio, a molécula é desprotonada, o que favorece a extração para o solvente menos polar.

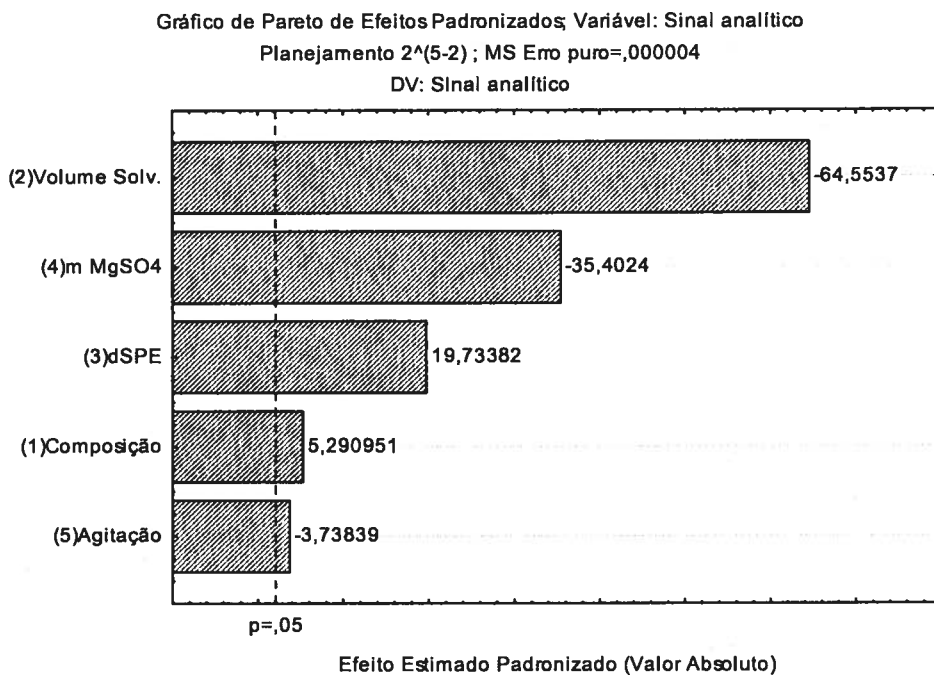


Figura 13 – Gráfico de Pareto para a análise por planejamento fatorial  $2^{5-2}$

Por último, observou-se que agitação utilizando vórtex conduziu à melhores resultados. Desta forma, estas 3 últimas condições foram fixadas (uso do dSPE, acetonitrila com 1% de hidróxido de amônio e agitação por vortex) e um planejamento composto central foi realizado para obtenção das quantidades ótimas de solvente extrator e massa de  $MgSO_4$ .

Os resultados desses experimentos também foram tratados no software Statistica®, gerando superfície de resposta apresentada na figura 14.

Superfície de resposta; Variável: Área Normalizada  
2 fatores, 1 bloco, 11 pontos; MS Erro puro=,0625333  
DV: Área Normalizada

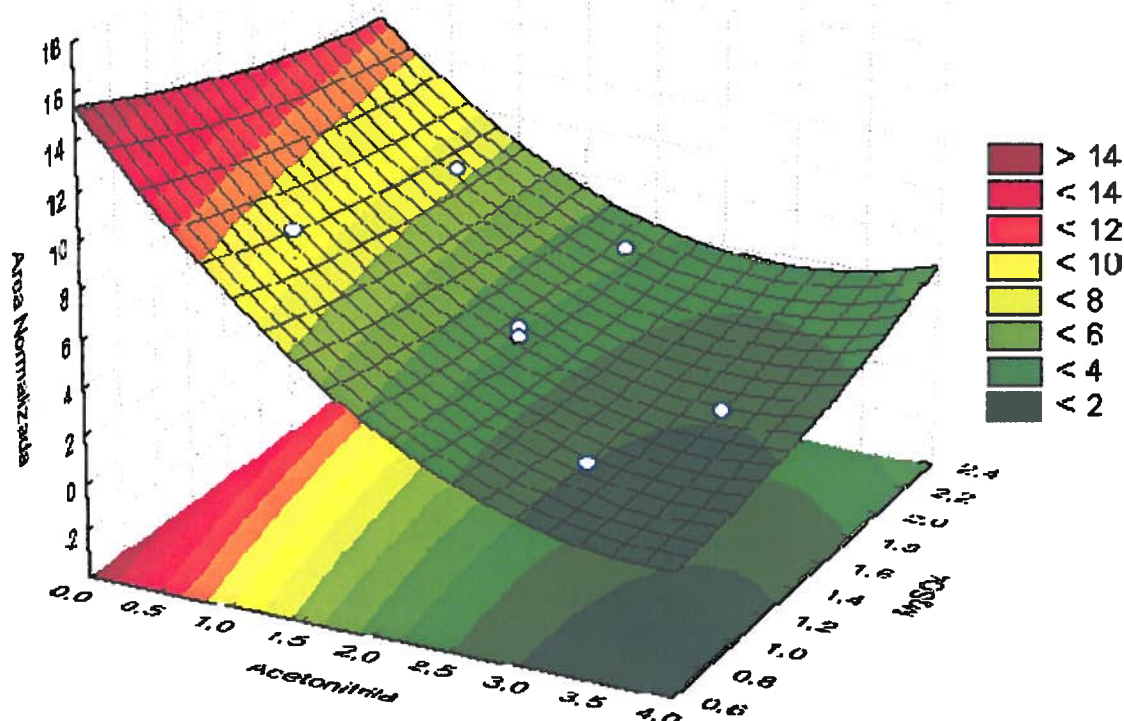


Figura 14 – Superfície de resposta obtida no planejamento composto central para otimização das variáveis volume de solvente extrator e massa de  $\text{MgSO}_4$ .

Observa-se que o volume de solvente teve um efeito mais evidente no aumento da resposta analítica. O modelo criado pelo software para descrever as variáveis indica que volumes menores de solvente extrator apresentam maiores sinais analíticos, o que foi descrito também pelo planejamento fatorial e discutido anteriormente. Porém, essa variação de volume é limitada por fatores práticos, já que o volume de extrato obtido é pequeno para volumes de solvente extrator menores que 1,0 mL. Apesar de o efeito ter sido menos pronunciado, massas menores de  $\text{MgSO}_4$  também parecem conduzir a melhores resultados, sendo também limitado por fatores práticos, realizando a extração de maneira menos eficiente. Não se obteve nesta superfície um ponto de máximo, entretanto não foi possível expandir o planejamento para a obtenção deste ponto, por questões experimentais, como já discutido anteriormente.

Dessa forma, assumiu-se a extração utilizando 1,0 mL de solução de 1% de  $\text{NH}_3$  em acetonitrila como solvente extrator, agitação em vórtex, 1,0 g de  $\text{MgSO}_4$  e *clean up* com dSPE.

## 5.2 Avaliação dos parâmetros de desempenho

Preparou-se uma curva de calibração de 100 a 1000  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de metanfetamina e 5  $\text{mg L}^{-1}$  de efedrina, como padrão interno, usando como solvente o extrato de brancos analíticos. A curva foi feita em duplicata e com a média dos sinais analíticos, plotou-se um gráfico (figura 15) utilizando o software Origin<sup>®</sup>, que por regressão linear, gerou a curva de calibração. O ponto referente à solução de 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  foi desconsiderado, pois é visivelmente um *outlier*.

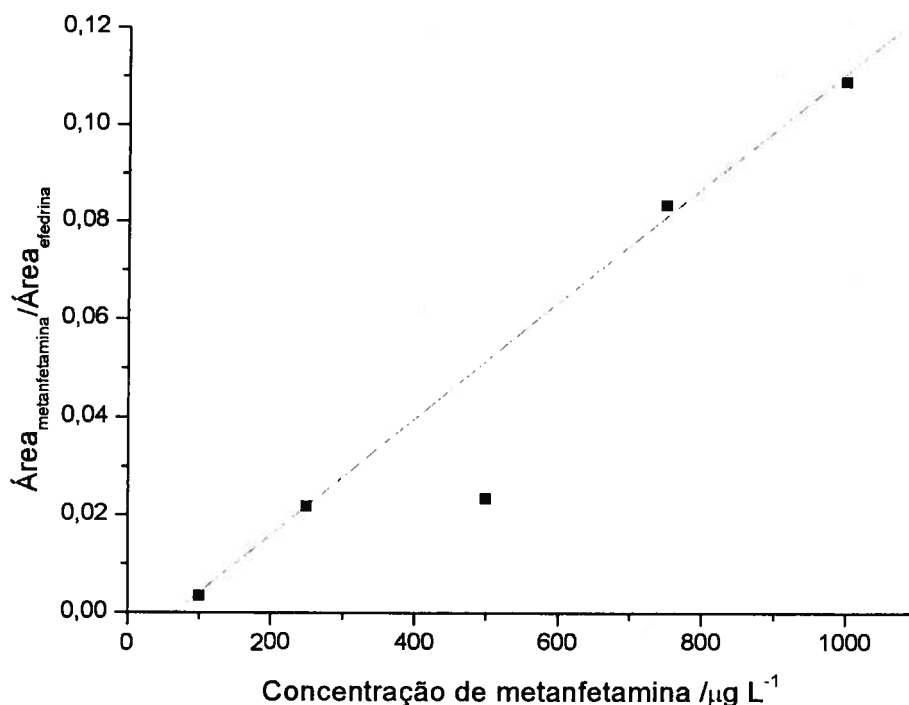


Figura 15 – Gráfico da curva de calibração obtida para metanfetamina, utilizando efedrina como padrão interno

Os parâmetros da curva de calibração podem ser visualizados na tabela 4. O coeficiente de correlação obtido foi adequado ( $R = 0,9997$ ).

O limite de detecção, LD, e o limite de quantificação, LQ, foram calculados baseado em parâmetros da curva analítica, como descrito por Butolli *et al.*<sup>[20]</sup>, utilizando as equações 1 e 2. Os valores de LD e LQ estão presentes na tabela 4.

$$LD = 3,3x\frac{s}{S} \quad (1) \quad \text{e} \quad LQ = 10x\frac{s}{S}; \quad (2)$$

onde *s* é a estimativa do desvio padrão da resposta, sendo que foi utilizado o desvio padrão do coeficiente linear da equação da curva de calibração, e *S* é o coeficiente angular.

Tabela 4 – Parâmetros da curva de calibração, limite de detecção e limite de quantificação obtidos para a determinação de metanfetamina em urina.

Equação	$(1,20327E-4 \pm 2,04153E-6) X - 0,01059 \pm 0,00131$
R	0,9997
Faixa Linear	100 a 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$
LD	35,9 $\mu\text{g.L}^{-1}$
LQ	109 $\mu\text{g.L}^{-1}$

Os limites de detecção e quantificação descritos na tabela 4 se referem às concentrações no extrato. Considerando que durante a extração ocorre uma concentração de 5 vezes (5 mL de urina para 1 mL de acetonitrila), esses limites para urina são cinco vezes menores, sendo de 7,18  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e 21,8  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , respectivamente para limite de detecção e quantificação. O limite de detecção obtido por Kumihashi *et al.*<sup>[21]</sup> foi de 5,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , utilizando um processo de extração em coluna acoplada ao CLAE. Como a taxa de excreção da metanfetamina inalterada na urina é alta (45%) e o desenvolvimento deste método visa aplicações forenses, considera-se que os limites de detecção e quantificação são satisfatórios. Em um trabalho que avaliou a concentração de metanfetamina na urina de 158 indivíduos suspeitos de uso desta droga, as concentrações variaram de 140 a 426000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .<sup>[21]</sup>

Os sinais analíticos dos extratos utilizados no ensaio de precisão e exatidão foram correlacionados às concentrações respectivas pela equação da curva de calibração. Essas foram divididas pelo fator de pré-concentração referente à extração, de 5:1, obtendo-se como resultado as concentrações das urinas fortificadas. As concentrações, expressas por seus intervalos de confiança a 95% compõem a tabela 5. O intervalo de confiança é descrito segundo a equação

$IC = \bar{x} \pm t \frac{s}{\sqrt{n}}$ , onde  $\bar{x}$  é a média das medidas, t é o fator t de student, s é o desvio padrão das amostras e n o numero de amostras.

As concentrações médias obtidas foram utilizadas para calcular a porcentagem de recuperação, tomado como parâmetro de exatidão. A porcentagem de recuperação é a razão entre a concentração obtida através da análise e a concentração adicionada à matriz, multiplicado por 100.

A precisão foi calculada como desvio padrão relativo (RSD), que é a razão do desvio padrão das amostras pela média destas, exibido como porcentagem. Os resultados referentes aos estudos de precisão e exatidão são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Intervalo de confiança de concentrações extraídas, fator de recuperação e RSD de urinas fortificadas com 100, 400 e 800  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . n = 3

Concentração adicionada / $\mu\text{g L}^{-1}$	Concentração obtida / $\mu\text{g L}^{-1}$	Recuperação / %	RSD / %
100	66,9 ± 13,7	66,9	8,25
400	255 ± 150	63,6	23,7
800	489 ± 42	61,1	3,43

Observar-se pelos resultados obtidos que as recuperações foram baixas, (em torno de 60%), indicando exatidão inadequada. Isso pode ter ocorrido por perda de analito adsorvido aos sais utilizados para remoção da água ou ainda pela condição utilizada na extração não ter sido suficiente para uma completa extração. Para tentar sanar esse problema, serão realizados estudos com maior adição de hidróxido de amônio ao solvente (garantir que realmente todo o analito esteja desprotonado) e volumes um pouco maiores de acetonitrila, pois a quantidade requerida para completa extração pode ser maior que aquela que conduziu ao maior fator de pré-concentração. Esses estudos ainda não foram realizados por falta de tempo para a finalização da monografia.

Com relação à precisão, valores de RSD adequados (< 10%) foram obtidos para as concentrações de 100 e 800  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , mas não para a concentração de 400  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Esse parâmetro também será reavaliado nos estudos para se melhorar a exatidão do método.

## 6. Conclusão

O método de extração apresentou porcentagens de recuperação maiores que 60%. Contudo, esse valor é menor que os obtidos com o método QuEChERS para extração de pesticidas em frutas e vegetais, que apresentam recuperação maiores que 85%. Como já mencionado, essa baixa recuperação pode ser devido ao pequeno volume utilizado de solvente extrator, de modo que não foi extraído todo o analito ou a perdas de analito protonado por adsorção no sal utilizado para remoção de água. Assim, mais estudos são necessários para que essas hipóteses sejam confirmadas.

A técnica analítica se mostrou eficiente para a análise de metanfetamina em urina, com limites de detecção e quantificação adequados.

A principal vantagem do método QuEChERS é ser um método de extração simples, rápido e de baixo custo. O estudo apresentado mostra que é possível fazer a extração de metanfetamina de urina, mas não foi avaliada a possibilidade de extração de mais compostos simultaneamente. Esse é um estudo importante para que o método de extração possa se tornar amplamente utilizável para análises forenses.



## 7. Referencias Bibliográficas

- [1] Concheiro, M.; de Castro, A.; Quintela, O.; López-Rivadulla, M.; Cruz, A., **Forensic Science International** 150 (2005) 221-226
- [2] Concheiro M.; Simões, S.M. dos S.S.; Quintela O.; de Castro A.; Dias M.J.R.; Cruz A.; López-Rivadulla M., **Forensic Science International** 171 (2007) 44–51
- [3] Chen, C.; Shen, C.; Yang, T.; Chang, Y.; Lee, M. **Talanta** 77 (2009) 1351–1357
- [4] Anastassiades, M.; Lehotay, S.J.; Stajnbaher, D.; Schenk, F.J., **J. AOAC Int.**, 86 (2003) 412
- [5] Prestes, O. D; Friggi, C. A; Martha B. Adaime, M. B.; Zanella, R., **Química Nova** 32 (2009) 1620-1634
- [6] Lehotay, S.J.; Kok, A.; Hiemstra, M. ; van Bodegraven, P., **J. AOAC Int.** 88 (2005) 595
- [7] Hercegova, A.; Domotorova, M.; Kruzlicova, D.; Matisova, E., **J. Sep. Sci.** 29 (2006) 1102
- [8] Jirovsky´, D.; Lemr K.; Ševcˇík J.; Smysl B.; Stra´nsky Z., **Forensic Science International** 96 (1998) 61–70
- [9] TRIPICCHIO, Adalberto. **Ice: droga antiga volta mais poderosa**. Disponível em: <[http://www.brasilmedicina.com.br/noticias/pgnoticias\\_det.asp?Codigo=1455&AreaSelecao=4](http://www.brasilmedicina.com.br/noticias/pgnoticias_det.asp?Codigo=1455&AreaSelecao=4)> Acesso em 03/11/2010
- [10] NIDA – National Institute on Drug Abuse – **Research Report Series: Methamphetamine** - NIH Publication Number 06-4210. Disponível em: <<http://drugabuse.gov/PDF/RRMetham.pdf>> Acesso em 03/11/2010
- [11] UNODC – United Nations Office on Drugs and Crimes. *World Drug Report 2010*
- [12] Cavalcanti, CT - Notas sobre o abuso das anfetaminas - Seus perigos e prevenção. *Neurobiologia*, 27: 85-91,1958

- [13] **AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, RESOLUÇÃO Nº 480, DE 23 DE SETEMBRO DE 1999**
- [14] Schepers, R.J.F.; Oyler, J.M.; Joseph, R.E. Jr.; Cone, E.J.; Moolchan, E.T.; Huestis, M.A., **Clinical Chemistry** 49 (2003) 121-132
- [15] Dionísio, A.G.G.; Batistão, M.B; dos Santos, V.B.; Iceri, T.M.; Cassiano, N.M.; Cass, Q.B.; **Scientia Chromatographica** 2 (2010) 19-29
- [16] Maurer, H. H. **Clin.Biochem.**38 (2005) 310– 318
- [17] COLLINS, C.H.; **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Ed. da UNICAMP, 2006, 453 p.
- [18] SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L., **Practical HPLC method development**. 2. ed. New York: Wiley, c1997. 765 p
- [19] Collins C. H; **Quim. Nova**, Vol. 29, No. 4, 889-890, 2006
- [20] Ribani, M; Bottoli C. B. G.; Collins C. H.; Jardim I. C. S. F.; Melo L. F. C., **Quim. Nova**, 27, 771-780, 2004
- [21] Kumihashi, M.; Ameno, K.; Shibayama, T.; Suga, K.; Miyauchi, H.; Jamal, M.; Wang , W.; Uekita, I.; Ijiri, I., **Journal of Chromatography B**, 845 (2007) 180–183