

|  |  |
| --- | --- |
| UNIVERSIDADE DE SÃO PAULOFaculdade de Ciências FarmacêuticasDepartamento de Análises Clínicas e Toxicológicas |  |

**DETERMINAÇÃO DE COCAÍNA, BENZOILECGONINA E COCAETILENO EM CABELO POR LPME – GC/MS**

1. *AMOSTRA*

* Controles: mecha de cabelo coletada rente ao couro cabeludo com espessura de lápis em voluntário sem histórico de uso de cocaína.
* Amostra positiva: mecha de cabelo coletada rente ao couro cabeludo com espessura de lápis em voluntário com histórico de uso de cocaína.

1. *MATERIAL*

*2.1 Equipamentos e acessórios*

* Equipamento de cromatografia em fase gasosa modelo 6850 acoplado a espectrômetro de massas quadrupolo modelo 5975, ambos da Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EUA).
* Coluna capilar de sílica fundida HP-5MS com as seguintes dimensões: 30m x 0,25mm x 0,25 μm.
* Termobloco com função de aquecimento e secagem de amostras Reacti-Therm III da Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, EUA).
* Agitador estilo vortex multi-tubo modelo VX-2500 da empresa VWR (Thorofare, NJ, USA).
* Fibras de LPME Q3/2 Accurel KM de polipropileno 600 µm i.d., 200 µm espessura da parede e 0.2 µm de tamanho de poros da Membrana (Wuppertal, Alemanha).
* Ponteira de eletroforese em gel modelo Round CC 4853 nas dimensões de 0,5mm com capacidade de 1-200 µL obtidos da empresa Costar (Corning, NY, USA).

***2.2 Reagentes***

* metanol;
* acetonitrila;
* solução padrão (1μg/mL) de cocaína (COC), benzoilecgonina (BE) e cocaetileno (CE) da Cerilliant® ;
* solução padrão interno deuterado (1μg/mL) de COC-d3, BE-d3 e BE-d3 da Radian® ;
* piridina ;
* diclorometano;
* butilcloroformato;
* 100μm fibra de polidimetilsiloxano;
* tampão sólido NaHCO3/K2CO3 (2:1);
* água deionizada (Milli-Q).

1. *PROCEDIMENTO*

***3.1 Identificação dos tubos***

Para cada análise, além dos tubos com a amostra de cabelo a ser analisada, é feita uma amostra de cabelo de referência negativa (‘branco’) e um adicionado que contém o cabelo de referência negativa mais os padrões de analitos de cocaína.

***3.2 Descontaminação do cabelo:***

## Procedimento comum para todos os tubos

* Pesar 50mg de cabelo em balança analítica;
* Transferir para um tubo de 15mL;
* Adicionar 2mL de diclorometano e deixar por 15min em estufa à 37°C;
* Desprezar o diclorometano utilizando uma pipeta pasteur (tomando o cuidado para não desprezar o cabelo juntamente);
* Deixar por cerca de 10min na capela para evaporar o resíduo de diclorometano;
* Adicionar 2mL de metanol.

***3.3 Preparo do adicionado, branco e amostra***

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Soluções/tubos | **Adicionado** | **Branco** | **Amostra** |
| COC (1.0 μg/mL) | 25μL | - | - |
| BEC (0.1μg/mL) | 25μL | - | - |
| CE (0.1μg/mL) | 25μL | - | - |
| COC-d3 (1.0 μg/mL) | 100μL | 100μL | 100μL |
| BE-d3 (1.0 μg/mL) | 100μL | 100μL | 100μL |
| CE-d3 (1.0 μg/mL) | 100μL | 100μL | 100μL |

***3.4 Liberação dos analitos da matriz***

* Deixar os tubos bem fechados na estufa à 50°C por 18hs;
* Retirar os tubos e deixá-los esfriar;
* Transferir o metanol para os vials de 4mL silanizados e evaporar à 50°C no bloco de aquecimento com evaporador;

***3.5 Derivatização***

* Adicionar em todos os tubos 100μL de acetonitrila, 2μL de piridina e 2μL de butilcloroformato;
* Com os tubos fechados, deixar no ultrassom por 6min;
* Acrescentar 2mL de água deionizada ;
* Extrair por LPME seguindo a ordem (adicionado, branco e amostra);
  1. ***Micro-extração em fase líquida (LPME)***
* Impregnar uma fibra de polipropileno de 9cm em éter diexílico (fase estacionária);
* Preencher a fibra com 50-70µL de HCl 0,05M (fase aceptora) utilizando ponteiras de eletroforese e fechar as pontas com auxílio de um alicate;
* Momento antes de inserir a fibra de LPME na amostra, colocar 30mg do tampão K2CO3/NaHCO3 (2:1)
* Inserir a fibra no frasco contendo a amostra e agitar por 10 min. a 2500 rpm;
* Após agitação, cortar as pontas da fibra, coletar a fase aceptora e transferi-la para um vial;
* Evaporar o extrato, ressuspender com 50 µL de acetato de etila e injetar 1 µL no GC-MS no modo SIM (*Selected Ion Monitoring*).

1. ANÁLISE DOS RESULTADOS

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Analito | Tempo de retenção (min) | *m/z* |
| COC 12,80 | | 182-272-303 |
| COC-d3 | 12,75 | 185-275-305 |
| BE\* | 14,70 | 224-272-345 |
| BE-d3 | 14,65 | 227-275-348 |
| CE | 13,50 | 196-272-317 |
| CE-d3 | 13,45 | 199-275-320 |

Os íons marcados em negrito são utilizados para quantificação e também são o pico-base para identificação..

BE\* = como butil-beozoilecgonina

Bibliografia

Pego AM, Roveri FL, Kuninari RY, Leyton V, Miziara ID, Yonamine M. Determination of cocaine and its derivatives in hair samples by liquid phase microextraction (LPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Forensic Sci Int. 274:83-90, 2017.