



Determinação de 11-nor-9-carboxi- Δ^9 -tetraidrocannabinol em urina humana por microextração líquido-líquido dispersiva com solidificação da gota orgânica flutuante e derivação on-line no sistema de injeção cromatográfico

Determination of 11-nor-9-carboxy- δ^9 -tetrahydrocannabinol in human urine by dispersive liquid-liquid microextraction with solidification of a floating organic drop and on-line derivatization in the injection system chromatographic

H. S. Dórea^{1,*}; I. A. Gomes^{1,2}; V. M. Prata¹; C. O. Moreira¹; M. R. R. Souza¹

¹Departamento de Química, Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos Poluentes, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000 São Cristóvão – SE, Brasil

²Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000 São Cristóvão – SE, Brasil

*hdorea@ufs.br

(Recebido em 08 de abril de 2016; aceito em 20 de dezembro de 2016)

A *Cannabis sativa* é a droga de abuso mais consumidas no mundo. Devido à baixa concentração dos metabólitos em amostras complexas, novas técnicas de extração estão sendo estudadas. O objetivo desse trabalho foi aplicar a Microextração Líquido-Líquido Dispersiva com Solidificação da Gota Orgânica Flutuante (DLLME-SFO) para determinar o 11-nor-9-carboxi- Δ^9 -tetraidrocannabinol (THC-COOH) em urina humana. Além disso, estabelecer um procedimento *on line* para a derivação do metabólito no injetor cromatográfico. O analito foi extraído da urina depois da hidrólise alcalina do glicuronídeo, usando o solvente de extração 1-dodecanol (30 μ L) e o metanol (200 μ L) como dispersor. NaCl 1% foi adicionado e o tempo de extração foi de 5 min. A melhor proporção entre BSTFA:extrato para derivação *on line* do THC-COOH foi 2:2, injetor operado no modo split 1:20 e temperatura de 240 °C. O extrato foi analisado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas no modo tandem (GC-MS/MS), depois da definição dos íons pais (m/z), da energia de excitação (modo ressonante) e dos íons filhos para a quantificação e confirmação (m/z) do canabinóide e do padrão interno deuterado. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram 1 e 10 ng mL⁻¹, respectivamente. O método analítico proposto apresentou vantagens com relação à sensibilidade, especificidade, linearidade e custo com relação à extração em fase sólida, assim como é adequado à química verde e seus limites são apropriados para analisar THC-COOH em urina humana.

Palavras-chave: THC-COOH, urina, DLLME-SFO.

Cannabis sativa is the most used drug in the world. Due to the low concentration of metabolites in complex samples, new extraction techniques are being studied. The objective of this study was to develop an analytical method by applying the technique of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction - Solidification of a Floating Organic Drop (DLLME-SFO) to determine 11-nor -9-carboxyl - Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC-COOH) in human urine sample. In addition, it was established an online procedure for derivatization of the metabolite in the chromatographic injector. After of the glucuronide alkaline hydrolysis, the analyte was extracted with 1-dodecanol (30 μ L) and methanol (200 μ L), as extraction and dispersive solvents, respectively, addition of 1 % NaCl and 5 min to extraction time. The best proportion between BSTFA:extract for on line derivatization of the THC-COOH was 2:2, the split was 1:20 and 240 °C for temperature. The extract was analyzed by gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry (GC-MS/MS), after definition of the parents ions (m/z), excitation energy (resonant mode) and daughter ions for quantitation and confirmation (m/z) of the cannabinoid and deuterated internal standard. The limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were 1 and 10 ng mL⁻¹, respectively. The proposed analytical method presented advantages to sensitivity, specificity, linearity and cost related to solid phase extraction, as well as being pro-ecological and appropriate limits for analysis of the THC-COOH in human urine.

Keywords: THC-COOH, urine, DLLME-SFO.

1. INTRODUÇÃO

As drogas de abuso ilegais são consideradas um problema mundial não só por envolver criminalidade, mas por debilitar a saúde física e psíquica do usuário, bem como comprometer

seu desempenho social e profissional. Dentre as drogas de abuso, a maconha ou *marijuana* (*Cannabis sativa*) é uma das mais populares e Jacobus et al. [1] afirmam que os adolescentes merecem uma atenção especial devido ao elevado consumo dessa droga (cerca de 50% na faixa dos 17 anos), mostrando que são comuns os sintomas de perda de atenção, aprendizagem, memória, qualidade do sono, riscos comportamentais, assim como mudança na estrutura do cérebro e aumento da probabilidade de problemas psíquicos futuros.

A *Cannabis sativa* tem sido utilizada por suas propriedades psicoativas há milhares de anos, tendo como principal componente psicoativo o Δ^9 -tetraidrocanabinol (Δ^9 -tetrahydrocannabinol, THC). Os canabinóides mais abundantes são o THC, seu precursor canabidiol e o canabinol, um produto de decomposição formado espontaneamente a partir do THC [2]

As principais matrizes para a análise de canabinóides em usuários são: cabelo [3], sangue [4] e urina [5]. Esta última é a amostra biológica mais utilizada para identificação do uso recente da maconha, por ser mais fácil de coletar, não invasiva e as concentrações e seus produtos de biotransformação são relativamente altas quando comparadas com as demais amostras biológicas [5]. Nessa matriz, o principal metabólito do Δ^9 -tetraidrocanabinol é o composto não psicoativo 11-nor-9-carboxi- Δ^9 -tetraidrocanabinol (*11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol*, THC-COOH), que é excretado em urina e constitui evidência de uso recente da *Cannabis* [6].

Para a determinação do metabólito THC-COOH em urina, é necessária uma etapa anterior à análise cromatográfica para isolar o composto alvo dos compostos interferentes e fazer uma pré-concentração para que o analito possa ser detectado com seletividade e confiabilidade [5].

Na etapa de preparação da amostra, novas técnicas têm sido desenvolvidas nas últimas duas décadas para melhorar a performance do método analítico, tornando a análise mais rápida, com menor ou nenhum consumo de solvente orgânico, sem perda do analito(s) durante o processo, facilidade de manipulação, resultados de precisão e exatidão de acordo com o exigido pelos órgãos de controle e diminuição na quantidade da amostra coletada. Essa tendência para que o método analítico atenda às exigências de eficiência, segurança para o analista e os requisitos da química verde, tem se tornado um dos tópicos de pesquisa mais importantes na química analítica [7].

As técnicas de microextração, portanto, são as mais estudadas atualmente, com destaque para a microextração em fase sólida (*Solid Phase Microextraction*, SPME)[3] e a microextração em fase líquida (*Liquid Phase Microextraction*, LPME) [7] com as suas variações; como a microextração em fase líquida com fibra oca (*Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction*, HF-LPME) [8], a microextração em fase líquida com gota suspensa (*Single Drop Microextraction*, SDME) [9], microextração com solidificação da gota orgânica flutuante (*Solidified Floating Organic Drop Microextraction*, SFODME) [10] e a microextração líquido-líquido dispersiva (*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*, DLLME) [11,12]. Esta última abriu novas possibilidades de combinação com outras técnicas [7], dentre elas a microextração líquido-líquido dispersiva com solidificação da gota orgânica flutuante (*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction - Solidification of a Floating Organic Drop*, DLLME-SFO) [13]. A eficiência das técnicas de microextração em fase líquida têm sido comprovadas para a determinação de diferentes analitos e amostras, tais como agrotóxicos [14] e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos [15] em água, pesticidas em vinhos [9], antibióticos em urina [16] e antidepressivos em plasma humano [17].

A microextração líquido-líquido dispersiva com solidificação da gota orgânica flutuante (DLLME-SFO) foi desenvolvida por Rezaee et al. [11] e é uma combinação das vantagens de DLLME e SFODME [18]. Tem como princípio a dispersão de um solvente entre duas fases líquidas imiscíveis, uma aquosa (amostra) e outra orgânica (fase extratora). Com uma leve agitação da solução contendo os três solventes, o analito é extraído para as microgotas que são formadas. Após a centrifugação a gota formada com a fase orgânica extratora contendo o analito é congelada em um banho de gelo, retirada com o auxílio de uma espátula e, após o retorno à fase líquida, é analisada por cromatografia em fase líquida [19] ou em fase gasosa [20]. Diagrama do processo de extração por DLLME-SFO e comparação de suas características com outras técnicas similares são apresentados por Leong et al. [21].

Alguns parâmetros são fundamentais para otimizar a capacidade de extração e pré-concentração da técnica DLLME-SFO para um determinado analito. Quanto maior a diferença entre os volumes da amostra e do solvente extrator, maior será o fator de enriquecimento do método. A escolha do solvente extrator é importante porque deve ser escolhido em função das propriedades físico-químicas do analito, ter ponto de fusão próximo a temperatura ambiente e possuir um bom comportamento cromatográfico, isto é, ser volátil e não interagir com a fase estacionária. Enquanto que o solvente dispersor possui a função de substituir os agitadores magnéticos na solução, proporcionando a dispersão do solvente extrator. Logo, este deve apresentar miscibilidade entre o solvente extrator e a amostra. A força iônica influencia na solubilidade do analito e melhora a extração. O pH está em função da acidez ou basicidade do analito, com o intuito de manter sua forma molecular neutra e facilitar a miscibilidade no solvente extrator. O tempo de extração é outro parâmetro importante para a completa extração do analito. O estado de equilíbrio entre o analito na fase aquosa e na fase orgânica extratora é atingido em segundos, devido as microgotas apresentarem uma grande área superficial, propiciando a transferência de massa. No entanto, o extrato ainda não está pronto para a análise e é fundamental a etapa de solidificação e centrifugação do solvente extrator [11,18].

A técnica DLLME-SFO tem sido usada com frequência para preparar amostras ambientais e raramente em amostras complexas de fluidos biológicos [19]. O presente trabalho tem como objetivo a aplicação da técnica de microextração líquido-líquido dispersiva com solidificação da gota orgânica flutuante e análise por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas no modo tandem (GC-MS/MS) para a determinação de THC-COOH em urina. Bem como desenvolver um procedimento de derivação *on line* no sistema de injeção cromatográfico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Os reagentes utilizados foram acetona grau p.a. (Alphatec), diclorometano grau HPLC (Panreac, U.S.A.), n-hexano grau HPLC 95% (Tedia, U.S.A.), acetona grau HPLC (Tedia, USA), metanol grau HPLC (J.T.Baker, USA), acetonitrila grau HPLC (J. T. Baker, USA). Ácido fosfórico p.a. adquirido da Merk (RJ, Brasil). O reagente N,O-bis(trimetilsilil)trifluoracetamida, BSTFA (98,7 %) foi obtido da Supelco (Bellofonte, USA) e os padrões de 11-nor-9-Carboxi- Δ^9 -tetraidrocanabinol (0,1 mg mL⁻¹ em metanol) e 11-nor-9-Carboxi- Δ^9 -tetraidrocanabinol deuterado (0,1 mg mL⁻¹ em metanol) foram adquiridas da Tedia (Celliriant®, Fairfield, USA). Água ultra-pura purificada pelo sistema Milli-Q® (Millipore) foi usada nos experimentos.

2.2 Soluções padrão e amostra

As soluções padrão de trabalho de 11-nor-9-carboxi- Δ^9 -tetraidrocanabinol e 11-nor-9-Carboxi- Δ^9 -tetraidrocanabinol deuterado foram preparadas nas concentrações de 1 µg mL⁻¹ pela diluição das soluções padrão estoques, levadas à secura em fluxo de nitrogênio e completadas com acetona grau HPLC. As soluções foram armazenadas a 4 °C e utilizadas no máximo por dois dias.

Para o desenvolvimento do método e a curva de calibração, brancos de amostras de urina (obtidas de voluntários que não fizeram uso de canabinóides) foram coletadas desprezando o jato inicial e armazenadas à - 20 °C em coletores universais de polipropileno. Para cada amostra teste de 2 mL de urina foram adicionados 20 ng mL⁻¹ do padrão de canabinóide e seu deuterado.

2.3 Procedimento de hidrólise do glicuronídeo e extração por ultrassom

Na urina humana, o THC-COOH encontra-se preferencialmente na forma conjugada com o ácido glicurônico. Por esse motivo foi necessária a inclusão da etapa prévia de hidrólise alcalina das amostras de urina. Portanto, foram adicionados 200 μL de NaOH (10 mol L^{-1}) em tubos de ensaio contendo 2 mL da amostra, 20 μL do THC-COOH (20 ng mL^{-1}) e 20 μL do THC-COOH- d_3 (20 ng mL^{-1}). A reação foi conduzida em banho-maria a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 min [22].

Para a posterior formação da gota solidificada, um pré-tratamento é necessário para amostras muito complexas. O procedimento utilizado neste trabalho é comum em amostras de urina [10, 23] Antes de qualquer experimento, as amostras de urina hidrolisada tiveram o pH ajustado para 1 com a adição de 330 μL de H_3PO_4 (10 mol L^{-1}) e, em seguida, foram misturadas com 4 mL de acetonitrila. A solução foi agitada manualmente por 1 min, levada a ultrassom por 10 min e, posteriormente, centrifugada por 5 min a 3500 rpm. O sobrenadante (fase orgânica) da solução foi transferido para um tubo de ensaio e levado a volume de 10 mL com água ultrapura.

2.4 Procedimento usando DLLME-SFO

Um volume de 10 mL da solução hidrolisada e pré-tratada teve a força iônica ajustada a 1% (m/v) com NaCl. Em seguida, com auxílio de uma seringa, uma mistura apropriada do solvente extrator (30 μL de 1-dodecanol) e solvente dispersor (200 μL de metanol) foi injetada rapidamente na solução, formando uma solução turva. O tubo foi selado. Após 5 min a solução foi centrifugada por 10 min a 3500 rpm. Durante a centrifugação, as gotículas do solvente orgânico (menos denso que a amostra) emergiram à superfície da solução aquosa. O tubo foi transferido para um banho de gelo e a solidificação da gota ocorreu em 5 min, devido a sua alta temperatura de congelamento ($24 \text{ }^\circ\text{C}$). A gota foi coletada e transferida para um vial cônico (300 μL) com o auxílio de uma alça microbiológica, em temperatura ambiente. Em segundos o solvente orgânico extrator contendo o THC-COOH descongelou. O volume de 2 μL do extrato foi injetado no GC-MS/MS para o procedimento de derivação *on line* e análise.

2.5 Derivação *online* com BSTFA

Amostras biológicas têm sido analisadas com frequência por GC-MS, no entanto esta técnica necessita que o analito seja derivatizado previamente [19,24]. A derivação do THC-COOH foi realizada *on line*, dentro do injetor do cromatógrafo, no modo *split* (1:20) e a $260 \text{ }^\circ\text{C}$. Para as injeções foram utilizadas duas seringas, uma com 2 μL do reagente derivatizante *N,O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida*, BSTFA, e em seguida foram injetados 2 μL do extrato proveniente da extração.

2.6 Condições cromatográficas

As análises foram realizadas em cromatógrafo a gás modelo CP-3800 associado ao espectrômetro de massa modelo 4000MS, ambos da Varian, GC-iontrap-MS/MS (WalnutCreek, CA, USA) equipado com amostrador automático (*autosampler*) modelo CP-8400 (Varian, Middelburg, The Netherlands), injetor SPI (*septum-equipped programmable inject*); injetor *split/splitless* a $260 \text{ }^\circ\text{C}$ com *split* 1:20, tempo de 1 min para abertura da válvula, coluna capilar NST5 (5% difenil 95% dimetilpolisiloxano, 30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 μm de espessura do filme), com programação de temperatura de $100 \text{ }^\circ\text{C}$ (1 min), $35 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ até $300 \text{ }^\circ\text{C}$ (6 min), Hélio ultra puro (99.999 %) como gás de arraste e vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura da linha de transferência de $300 \text{ }^\circ\text{C}$. O solvente *delay* foi de 7,5 min com tempo total de análise de 12,71 min. O modo de operação do espectrômetro de massas foi estudado anteriormente [6], tendo sido obtido os seguintes parâmetros: *SCAN* (varredura: 40-500m/z) e MS/MS. Íons precursores (m/z), energia de excitação (modo ressonante) e íons de quantificação e confirmação (m/z) do canabinóide e padrão interno foram, respectivamente: (THC-COOH – 371; 1,46 volts; 305 e

289) e (THC-COOH-d₃ – padrão interno; 374; 1,52 volts; 308 e 268). Modo de ionização por elétrons (70 eV). Sistema de aquisição de dados *Workstation Star 5.0* (Varian, EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cada um dos parâmetros e suas variáveis estudadas e que são apresentadas a seguir foram analisados em triplicata, observando a área do pico cromatográfico obtido no GC-MS/MS a partir de amostras de urina (2 mL) com adição de 20 ng mL⁻¹ do metabólito do canabinóide THC e seu composto deuterado. O estudo foi analisado de forma univariada, selecionando um parâmetro enquanto que os demais permaneciam fixos.

3.1 Otimização da derivação *online*

A derivação é uma etapa importante na análise do metabólito THC-COOH por cromatografia em fase gasosa devido à propriedade termolábil desse canabinóide [6]. O analito deve possuir propriedades adequadas para a interação físico-química com a fase estacionária da coluna cromatográfica. Os procedimentos de derivação são realizados para converter compostos em uma forma apropriada para serem analisados por cromatografia em fase gasosa, aumentando a estabilidade térmica e a volatilidade, melhorando a simetria dos picos, a seletividade e a sensibilidade da análise [6]. As amidas trimetilsilil são as mais usadas como reagentes de sililação, como a N-metil-N-trimetil-silil-trifluoroacetamida (MSTFA) e a N, O-bis-trimetil-silil-trifluoroacetamida (BSTFA). A maioria dos procedimentos é *off-line* e em fase líquida, podendo usar ultrassom [6]. Dessa forma, é necessária uma etapa adicional no procedimento analítico, podendo ser mais uma fonte de contaminação e aumento no tempo de análise da amostra. A derivação *online* evita esses problemas, reduz a quantidade de reagente utilizado e aumenta a velocidade e eficiência da análise [6].

O reagente utilizado para derivação do THC-COOH foi o BSTFA e alguns parâmetros foram estudados para determinar a influência no processo de sililação. Foram testados os diferentes modos de injeção (*split*, *splitless* e *splitless* pulsado), os volumes do reagente derivatizante e do extrato e a proporção entre eles, a temperatura e o tempo de purga do injetor.

Diferentes temperaturas do injetor foram avaliadas variando de 220 a 300 °C (com incrementos de 20 °C), como mostra a Figura 1a. Os testes foram realizados com tempo de purga de 0,5 min e proporção 1:1 de BSTFA:extrato (1 µL de cada).

Os resultados mostram um aumento de rendimento entre 220-240 °C, sugerindo a alta temperatura de ebulição do dodecanol (cerca de 259 °C) como fator principal para o aumento da resposta. A diminuição após 240 °C indica uma reação de descarboxilação, com parte do analito se degradando antes da reação com o BSTFA. A temperatura de 240 °C foi selecionada.

Os modos de injeção *split*, *splitless* e *splitless* pulsado foram testados. Os experimentos foram realizados com razões de *split* diferentes (1:10, 1:20 e 1:50) e tempo de abertura da janela do *splitless* (0,5 e 1,0 min). Observou-se que o modo pulsado foi o mais desfavorável para a reação de derivação.

Os melhores resultados foram com razões de 1:20 e 1:50, como mostra a Figura 1b. Como em razões maiores há um maior consumo de gás de arraste, foi adotada a razão de 1:20. Com relação ao parâmetro tempo de abertura da janela do injetor, o tempo de 0,5 min forneceu resultados com picos menores, que pode ser atribuído a reação de derivação incompleta.

O volume do reagente derivatizante tem efeito significativo na derivação de drogas ácidas [25]. Foram avaliados os volumes de 1 e 2 µL, tanto para o reagente derivatizante BSTFA quanto para o extrato. Os resultados demonstraram que o aumento no volume de BSTFA contribuiu para que a reação se processe quantitativamente. Foi definido o volume de 2 µL para cada injeção do extrato e do BSTFA.

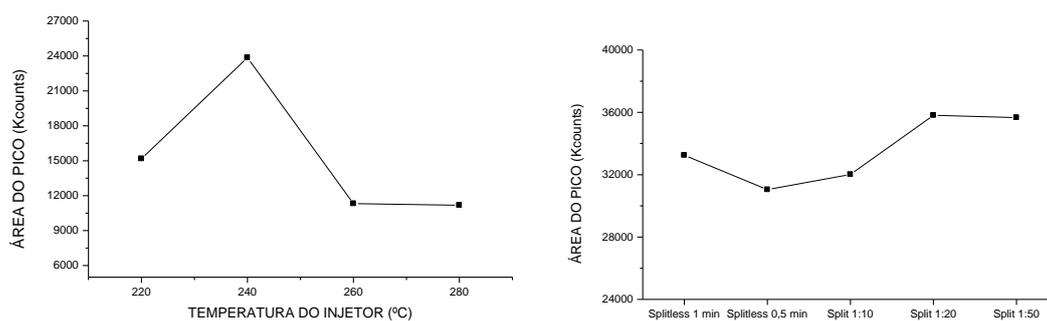


Figura 1 (a) efeito da temperatura (b) efeito do modo de injeção.

3.2 Parâmetros para a extração por DLLME-SFO

Os experimentos foram baseados nos principais parâmetros para a técnica DLLME-SFO. Foram avaliados neste estudo a escolha do solvente de extração (hexadecano, dodecanol e undecanol), do solvente de dispersão (acetona, acetonitrila e metanol), os volumes dos solventes de extração (10, 20, 30 e 50 μL) e de dispersão (100, 200, 400 e 600 μL), o efeito *salting out* (0, 1, 2 e 3 % de sal) e o tempo de extração (1, 2,5, 5 e 10 min).

Para a escolha do solvente de extração para DLLME-SFO deve ser levado em consideração que tenha densidade menor do que a da água, alta afinidade pelos analitos, baixa temperatura de congelamento (na faixa de 10-30 $^{\circ}\text{C}$) e bom comportamento cromatográfico [13, 26]. Baseando-se nestas considerações, undecanol, 1-dodecanol e hexadecano foram os solventes selecionados para os testes. Foram fixados o volume de 30 μL para o solvente de extração em teste, 200 μL de acetonitrila, tempo de extração de 1 min e centrifugação por 10 min a 3500 rpm. A Figura 2 apresenta os resultados obtidos.

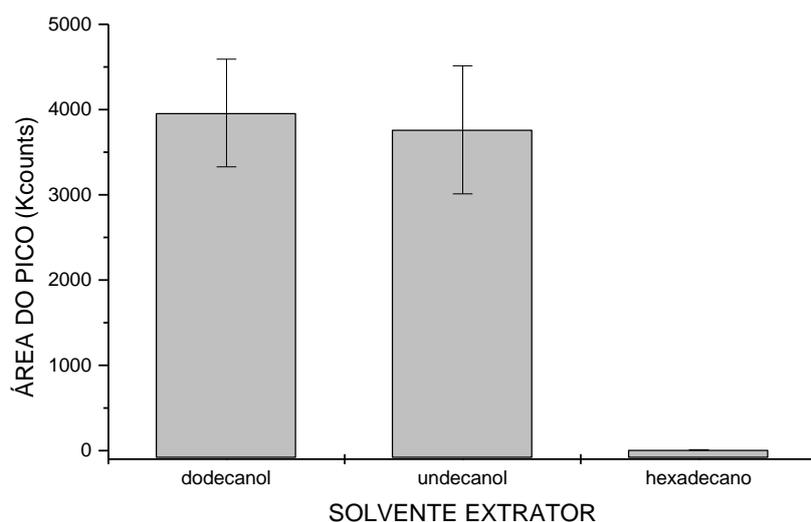


Figura 2. Efeito do solvente extrator na determinação do THC-COOH em urina por DLLME-SFO e GC-MS/MS (as condições cromatográficas estão apresentadas na parte experimental).

Observa-se que tanto o 1-dodecanol quanto o undecanol apresentaram resultados semelhantes, enquanto que o hexadecano, devido a sua hidrofobicidade, apresentou baixa

resposta pela não solubilização no solvente dispersor (acetonitrila). No momento que a mistura de solventes (extrator e dispersor) foi adicionada a amostra, as gotículas do solvente emergiram imediatamente à superfície da solução, não sendo alcançado o estado de turvação (dispersão). Portanto, não houve a transferência do analito contido na amostra para a fase orgânica. Sendo a molécula do THC-COOH lipofílica, o resultado do 1-dodecanol foi ligeiramente melhor por possuir característica mais apolar quando comparado ao undecanol. Portanto, o 1-dodecanol foi escolhido como solvente de extração.

Para avaliar o efeito do volume do 1-dodecanol na eficiência da extração do THC-COOH, foram testados diferentes os volumes de 10, 20, 30 e 50 μL . Os demais parâmetros permaneceram os mesmos. Os resultados são apresentados na Figura 3a.

Os resultados mostram que nos volumes menores houve maior flutuação do sinal, diminuindo a precisão da resposta. Isso pode ter sido ocasionado pela dificuldade na formação da gota do solvente orgânico e sua posterior coleta. Houve uma variação no volume da gota do solvente extrator. Com 30 e 50 μL a gota foi uniforme e o volume foi reprodutível. No entanto, houve uma diluição do analito para o volume maior, ocasionando em perda de massa quando injetado no cromatógrafo. Com base nisso, o volume de 30 μL de 1-dodecanol foi selecionado.

O solvente de dispersão deve ser miscível em ambas as fases, tanto na fase aquosa (em nosso estudo foi a amostra de urina) quanto na orgânica (solvente de extração 1-dodecanol), para dispersar o solvente extrator na amostra. As gotículas formadas aumentam a área superficial de contato entre as fases, fazendo a transferência de massa do THC-COOH e promovendo uma extração rápida e eficiente [15, 22].

Os solventes acetona, acetonitrila e metanol foram selecionados devido a solubilidade deles em água. Os resultados obtidos (Figura 3b) mostram que a melhor eficiência para a extração do THC-COOH em urina foi com o metanol, por apresentar maior poder de solvatação com o 1-dodecanol do que com a acetona ou a acetonitrila [27], evidenciado não só pela maior eficiência na extração, como pela melhor repetitividade.

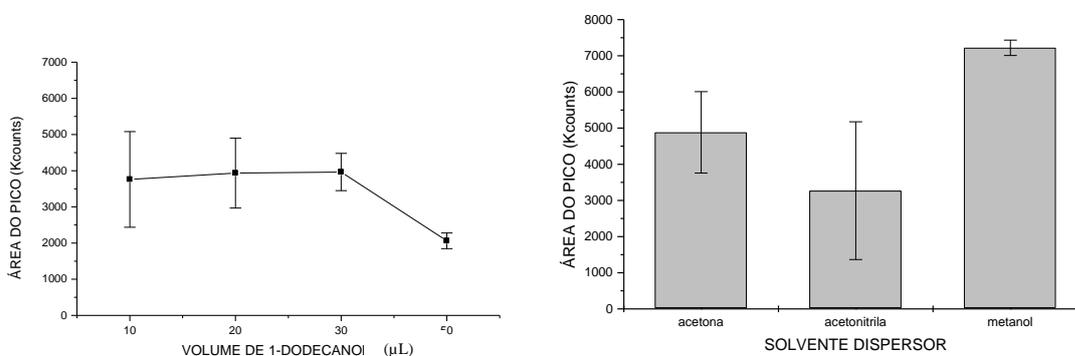


Figura 3. (a) Efeito do volume do solvente extrator na determinação do THC-COOH em urina por DLLME-SFO e GC-MS/MS. (b) Efeito do solvente dispersor (as condições cromatográficas estão apresentadas na parte experimental).

O volume do solvente dispersor (metanol) influencia na dispersão do solvente extrator, mas, por outro lado, pode favorecer a dissolução do analito na fase aquosa [11]. Por isso, esse parâmetro foi investigado na faixa de 100 a 600 μL para buscar o melhor compromisso entre dispersão do solvente extrator e não dissolução do analito na fase aquosa. Portanto, observa-se pelos resultados na Figura 4a que 100 μL foram insuficientes para realizar uma boa dispersão e acima de 200 μL dois processos competitivos podem ter ocorrido. Um é o aumento do coeficiente de partição pelo aumento do volume, o que levaria a uma melhora na eficiência de extração. O outro é o aumento na solubilidade do analito na fase aquosa. O que provavelmente deve ter ocorrido. O mesmo comportamento foi relatado anteriormente [19, 25, 28, 29]. Portanto, o volume de 200 μL de metanol foi selecionado.

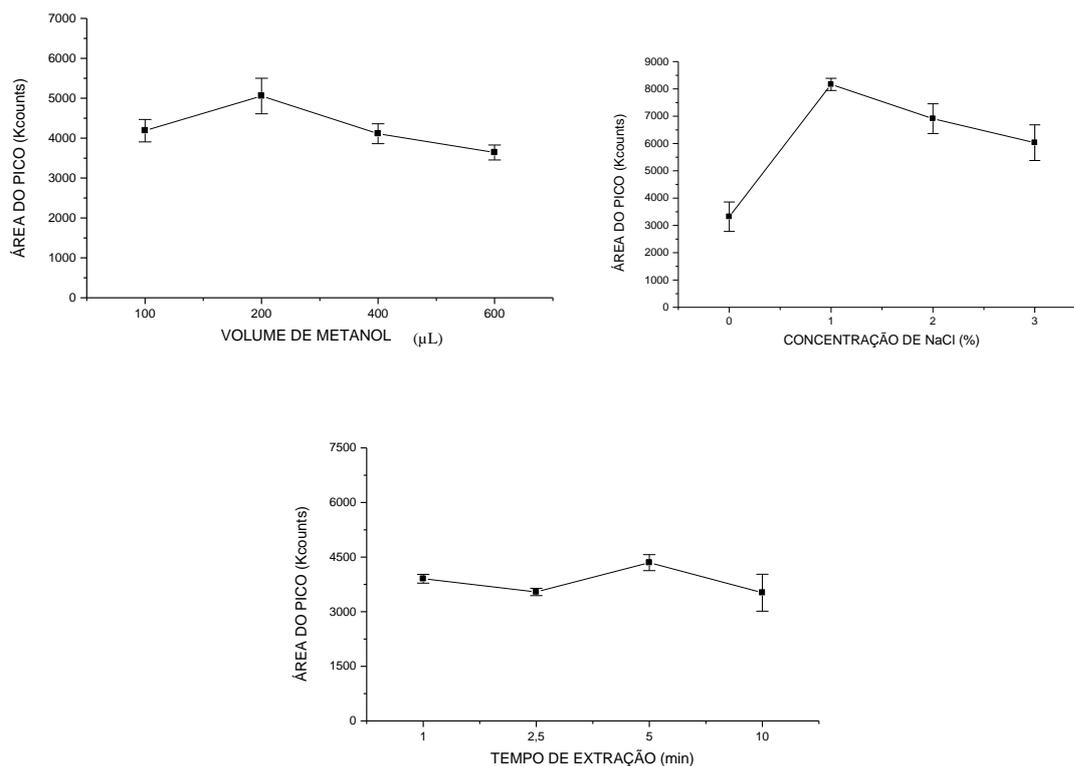


Figura 4. (a) Efeito do volume do solvente de dispersão na determinação do THC-COOH em urina por DLLME-SFO e GC-MS/MS. (b) Efeito da concentração de sal (NaCl). (c) Efeito do tempo de extração (as condições cromatográficas estão apresentadas na parte experimental).

O aumento da força iônica causa mudança na solubilidade de um analito em uma amostra líquida, a fim de contribuir na eficiência da extração. Portanto, a influência da concentração de NaCl na eficiência da extração do THC-COOH em urina foi estudada na faixa de 1 a 3 % (m/v). Os resultados obtidos são mostrados na Figura 4b.

Os dados mostram que a eficiência de extração melhorou com o aumento da força iônica, contribuindo para a diminuição da solubilidade do THC-COOH na matriz. No entanto, concentrações mais altas de NaCl (2 e 3 %) reduzem a capacidade de difusão dos analitos na fase aquosa em direção às gotículas do solvente extrator, haja vista que o cloreto de sódio é um agente espessante e, por isso, aumenta a viscosidade do meio [10]. Com base nos resultados obtidos, foi definida a adição de 1% de NaCl.

Em DLLME-SFO o tempo de extração é definido a partir do momento da injeção dos solventes extrator e dispersor. No presente estudo, o tempo de extração variou de 1 a 10 min. Os resultados são exibidos na Figura 4c.

Devido a rápida transferência de massa, decorrente da formação de grande área superficial do solvente de extração (turbulência da solução gerada pelo solvente dispersor), o estado de equilíbrio é atingido rapidamente [11]. Os resultados mostraram que a extração ocorre a partir de 1 minuto. O tempo de extração de 5 min foi selecionado para garantir maior eficiência do método.

A Tabela 1 apresenta os parâmetros que foram obtidos para extração do THC-COOH em amostras de urina por DLLME-SFO, com a escolha dos solventes 1-dodecanol e metanol, redução do volume em mais de 67 vezes (15,5 mL para 0,23 mL) comparando com extração em fase sólida [22] nas etapas de condicionamento, eluição e purga, e um fator de pré-concentração para a técnica de 400 (10 mL da fase aquosa e cerca de 0,025 mL da fase orgânica, considerando a perda por miscibilidade). Comparando com a extração líquido-líquido convencional (liquid-liquid extraction, LLE), esta apresenta a desvantagem no uso de cerca 300

mL de solvente orgânico, reduzindo o fator de pré-concentração, além de ser um problema para o descarte e impactar o meio ambiente. O custo por análise torna-se elevado e uma grande quantidade de amostra é necessária [30].

O tempo de equilíbrio é uma das principais vantagens da técnica DLLME-SFO, haja vista que é alcançado muito rapidamente. Em nosso estudo foi alcançado com menos de 1 minuto. Essa vantagem já foi observada com relação à técnica SFODME [10].

Tabela 1. Condições obtidas para a extração de THC-COOH em urina por DLLME-SFO.

Parâmetro	Método proposto
Solvente extrator	1-dodecanol
Volume do solvente extrator	30 μ L
Solvente dispersor	Metanol
Volume do solvente dispersor	200 μ L
Concentração de sal	1 % NaCl
Tempo de extração	5 min

3.3 Figuras de mérito

Definidos os parâmetros da técnica DLLME-SFO e as condições cromatográficas com derivação *on line* no sistema de injeção, o método analítico proposto foi estudado para apresentar parâmetros de confiabilidade. Para tanto, testes de seletividade, linearidade, sensibilidade, limite de quantificação e limite de detecção foram determinados em amostras de 2 mL de urina (branco).

Matrizes complexas podem apresentar interferentes que ocasionam efeito da matriz positivo ou negativo no sinal do analito. Compostos endógenos podem ser extraídos juntos com o analito, ocasionando um resultado superestimado. Por outro lado, uma forte interação do analito com a matriz pode levar a um resultado subestimado [31].

Para certificar a seletividade do método, foram realizados testes aplicando o procedimento analítico desenvolvido. As áreas dos picos cromatográficos foram comparadas para amostras de urina, em água ultra pura e em injeções diretas de padrão de THC-COOH na mesma concentração.

A Figura 5 mostra o cromatograma de íons totais (*Total Ion Chromatogram*, TIC) para 500 ng mL⁻¹ de THC-COOH em urina, em água pura e por injeção direta, respectivamente. A reprodutibilidade entre as três apresentou coeficiente de variação de 0,9%. Portanto, não foi observado o efeito de matriz.

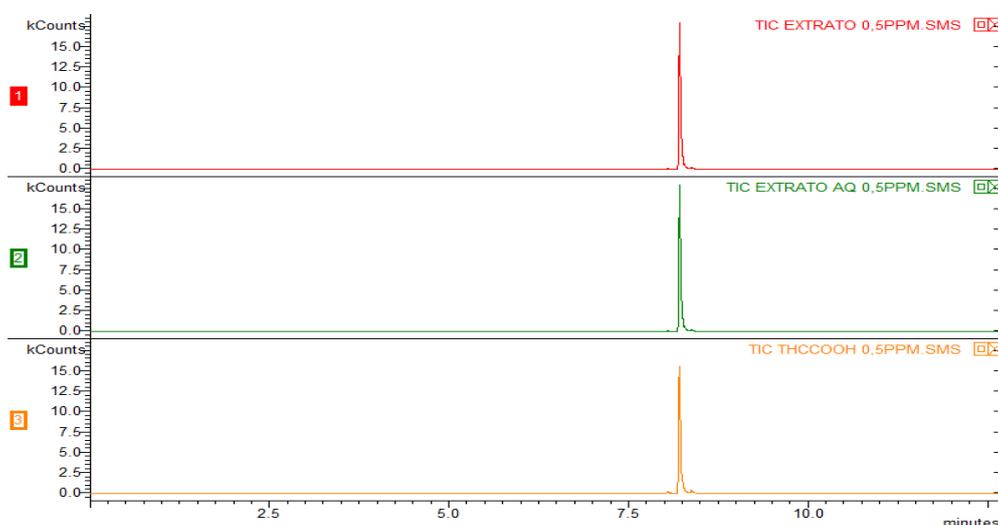


Figura 5. Teste de seletividade. Cromatogramas de íons totais do THC-COOH em urina (1), água pura (2) e por injeção direta (3).

A capacidade do método analítico proposto nesse trabalho com relação a linearidade entre o sinal analítico e a concentração do analito em urina foi estudada no intervalo de 10 a 1000 ng mL⁻¹, a fim de aumentar a faixa de concentração com relação ao estudo anterior [6]. O coeficiente de determinação (r^2) foi 0,9915. Estudo com LC-MS-MS mostrou limite máximo do intervalo de linearidade até 250 ng mL⁻¹[4]. Com essa mesma técnica de análise, outro trabalho obteve o valor máximo de 500 ng mL⁻¹[22]. Para eletroforese capilar com espectrometria de massas (CE-MS) a faixa de linearidade foi estabelecida em concentrações mais elevadas (0,1 a 10 µg mL⁻¹)[32].

A sensibilidade foi determinada pela inclinação da curva analítica com 5 pontos (injetados em triplicata) em urina (branco), dentro do intervalo de linearidade.

O limite de detecção foi definido como 3 vezes o ruído da linha de base (S/N) [31]. Logo, o valor de LD foi 1 ng mL⁻¹. Determinação de THC-COOH por UPLC-MS-MS o limites de detecção foi de 3 ng mL⁻¹ e valores similares ao desse estudo foi encontrado por GC-MS (0,86 ng mL⁻¹)[5]. Com a técnica de extração por SPE e análise por LC-MS-MS, o LD foi de 2 ng mL⁻¹ [22].

Em outras drogas de abuso, como a amfetamina, o LD foi de 8 µg L⁻¹ para extração em urina por DLLME-SFO e análise por HPLC-UV [19].

O limite de quantificação do método proposto para o THC-COOH em urina foi definido como o primeiro ponto da curva analítica [31]. Portanto, o valor de LQ foi 10 ng mL⁻¹.

4. CONCLUSÃO

Este trabalho teve como objetivo usar a microextração líquido-líquido dispersiva com solidificação da gota orgânica flutuante para a determinação de THC-COOH em urina e análise por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas no modo tandem.

Pode-se destacar que a derivação do analito ocorreu *on line*, eliminando contaminações ou perdas. A derivação foi no sistema de injeção do cromatógrafo, com o extrato orgânico contendo o THC-COOH e o reagente derivatizante BSTFA.

A aplicação de uma técnica de microextração como a DLLME-SFO não só resultou na grande redução no consumo de solventes orgânicos tóxicos, como também proporcionou seletividade, linearidade, sensibilidade, bom fator de pré-concentração e baixos limites de quantificação e de detecção. Aliado a essas vantagens, este método contribui para diminuir o custo da análise, a exposição dos analistas a vapores tóxicos e ao impacto ambiental que as análises químicas trazem ao laboratório. Enfim, essa técnica mostrou possuir grande potencial para determinar canabinóides, em matrizes complexas como a urina.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo número 472364/2011), pelo suporte financeiro concedido e pela bolsa de Isla Alcântara Gomes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Jacobus J, Bava S, Cohen-Zion M, Mahmood O, Tapert SF. Functional consequences of marijuana use in adolescents. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2009;92(4):559-65.
2. Honorio KM, Arroio A, da Silva ABF, Original L. Aspectos terapeuticos de compostos da planta *Cannabis sativa*. *Química nova*. 2006;29(2):318-25.
3. Emídio ES, de Menezes Prata V, Dórea HS. Validation of an analytical method for analysis of cannabinoids in hair by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2010;670(1-2):63-71.

4. Lacroix C, Saussereau E. Fast liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of cannabinoids in micro volume blood samples after dabsyl derivatization. *CHROMB Journal of Chromatography B*. 2012;905:85-95.
5. Kim SY, Kim JY, Kwon W, In MK, Kim YE, Paeng K-J. Method development for simultaneous determination of amphetamine type stimulants and cannabinoids in urine using GC-MS. *Microchemical Journal*. 2013;110:326-33.
6. Prata VD, Emidio ES, Dorea HS. New catalytic ultrasound method for derivatization of 11-nor-Delta(9)-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine, with analysis by GC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012;403(2):625-32.
7. Spietelun A, Marcinkowski L, de la Guardia M, Namiesnik J. Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques. *Talanta*. 2014;119:34-45.
8. Emídio ES, de Menezes Prata V, de Santana FJM, Dórea HS. Hollow fiber-based liquid phase microextraction with factorial design optimization and gas chromatography-tandem mass spectrometry for determination of cannabinoids in human hair. *Journal of Chromatography B*. 2010;878(24):2175-83.
9. dos Anjos JP, de Andrade JB. Simultaneous determination of pesticide multiresidues in white wine and rosé wine by SDME/GC-MS. *Microchemical Journal*. 2015;120:69-76.
10. Viñas P, Campillo N, Andruch V. Recent achievements in solidified floating organic drop microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2015;68:48-77.
11. Rezaee M, Assadi Y, Milani Hosseini M-R, Aghae E, Ahmadi F, Berijani S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*. 2006;1116(1-2):1-9.
12. Dórea HS. MSPD in Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos. Eduardo Costa de Figueiredo, Keyller Bastos Borges, Maria Eugênia C. Queiroz (org.)1a. ed. Rio de Janeiro LTC; 2015.
13. Leong MI, Huang SD. Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop combined with gas chromatography with electron-capture or mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*. 2008;1211(1-2):8-12.
14. Caldas SS, Goncalves FF, Primel EG, Prestes OD, Martins ML, Zanella R. Modern techniques of sample preparation for pesticide residues determination in water by liquid chromatography with detection by diode array and mass spectrometry. *Quimica Nova*. 2011;34(9):1604-17.
15. Xu H, Ding Z, Lv L, Song D, Feng YQ. A novel dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples. *Analytica Chimica Acta*. 2009;636(1):28-33.
16. Jia S, Li J, Park S-R, Ryu Y, Park IH, Park JH, et al. Combined application of dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of floating organic droplets and charged aerosol detection for the simple and sensitive quantification of macrolide antibiotics in human urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2013;86:204-13.
17. Suh JH, Lee YY, Lee HJ, Kang M, Hur Y, Lee SN, et al. Dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplets followed by high performance liquid chromatography for the determination of duloxetine in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2013;75:214-9.
18. Khalili Zanjani MR, Yamini Y, Shariati S, Jönsson JÅ. A new liquid-phase microextraction method based on solidification of floating organic drop. *Analytica Chimica Acta*. 2007;585(2):286-93.
19. Ahmadi-Jouibari T, Fattahi N, Shamsipur M. Rapid extraction and determination of amphetamines in human urine samples using dispersive liquid-liquid microextraction and solidification of floating organic drop followed by high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014;94:145-51.
20. Diao CP, Wei CH. Rapid determination of anilines in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop prior to gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012;403(3):877-84.
21. Leong M-I, Fuh M-R, Huang S-D. Beyond dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*. 2014;1335:2-14.
22. Weinmann W, Goerner M, Vogt S, Goerke R, Pollak S. Fast confirmation of 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC-COOH) in urine by LC/MS/MS using negative atmospheric-pressure chemical ionisation (APCI). *Forensic Science International*. 2001;121(1-2):103-7.
23. Liu H, Zhang M, Wang X, Zou Y, Wang W, Ma M, et al. Extraction and determination of polybrominated diphenyl ethers in water and urine samples using solidified floating organic drop microextraction along with high performance liquid chromatography. *Microchim. Acta*. 2012; 176: 303-309.

24. Caballero-Casero, N, Lunar, L, Rubio, S. Analytical methods for the determination of mixtures of bisphenols and derivatives in human and environmental exposure sources and biological fluids. A review, *Analytica Chimica Acta*. 2016; 908: 22–53.
25. Wu J, Hu R, Yue J, Yang Z, Zhang L. Determination of fecal sterols by gas chromatography–mass spectrometry with solid-phase extraction and injection-port derivatization. *Journal of Chromatography A*. 2009;1216(7):1053-8.
26. Wang C, Wu Q, Wu C, Wang Z. Application of dispersion–solidification liquid–liquid microextraction for the determination of triazole fungicides in environmental water samples by high-performance liquid chromatography. *Journal of Hazardous Materials*. 2011;185(1):71-6.
27. Bonner, O. D., Paljk, S., & Klofutar, C. Thermodynamic studies of binary methanol and ethanol solutions of 1-dodecanol and 1-tetradecanol at 25°C. *Journal of Solution Chemistry*. 1993; 22 (1): 27-42.
28. Chang CC, Huang SD. Determination of the steroid hormone levels in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction with solidification of a floating organic drop followed by high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*. 2010;662(1):39-43.
29. Wang Y-Y, Zhao G-Y, Chang Q-Y, Zang X-H, Wang C, Wang Z. Developments in Liquid-phase Microextraction Method Based on Solidification of Floating Organic Drop. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. 2010;38(10):1517-22.
30. Congost, M., de, . T. R., & Segura, J. (October 01, 1988). Optimization of the quantitative analysis of the major cannabis metabolite (11-nor-9-COOH- Δ^9 -tetrahydrocannabinol) in urine by gas chromatography/mass spectrometry. *Biological Mass Spectrometry*, 16, 367-372.
31. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, Food and Drug Administration
32. Iwamuro Y, Iio-Ishimaru R, Chinaka S, Takayama N, Hayakawa K. Analysis of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid and its glucuronide in urine by capillary electrophoresis/mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*. 2012;26(11):1452-6.