

Determinação por injeção direta no HPLC de cocaína em amostras de urina e em amostras de papелotes de cocaína e crack

Manoel Lima de Menezes*

Andréa Sanchez*

Priscila Raquel Martins*

Márcia Aparecida Zeferino Garcia**

Arnaldo Alves Cardoso,

Pedro Lessi***

Oduvaldo Câmara Marques Pereira****

*Departamento de Química, Universidade Estadual Paulista-UNESP, Faculdade de Ciências, Av. Edmundo Carrijo Coube S/N, Bauru, São Paulo, 17033-360.

** Departamento de Química, Universidade do Sagrado Coração-USC, Rua Irmã Arminda nº 10-50, Bauru, São Paulo, Brasil, CEP-17044-160.

*** Departamento de Química Analítica, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Instituto de Química, Rua Prof. Francisco Degni S/N, Araraquara, São Paulo, Brasil, CEP-14801-970.

**** Departamento de Farmacologia, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Instituto de Biociências, , Rubião Jr. Botucatu, São Paulo, Brasil, CEP- 18618-000.

MENEZES, Manoel Lima de et al. Determinação por injeção direta no HPLC de cocaína em amostras de urina e em amostras de papелotes de cocaína e crack. *Salusvita*, Bauru, v. 19, n. 2, p. 73-80, 2000.

RESUMO

Desenvolveu-se um método analítico para a extração e determinação de cocaína em amostras de urina. O método permite a injeção direta da amostra de urina em uma coluna cromatográfica ISRP-C₈ (100mm x 4,6mm DI), empregando uma fase móvel composta por uma solução de fosfato dibásico de sódio 0,05mol.L⁻¹ (pH 8,0) e acetonitrila 70:30 (v/v). As recuperações de cocaína presentes em amostras de urina fortificadas foram maiores que 98,8 ± 5,1% com um desvio-padrão relativo de 2,7%. O limite de detecção para a determinação de cocaína foi de 0,1mg mL⁻¹ e a variação de linearidade foi avaliada entre as concentrações de 0,10 a 15,00mg mL⁻¹ para a cocaína.

Na amostra de "crack" e nas duas amostras de cocaína foram determinados 867, 894 e 65 mg.g⁻¹ de cocaína, respectivamente.

Unitermos: cocaína, urina, HPLC.

INTRODUÇÃO

A determinação e quantificação de cocaína é de grande interesse na área da toxicologia forense. Cocaína é um alcaloíde da *Erythroxylum*

coca, planta nativa do Sri Lanka, Bolívia, Colômbia e Peru. O conteúdo de cocaína nas folhas de coca oscila de 0,5 a 2,0%. O vegetal é usado pelos índios da região andina com a finalidade de produzir sensações de bem-estar e diminuir o estado de fadiga, sendo as folhas mascadas com um pouco de óxido de cálcio, pois o meio alcalino favorece a liberação do composto na forma livre, mais facilmente absorvido em função da maior lipossolubilidade (Larini, 1993).

A cocaína é rapidamente biotransformada, principalmente por processos de hidrólise das ligações ésteres e N-desmetilação. Estes processos resultam na formação do éster metilecgonina (EME), da benzoilecgonina (BEC), da ecgonina e da norcocaína, como pode ser observado na FIGURA 1. Embora a cocaína seja rapidamente hidrolizada a benzoilecgonina, estudos têm demonstrado que até $0,5\text{mg L}^{-1}$ de cocaína pode ser detectada na urina, sem sofrer hidrólise, após 12 horas de sua inalação (Larini, 1993).

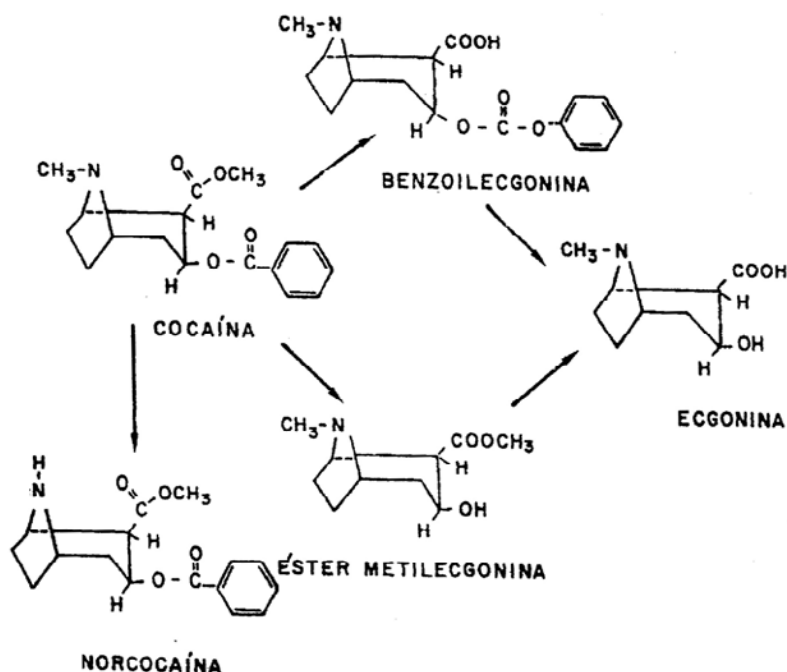


FIGURA 1 – Biotransformação da cocaína.

As amostras de urina e sangue são os fluidos biológicos mais comuns para a determinação da cocaína. A preparação da amostra é um pré-requisito importante para a determinação da cocaína por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*-Cromatografia Líquida de Alta Performance), em amostras de fluidos biológicos. A extração é usualmente efetuada por partição líquido-líquido, com variações do pH da amostra, ou por extração em fase sólida (SPE). Elevando-se o pH da amostra com adições de soluções de carbonato de sódio ou hidróxido de sódio, a cocaína pode ser facilmente extraída da amostra empregando solventes or-

MENEZES, Manoel Lima de et al. Determinação por injeção direta no HPLC de cocaína em amostras de urina e em amostras de papéletes de cocaína e crack. *Salusvita*, Bauru, v. 19, n. 2, p. 73-80, 2000.

MENEZES, Manoel
Lima de et al.
Determinação por
injeção direta no
HPLC de cocaína
em amostras de
urina e em amostras
de papelotes de
cocaína e crack.
Salusvita, Bauru, v.
19, n. 2, p. 73-80,
2000.

gênicos, tais como: hexano, éter dietílico ou clorofórmio. A fase orgânica normalmente é evaporada, o resíduo é dissolvido com a própria fase móvel, e injetado no HPLC. Habitualmente, a cromatografia líquida de alta performance é a técnica mais empregada na determinação de cocaína em diversos tipos de amostras (Nakahara, 1999., Höld et al., 1998, Moeller et al., 1998, Ma et al., 1997). As separações e determinações da cocaína, benzoilecgonina e norcocaína normalmente são efetuadas em colunas cromatográficas C₁₈, empregando-se fases móveis compostas por: metanol-acetonitrila-acetato de sódio 0,026 mol L⁻¹, pH 2,2 contendo 1,29 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de fosfato de tetrabutilamônio (12,5:10:77,5 v/v/v) (Ma et al., 1997) e acetonitrila - tampão fosfato 0,02 mol L⁻¹, pH 6,0 (55:45 v/v) (Schwartz & David, 1985).

Tagliaro et al. (1998), empregaram a técnica de eletroforese capilar em solução livre na determinação de drogas de abuso e drogas ilícitas, mas o emprego desta técnica também requer o preparo das amostras antes de serem injetadas no equipamento de eletroforese capilar de zona.

Vários métodos analíticos, utilizando a técnica de injeção direta da amostra empregando colunas ISRP (*internal surface reverse phase*), têm sido desenvolvidos e avaliados para aplicações semelhantes, tais como: extração e separação de pesticidas em leite cru, (Menezes et al., 1998) e a determinação de cafeína em amostras de urina por injeção direta no HPLC. (Menezes et al., 1999).

O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver um método analítico simples e rápido para a determinação direta de cocaína em amostras de urina, como auxílio na área da toxicologia analítica, notadamente nos segmentos da toxicologia forense e toxicologia clínica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes

A acetonitrila foi obtida da Carlo Erba (Milan, Italy), fosfato dibásico de sódio e ácido clorídrico (p.a) foram adquiridos da Merck (E. Merck, Darmstadt, Germany). A água utilizada foi obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q, obtido da Millipore, (Millipore, Bedford, M A, USA). O padrão de cocaína, bem como as amostras de cocaína e *crack*, foram doados pela Polícia de Investigações de Entorpecentes de Bauru, através do Delegado Titular Edson Cardia.

Fortificação das amostras de urina com cocaína e preparação da curva de calibração

A amostra de urina foi diluída 1:100 (v/v) com água purificada e a esta adicionadas quantidades conhecidas de cocaína, para obter concentrações de 3,00; 6,00 e 9,00mg mL⁻¹.

As soluções-padrão contendo 0,56; 1,12; 2,25; 4,50 e 9,00mg mL⁻¹

de cocaína foram preparadas, efetuando-se a diluição de uma solução-padrão contendo 500mg mL^{-1} de cocaína. Esta solução foi preparada previamente dissolvendo-se 0,05g do padrão de cocaína em 1,0mL de uma solução de ácido clorídrico $1,00\text{mol L}^{-1}$, completando-se o volume para 10,0mL com água purificada.

Preparação da amostra de crack e das amostras de cocaína

A uma massa de 0,05g da amostra de *crack* e/ou cocaína foi adicionada 1,0mL de uma solução de ácido clorídrico $1,00\text{mol.L}^{-1}$ e 5,0ml de água pura. A mistura foi homogeneizada e filtrada em papel de filtro Whatman qualitativo e transferido para um balão volumétrico com capacidade de 10,0mL, completando-se o volume com água pura. Estas soluções foram diluídas de 1:200 (v/v) antes de serem injetadas no sistema de cromatografia líquida.

Instrumentação

Os experimentos cromatográficos foram realizados sob condições isocráticas em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, Varian Modelo 2510, equipado com uma bomba recíproca, um detector de ultravioleta de comprimento de onda variável, Varian Modelo 2550, com comprimento de onda ajustado em 235nm, e um integrador SP 4400 Chromajet (Varian Associates, Inc; Sunnyvale, CA, USA). As amostras e as soluções- padrão foram injetadas em uma coluna ISRP-C₈, com uma válvula manual de injeção (Rheodyne 7125, Cotati, CA, USA), utilizando uma alça de 10mL.

Condições Cromatográficas

A coluna cromatográfica ISRP-C₈ (100 mm x 4,6 mm DI) empregada foi preparada de acordo com Menezes & Felix, (1998).

A determinação da cocaína foi realizada à temperatura ambiente, com uma vazão da fase móvel ajustada em $1,0\text{mL min}^{-1}$. A fase móvel empregada foi composta por uma mistura de solução de fosfato dibásico de sódio $0,05\text{mol L}^{-1}$ pH 8,0 e acetonitrila (70:30 v/v).

Avaliação da Injeção direta da amostra de urina fortificada com cocaína

Os experimentos foram realizados injetando-se triplicatas para cada concentração da amostra de urina previamente fortificada, contendo 3,00; 6,00 e 9,00 mg mL^{-1} de cocaína. Os resultados obtidos foram avaliados em função da percentagem de retenção e do desvio padrão relativo, [desvio-padrão relativo(DPR= desvio/média dos resultados x 100)]*

Determinação da Concentração de cocaína nas amostras de

MENEZES, Manoel Lima de et al. Determinação por injeção direta no HPLC de cocaína em amostras de urina e em amostras de papéletes de cocaína e crack. *Salusvita*, Bauru, v. 19, n. 2, p. 73-80, 2000.

*O desvio padrão relativo também é conhecido como coeficiente de variância, (SKOOG et al., 1998).

cocaína e crack

As amostras reais de cocaína e *crack* foram injetadas em triplicata e os resultados avaliados de acordo com o desvio-padrão relativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método de injeção direta desenvolvido permite a determinação da concentração da cocaína em amostras de urina sem o tratamento prévio da amostra. A amostra de urina foi diluída 1:100 (v/v), para que se pudesse assegurar que os metabólitos e pequenas concentrações de proteínas fossem eluídos rapidamente da coluna cromatográfica, com um tempo de retenção de $2,50 \pm 0,02$ minutos.

A FIGURA 2 apresenta os cromatogramas da solução padrão de co-

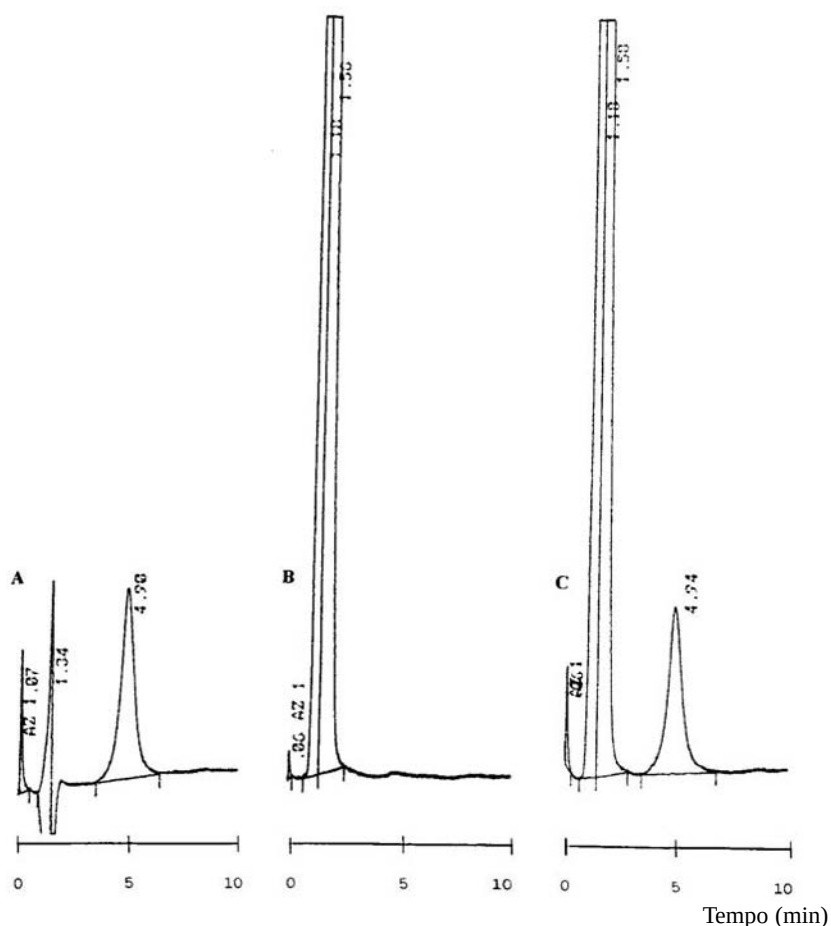


FIGURA 2 - Cromatogramas obtidos com: solução padrão contendo $9,00 \text{ mg mL}^{-1}$ de Cocaína com um tempo de retenção de $4,90 \pm 0,04$ minutos(A), amostra de urina sem ser fortificada (B) e cromatograma obtido com amostra de urina fortificada com $8,00 \text{ mg mL}^{-1}$ de cocaína (C).

caína: (A) 9,00 mg mL⁻¹, (B) amostra de urina e (C) amostra de urina fortificada com 8,00mg mL⁻¹ cocaína. No cromatograma C, observou-se que a cocaína é extraída da matriz sem picos interferentes. Isto se deve ao fato de empregarmos uma fase móvel constituída por uma solução aquosa de fosfato dibásico de sódio 0,05mol L⁻¹ pH 8,0 e acetonitrila (70:30 v/v). É importante enfatizar que, em solução básica, outros produtos comumente encontrados em amostras de urina, com propriedades ácidas ou ligeiramente ácidas, tais como: ácido benzóico, ácido hipúrico, ácido metilhipúrico, ácido acético, ácido cítrico, ácido tricloroacético e amino-ácidos apresentam-se parcialmente na forma ionizada e parcialmente na forma molecular; os fenóis, hidroquinona e catecol apresentam-se na forma iônica. Por outro lado, a cocaína não apresenta uma forma iônica em uma faixa de pH, tendo uma estrutura relativamente apolar. Sendo assim, em pH 8,4, devido às suas formas iônicas, os compostos indicados como “comumente encontrados em urina” não sofrem retenção por uma fase estacionária apolar (ISRP-C₈) enquanto a cocaína é retida.

Os experimentos cromatográficos para avaliar a eficiência da retenção foram verificados efetuando-se a fortificação de amostras de urina com cocaína, cujas concentrações de 3,00; 6,00 e 9,00mg mL⁻¹ foram injetadas em triplicata. As recuperações obtidas foram elevadas, obtendo-se valores de recuperação maiores que 98,8 ± 5,1%. A repetibilidade dos resultados foi verificada através de médias e cálculos dos desvios-padrão relativos, encontrando-se valores muito significativos, como pode ser observado na TABELA 1.

TABELA 1 – Avaliação da recuperação da cocaína nas amostras de urina fortificadas e os respectivos desvios-padrão relativos.

nível de fortificação (mg mL ⁻¹)	Recuperação (%)	DPR (%)
3,00	98,8 ± 5,1	2,7
6,00	99,3 ± 2,9	1,6
9,00	99,7 ± 2,3	1,2

O limite de detecção foi determinado medindo-se a concentração mínima de cocaína detectada, considerando-se a altura do pico correspondente a duas vezes o nível de ruído. Desta forma, encontrou-se um limite de detecção de 0,10mg mL⁻¹ de cocaína, determinada com detector de UV-visível ajustado com um comprimento de onda em 235nm e 0,04 unidades de absorbância e o integrador ajustado com uma unidade de atenuação. A linearidade do detector foi realizada determinando-se a concentração de cocaína em soluções aquosas, entre uma variação de 0,10 a 15,00mg mL⁻¹ de cocaína.

O emprego da coluna cromatográfica ISRP-C₈ também foi validado para determinações de concentrações de cocaína em amostras reais, tais como: amostras de cocaína (papelotes) e amostra de crack. As amostras foram preparadas previamente, de acordo com o item 2.3, e diluídas a

MENEZES, Manoel Lima de et al. Determinação por injeção direta no HPLC de cocaína em amostras de urina e em amostras de papelotes de cocaína e crack. *Salusvita*, Bauru, v. 19, n. 2, p. 73-80, 2000.

MENEZES, Manoel Lima de et al. Determinação por injeção direta no HPLC de cocaína em amostras de urina e em amostras de papelotes de cocaína e crack. *Salusvita*, Bauru, v. 19, n. 2, p. 73-80, 2000.

1:200 (v/v) e, em seguida, injetadas no sistema de cromatografia líquida. Para as amostras de cocaína, foram encontradas concentrações de 894 e 65mg g⁻¹ de cocaína. Na amostra de *crack* encontrou-se uma concentração de 867 mg g⁻¹ de cocaína. A grande diferença entre as concentrações de cocaína presentes na amostra de *crack* e amostras de papelotes de cocaína, TABELA 2, pode ser explicada pelo fato da cocaína poder ser diluída com açúcar, amido ou farinha de trigo, e dificilmente esta será encontrada “pura” em forma de papelotes de cocaína. A farinha e o amido serão extraídos durante o pré-tratamento da mostra, por meio de filtração e o açúcar dissolvido não será detectado durante o monitoramento dos cromatogramas com o detector na região do ultravioleta-visível.

TABELA 2 - Concentração de cocaína em uma amostra real de *crack* e duas amostras reais de cocaína.

Amostras	Cocaína (mg g ⁻¹)	DPR (%)
Cocaína	1 894 ± 0,7	0,03
Papelote de cocaína	65 ± 1,5	0,76
“Crack”	867 ± 6,0	0,23 2

CONCLUSÃO

O método desenvolvido é simples, rápido e a coluna cromatográfica ISRP-C₈ pode ser utilizada para a determinação direta das concentrações de cocaína em amostras de urina ou em amostras de papelotes de cocaína ou *crack*.

Observou-se que o teor de cocaína encontrado no *crack* é várias vezes superior as concentrações de cocaína encontradas em amostras de papelotes de cocaína. Considerando-se que o teor de cocaína no *crack* foi próximo ou superior aos valores encontrados nas amostras não diluídas de cocaína, talvez isto sugere porque os usuários de *crack* se viciarem com maior rapidez e, conseqüentemente, estarem mais sujeitos a intoxicações agudas, “*overdose*” de cocaína, ao usarem com freqüência esta droga de abuso.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP, à Universidade Estadual Paulista-UNESP pela ajuda financeira e ao Instituto de Saúde dos Trabalhadores do Município de Bauru pelo uso da infraestrutura dos laboratórios. Os autores também agradecem ao Delegado Edson Cardia, pela doação do padrão e amostras de cocaína e amostra de *crack*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

HÖLD, K. D., HUBBARD, L. D., DIANA, G. W., ROLLINS, D. R. Quantification of cocaine in human hair: the effect of centrifugation of hair digests. *J.Anal. Toxicol.* v. 22, p.414, 1998.

LARINI, L. Toxicologia. 2. Ed. São Paulo, Manole; 1993.

MA, F. ZHANG, J. LAU, C. E. Determination of cocaine and its metabolites in serum microsamples by high-performance liquid chromatography and its application to pharmacokinetics in rats., *J. Chromatogr.B. Biomed Sci. Appl.*, v. 693, n. 2, p.307-312, 1997.

MENEZES, M.L. DEMARCI, A. A. C. FÉLIX, G. On-line extraction and determination of carbofuran in raw milk by direct HPLC injection on an ISRP column., *Chromatographia.* v.47, n.1/2, p.81, 1998.

MENEZES, M.L. FÉLIX, G. On-line extraction and separation of bendiocarb, methomyl, methylparathion and pentachlorophenol pesticides from raw milk, *J.Liq.Chromatogr.Rel. Technol.* v.21, n.18, p.2863, 1998.

MENEZES, M. L. SANCHEZ, A, MARTINS, P. R., GARCIA, M. Z., PEREIRA, O. C. M., CARDOSO, A. A. Determinação de cafeína em amostras de urina por injeção direta no HPLC., *Salusvita*, v.18, n.2, p.35, 1999.

MOELLER, M.R. STEINMEYER, S. KRAEMER., T. Determination of drugs of abuse in blood-Review., *J.Chromatogr.B.* v.713, p.91, 1998.

NAKAHARA, Y. Hair analysis for abused and therapeutic drugs., *J. Chromatogr.B.* v.733, p.161, 1999.

SCHWARTZ, R. DAVID, O. K. Liquid chromatography of opium alkaloids, heroin, cocaine and related compounds using electrochemical detection. *Anal. Chem.*, v.57, p.1362, 1985.

SKOOG, D. A. HOLLER, F. J. NIEMAN, T. A. Principles of instrumental analysis 5.ed. San Francisco, Harcourt Brace College Publishing, appendix (A-7), 1998.

TAGLIARO, F. TURRINHA, S. PISI, S. SMITH, P. MARIAGO, M. Determination of illicit and/or abused drugs and compounds of forensic interest in biosamples by capillary electrophoretic/electrokinetic methods-Review. *J.Chromatogr.B* v.713, p.27, 1998.

MENEZES, Manoel Lima de et al. Determinação por injeção direta no HPLC de cocaína em amostras de urina e em amostras de papelotes de cocaína e crack. *Salusvita*, Bauru, v. 19, n. 2, p. 73-80, 2000.