

DETECÇÃO DE EFEDRINA EM URINA HUMANA ATRAVÉS DA ESPECTROSCOPIA RAMAN

Anderson Eduardo Guimarães¹, Daniel Barsottini², Marcos Tadeu T. Pacheco³

^{1,2,3}Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D Universidade do Vale do Paraíba, Av. Shishima Hifumi, 2911 – Urbanova – 12244-000 – São José dos Campos – SP, anders@univap.br

Palavras-chave: Espectroscopia Raman, Doping, Efedrina

Área do Conhecimento: III - Engenharias

Resumo - Atualmente, deter a utilização de drogas no meio esportiva é um desafio. Tais substâncias ganham destaque na medida em que conseguem mascarar o resultado dos testes, ocultando a sua utilização. O exame clássico, que é a análise no cromatógrafo, apresenta relativa dificuldade para certas substâncias, além de levar cerca de duas horas para apresentar o resultado. Existe uma grande necessidade, no controle do doping, para o desenvolvimento de novas técnicas justificando nosso interesse. Utilizando um sistema Raman de bancada com laser de Ti:Safira, sintonizado em 785 nm, foi analisada uma amostra de urina com concentração de 75mg/ml de Efedrina. O sinal foi coletado em um espectrômetro Kaiser f/l.8 e um detector CCD refrigerado e os espectros processados permitem identificar a presença de Efedrina através dos picos situados em 618, 753, 834, 1002, 1025, 1209, 1465 e 1600 cm^{-1} . Futuramente, o processamento deve fornecer a quantificação das concentrações e, o melhoramento tecnológico é uma expectativa promissora para aplicação desta ferramenta no controle do doping.

Introdução

Nos desportos, a busca por melhores resultados é uma constante preocupação e tem levado alguns atletas a utilização de recursos ilegais a fim de se obter vantagens sobre os adversários. As ações repugnadas pelas entidades dirigentes do desporto são classificadas como "doping" que é definido como qualquer manobra que altere artificialmente o desempenho fisiológico aumentando a performance física [1].

Entre as principais substâncias condenadas pelo Comitê Olímpico Internacional (COI), encontram-se a Efedrina, Eritropoietina (EPO), Testosterona, Stanozolol, Nandrolona, Furosemida e DHEA ativos [1-4]. Destas, uma classe de grande destaque é a das substâncias estimulantes, como a Efedrina, a Cafeína e similares, que visam diminuir a sensação de fadiga, proporcionando o aumento da performance de resistência. Geralmente, são utilizadas por praticantes de esportes coletivos, como basquete, vôlei e futebol e também servem para atletas de provas de longa duração, como a maratona e a marcha [5-7]

A Efedrina é um princípio ativo comum para tratamento de faringite, resfriados entre outros distúrbios respiratórios e, por esse motivo, o COI proibiu a utilização de medicamentos que contenham Codeína, Efedrina e Propanolamina (Bisolvon compositum), pois somado ao efeito ergogênico, o uso crônico apresenta efeitos

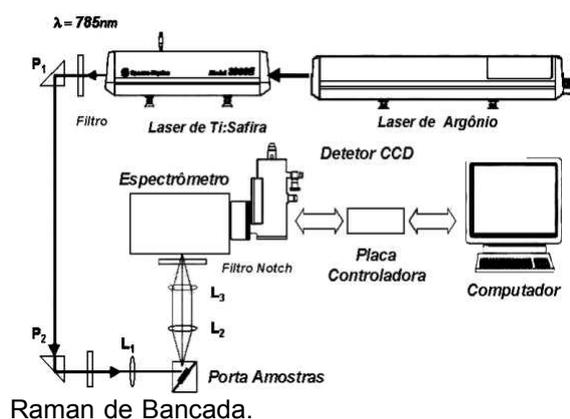
colaterais como hipertensão, taquicardia, paranóia psicótica e depressão [2-4].

Atualmente, o exame clássico é a análise no cromatógrafo associado a um espectrômetro de massa, porém além de apresentar relativa dificuldade para determinadas substâncias leva cerca de duas horas para apresentar o resultado [8]. O objetivo deste trabalho é verificar a utilização da Espectroscopia Raman (ER) como uma nova ferramenta para esta análise, devido a sua comprovada eficiência em diversos estudos biológicos e a grande vantagem de diagnóstico em tempo real [9-11].

Materiais e Método

Foi utilizado um Laser de Ti:Safira bombeado por um Laser de Argônio (Figura 1). Para este experimento o Laser de Ti:Safira foi sintonizado em 785 nm. O sinal Raman foi coletado por um espectrógrafo e analisado em um detector CCD (CSMA) controlado por PC. O ruído presente com o sinal foi atenuado pela refrigeração do detector com Nitrogênio líquido (N_2) e o uso de filtros ópticos. As amostras foram analisadas em cubeta de quartzo de 1cm x 1cm, com potência de excitação de 70 mW e a abertura da fenda do espectrógrafo foi ajustada em 10 μm .

Figura 1 - Diagrama Esquemático do Sistema



A Efedrina na forma de Cloridrato foi elaborada em um laboratório comercial. A urina humana obtida por micção foi utilizada para as medidas espectrais dentro do tempo de uma hora sem nenhum pré-tratamento em volume de 2 ml. A Efedrina foi adicionada à urina humana, obtendo-se a concentração de 75 mg/ml. O processamento dos espectros obtidos foi realizado através do programa matemático Origin, versão 6.0, onde foi subtraído o fundo de fluorescência. Para calibração do deslocamento Raman, utilizou-se a solução de indino com ajuste de polinômio de ordem 3 [10].

Resultados

Na Figura 2 tem-se o espectro Raman da Efedrina comercial em estado sólido obtido com 5 acumulações sendo cada uma destas com tempo de aquisição de 20 segundos. Pode-se observar picos Raman bem definidos nas frequências de 618, 753, 834, 1002, 1025, 1175, 1208, 1334, 1390, 1462 e 1603 cm^{-1} .

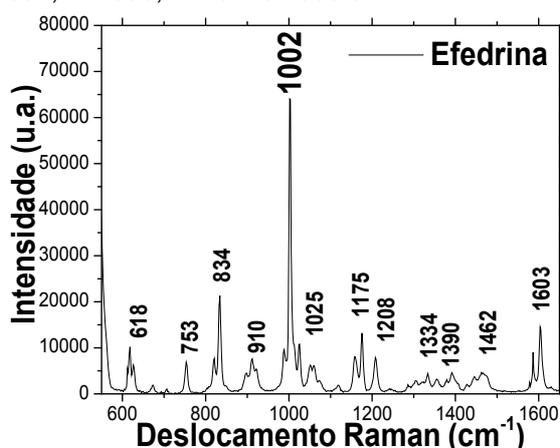
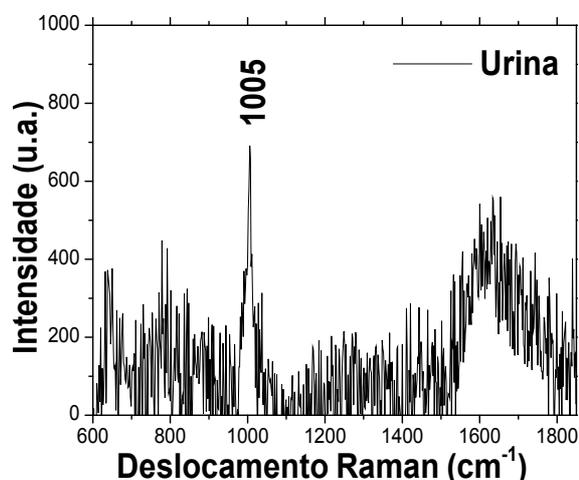


Figura 2 - Espectro Raman da Efedrina.

A Figura 3 apresenta o Espectro da urina sem adição de nenhum componente. Este espectro foi obtido mediante 10 acumulações

sendo que cada uma destas com tempo de aquisição de 10 segundos.

Figura 3 - Espectro Raman da Urina Humana.



Na Figura 4 temos o espectro Raman obtido de uma solução de Efedrina em Urina, a uma concentração de 75 mg/ml. Para esta amostra, o número de acumulações foi aumentado para 10 acumulações, sendo cada uma destas com tempo de aquisição de 20, devido a baixa intensidade do sinal e a menor relação sinal-ruído, devido a presença da urina (Figura 3).

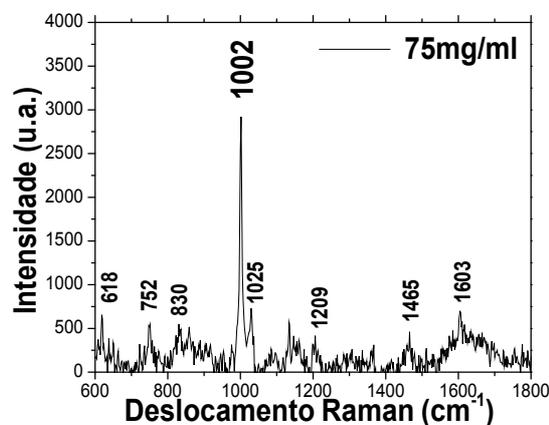
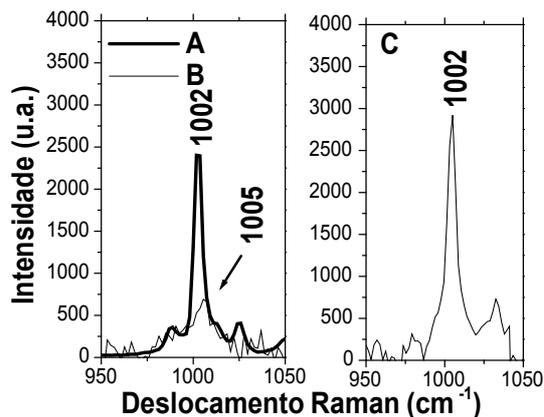


Figura 4 – Droga adicionada à urina.

Para análise dos resultados, ferramentas matemáticas são utilizadas para auxiliar na interpretação dos espectros Raman conforme mostra a Figura 5.

Figura 5 – Espectro Raman da Efedrina (A), Espectro Raman da Urina (B) e a composição



espectral (C).

A comparação entre a composição espectral e os resultados práticos é detalhada na Figura 6.

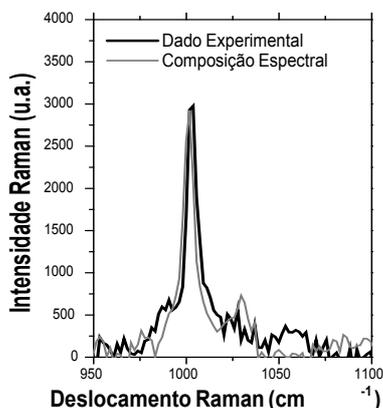
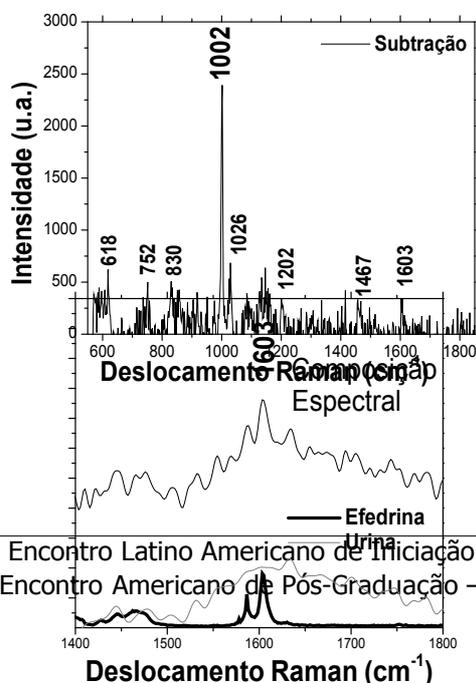


Figura 6 – Aplicação matemática para análise Raman.

Na Figura 7, apresenta o espectro com a subtração matemática, o pico na região de 1002 cm^{-1} , permitindo visualizar a recuperação das informações espectrais da droga.

Figura 7 – Espectro da concentração analisada de efedrina subtraído os componentes Raman da



urina.

Figura 8 - Comparação dos espectros experimentais e o processamento matemático.

A manipulação matemática pode ser aplicada em diferentes regiões espectrais (Figura 8) e confirmada através da comparação com os dados experimentais (Figura 9).

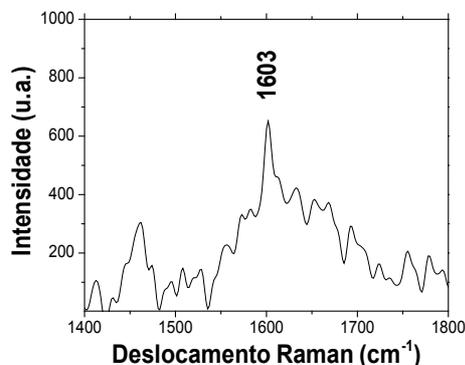


Figura 9 – Espectro de Efedrina obtido experimentalmente.

Discussão

Na Figura 3, pode-se identificar o pico típico da Uréia localizado em 1005 cm^{-1} e duas bandas expressivas (picos mais alargados) em torno de 600 cm^{-1} e 1600 cm^{-1} , que aparecem em virtude da presença de água, que é um dos principais constituintes da urina [12].

A análise qualitativa confirma a detecção da presença da Efedrina através da repetição dos picos da droga na amostra analisada (Figura 4). Na Figura 5, temos uma tentativa de recompor matematicamente, através da composição dos espectros isolados da urina e da efedrina em pó, o espectro da solução destes componentes. O espectro da urina na região de 1005 cm^{-1} foi considerado o mesmo daquele obtido na Figura 3, entretanto o espectro da efedrina obtido na Figura 1, na região de 1002 cm^{-1} foi ajustado considerando a intensidade do pico em 1603 cm^{-1} que aparece superposto a banda de emissão da urina nesta mesma região (Figura 4).

Embora o pico mais intenso da droga em 1002 cm^{-1} (Figura 2) sobreponha o pico da urina na região de 1005 cm^{-1} (Figura 3) pode-se confirmar a presença deste componente subtraindo os componentes espectrais obtidos na amostra isolada de urina do espectro da solução analisada. Esta manobra é uma alternativa para contornar esta situação, uma vez que a menor largura de faixa permitida pelo sistema seja de 6 cm^{-1} . Na figura 7 o espectro com a subtração matemática permite visualizar o pico na região de 1002 cm^{-1} , recuperando as informações espectrais da droga.

Outras regiões espectrais também podem ser exploradas, como o pico Raman da Efedrina situado em 1603 cm^{-1} que destaca-se pelo fato de não estar localizado em uma região comum à Urina. Do mesmo modo, a manipulação matemática proposta anteriormente pode ser aplicada neste caso (Figura 8).

Conclusão

O Sistema Raman diferenciou os espectros da urina normal com o da solução contendo a concentração de 75mg/ml de Efedrina através dos picos localizados em 618, 753, 834, 1002, 1025, 1209, 1465 e 1600 cm^{-1} , que não são comuns na Urina em sua forma natural, podendo por esta razão ser atribuídos a presença da droga analisada.

Embora o COI considere como Doping concentrações a partir de 10 $\mu\text{g/ml}$ [1], este primeiro estudo extrapolou este valor com objetivo de obter uma melhor resolução do espectro Raman. Uma vez demonstrado que o sistema Raman pode identificar esta substância, melhorias técnicas na parte instrumental devem ser ajustadas a fim de aumentar a sensibilidade e, melhorar sua eficiência para concentrações de ordem prática.

Como trabalhos futuros, a análise da Efedrina em Urina deve voltar-se para o processamento quantitativo e a via metabólica.

Estudos desta natureza, possibilitam testar as substâncias de interesse no sistema de bancada, viabilizando o desenvolvimento de um sistema compacto que pode contar com rotinas de processamento para oferecer o resultado em tempo real [12]. Tais fatores, somados à possibilidade de diagnóstico transcutâneo, que é uma grande promessa [11], certamente, farão a ER ser considerada como uma grande esperança para o controle do doping, revolucionando os procedimentos atuais.

Referências

- [1] International Olympic Committee. List of Prohibited Classes and Prohibited Methods. COI. Lausanne, 2003.
- [2] Mottram, D. R, Phd Drugs In Sport, USA, Human Kinetics, 1988
- [3] Yesalis, Charles; Cowart, Virginia. The Steroids Game-Na Expert'S Inside At Anabolic Steroid Use In Sports. Usa, Human Kinetics, 1988.
- [4] Dirix, A Knuttgen, H. E Titell, K. Olympic Book Of Sports Medicine. Blacwell, Londres, 1988
- [5] Golding, L.A. 1972. Drugs And Hormones. In Ergogenic Aids And Muscular Performance, Ed. W.P. Morgan , New York: Academic Press.
- [6] Ivy, John L. 1983. Amphetamines. In Ergogenic Aids In Sports. Champaign, Il: Human Kinectis.
- [7] Lombardo, J.A. 1986. Stimulants And Athletic Performance (Parte 1 Fo 2): Amphetamines And Caffeine. The Physical And Sportsmedicine 14 (11):128-42 .
- [8] Adamsom, J.W.; Vapnek, D. Recombinant Erythropoietin To Improve Athletic Performance. New England Journal Of Medicine, V.324, P.698-9, 1991.
- [9] Berger A. J., Itzkan I., Feld M. S. Feasibility Of Measuring Blood Glucose Concentration By Near Infrared Raman Spectroscopy. *Spectrochimica Acta A* 1997;53:287-292.
- [10] Wollman, S.T. & Bohn, P.W. Evaluation Of Polynomial Fitting Functions For Use With Ccd Arrays In Raman Spectroscopy. *Applied Spectroscopy* . Vol. 47, No. 1, 125-126, 1993.
- [11] Pilotto S, Pacheco Mt, Silveira L Jr, Vellaverde Ab, Zangaro Ra. Analysis Of Near-Infrared Raman Spectroscopy As A New

Technique For A Transcutaneous Non-Invasive Diagnosis Of Blood Components. *Lasers Med Sci.*;16(1):2-9. 2001.

[12] Dou, X. Yamaguchi, Y., Yamamoto, H., Doi, S., Ozaki, Y. A Highly Sensitive Compact Raman system without a spectrometer for quantitative analysis of biological samples. *Vibrational Spectroscopy* 14 (1997) 199-205.