



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Francisca Raquel de Frias Machado

METODOLOGIAS ANALÍTICAS USADAS NA
DETERMINAÇÃO DE DROGAS DE ABUSO EM
AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Relatório de Estágio no âmbito do Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses orientado pelo Professor Doutor Duarte Nuno Pessoa Vieira e pela Doutora Cláudia Isabel Reis Margalho, apresentado à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2022

Ao meu pai, à minha irmã e ao meu padrinho.

Agradecimentos

Ao meu orientador, o Professor Doutor Duarte Nuno Vieira, pelo excelente professor que foi e pela disponibilidade, gentileza e prontidão ao longo desta última etapa.

À minha coorientadora, a Doutora Cláudia Margalho, não só pela excelente orientação dada, mas também pela disponibilidade e dedicação ao longo deste longo processo.

Ao Doutor João Miguel Franco – diretor do Serviço de Química e Toxicologia Forenses – por ter possibilitado esta experiência; e a todos os profissionais que tive o prazer de conhecer por conta disso.

À Universidade de Coimbra e ao Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. pelas oportunidades oferecidas.

À minha mãe, pelo apoio incondicional, pela disciplina e por me motivar a continuar de cabeça erguida e a lutar por um futuro meu; à minha avó, pela preocupação e compreensão, e, acima de tudo, pela fé transmitida.

Aos valiosos amigos que me acompanharam, sem os quais esta jornada teria sido extremamente mais sinuosa; e ao meu tio, por nunca ter deixado de acreditar em mim e por me apoiar incondicionalmente.

A todos vós e a deus, um bem-haja do fundo do coração.

Resumo

Em Portugal, o Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. é a instituição nacional de referência na área científica da Medicina Legal, sendo a Toxicologia Forense uma importante vertente da mesma. O estágio realizado no Serviço de Química e Toxicologia Forenses (Delegação do Centro) ao longo de um ano permitiu contactar com a realidade vivida num laboratório de análises toxicológicas forenses, desde a entrada das amostras de rotina no Serviço à emissão dos respetivos resultados analíticos – com as diversas etapas descritas detalhadamente ao longo do presente relatório. Foi acompanhado, em particular, o desenvolvimento de análises toxicológicas qualitativas e quantitativas de drogas de abuso em matrizes biológicas. As análises iniciam-se, de uma forma geral, pela preparação das amostras pela técnica de extração em fase sólida (SPE), seguida da técnica de derivatização química para a posterior análise por cromatografia de gases acoplada à espetrometria de massas com ionização por impacto eletrónico (GC-MS-EI). Foi feita a análise de opiáceos, de cocaína e metabolitos, de canabinóides, de anfetaminas e substâncias relacionadas, e ainda de Novas Substâncias Psicoativas (NSP). O abuso destas substâncias constitui um grave problema de saúde pública. No decorrer do estágio realizado notou-se um aumento significativo do número de casos de alfa-pirrolidinohexanofenona (α -PHP) – uma NSP pertencente ao grupo das catinonas sintéticas. Perante esta situação, foi oportunamente desenvolvido um trabalho científico de validação de um método quantitativo para esta substância em sangue, posteriormente submetido a publicação na revista *Journal of Analytical Toxicology*.

Palavras-chave: Toxicologia forense; Drogas de abuso; SPE; GC-MS-EI; α -PHP.

Abstract

In Portugal, the National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences, I.P. is the national institution of reference in the scientific area of Legal Medicine, with Forensic Toxicology being an important branch of it. The internship carried out at the Forensic Chemistry and Toxicology Service (Centre Branch) over a year allowed contact with the reality experienced in a forensic toxicology laboratory, from the moment of entry of routine casework samples at the Service, to the issuance of the respective analytical results – with the various steps described in detail throughout this report. The development of qualitative and quantitative toxicological analysis of drugs of abuse in biological matrices was followed, in particular. The analysis generally begins with the preparation of samples by solid phase extraction (SPE), followed by the chemical derivatization technique for subsequent analysis by gas chromatography - mass spectrometry with cold electron ionization (GC-MS-EI). Opiates, cocaine and metabolites, cannabinoids, amphetamines and related substances, and New Psychoactive Substances (NPS) were analyzed. The abuse of these substances poses a serious public health problem. There was a significant increase in the number of cases of alpha-pyrrolidinohexanophenone (α -PHP) during the internship – an NPS belonging to the group of synthetic cathinones. That said, a scientific work with a validated analytical methodology for the determination of this substance in blood was developed and submitted to the Journal of Analytical Toxicology for publication.

Keywords: Forensic toxicology; Drugs of abuse; SPE; GC-MS-EI; α -PHP.

Índice Geral

Dedicatória	ii
Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Índice Geral	ix
Índice de Figuras	xi
Índice de Tabelas	xi
Índice de Abreviaturas	xiii
Visão Geral do Relatório	xvii
Capítulo 1 – Introdução	1
1.1 Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.	1
1.1.1 Organização	1
1.2 Serviço de Química e Toxicologia Forenses	2
1.2.1 Atividade Pericial	3
Capítulo 2 – Estágio Realizado no Serviço de Química e Toxicologia Forenses da Delegação do Centro do INMLCF, I.P.	5
2.1 Objetivo	5
2.2 Cadeia de Custódia	5
2.2.1 Cadeia de Custódia Intralaboratorial	6
2.2.2 Base de Dados	6
2.3 Receção, Registo e Armazenamento de Amostras	7
2.4 Matrizes Biológicas	7
2.5 Análises de Triagem	9
2.6 Drogas de Abuso	10
2.6.1 Opiáceos	12
2.6.2 Cocaína e metabolitos	15
2.6.3 Canabinóides	17
2.6.4 Anfetaminas e substâncias relacionadas	20
2.6.5 Novas substâncias psicoativas	23
2.7 Procedimento de rotina para a determinação de drogas de abuso em matrizes biológicas	25
2.7.1 Preparação do Controlo de Qualidade Interno	26
2.7.2 Preparação da amostra	27
2.7.3 Análise Instrumental	31
	ix

2.7.4	Avaliação, cálculo e expressão de resultados	33
	Capítulo 3 – Atividades Formativas	37
4.1	19º Congresso Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses	37
4.2	Formação sobre Medidas de Autoproteção – Edifício da Sede/ Delegação Centro do INMLCF, I.P.	37
	Capítulo 4 – Conclusão	39
	Referências Bibliográficas	41
	Anexos	47

Índice de Figuras

Figura 1: Distribuição das Delegações e dos GMLF do INMLCF, I.P..	2
Figura 2: Gráfico ilustrativo da relação <u>Absorvância</u> – Concentração.	10
Figura 3: Metabolismo da morfina e seus precursores.	13
Figura 4: Metabolismo da cocaína, inclusive em associação com etanol.	16
Figura 5: Metabolismo do Δ^9 -THC.	19
Figura 6: Estrutura da anfetamina e dos seus derivados metanfetamina, MDMA, MDA, MDEA e MBDB.	21
Figura 7: Metabolismo da anfetamina.	22
Figura 8: Esquema SPE.	28
Figura 9: Esquema GC-MS.	32

Índice de Tabelas

Tabela 1: Controlos positivos e calibradores usados no CQI, dos respetivos grupos de substâncias analisadas no SQTF-C.	26
Tabela 2: Intervalos máximos de tolerância para a identificação de substâncias.	34

Índice de Abreviaturas

α-PHP	<i>alpha-pyrrolidinohexanophenone / alfa-pirrolidinohexanofenona</i>
Δ^9-THC	<i>Δ^9-tetrahidrocanabinol</i>
19º CNMLCF	19º Congresso Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses
AAFS	<i>American Academy of Forensic Sciences</i>
A_{CUT-OFF}	Média das absorvâncias obtidas para o calibrador <i>cut-off</i>
ANSI/ASB	<i>American National Standards Institute/ AAFS Standards Board</i>
ANSR	Autoridade Nacional de Segurança Rodoviária
BE	Benzoilecgonina
EAA	Espetrofotometria de Absorção Atômica
EAM	Espetrofotometria de Absorção Molecular
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay / Ensaio de imunoabsorção enzimática</i>
EMCDDA	<i>European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction / Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência</i>
EME	Éster metílico da ecgonina
GC	<i>Gas Chromatography / Cromatografia de gases</i>
GC-FID	<i>Gas Chromatography - Flame Ionization Detector / Cromatografia de gases com detetor por ionização de chama</i>
GC-MS	<i>Gas Chromatography - Mass Spectrometry / Cromatografia de gases acoplada à espetrometria de massas</i>
GC-MS-EI	<i>Gas Chromatography - Mass Spectrometry with cold Electron Ionization / Cromatografia de gases acoplada à espetrometria de massas com ionização por impacto eletrónico</i>
GMLF	Gabinetes Médico-Legais e Forenses
GNR	Guarda Nacional Republicana

IE	Imunoensaios
INMLCF, I.P.	Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.
IPAC	Instituto Português de Acreditação, I.P.
LIMS	<i>Laboratory Information Management System</i>
LLE	<i>Liquid-Liquid Extraction</i> / Extração em fase líquida
LOD	<i>Limit of Detection</i> / Limite de deteção
LOQ	<i>Limit of Quantification</i> / Limite de quantificação
MBDB	<i>N-metil-1-(3,4-metilenodioxifenil)-2-butanamina</i>
MBTFA	<i>N-metil-bis(trifluoroacetamida)</i>
MDA	<i>3,4-metilenodioxianfetamina</i>
MDEA	<i>3,4-metilenodioxietilamfetamina</i>
MDMA	<i>3,4-metilenodioximetamfetamina</i>
MSTFA/TMCS	<i>N-metil-trimetilsilil-trifluoroacetamida/Trimetilclorosilano</i>
m/z	Massa/carga
NSP	Novas Substâncias Psicoativas
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> / Tampão fosfato-salino
PI	Padrão Interno
PJ	Polícia Judiciária
PSP	Polícia de Segurança Pública
PMR	<i>postmortem redistribution</i> / Redistribuição <i>postmortem</i>
r²	Coefficiente de determinação
rpm	Rotações por minuto
RQ	Responsável da Qualidade
SCPF	Serviço de Clínica e Patologia Forenses
SGBF	Serviço de Genética e Biologia Forense

SICAD	Serviço de Intervenção nos Comportamentos Aditivos e nas Dependências
SIM	<i>Selected Ion Monitoring</i> / Monitorização seletiva de iões
SNC	Sistema Nervoso Central
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> / Extração em fase sólida
SQTF	Serviço de Química e Toxicologia Forenses
SQTF-C	Serviço de Química e Toxicologia Forenses da Delegação do Centro
TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i> / Cromatograma de iões totais
tR	Tempo de retenção
UPLC-MS/MS	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry</i> / Cromatografia em fase líquida de ultra eficiência acoplada à espetrometria de massas em tandem
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana
WADA	<i>World Anti-Doping Agency</i> / Agência Mundial Antidoping

Visão Geral do Relatório

O presente relatório foi desenvolvido em contexto de estágio curricular de Mestrado e encontra-se dividido em quatro capítulos. No primeiro capítulo é feita uma introdução à área científica da Medicina Legal e ao local de realização do estágio, com um breve enquadramento histórico, organizacional e legal. O segundo capítulo diz respeito à experiência de estágio, desenvolvido no Serviço de Química e Toxicologia Forenses da Delegação do Centro. Inicia-se pela clarificação do objetivo do estágio realizado e pela descrição detalhada do funcionamento do Serviço nos processos que envolvem as amostras – desde o cumprimento da cadeia de custódia, ao encaminhamento para análises toxicológicas específicas. Logo de seguida é feita uma abordagem às drogas de abuso no que diz respeito à sua classificação, mecanismos de ação e sintomatologia associada, apresentando-se também um enquadramento do estado do consumo a nível global, europeu e nacional. É ainda retratado nesse capítulo o procedimento de rotina para a determinação de drogas de abuso em matrizes biológicas, desde a preparação das amostras e respetivo controlo de qualidade interno, à análise instrumental e interpretação dos resultados. No terceiro capítulo são resumidas duas atividades formativas em que, para uma delas, foi desenvolvido e apresentado um poster científico alusivo à importância da integridade da amostra de sangue na análise toxicológica forense (ANEXO II). No quarto capítulo encontra-se uma conclusão sucinta do trabalho de estágio desenvolvido. Por fim, para além da componente de estágio detalhada a longo dos capítulos suprarreferidos, o relatório possui também uma componente analítica relativa ao desenvolvimento de um artigo científico, submetido a publicação na revista *Journal of Analytical Toxicology*. Trata-se da validação de uma metodologia analítica de determinação de α -PHP em sangue pela técnica analítica GC-MS-EI, aplicada a 15 casos de rotina analisados no SQTF-C (ANEXO III).

Capítulo 1 – Introdução

A Medicina Legal, especialidade concomitantemente médica e jurídica, tem uma história de longa data cuja origem remonta às civilizações mais antigas. Apoia-se em conhecimentos técnico-científicos da medicina e de diversas outras áreas para a resolução de problemas de natureza jurídica, o que a torna um importante auxílio em sede de Direito (1). A Toxicologia Forense, em particular, representa uma importante vertente da Medicina Legal, dedicada à resolução de questões judiciais mediante a aplicação dos princípios da toxicologia fundamental e da química analítica instrumental (2).

1.1 Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.

O Decreto-Lei n.º 96/2001, de 26 de Março, vem, numa primeira fase, criar três Institutos de Medicina Legal (Porto, Coimbra e Lisboa), com autonomia e independência técnico-pericial, acabando por gerar diferentes escolas doutrinárias e metodologias periciais (3).

Foram posteriormente reestruturados os serviços e otimizados os recursos humanos através da criação do Decreto-Lei n.º 166/2012, de 31 de Julho, passando a entidade a designar-se por Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. (INMLCF, I.P.). Isto permitiu uma uniformização de metodologias periciais a nível nacional, salvaguardando sempre a independência técnico-científica dos peritos na apreciação de cada processo a si atribuído. Em linha com estas alterações, o novo Instituto fica sob tutela do Ministério da Justiça, e é criado um único Conselho Médico-Legal, alargando-se a sua composição com o envolvimento da Ordem dos Médicos (4).

Com a natureza de Laboratório do Estado, o INMLCF, I.P. é atualmente a instituição nacional de referência na área científica da medicina legal, promovendo a formação e a investigação nesse domínio. Colabora com a justiça, nomeadamente com os tribunais, com o Ministério Público e com os órgãos da polícia criminal, através da realização de exames periciais e da prestação de apoio técnico e laboratorial, tendo sempre em vista a prossecução do interesse público (5,6).

1.1.1 Organização

Sediado em Coimbra, o INMLCF, I.P. encontra-se dividido em três Delegações – Norte (Porto), Centro (Coimbra) e Sul (Lisboa) – em concordância com o artigo 1º da Portaria n.º 19/2013, de 21 de Janeiro, que aprova os estatutos do INMLCF, I.P..

Foram também criados trinta e dois Gabinetes Médico-Legais e Forenses (GMLF), dependentes das Delegações (7), pensados com o intuito de diminuir as distâncias que os cidadãos teriam de percorrer para a realização de perícias. Desta forma, O INMLCF, I.P. tem presença assegurada em praticamente todo o território nacional, aproximando a justiça às populações.

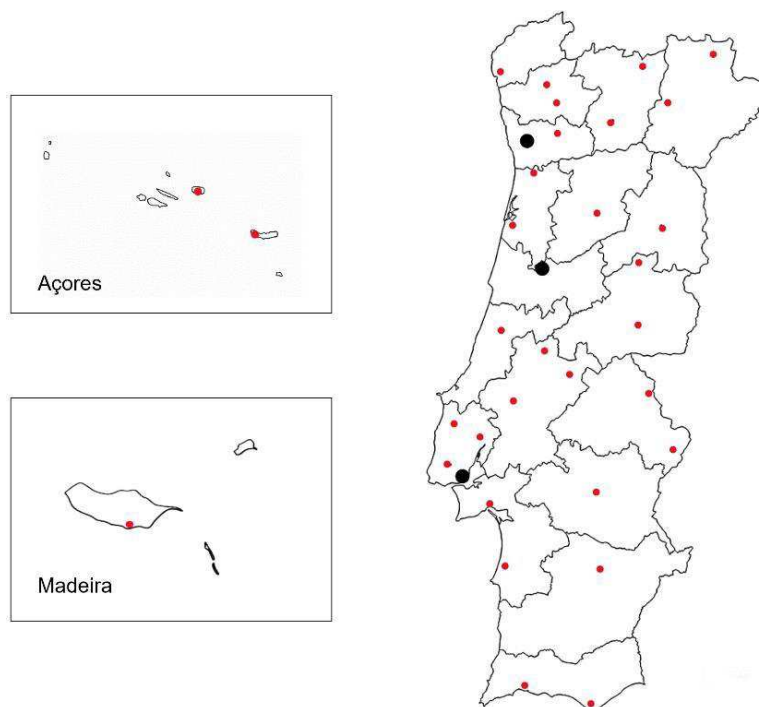


Figura 1: Distribuição das Delegações (•) e dos GMLF (•) do INMLCF, I.P..

Os GMLF encontram-se normalmente acoplados a hospitais, fator este que não só permite a racionalização e rentabilização de recursos, como também assegura o acesso a melhores serviços. Os GMLF das ilhas da Madeira e dos Açores encontram-se sob alçada da Delegação do Centro.

1.2 Serviço de Química e Toxicologia Forenses

Criado com a publicação do Decreto-Lei nº 166/2012, de 31 de julho, o Serviço de Química e Toxicologia Forenses (SQTF) está sediado na Delegação do Sul, com extensões funcionais nas Delegações do Centro e do Norte. Os seus laboratórios estão acreditados pelo Instituto Português de Acreditação, I.P (IPAC), de acordo com o referencial da norma internacional NP EN ISO/IEC 17025:2018, ficando sujeitos a auditoria externa anual. O SQTF participa regularmente em ensaios de aptidão, interlaboratoriais, organizados por entidades

internacionais reconhecidas (8). Este fator permite evidenciar a qualidade dos serviços prestados e, por conseguinte, dos resultados apresentados. Ficam asseguradas as boas práticas laboratoriais, de acordo com a ética e legislação, na determinação, confirmação e quantificação de substâncias de interesse forense, em diferentes tipos de matrizes biológicas e não biológicas.

O SQTF da Delegação do Centro (SQTF-C) – onde foi desenvolvido o trabalho de estágio apresentado – está localizado no Polo III da Universidade de Coimbra e encontra-se dividido em três setores: o setor administrativo; o setor de receção, registo e armazenamento de amostras; e o setor de análises químicas e toxicológicas. Constituído por cinco equipas de trabalho, o setor de análises químicas e toxicológicas desenvolve, valida e executa procedimentos de ensaio, contribuindo também para o desenvolvimento de projetos científicos com relevância para o Serviço. Os grupos de substâncias analisadas no SQTF-C, bem como as equipas responsáveis pela sua análise, encontram-se descritos na tabela do ANEXO I.

1.2.1 Atividade Pericial

O regime jurídico das perícias médico-legais ficou estabelecido pela Lei nº 45/2004, de 19 de agosto, tendo sido posteriormente alterado pelo Decreto-Lei nº 53/2021, de 16 de junho. No SQTF-C, as perícias toxicológicas *in vivo* são solicitadas pelas seguintes entidades:

- Autoridade Nacional de Segurança Rodoviária (ANSR) – PSP e GNR – para controlo de condução sob a influência de álcool e outras substâncias psicotrópicas;
- Serviços de Clínica e Patologia Forenses (SCPF) – INMLCF, I.P. – em exames no âmbito do direito penal, civil e do trabalho;
- Serviço de Psiquiatria Forense – INMLCF, I.P. – para avaliação do estado de influenciado por substâncias psicotrópicas;
- Hospitais;
- Particulares.

Já as perícias toxicológicas *postmortem*, realizadas a pedido dos GMLF ou do SCPF, são solicitadas para confirmação ou exclusão de intoxicação por substâncias, envolvidas de forma direta ou indireta na causa de morte, seja ela violenta (homicídio, suicídio, acidente), súbita, ou de causa ignorada (9).

Resta referir que, tal como o SQTF, também o SCPF e o Serviço de Genética e Biologia Forenses (SGBF) do INMLCF, I.P. são responsáveis pela realização de perícias específicas (10–12).

Capítulo 2 – Estágio Realizado no Serviço de Química e Toxicologia Forenses da Delegação do Centro do INMLCF, I.P.

2.1 Objetivo

Sendo a perícia médico-legal uma atividade de máxima responsabilidade, é condição *sine qua non* o contacto direto com os Serviços Médico-Legais durante a formação. Assim, com vista a promover formação pós-graduada qualificada na área, o Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra proporciona, para além da componente teórica imprescindível, a modalidade de estágio.

Antes de iniciar o estágio foi assinado um compromisso de confidencialidade para garantir completo sigilo sobre qualquer informação relacionada com o SQTF-C e/ ou sobre qualquer facto de natureza pericial a que pudesse vir a ter acesso.

O principal objetivo do estágio realizado foi a aquisição de conhecimentos e competências laboratoriais para a análise de drogas de abuso em matrizes biológicas, aplicando os procedimentos analíticos (acreditados e não acreditados) existentes no SQTF-C do INMLCF, I.P..

Esse objetivo foi alcançado, numa primeira fase, através do acompanhamento dos procedimentos internos do SQTF-C referentes à realização das perícias toxicológicas de drogas de abuso em amostras biológicas, seguindo-se uma familiarização com os procedimentos laboratoriais específicos e, ulteriormente, o acompanhamento diário das análises de rotina, desde a entrada das amostras no Serviço, até à sua análise cromatográfica e apresentação dos respetivos resultados qualitativos e quantitativos.

Foi-me, por isso, possível experienciar a rotina no SQTF-C – em particular da Equipa II – tendo participado ativamente no desenvolvimento das análises toxicológicas através de tarefas diárias que me foram sendo solicitadas e confiadas, sempre supervisionada pelo orientador responsável pelo estágio no SQTF-C.

2.2 Cadeia de Custódia

À documentação da história cronológica das amostras em todas as etapas, desde a sua colheita até à sua destruição, dá-se o nome de cadeia de custódia (13). Existe com o propósito de garantir a idoneidade e rastreabilidade das amostras utilizadas em processos judiciais, abrangendo duas componentes:

- Uma primeira, prévia à entrada no SQTF-C, relativa às etapas de colheita, acondicionamento, transporte e entrega das amostras;

- E uma segunda que, após entrada no SQTF-C, compreende a receção, armazenamento, manuseamento, análise e destruição das mesmas (com devida autorização das entidades competentes).

Visto terem um impacto importante em circunstâncias onde os indivíduos podem vir a ser legalmente responsabilizados, as amostras devem ser mantidas em áreas seguras, com acesso limitado aos indivíduos responsáveis pelo seu processamento. A quebra da cadeia de custódia, para além de comprometer a integridade da amostra, pode retirar credibilidade à instituição responsável pela mesma (13).

2.2.1 Cadeia de Custódia Intralaboratorial

Tendo em conta que, como referido, a cadeia de custódia deve ser mantida desde a colheita da amostra até à sua destruição, é da competência do SQTF-C mantê-la o mais intacta e inalterada possível durante o período em que fica à sua responsabilidade. Para tal, é feito um registo que permite, posteriormente, reconstruir todas as operações realizadas com as amostras. O manuseamento das amostras deve ser feito de forma a reduzir, o máximo possível, a probabilidade de contaminação, deterioração ou alterações de características das mesmas (13,14). Implica o registo do analista, bem como a data e hora tanto da retirada do congelador como da sua reposição, devendo assegurar-se igualmente o seu correto acondicionamento. Fica assim garantida, também, a atribuição de responsabilidades no caso de quebra da cadeia de custódia.

Para além das amostras, é similarmente atribuído um código interno a soluções, reagentes, padrões e equipamentos volumétricos e analíticos. Relativamente a reagentes e padrões, é sempre feito um registo de quando foi iniciada a sua utilização, por quem e para que finalidades, ficando também registados os cálculos justificativos das quantidades usadas de cada componente no caso das misturas de padrões e das soluções de reagentes. Os registos, efetuados em modelos validados internamente no SQTF, são verificados e atualizados regularmente pelo responsável da qualidade (RQ), e auditados anualmente em auditorias internas e externas.

2.2.2 Base de Dados

STARLIMS ou LIMS (*Laboratory Information Management System*) é o software usado pelo SQTF para gerir informações relativas a:

- Receção e registo de amostras, bem como os dados que a elas vêm associados;
- Atribuição dos procedimentos a realizar para cada amostra, de acordo com o solicitado pela entidade competente;

- Registo de resultados para a realização do relatório final e/ou encaminhamento para análises adicionais.

Fácil de usar e bastante intuitivo, o LIMS fornece uma rastreabilidade completa do estado de cada processo, desde o momento em que as amostras dão entrada no SQTF (15). Os dados ficam devidamente protegidos e acessíveis aos profissionais do SQTF, cada um com requisitos individuais de acordo com a função que desempenham.

2.3 Receção, Registo e Armazenamento de Amostras

Nesta etapa, que é a primeira da cadeia de custódia intralaboratorial, devem sempre estar presentes dois técnicos. Os kits recebidos são abertos e é verificado se o conteúdo corresponde ao descrito nas requisições e códigos que acompanham as amostras. Sempre que seja verificada qualquer irregularidade (e.g. bolsa não selada ou descrição de conteúdo incongruente), a ocorrência é registada.

Todas as amostras vêm devidamente identificadas e codificadas, sendo-lhes depois atribuído um código interno no SQTF-C. Amostras do mesmo caso possuem todas o mesmo código associado à natureza de cada uma. As amostras são etiquetadas, colocadas em suportes sequencialmente numerados e nas respetivas posições, e armazenadas em câmaras frigoríficas à temperatura de cerca de -8°C (as temperaturas são controladas remotamente através de sondas que emitem registos para um computador).

Toda a informação recebida pelo SQTF-C fica registada no LIMS, com atribuição de procedimentos de ensaio específicos a cada processo e a cada uma das amostras que lhe está associada. Posteriormente é feito o encaminhamento dos processos para análise, de acordo com os respetivos procedimentos e conforme a solicitação que se encontra na requisição de análises toxicológicas forenses. O facto de constar também informação adicional pertinente de cada caso pode vir a auxiliar o toxicologista forense na condução das perícias.

Este setor é ainda responsável pela lavagem e preparação do material de laboratório utilizado no SQTF-C.

2.4 Matrizes Biológicas

A escolha da matriz é um passo importante para o sucesso da análise toxicológica, variando consoante o estudo a realizar. É fundamental ter em conta a qualidade e a quantidade de amostra utilizada, que deve ser representativa da mesma, de forma a permitir chegar a

conclusões adequadas. Relativamente às amostras biológicas *postmortem*, a análise pode ser realizada em sangue (cardíaco e periférico), urina, humor vítreo, fígado, bÍlis, rim, estômago e conteúdo gástrico, líquido pericárdico, entre outras. Já as amostras *in vivo* analisadas no SQTf-C são maioritariamente sangue e urina, podendo também ser analisadas amostras de cabelo, saliva e conteúdo gástrico. Na análise de drogas de abuso, as matrizes mais comumente utilizadas são sangue e urina.

O sangue, como matriz de eleição para a realização das perÍcias toxicológicas, permite identificar e quantificar substâncias na sua forma inalterada, bem como os seus metabolitos. É um bom indicador das concentrações *antemortem*, permitindo a correlação direta com o estado clínico e a diferenciação entre um consumo crónico ou agudo das substâncias em causa. É uma matriz complexa, que exige um cuidado especial durante a colheita uma vez que, dependendo do local anatômico onde esta é efetuada, as concentrações das substâncias podem diferir acentuadamente (13,14,16). Na análise de amostras *postmortem*, o sangue cardíaco é usado principalmente em análises qualitativas. Esta matriz está habitualmente disponível em maior quantidade, mas está também mais sujeita a fenómenos putrefativos e de redistribuição *postmortem* (PMR) que podem dificultar a interpretação dos resultados nelas obtidos (17). Precisamente por ser menos influenciado por estes fenómenos, o sangue periférico é a matriz mais usada para a realização de análises quantitativas de drogas de abuso e da maioria das substâncias analisadas no SQTf-C.

A urina, matriz biológica menos complexa, apresenta geralmente concentrações das substâncias e dos seus metabolitos bastante superiores às encontradas no sangue, podendo a presença destas ser detetada desde algumas horas até várias semanas após o consumo (14). Embora não permita estabelecer uma correlação com os níveis plasmáticos nem seja, por esse motivo, útil para a realização de análises quantitativas, a urina permite fornecer informações qualitativas sobre a exposição a determinada substância. Achados negativos na urina podem ser consistentes com uma morte que ocorra imediatamente após o seu consumo, quando as concentrações sanguíneas da substância sejam elevadas (14). Isto acontece porque a presença das substâncias na urina vai depender do tempo decorrido entre o consumo e a eliminação das mesmas pelo organismo.

Para além das amostras biológicas recebidas no SQTf-C, são também, ocasionalmente, recebidas e analisadas amostras não biológicas. Estas amostras consistem em material relacionado com o caso sob investigação: conteúdo de saquetas, seringas, colheres, comprimidos, garrafas, líquidos, etc.. A análise destes materiais pode auxiliar na pesquisa de substâncias nas matrizes biológicas correspondentes ao caso em apreço.

2.5 Análises de Triagem

No SQTf-C, as análises de triagem de drogas de abuso e benzodiazepinas são efetuadas pelo sistema de análise EVOLIS™, e têm por base reações imunoenzimáticas – em particular *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).

Amplamente utilizados como métodos de rotina na análise de fluídos biológicos, os métodos imunoenzimáticos baseiam-se na interação competitiva entre antigénios (as moléculas-alvo) e anticorpos (os conjugados), podendo ser usados de maneira restrita ou mais abrangente. De um modo geral, apresentam limites de deteção muito baixos e os resultados são obtidos com rapidez (18).

O procedimento de triagem (Equipa I) inicia-se com a descongelação das amostras e a etiquetagem (com código de barras) dos tubos de ensaio. As amostras são preparadas através da diluição de 200 µL de amostra com 800 µL de diluente. É também preparado um conjunto de amostras de controlo de qualidade interno (CQI), composto por branco de reagentes, amostra branca, calibrador isento da substância a analisar, calibrador fortificado com a concentração de *cut-off* e controlos positivos (nível baixo e alto).

Do procedimento de triagem obtém-se um resultado qualitativo, expresso em medidas de absorvância. É obtida uma resposta linear inversa, como demonstrado na Figura 2, em que quanto maior for a quantidade de analito presente na amostra, menor será a absorvância obtida, e vice-versa. Deve sempre considerar-se a natureza subjetiva da leitura visual do ensaio – pronunciada através da presença ou ausência de cor – sendo mais difícil nos casos em que a concentração dos analitos se encontra próxima dos valores *cut-off* estabelecidos (2,19).

As técnicas de triagem por imunoensaios (IE) fornecem um resultado – positivo ou negativo – para o grupo da substância presente, e não para o analito em concreto. Perante um resultado positivo, a amostra é encaminhada para confirmação por procedimentos analíticos mais específicos. A importância de confirmar sempre os resultados obtidos por IE é bem ilustrada pelos derivados anfetamínicos, visto que podem apresentar reações cruzadas para fármacos de outros grupos, para componentes de matrizes putrefactas, ou mesmo para substâncias provenientes da alimentação (1).

Devido à sua simplicidade e operacionalidade, bem como à facilidade de preparação da amostra para os ensaios, esta técnica automatizável de triagem revela-se altamente vantajosa, permitindo economizar recursos e reduzir o tempo entre a colheita da amostra e a emissão de relatórios.

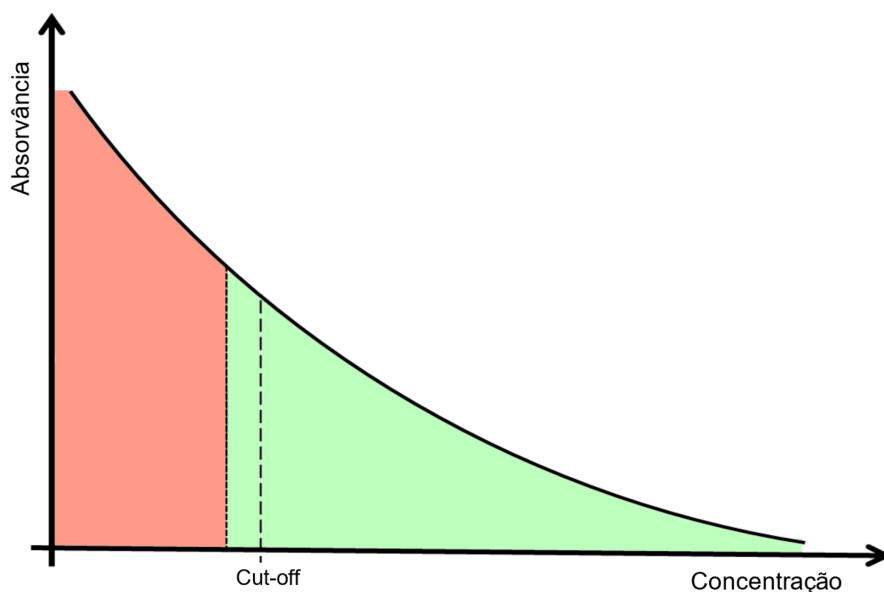


Figura 2: Gráfico ilustrativo da relação Absorvância – Concentração.

Um resultado diz-se positivo quando a absorvância obtida para a amostra de ensaio é inferior à média das absorvâncias obtidas para o calibrador cut-off ($A_{\text{CUT-OFF}}$). Por outro lado, um resultado diz-se negativo quando a absorvância obtida para a amostra de ensaio é superior à $A_{\text{CUT-OFF}}$, com exceção dos resultados cujo valor fique compreendido entre o valor de $A_{\text{CUT-OFF}}$ e $[A_{\text{CUT-OFF}} + (A_{\text{CUT-OFF}} \times 0,15)]$, que podem ser considerados como positivos – como ilustrado acima.

2.6 Drogas de Abuso

O uso de drogas de abuso remonta às civilizações mais antigas, utilizadas como fonte de prazer, de inspiração e de cura, e como meio de contacto com entidades divinas. Ao longo dos tempos, o uso destas substâncias foi-se adaptando em função da época, da cultura e dos padrões de consumo emergentes (20). Podem ser classificadas tendo em conta diversos parâmetros, sendo o mais comum o efeito que desempenham a nível do sistema nervoso central (SNC): podem atuar como depressores do SNC (e.g. opiáceos), como estimulantes do SNC (e.g. cocaína) ou ainda como alucinogénios (e.g. canabinóides) (21).

O abuso destas substâncias constitui um problema de saúde pública, havendo diversos estudos que relacionam o consumo ocasional durante a adolescência com o desenvolvimento de quadros de toxicoddependência em adulto – existindo também uma grande contribuição de fatores genéticos e ambientais (22).

Atualmente verifica-se uma tendência de os jovens consumirem mais drogas de abuso do que os adultos, com níveis de uso cada vez maiores em comparação a gerações anteriores (23). Estima-se que uma em cada dezoito pessoas a nível mundial usaram pelo menos uma droga de abuso em 2020 – um aumento de 26% face aos dados da década anterior – e embora os homens representem a maior parte dos consumidores de drogas de abuso, as mulheres tendem a evoluir para transtornos por uso de drogas mais rapidamente (23).

O número de mortes associadas ao consumo de drogas de abuso continua a aumentar, com uma das maiores preocupações atuais associada às doenças infecciosas transmitidas por injeção de drogas de abuso (23,24). Estima-se que cerca de 11 milhões de pessoas a nível mundial usam drogas injetáveis, das quais 5.5 milhões vivem com hepatite C e 1.4 milhões com VIH – preocupação especialmente relevante na Europa Oriental, onde 1.3% da população é portadora de uma doença infecciosa, representando a maior taxa de prevalência entre a população mundial (23).

No decorrer da pandemia COVID-19, notou-se uma tendência no aumento da procura e obtenção de drogas de abuso por vias digitais, com o mercado da *dark web* a expandir-se e as redes sociais a disponibilizarem meios de comércio de estupefacientes (23,24). Durante os períodos de confinamento obrigatório houve uma redução do uso de drogas de abuso por adolescentes, mas também da procura de ajuda – bem como da disponibilidade da mesma – para o tratamento da toxicod dependência (23). A criminalidade associada à droga aumentou 15% desde 2010 na União Europeia (24).

Num breve enquadramento legal, um primeiro esforço no combate à droga em Portugal foi levado a cabo pela criação do Decreto-Lei n.º 15/93, de 22 de janeiro, que aprovou o regime jurídico do tráfico e consumo de estupefacientes e substâncias psicotrópicas (25). Sofreu diversas atualizações, a mais recente expressa na Lei n.º 25/2021, de 11 de maio, que veio incluir as novas substâncias psicoativas (NSP) na definição de droga (26). O consumo de estupefacientes foi descriminalizado em 2001 (mas não despenalizado) após entrada em vigor da Lei n.º 30/2020, de 29 de novembro, que definiu o regime jurídico do consumo de estupefacientes e substâncias psicotrópicas e a proteção sanitária e social dos consumidores, distinguindo o consumo do tráfico. As medidas implementadas vieram retirar parte do estigma social em torno do consumo de drogas, permitindo considerar o consumidor como um indivíduo com necessidade de apoio especializado (27).

Resta referir que o despoletar da guerra na Ucrânia poderá vir a ter graves implicações no mercado das drogas – principalmente a nível europeu – pela criação de novas rotas de tráfico de estupefacientes, não esquecendo que esta situação poderá ainda causar pressão adicional nos serviços de tratamento da toxicod dependência (devido aos refugiados toxicod dependentes que procuram exilo) (24).

2.6.1 Opiáceos

Os opiáceos, analgésicos narcóticos naturais, são obtidos da papoila *Papaver somniferum* por incisão da bolsa de sementes após a queda das pétalas da flor. O látex exsudado, depois de exposto ao ar até secar, contém mais de 20 alcalóides entre os quais morfina (10 a 20%), codeína, tebaína, noscapina e papaverina (28–30). A morfina, principal alcalóide do ópio e uma das substâncias conhecidas mais eficazes no alívio da dor, foi isolada na sua forma pura em 1803. A partir dela foram desenvolvidos diversos derivados sintéticos e semissintéticos, sendo de destacar a heroína, descrita pela primeira vez em 1874 e retirada posteriormente do mercado devido ao seu potencial aditivo físico e psicológico (28,31). A heroína pode ser injetada - sendo esta a via de administração mais comum, com ação após aproximadamente 10 minutos (intravenosa) ou 30 a 45 minutos (intramuscular) - fumada ou inalada, e ainda consumida por via oral, usualmente misturada com outras drogas (29,30). A codeína é outro exemplo de um opiáceo amplamente utilizado, fundamentalmente como antitússico e no controlo da dor moderada. É produzida comercialmente a partir da morfina e, após o consumo, é biotransformada em morfina e norcodeína (29).

De uma forma geral os opiáceos são bem absorvidos pela mucosa nasal, pelos pulmões e pelo trato gastrointestinal. São maioritariamente metabolizados no fígado em compostos inativos por reações de desmetilação, desacetilação e conjugação com o ácido glucurónico (29). Como consequência destas reações, alguns opiáceos podem transformar-se em morfina no organismo, como é o caso da heroína (diacetilmorfina) – rapidamente desacetilada a 6-acetilmorfina, metabolito específico da heroína e marcador do seu consumo (29,30) – como representado na Figura 3. Num intervalo de 24 horas, cerca de 10 a 20% da dose administrada é excretada na urina, sendo de notar que apenas a morfina resultante da metabolização pode ser detetada na urina quando decorridos 3 dias da administração (13,31).

Com propriedades similares às de alguns peptídeos endógenos, os opiáceos exercem a sua ação farmacológica consoante a afinidade que apresentam para os diferentes recetores opióides distribuídos pelo SNC e por outras partes do organismo (13,29,30). Agem como:

- Agonistas – como é caso da morfina, da heroína e do fentanil – por ativação dos recetores μ , κ e δ ;
- Agonistas parciais – como é o caso da buprenorfina – ativando parcialmente o recetor μ e bloqueando o recetor κ ;
- Antagonistas – como é o caso da naloxona – que impede a ativação dos recetores.

Como resultado destas interações, os sintomas mais frequentes em caso de intoxicação aguda são a depressão do SNC, depressão respiratória, miose, diminuição do reflexo da tosse, vasodilatação e taquicardia, podendo ainda ocorrer edema pulmonar, obstipação e

hipotensão, por exemplo (13,29,30). A *overdose* pode ocorrer por mistura de opiáceos com outras drogas supressoras do SNC – causando colapso respiratório, coma e morte – mas, na maioria dos casos, ocorre devido ao consumo de uma dose de heroína de maior pureza (23,29).

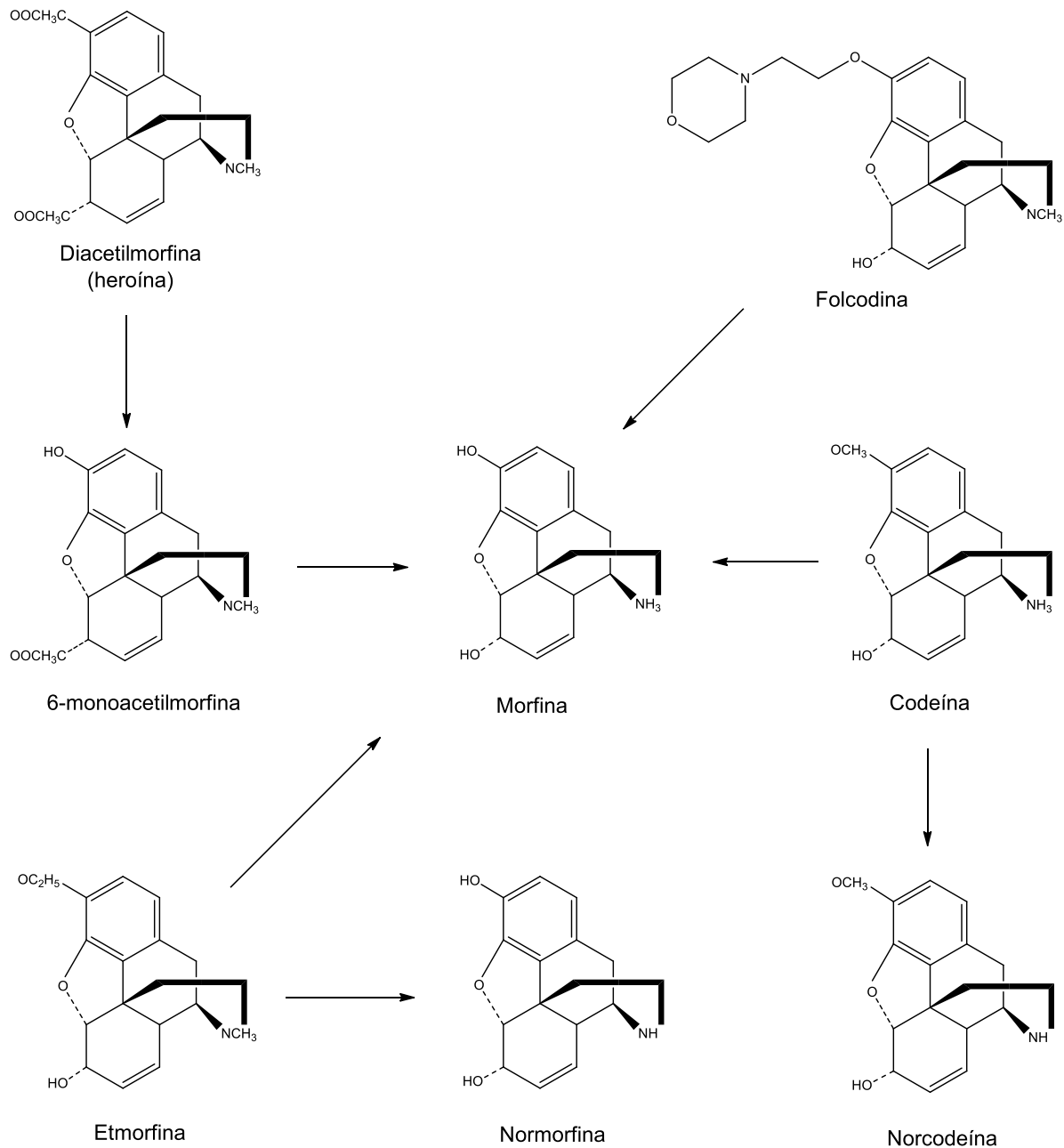


Figura 3: Metabolismo da morfina e seus precursores.

A metadona é um opiáceo sintético que, embora seja utilizado no tratamento médico de substituição para os dependentes de opiáceos, é responsável por inúmeros casos de intoxicação e *overdose* (32). Possui elevado poder analgésico e sedativo e, por ser uma substância lipofílica, é rapidamente absorvida no trato gastrointestinal e largamente distribuída pelo organismo, apresentando um metabolismo lento que lhe proporciona um tempo de semivida longo (13,32). Liga-se extensamente às proteínas dos tecidos (86%) produzindo efeitos cumulativos e gerando um risco de *overdose* e morte por depressão respiratória – que aumenta com o consumo simultâneo de álcool e outras drogas. Sinais típicos de *overdose* incluem unhas e lábios cianóticos, depressão respiratória, pulso fraco, desorientação e vômitos, entre outros (13,32).

O uso abusivo de opiáceos continua a ser a principal causa de morte por *overdose* a nível mundial (representam 2/3 das mortes diretamente relacionadas com o consumo de drogas), tendo-se alcançado níveis sem precedentes de mortes causadas pelo consumo de fentanil na América do Norte durante a situação pandémica (23). Durante esse período houve uma redução no uso e no tráfico de heroína a nível europeu, tendo-se notado um aumento significativo do consumo de substâncias de substituição (e.g. metadona e benzodiazepinas) nos países afetados pela escassez de produto. O mercado recuperou rapidamente em 2021, chegando mesmo a superar os níveis pré-pandémicos com novos recordes de apreensões a nível global (23,24). Atualmente, o Afeganistão continua a ser o maior produtor ilícito de ópio (86%).

Estima-se que, a nível global, 31 milhões de pessoas consumiram opiáceos – em particular, heroína – em 2020 (23). A pureza da heroína aumentou e o preço baixou ao longo dos últimos dez anos e, de uma forma geral, os opiáceos continuam a ser o principal grupo de substâncias responsável pela procura de tratamento da toxicod dependência na Europa (24). Tem ainda havido uma preocupação crescente relativamente aos opiáceos sintéticos que têm surgido na Europa, devido aos potenciais efeitos adversos na saúde dos consumidores (23,24).

Em Portugal, dados de 2016/17 mostram que a prevalência do consumo de heroína é de 0,1% (na faixa etária dos 15 aos 74 anos) (33). Os padrões de consumo, de uma forma geral, não sofreram alterações durante a crise pandémica.

No SQTF faz-se pesquisa de morfina, codeína e 6-acetilmorfina por GC-MS-EI (cromatografia de gases acoplada à espetrometria de massa com ionização por impacto eletrónico), sendo os procedimentos de confirmação e quantificação acreditados no sangue.

2.6.2 Cocaína e metabolitos

A cocaína, estimulante do SNC com ação intensa, é um alcalóide extraído das folhas da planta *Erythroxylon coca* com origem na América do Sul e nas regiões altas dos Andes. Depois de colhidas, as folhas da planta são secas e convertidas numa pasta (13,34–36). Trata-se de uma droga psicotrópica utilizada há mais de 2000 anos – as folhas da planta eram mascadas em cerimónias religiosas pelos incas do Peru – tendo sido isolada pela primeira vez nos meados do século XIX (13,35). A cocaína começou a ser vista como um problema social em 1914, limitando-se atualmente a sua utilização terapêutica à analgesia local (e.g. oftalmologia).

Quimicamente, a cocaína (metilbenzoilecgonina) é um éster do ácido benzoico e da metilecgonina, sintetizado a partir da ecgonina na presença de metanol e de ácido benzoico após hidrólise dos ésteres dos alcaloides extraídos da planta (34,35). Farmacologicamente, o mecanismo de ação mais relevante consiste na sua capacidade para bloquear a condutância a nível dos canais de sódio, possuindo a capacidade para bloquear a recaptção dos neurotransmissores norepinefrina, dopamina e serotonina (35).

Enquanto droga de abuso, a cocaína pode ser encontrada sob duas formas: em forma de *crack* – constituído por cocaína na forma livre e consumido na forma fumada – ou em forma de sal – constituído por apenas cerca de 30% da substância pura quando chega ao consumidor final. Pode ser consumida de forma (13,34–36):

- Oral: menor capacidade aditiva uma vez que não é bem absorvida, produzindo efeitos em 2 a 3 minutos após administração (sendo necessários entre 15 a 20 minutos para que a concentração sanguínea máxima seja atingida), com duração de menos de 1 hora.
- Inalada: trata-se da via de administração mais comum, visto que a vascularização da mucosa nasofaríngea favorece a sua absorção e produz efeitos rápidos (1 a 5 minutos), embora provoque danos graves nas mucosas. O pico plasmático é alcançado entre 20 a 30 minutos após o consumo e os efeitos podem ter duração de 1 a 2 horas.
- Fumada: produz efeitos em 10 segundos (pico plasmático alcançado entre 5 a 10 minutos) com duração de 30 a 60 minutos. Como passa diretamente para a corrente sanguínea, representa um elevado risco de dependência e *overdose*.
- Intravenosa: muitas vezes misturada com heroína – mistura vulgarmente designada por “*speedball*” - produz efeitos em cerca de 10 segundos que duram entre 30 a 60 minutos, com o pico plasmático alcançado em 5 a 10 minutos após administração. Representa também um elevado risco de dependência e *overdose*.

A absorção de cocaína pelo organismo vai depender da via de administração, apresentando maior biodisponibilidade após administração intravenosa. Na administração oral em particular, a sua absorção incompleta é explicada pelo efeito de primeira passagem no fígado e pela hidrólise que pode sofrer a nível do trato gastrointestinal (35). Visto ser uma substância muito lipossolúvel, atravessa rapidamente as barreiras placentária e hematoencefálica, distribui-se rapidamente por todo o organismo e, apesar da vasoconstrição que produz, a sua velocidade de absorção supera a de eliminação, levando à acumulação da substância no organismo (35).

A metabolização ocorre no fígado por hidrólise das ligações éster, originando os metabolitos inativos benzoilecgonina (BE) (35-54%), éster metílico da ecgonina (EME) (32-49%), e norcocaína (com atividade pouco relevante). Para além dos referidos, em casos de consumo concomitante de etanol obtém-se o metabolito cocaetileno - com atividade tóxica a nível hepático e cardíaco – podendo ser utilizado como marcador deste padrão de consumo (35). A cocaína possui um tempo de semivida que varia de 4 a 5 horas – consoante a via de administração – sendo eliminada juntamente com os seus metabolitos através da urina por fenómenos de excreção simples, com a BE como principal metabolito urinário. Cerca de 64-69% da dose ingerida é eliminada nos três dias após administração, em que 1-9% da cocaína é excretada na sua forma inalterada (28,35).

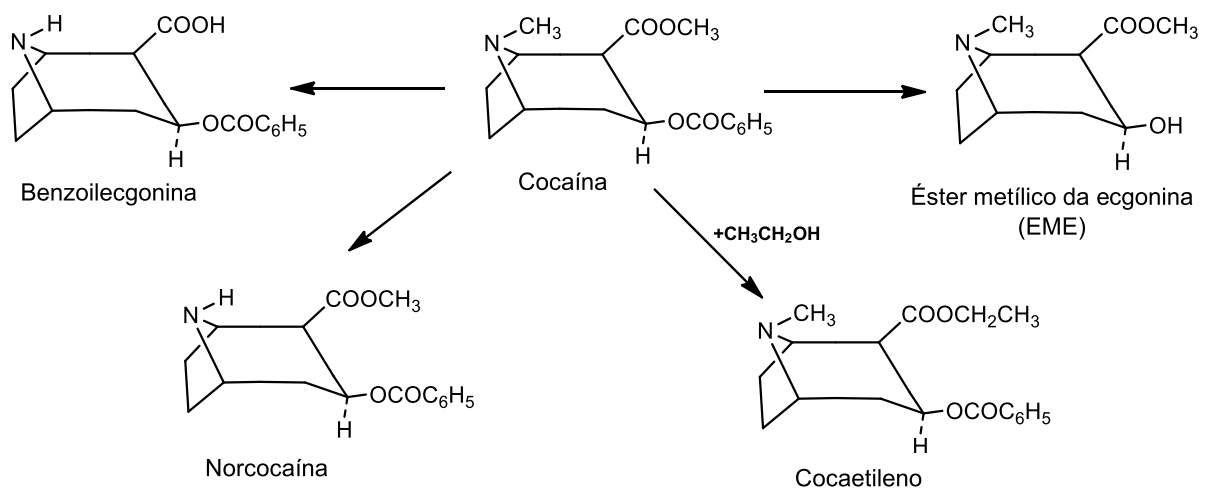


Figura 4: Metabolismo da cocaína, inclusive em associação com etanol.

Possui efeitos estimulantes do SNC imediatos - tais como euforia, supressão do apetite, sensação de poder, ansiedade, delírios e excitação física, mental e sexual - e ainda efeitos a nível cardíaco como o aumento da temperatura corporal, a elevação da pressão arterial e a aceleração dos batimentos cardíacos. O consumo de doses elevadas pode

ocasionar uma significativa hipertensão arterial e levar a convulsões e morte por falência respiratória e cardíaca (34–36).

Embora a América do Norte e a Europa Central e Ocidental continuem a ser os maiores produtores e consumidores de cocaína, tem-se notado uma tendência de expansão do mercado para a África e a Ásia (23). Em 2020 alcançou-se um recorde de apreensões de cocaína, 90% das quais estavam ligadas ao tráfico por via marítima. Estima-se que 21.5 milhões de pessoas usaram cocaína em 2020 (0.4% da população mundial) (23), com a cocaína a desempenhar um papel cada vez mais significativo em problemas de saúde relacionados com o consumo de drogas na Europa (24).

Com o surgimento da pandemia COVID-19 houve uma diminuição no tráfico e consumo de cocaína – embora o mercado tenha recuperado novamente em 2021 – sendo de notar que a pureza das doses tem vindo a aumentar ao longo da última década (24). Para além da problemática a nível da saúde pública, é importante salientar também que o cultivo ilícito de *Erythroxylon coca* afeta direta e indiretamente a desflorestação, gerando uma pegada de carbono significativa (23).

Em Portugal, dados de 2016/17 sugerem que a prevalência do consumo de cocaína é de 0,2% (na faixa etária dos 15 aos 74 anos), sendo esta a segunda substância ilícita mais consumida no país (33). Os consumidores não sentiram impactos nos padrões de consumo durante a crise pandémica.

No SQTF-C é feita a pesquisadas de cocaína, BE e EME por GC-MS-EI (procedimentos de confirmação e quantificação acreditados no sangue).

2.6.3 Canabinóides

Canábis ou maconha são nomes genéricos vulgarmente utilizados para designar as diversas preparações psicoativas produzidas a partir da planta de nome botânico *Cannabis sativa*. Trata-se de uma planta com origem na Ásia Central – muito resistente a pragas e que cresce com facilidade – que pode ser fumada ou ingerida, e cujo princípio ativo é o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC). É utilizada há séculos pela humanidade para diversos fins – como alimentação, têxtil, rituais religiosos e práticas medicinais – apresentando um elevado potencial terapêutico apesar das suas propriedades psicotrópicas, com relatos medicinais da planta pelos chineses desde há 2000 anos (37,38). Como a concentração de Δ^9 -THC na planta depende de fatores intrínsecos (zona anatómica) e extrínsecos (solo, clima, época da colheita e tempo decorrido entre a colheita e o uso), os efeitos produzidos variam bastante de uma planta para a outra. Relativamente à zona anatómica da planta (13,37,39):

- As folhas secas, flores e pequenos talos possuem menor conteúdo de substâncias psicoativas (1 a 5%), sendo usualmente adicionados a tabaco;
- O material seco encontrado no topo das plantas possui cerca de 5 a 8% de compostos psicoativos;
- A resina seca extraída das flores das plantas e transformada numa barra de cor castanha (vulgarmente designada por haxixe) é potencialmente mais tóxica e possui até 20% de compostos psicoativos;
- Por sua vez, nas sementes da planta não existe Δ^9 -THC.

Quando consumido por inalação, o Δ^9 -THC que vai diretamente para os pulmões é 10-50% absorvido (dependendo da técnica de fumo), chegando ao cérebro pela corrente sanguínea numa questão de minutos. O pico plasmático é alcançado em cerca de 3 a 10 minutos, com efeitos máximos em 15 a 30 minutos e duração de 2 a 6 horas, permanecendo no organismo por 1 a 7 dias. Por via oral, o Δ^9 -THC é absorvido lentamente pelo trato gastrointestinal (4-12%), alcançando-se o pico plasmático em 1 a 2 horas após o consumo, com efeitos sentidos em 30 a 90 minutos que podem durar de 4 a 12 horas (13,28,38,39). Devido à extensa biotransformação hepática e à degradação do Δ^9 -THC pelo meio ácido do estômago e dos micro-organismos presentes no trato gastrointestinal, a biodisponibilidade da substância é baixa (37).

É uma substância extremamente lipossolúvel que se liga às proteínas plasmáticas em cerca de 97-99% e atravessa facilmente as barreiras hematoencefálica e placentária, sendo também transmitida pelo leite materno(37,39). Após absorção, e numa fase inicial, o Δ^9 -THC é rapidamente distribuído para tecidos altamente vascularizados – causando uma diminuição da concentração a nível plasmático – seguindo-se uma redistribuição da substância e a acumulação da mesma em tecidos menos vascularizados, com tendência a acumular-se no tecido adiposo durante semanas devido à elevada afinidade (37).

Das extensas reações de metabolização (pelo sistema enzimático hepático do citocromo P450) é obtido por hidroxilação o 11-OH- Δ^9 -THC (metabolito ativo) e por oxidação o THC-COOH (metabolito inativo) que se conjuga com o ácido glucurónico e é excretado em quantidades significativas na urina, sendo este um bom biomarcador de exposição a *Cannabis* – mas que não indica, no entanto, se o consumidor se encontrava sobre o efeito de Δ^9 -THC (13,28,38,39). Mais de 65% de Δ^9 -THC é eliminado nas fezes e cerca de 20% excretado na urina, com aproximadamente 70% da dose administrada a ser excretada nas primeiras 72 horas após o consumo (13,28,37).

O Δ^9 -THC liga-se a recetores canabinóides específicos, predominantemente pré-sinápticos – CB1 (expresso no cérebro e responsável pela aprendizagem, memória e coordenação motora) e CB2 (expresso apenas nos tecidos periféricos, em particular no

sistema imunitário) – relacionados com a produção de dopamina (37,39). De entre os vários efeitos produzidos pela substância são de destacar: aumento dos batimentos cardíacos, olhos vermelhos, boca seca, alucinações, fome, alteração da memória recente, alegria extrema e coordenação motora diminuída. Apresenta toxicidade a nível do sistema imunitário, do sistema pulmonar e do sistema cardiovascular, e aumenta o risco de sintomas psicóticos e de desenvolvimento de doenças mentais (37).

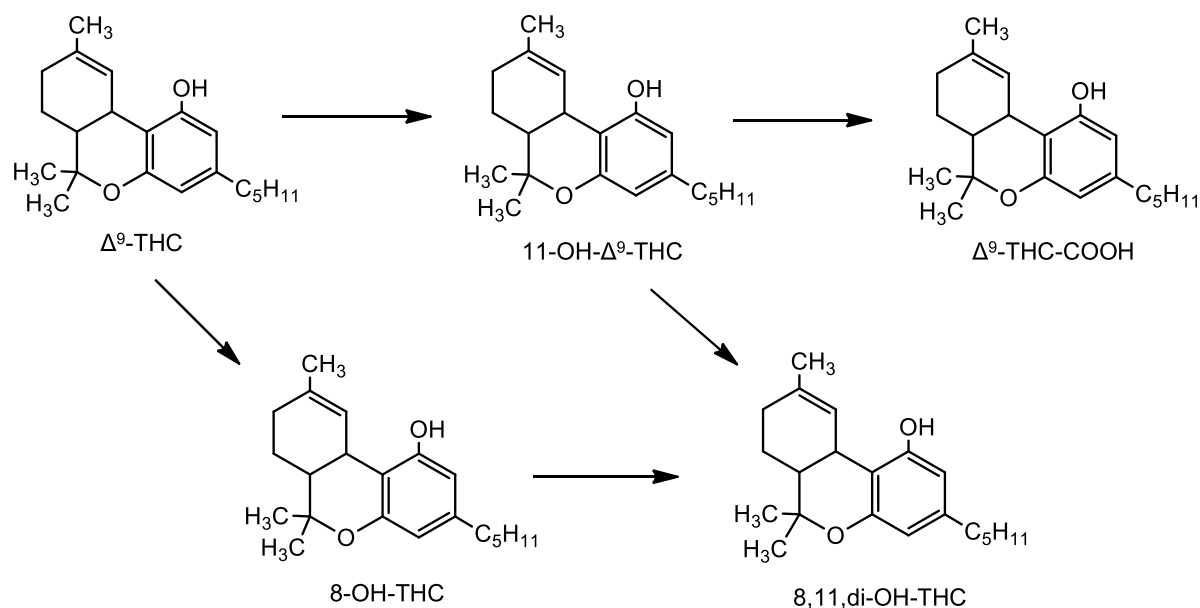


Figura 5: *Metabolismo do Δ^9 -THC.*

A canábis, para além de ser a droga de abuso mais consumida pela população jovem, continua a ser também a mais consumida a nível mundial, tendo-se notado um aumento de 23% no número de consumidores durante a última década (23). Estima-se que 209 milhões de pessoas consumiram canábis em 2020 (4% da população mundial), com o consumo mais elevado registado na América do Norte (16.6% da população consome canábis) (23).

Contrariamente a outras drogas de abuso, os períodos de confinamento devidos à pandemia COVID-19 levaram a um aumento no consumo de canábis por consumidores regulares – tanto em termos de quantidade como de frequência – embora se tenha notado uma diminuição no número de novos consumidores (23). Houve ainda um notório aumento de apreensões com origem em Espanha, o que poderá ser um indicador de que o país se está a tornar o fornecedor mais importante no mercado europeu (24).

O número de países que reportaram produtos adulterados com canabinóides sintéticos aumentou, levantando preocupações a nível dos riscos para a saúde dos

consumidores (24). A percentagem de Δ^9 -THC nos produtos apreendidos aumentou significativamente ao longo da última década e, atualmente, 1/3 das admissões em centros de tratamento da toxicod dependência na Europa Ocidental e Central são devidos a transtornos por uso de canábis (23,24).

Em Portugal, dados de 2016/17 mostram que a prevalência do consumo é de 4.5% (na faixa etária dos 15 aos 74 anos), não tendo sido sentidos impactos nos padrões de consumo durante a crise pandémica (33).

No SQTf-C são pesquisadas as seguintes substâncias por UPLC-MS/MS: Δ^9 -THC, 11-OH- Δ^9 -THC e Δ^9 -THC-COOH.

2.6.4 Anfetaminas e substâncias relacionadas

A anfetamina, sintetizada pela primeira vez em 1887 na Alemanha, é um composto sintético baseado na estrutura química da feniletilamina com efeitos estimulantes no SNC, amplamente utilizada durante a Segunda Guerra Mundial para manter a capacidade de combate dos soldados (13,28). Por ser uma substância que ocorre naturalmente, pode ser encontrada nos líquidos biológicos em quantidades vestigiais. É utilizada desde os anos 30 no tratamento da obesidade (visto que acelera a combustão dos lípidos e atua nos centros de controlo do apetite), da narcolepsia, da hipotensão e de crianças hiperativas com défice de atenção (28,40).

A metanfetamina, sintetizada pela primeira vez em 1919 no Japão, possui uma ação mais duradoura do que a da anfetamina e maior toxicidade a nível do SNC (13,41). Existem atualmente outras substâncias derivadas da anfetamina – nomeadamente MDA, MDMA, MDEA e MBDB (sendo esta última um análogo alfa-etilo do MDMA, com efeitos menos intensos) – que são de fácil obtenção e exibem efeitos psicofarmacológicos bastante apelativos para os consumidores em contexto recreativo, com abuso particular por atletas e estudantes (13,28,42).

De uma forma geral, apresentam efeitos semelhantes entre si - mais ou menos intensos conforme a substância e a dose ingerida – resumindo-se em: euforia, bem-estar, desejos de contato, redução de barreiras ao nível da comunicação, sentimentos de empatia, redução da fadiga e melhoria no desempenho de tarefas físicas e mentais; mas também em estados de ansiedade, agitação, pânico, alucinações e mesmo hipertermia, que por sua vez pode conduzir a situações mais graves e, eventualmente, à morte. É comum observar em consumidores a longo prazo de metanfetaminas a vulgarmente designada “*meth mouth*” (boca de metanfetaminas), provocada por infeções da mucosa oral devidas a xerostomia, que causa dificuldades na fala e na alimentação, halitose e aumento de cáries dentárias (13,28,41).

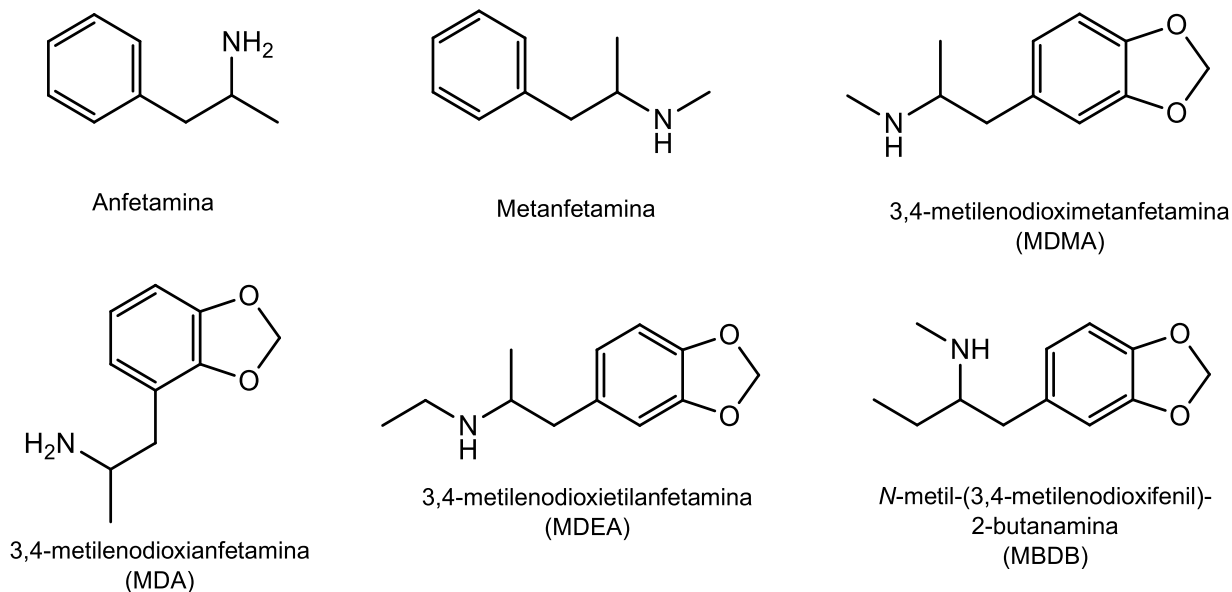


Figura 6: Estrutura da amfetamina e dos seus derivados metanfetamina, MDMA, MDA, MDEA e MBDB.

As amfetaminas e as metanfetaminas atuam inibindo as proteínas transportadoras de dopamina e noradrenalina existentes nos neurónios, impedindo a sua reabsorção e levando ao aumento da sua concentração nas sinapses (28,40,43). Embora estimulem as células cerebrais com efeitos ao nível da melhoria do humor e do desempenho físico, exibem efeitos neurotóxicos cerebrais, podendo o abuso continuado destas substâncias provocar uma redução nos níveis de dopamina e conduzir ao surgimento de sintomas semelhantes aos encontrados na doença de Parkinson (e.g. descoordenação motora severa). Podem ser consumidas por via (13,28,43):

- Oral: em forma de pastilhas ou comprimidos; apresentam absorção rápida e são amplamente distribuídas pelo organismo, atravessando facilmente as barreiras hematoencefálica e placentária; produzem efeitos em 15 a 30 minutos, que se prolongam até 10 horas após o consumo, com aumento da perigosidade com a associação ao álcool;
- Inalação/fumada: mais frequente no consumo de metanfetaminas; provoca danos nas mucosas do nariz e produz efeitos imediatos e de curta duração;
- Intravenosa: consumidas na sua forma pura ou misturadas com outras drogas; produzem efeitos imediatos intensos (efeito “flash”), sendo maior o risco de overdose, de contágio de doenças e de danos físicos.

Apresentam rápida absorção através do trato gastrointestinal - absorção completa em cerca de 4 a 6 horas após a ingestão - e uma rápida distribuição por todo o organismo. Por serem substâncias muito lipossolúveis atravessam facilmente as barreiras hematoencefálica e placentária. A anfetamina possui uma semivida de cerca de 8 horas e sofre metabolismo hepático com transformação em metabolitos ativos, sendo os principais a fenilacetona, o ácido benzoico e, em menor quantidade, a norefedrina (13,28,42).

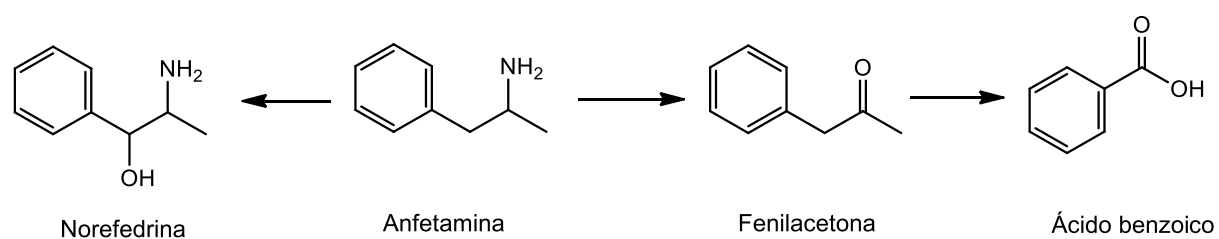


Figura 7: *Metabolismo da anfetamina.*

A excreção dá-se por via urinária (com início cerca de 3 horas após a administração, que pode prolongar-se até 4 a 7 dias), sendo 30% da dose de anfetamina administrada excretada na forma livre e durante as primeiras 24 horas (dependendo do pH da urina), 2% como norefedrina e 0.9% na forma de fenilacetona. Por sua vez, e a título de exemplo, a metanfetamina é transformado em anfetamina e a MDMA é transformada, principalmente, em MDA(13,28,42).

As anfetaminas são o segundo estimulante mais usado na Europa, depois da cocaína. A nível global, estima-se que 34 milhões de pessoas usaram anfetaminas em 2020 (representando 0.7% da população mundial), com o maior número de consumidores concentrados na Ásia (Este e Sudeste) (23). A diferença de representação de género nos centros de tratamento da toxicod dependência é particularmente acentuada neste grupo de substâncias: embora as mulheres representem quase metade dos consumidores de anfetaminas e derivados a nível global, fazem parte de apenas 1/5 dos consumidores em tratamento (23).

As tendências mais recentes apontam para um aumento do consumo e do tráfico de metanfetaminas – maiores quantidades e para mais regiões do globo – com um recorde de apreensões registado a nível global em 2020 (23,24). A pureza das anfetaminas e das metanfetaminas aumentou ao longo da última década (24), sendo de notar que a produção destes compostos gera desperdícios que representam uma ameaça ao ambiente, em particular para as comunidades locais (23).

Devido aos condicionalismos impostos pela pandemia COVID-19 – com implicações ao nível da vida noturna – registou-se uma diminuição na procura de estimulantes durante o ano de 2020 que se prolongou para 2021 (24). Estima-se, ainda assim, que cerca de 20 milhões de pessoas consumiram MDMA em 2020 (aproximadamente 0.4% da população mundial), sendo a Europa o maior mercado consumidor da substância (23).

Em Portugal, dados de 2016/17 sugerem que a prevalência do consumo de MDMA é de 0.1% (na faixa etária dos 15 aos 74 anos) – sendo a terceira substância ilícita mais consumida no país. Relativamente às anfetaminas e metanfetaminas, a prevalência do consumo em Portugal é inferior a 0.1% (33). Os consumidores relataram um grande impacto na utilização de anfetaminas e substâncias derivadas durante a crise pandémica.

No SQTF são pesquisadas as seguintes substâncias por GC-MS-EI: anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA e MBDB (procedimentos de confirmação e quantificação acreditados no sangue).

2.6.5 Novas substâncias psicoativas

As Novas Substâncias Psicoativas (NSP) são substâncias químicas de estrutura molecular semelhante às drogas de abuso clássicas, criadas para imitar os efeitos produzidos por estas, mas suficientemente diferentes ao ponto de não estarem abrangidas por leis próprias que as controlam (23,44). A designação “novas” não se refere somente ao carácter recente destas substâncias, mas também ao facto de estarem associadas a novos e sofisticados meios de produção, comercialização, aquisição e consumo (45). Podem ser divididas em quatro categorias, sendo elas: estimulantes sintéticos (dos quais fazem parte as catinonas sintéticas, que surgiram como opção legal das anfetaminas, das metanfetaminas e da cocaína), canabinóides sintéticos, alucinogénios sintéticos e depressores sintéticos (que compreendem os opióides sintéticos, utilizados como opção legal da heroína) (44).

Numa fase inicial, estas substâncias eram vendidas em *smartshops* e através da *internet* em embalagens atrativas com a indicação de que o produto nelas contido é impróprio para consumo humano e dirigido a pessoas com idade superior a 18 anos, mas sem apresentarem qualquer indicação da dose, de precauções ou mesmo de contra-indicações ao consumo. Uma vez que a maioria destas substâncias apresentam poucos ou nenhuns estudos clínicos, os efeitos causados são imprevisíveis e podem constituir uma ameaça para a saúde pública (44,46).

A Decisão n.º 2005/387/JAI, de 10 de maio de 2005 veio, para além de definir o conceito de NSP, estipular o intercâmbio de informações, a avaliação de riscos e o controlo destas substâncias (47). Foi criado o Mecanismo de Alerta Rápido (*Early-Warning System - EWS*) – que trabalha em estreita colaboração com o Observatório Europeu da Droga e da

Toxicodependência (EMCDDA) e com a EUROPOL – no qual Portugal está representado através do Serviço de Intervenção nos Comportamentos Aditivos e nas Dependências (SICAD) (45). Desta forma ficaram asseguradas a recolha e a análise rápidas de informação relevante e fiável sobre as NSP, permitindo tomar iniciativas no sentido de controlar estas substâncias. A União Europeia monitoriza atualmente cerca de 880 NSP (24), sendo a maioria destas canabinóides sintéticos (n = 224), seguidos das catinonas sintéticas (n = 162). O regime jurídico da prevenção e proteção contra a publicidade e o comércio de NSP em Portugal ficou definido através do Decreto-Lei n.º 54/2013, de 17 de abril, com aprovação de uma lista de NSP cuja produção, importação, exportação, publicidade, distribuição, venda, detenção ou disponibilização passou a ser proibida (48).

Embora o consumo de NSP seja inferior ao das restantes drogas de abuso abrangidas por legislação internacional, tem-se notado uma tendência de expansão geográfica do mercado destas substâncias (23). Para além disso, a velocidade a que novas NSP surgem e são introduzidas no mercado supera a capacidade de resposta rápida na tomada de medidas de controlo, podendo de certo modo afirmar-se que o mercado destas substâncias tem tendência a andar sempre um passo à frente da Lei. Cerca de 7 toneladas de NSP foram apreendidas a nível global em 2020, sendo o consumo mais prevalente na Europa Ocidental e na Ásia Central. A China é um dos principais países de origem destas substâncias (24). Em Portugal, o consumo de NSP está associado principalmente a canabinóides sintéticos e a catinonas sintéticas, com uma prevalência de 0.2% na faixa etária dos 15 aos 74 anos (dados relativos a 2016/17) (33).

Uma vez que as NSP têm vindo a ser usadas como adulterares de outras drogas de abuso, uma parte dos consumidores de NSP não têm consciência de as estar a consumir – fator que, por si só, pode desencadear problemas sérios para a saúde pública (23,24). Um dos mais recentes motivos de preocupação em torno destas substâncias está ligado ao surgimento de opióides sintéticos análogos do fentanil – considerado atualmente o grupo mais prejudicial (e de crescimento mais rápido) de NSP, com implicações graves a nível da saúde dos consumidores que podem desencadear consequências fatais (23).

Houve um notório aumento recente de doses apreendidas de α -PHP em Portugal – catinona sintética adicionada à lista de NSP com a Lei nº 25/2021, de 11 de maio (49) – tendo sido noticiados surtos psicóticos associados ao seu consumo (50). Há registo de apreensões de quantidades menores da substância em anos anteriores, mas uma vez que ainda não existia uma lei específica que a regulamentasse, os traficantes desta substância não eram punidos criminalmente e, por esse motivo, o tráfico continuou (51–53).

Ao longo do estágio realizado notou-se um aumento de casos detetados de α -PHP durante as análises de rotina de drogas de abuso. Surgida a oportunidade, para além do trabalho de estágio foi também desenvolvido um artigo científico com a validação de um

método de quantificação da substância no sangue, submetido a publicação na revista *Journal of Analytical Toxicology*, disponível em anexo (ANEXO III).

2.7 Procedimento de rotina para a determinação de drogas de abuso em matrizes biológicas

As análises de rotina de determinação de drogas de abuso iniciam-se pelo levantamento das amostras a analisar, após criação da respectiva folha de série no LIMS. Nessa folha ficam registados os equipamentos, as soluções e os reagentes utilizados, bem como as respetivas quantidades utilizadas para a análise, permitindo a rastreabilidade.

Após descongelação e homogeneização, são medidos 500 µL de amostra para análise – valor que poderá ser inferior caso seja necessário fazer uma diluição da amostra, por esta possuir valores de concentração de analito superiores ao último calibrador da curva de calibração. Segue-se então o processo analítico, dividido de uma forma geral em cinco etapas:

- Diluição da alíquota da amostra (500 µL) com uma solução tampão (4 mL): é utilizado Tampão Fosfato-Salino (PBS) para opiáceos, e dihidrogenofosfato de potássio para cocaína e metabolitos, anfetaminas e derivados, e NSP;
- Preparação do controlo de qualidade interno (CQI) em simultâneo com a preparação das amostras de rotina, com adição de padrão interno (PI);
- Homogeneização e centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos, seguida da extração em fase sólida (SPE) dos analitos em estudo;
- Secagem do eluído sob corrente de azoto (a 40 °C) e reconstituição com os respetivos reagentes derivatizantes para posterior derivatização química do extrato obtido, ou com metanol caso não seja necessária a derivatização;
- Análise instrumental por GC-MS-EI.

Os procedimentos analíticos utilizados no SQTF-C nas análises de rotina de determinação de drogas de abuso em sangue por GC-MS-EI foram devidamente validados segundo a norma adotada pelo grupo de diretrizes analíticas *American National Standards Institute / American Academy of Forensic Sciences (AAFS) Standards Board – ANSI/ASB Standard 036* – na qual estão descritos os parâmetros de boas práticas para a validação de métodos analíticos em toxicologia forense (54) e estão acreditados de acordo com a norma internacional NP EN ISO/IEC 17025:2018.

2.7.1 Preparação do Controlo de Qualidade Interno

Para a confirmação de drogas de abuso, o CQI deve incluir controlos negativos (branco de reagentes e amostra branca) e controlos positivos. Na amostra branca e no branco de reagentes – usados para avaliar o efeito da matriz em cada sequência analítica – não deve ser detetada a presença das substâncias pesquisadas, nem de outros sinais interferentes significativos. A análise de amostras controlo positivas, por outro lado, vai permitir estabelecer os intervalos de abundâncias iónicas utilizados na confirmação qualitativa das substâncias pesquisadas.

Na quantificação de drogas de abuso, as amostras controlo – e também as amostras de rotina – são preparadas e analisadas em duplicado. São ainda preparados calibradores de forma a obter uma curva de calibração que permita determinar a concentração das substâncias em análise, previamente confirmadas.

Para o CQI são fortificadas alíquotas de sangue branco, ou uma porção equivalente de água desionizada no caso do branco de reagentes. O conjunto de amostras de CQI deve sempre ser preparado e analisado contemporaneamente e nas mesmas condições das amostras de rotina, por forma a garantir a qualidade dos resultados analíticos obtidos. As misturas de padrões utilizados na preparação dos controlos e os dos calibradores usados na construção da curva de calibração devem provir de fontes independentes.

	Confirmação	Quantificação	
	Controlos (ng/mL)	Controlos (ng/mL)	Calibradores (ng/mL)
Opiáceos	10, 20, 50, 200, 900	25, 200, 900	25, 50, 100, 300, 500, 750, 1000
Cocaína e metabolitos	10, 25, 200, 900	25, 200, 900	25, 50, 100, 300, 500, 750, 1000
Anfetaminas e derivados	10, 20, 50, 200, 900	50, 200, 900	25, 100, 300, 500, 750, 1000

Tabela 1: Controlos positivos e calibradores usados no CQI, dos respetivos grupos de substâncias analisadas no SQTF-C.

No caso da análise de urinas, são preparados controlos a 100, 500 e 1000 ng/mL, independentemente do grupo em análise.

No SQTF, a todas as amostras (CQI e rotina) é adicionado um PI (25 µL), constituído por análogos deuterados das substâncias pesquisadas, em que um ou mais átomos de hidrogénio são substituídos por deutério – o isótopo estável mais pesado do hidrogénio. Trata-se de um composto que é adicionado a todas as amostras em igual concentração, e que fica

sujeito às mesmas etapas do processo de análise que as substâncias pesquisadas. Idealmente, o PI deve ser estável e ter estrutura química semelhante ao analito de interesse; não deve interferir com componentes da matriz nem estar presente na amostra, de forma a não interferir com os resultados; e não deve ser uma substância comercializada. Assim, sempre que possível deve usar-se para PI uma substância deuterada análoga à substância em estudo (56). A sua utilização melhora a precisão analítica, normalizando o efeito de eventuais variações no volume de amostra injetado aquando da análise instrumental, ou mesmo na recuperação do analito (2).

2.7.2 Preparação da amostra

A preparação da amostra representa a primeira etapa – e uma das mais importantes – da análise toxicológica propriamente dita. Consiste na purificação da amostra pela remoção de interferentes naturalmente presentes (e.g. lípidos, proteínas ou sais minerais), permitindo a extração dos analitos de interesse, tipicamente presentes em baixas concentrações. Este processo influencia diretamente a capacidade de deteção do método analítico posteriormente empregue, principalmente quando se trata da análise de matrizes biológicas complexas (19,57). Tem, portanto, particular importância no sentido em que permite:

- Isolar os componentes de interesse da matriz, impedindo que os compostos interferentes afetem a análise;
- Concentrar o analito a um nível adequado para a deteção;
- Converter o analito numa forma mais adequada à sua deteção, quando necessário;
- Aumentar o tempo de vida das colunas cromatográficas ao prevenir a sua degradação.

Existem diversas técnicas de preparação de amostras, que devem ser escolhidas e aplicadas conforme a natureza da amostra e as propriedades físico-químicas do analito em estudo, de forma a melhorar a sensibilidade e a seletividade analíticas. Para tal, é também necessário ter-se em conta uma diversidade de fatores como o custo, a rapidez, a exatidão e a precisão (21).

2.7.2.1 Extração em fase sólida

A SPE é uma técnica relativamente simples e versátil, de elevado interesse em análises toxicológicas. Devido à sua eficiência na extração de drogas de abuso, foi a técnica extrativa maioritariamente utilizada durante o estágio realizado. Tem por base a extração sólido-líquido, realizada em colunas de extração descartáveis (Oasis® MCX 3cc, 60 mg) que

contêm a fase sólida (estacionária) entre duas membranas de retenção. Os analitos são separados de acordo com a sua afinidade pela fase estacionária, com base nas suas propriedades físicas e químicas. A SPE processa-se em quatro fases, nomeadamente (13):

- Acondicionamento: permite a ativação da fase sólida presente nas colunas, ficando assim preparadas para os mecanismos de adsorção;
- Aplicação da amostra: após centrifugação, é adicionado às colunas o sobrenadante da amostra, permitindo a interação dos analitos com a coluna e a retenção dos mesmos;
- Lavagem: remove eventuais interferentes da matriz retidos na coluna, sem interferir com os analitos de interesse;
- Secagem das colunas sob vácuo;
- Eluição: ocorre a quebra das ligações entre os analitos de interesse e o adsorvente, permitindo a colheita dos mesmos para análise posterior.

É de notar que as fases da SPE são iguais para todos os procedimentos analíticos de determinação de drogas de abuso, diferindo somente na etapa da lavagem: no caso da análise de cocaína e metabolitos, de anfetaminas e substâncias relacionadas, e de NSP, os solventes e soluções tampão usados são comuns, estando o procedimento descrito no Capítulo 3 – com a diferença de serem utilizados 2 mL de n-Hexano ao invés de 1 mL; no caso dos opiáceos, a lavagem é realizada com 2 mL de tampão carbonato a 0.15 M, seguidos de 2 mL de água desionizada e de 2 mL de n-Hexano.

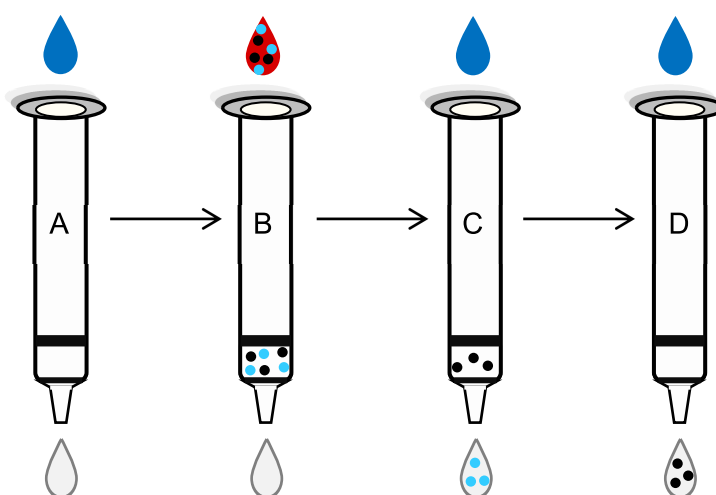


Figura 8: Esquema SPE. Após acondicionamento da coluna (A) aplica-se a amostra (B), seguindo-se o processo de lavagem (C) que remove interferentes presentes na matriz (•) e, por fim, a eluição (D) que vai permitir a quebra de ligações entre os analitos de interesse (•) e o polímero.

Comparativamente a outros métodos extrativos, a SPE tem como vantagens a relativa facilidade de execução, a retenção seletiva dos analitos de interesse, a utilização de pequenos volumes de amostra e solventes orgânicos, a simultânea purificação e pré-concentração das amostras, a não-formação de emulsões e a possibilidade de automação (21).

Relativamente às desvantagens, é de destacar o possível bloqueio dos poros da fase extratora por componentes da matriz, e a eventual adsorção irreversível dos analitos à coluna extratora, impossibilitando a recuperação dos mesmos. Por outro lado, uma vez que a presença de impurezas nos solventes orgânicos ou nas soluções tampão pode interferir no processo de extração, é importante recorrer a materiais de elevada pureza (19).

2.7.2.2 Extração em fase líquida

A extração em fase líquida (LLE) tem por base a separação direta do analito da matriz que o contém, por meio de um solvente imiscível em água. Os analitos passam à sua forma não ionizada, favorecendo a partição entre a fase aquosa e a fase orgânica. A escolha do solvente, como fator determinante da LLE, depende do analito a ser extraído e da análise instrumental a ser efetuada (13). Antes de se proceder à LLE, deve ter-se em conta uma série de fatores como a solubilidade, a polaridade, a volatilidade e o grau de pureza. A eficiência da LLE depende essencialmente da afinidade do analito para o solvente de extração, podendo ser inferida pela recuperação do composto de interesse (21).

A LLE foi usada ao longo deste estágio para a extração de drogas de abuso em urina, por meio de Toxi-Tubes A e B ®, sendo este um procedimento analítico não acreditado no SQTFC. Trata-se de um método que permite a extração eficiente de um amplo espectro de drogas de abuso e dos respetivos metabolitos, recorrendo-se para tal a Toxi-Tubes A ® (destinados à extração de drogas básicas e neutras) para a extração de opiáceos e anfetaminas, ou a Toxi-Tubes B ® (destinados à extração de drogas ácidas ou neutras) para a extração de canabinóides (58). Os Toxi-Tubes ® chegam ao laboratório tampados e pré-embalados com reagentes extrativos, facilitando a preparação das amostras.

Excluindo a particularidade de a amostra necessitar de ser hidrolisada (com 50 µL de hidróxido de potássio, a 80°C por 15 minutos) antes de ser adicionada aos Toxi-Tubes B ®, o procedimento extrativo é igual para ambos os Toxi-Tubes ®:

- Uma quantidade de amostra (500 ou 1000 µL) é adicionada aos Toxi-Tubes ®, procedendo-se à agitação suave dos mesmos por 5 minutos;
- Seguidamente, são centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos e, finda esta etapa, o sobrenadante é transferido para um tubo de vidro e levado à secura sob corrente de azoto, a 40°C;

- Após reconstituição com metanol ou com um reagente de derivatização (quando necessária a derivatização dos compostos), as amostras ficam prontas para análise.

Revela-se uma técnica extrativa rápida, eficiente e de simples execução (59).

2.7.2.3 Derivatização química

A derivatização química, que consiste na substituição de hidrogénios livres ativos (e.g. OH, COOH, SH, NH₂, NH), é realizada com o intuito de melhorar o desempenho cromatográfico de determinados compostos que, de outra forma, não poderiam ser prontamente monitorizados. Os grupos funcionais referidos têm, por natureza, tendência a formar ligações de hidrogénio intermoleculares que acabam por afetar a volatilidade dos compostos e a sua estabilidade térmica (2,60).

O processo de derivatização é especialmente empregue em cromatografia de gases (GC) para melhorar as características de volatilidade, adsorção e estabilidade dos analitos em estudo (19). Melhora a resposta do detetor e, por conseguinte, a resolução e a simetria dos picos cromatográficos obtidos, tornando mais fácil a identificação dos compostos. A reação deve ser rápida, completa e reprodutível, sem causar rearranjos ou alterações estruturais no composto durante a formação do derivado – o qual não deve interagir com a coluna do equipamento de GC (60).

A escolha do reagente derivatizante vai depender da estrutura química e das propriedades do composto que se pretende derivatizar. Na preparação de amostras para a determinação de drogas de abuso no SQTF-C, as reações de derivatização utilizadas são a silição e a acilação, embora exista também a alquilação, cujo processo geral é a esterificação (19,60).

A silição, mecanismo utilizado na derivatização de opiáceos, cocaína e metabolitos, traduz-se na introdução de um grupo silil numa molécula, em substituição aos hidrogénios ativos. Este processo reduz a polaridade dos compostos, tornando os derivados mais voláteis e mais estáveis – produzindo picos estreitos e simétricos (60). Uma vez que os reagentes são, geralmente, sensíveis à humidade, deve tomar-se especial cuidado para garantir que tanto a amostra quanto os solventes estejam secos antes da adição do reagente derivatizante. No SQTF-C, é utilizado para esta reação o N-metil-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) juntamente com 5% trimetilclorosilano (TMCS) – que serve de catalisador, aumentando o poder de silição – numa quantidade de 60 µL.

A acilação é caracterizada pela introdução de um grupo acilo (R-CO-) num composto orgânico (2), sendo utilizada para a derivatização de anfetaminas e substâncias relacionadas.

Compostos que contenham hidrogénios ativos – nomeadamente -OH, -SH e -NH – são convertidos em ésteres, tioésteres e amidas, respetivamente. Esta reação produz derivados voláteis e aumenta a estabilidade de compostos termicamente lábeis ao inserir um grupo protetor na molécula. Os derivados tendem a produzir padrões de fragmentação de clara interpretação, fornecendo informações úteis sobre a estrutura dos compostos em estudo (60). Tal como os reagentes de silição, também os reagentes de acilação são sensíveis à humidade, devendo ser tomadas iguais precauções (60). Como reagente de derivatização, é utilizado no SQTF-C o N-Metil-bis(trifluoroacetamida) (MBTFA), numa quantidade de 60 µL, sendo de referir que, previamente à evaporação do eluído obtido da SPE, são também adicionados 30 µL do reagente derivatizante para prevenir a volatilização dos compostos em estudo.

Os procedimentos de derivatização que recorrem a blocos de aquecimento são geralmente demorados, e tendo isso em conta, é utilizada no SQTF-C a técnica de derivatização por ação de microondas (61). Trata-se de uma técnica eficaz, de maior rendimento de reação, maior seletividade e menor decomposição térmica. Reduz significativamente o tempo necessário para a derivatização dos compostos – de uma hora a menos de dois minutos – permitindo acelerar a análise laboratorial (62).

Após derivatização as amostras são transferidas para *vial*, seguindo-se a análise instrumental por GC-MS-EI.

2.7.3 Análise Instrumental

Utilizada no SQTF para a determinação de drogas de abuso, a cromatografia de gases (GC) acoplada à espetrometria de massa (GC-MS) com ionização por impacto eletrónico (GC-MS-EI) é uma técnica analítica hifenada que permite realizar análises qualitativas e quantitativas pela associação da capacidade de separação da GC à capacidade de deteção seletiva da espetrometria de massa. Possui diversas aplicações, desde a análise de resíduos de fogos e explosões, à análise de produtos farmacêuticos e substâncias controladas, como é o caso das drogas de abuso (63–65).

Como referido, a GC é uma técnica de separação que isola componentes voláteis de uma mistura, conforme a diferente distribuição dos analitos entre uma fase móvel e uma fase estacionária (65). A fase móvel é, neste caso, um gás quimicamente inerte (hélio) que flui pelo sistema e transporta a amostra através de uma coluna – em que o líquido viscoso que reveste a sua parede interna é a fase estacionária – e cuja temperatura é regulada pelo forno do equipamento (64,66). Os analitos são separados com base na sua adsorção à fase estacionária – se um componente de uma amostra tiver uma afinidade mais forte pela fase estacionária, irá permanecer na coluna por mais tempo. Assim, o cromatograma produzido

sugere o tempo que cada componente fica retido na coluna (tempo de retenção – tR), sendo que a área do pico obtido representa a quantidade de composto que está presente na amostra (64).

Durante a análise, a amostra em *vial* é colocada no amostrador automático que, quando a análise começa, posiciona o *vial* no injetor automático. Um pequeno volume de amostra (1-2 μL) é carregado numa microseringa capilar graduada e injetado no GC. Os sistemas de injeção podem atuar em modo *split* ou *splitless* – com ou sem partição de fluxo, respetivamente – permitindo controlar a quantidade de amostra que é introduzida na coluna. No modo *split*, apenas uma quantidade de amostra é analisada, dependendo do rácio estabelecido pelo analista, e a restante é eliminada através de uma válvula, evitando a saturação da coluna. Já no modo *splitless*, a totalidade da amostra é analisada (19,66).

Após vaporização da amostra e separação dos compostos nela presentes, os mesmos são levados a um detetor – espectrómetro de massa. Pela técnica analítica espectrometria de massa, cada molécula de analito é bombardeada com eletrões de alta energia, o que faz com que a molécula do analito se fragmente e perca um eletrão, dando-lhe uma carga geral positiva. Os analitos carregados positivamente e os respetivos fragmentos são então separados pela razão massa/carga (m/z) no analisador de massa e detetados no fotomultiplicador de eletrões, produzindo um espectro de massa (19,66). Em GC-MS, o espectro de massa é conhecido como cromatograma de iões totais (TIC), podendo os componentes de uma amostra ser identificados – por comparação – através da biblioteca de espectros do GC-MS, num computador com *software* apropriado.

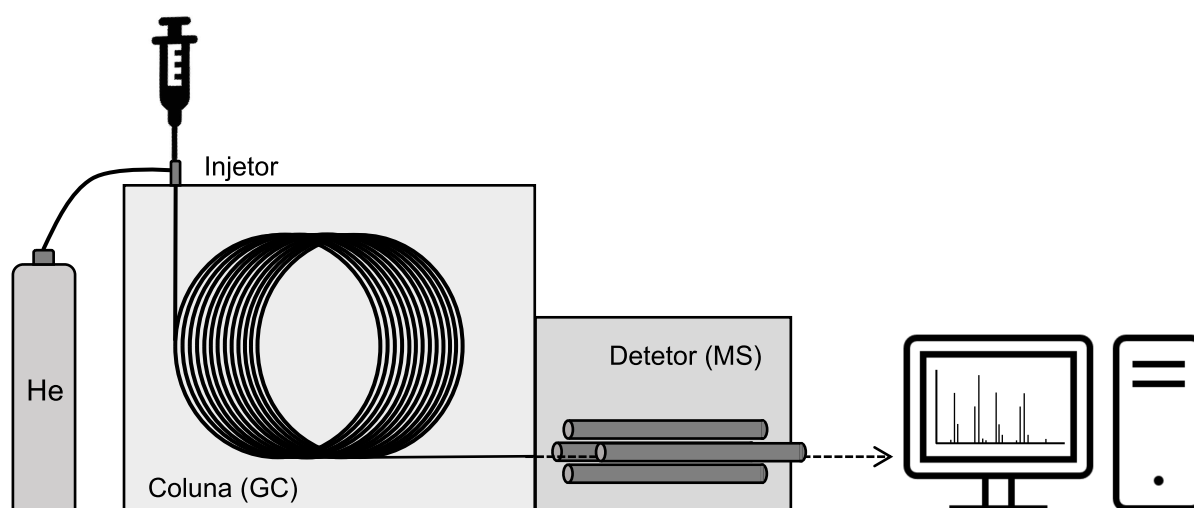


Figura 9: Esquema GC-MS.

Tendo em conta as baixas concentrações de analito usualmente presentes nas amostras biológicas, é utilizado no SQTF-C o detetor de espectrometria de massa de quadrupolo simples, em modo SIM – ou seja, com monitorização seletiva de iões. Quando há suspeita da presença de substâncias desconhecidas na amostra, não incluídas no método existente, é feita uma análise em varrimento contínuo, conhecida por modo *full scan* – sem prévia derivatização da amostra, sendo a mesma reconstituída com metanol após evaporação. Este modo de análise permite obter um espectro de massa completo – com todos os iões do composto analisado (63).

Esta técnica relativamente fácil e de baixo custo tem como vantagens (19,64):

- Alta resolução, velocidade, sensibilidade, especificidade e precisão;
- Podem ser analisados gases, líquidos ou mesmo alguns sólidos, desde que sejam previamente preparados para a análise;
- Embora sejam maioritariamente analisadas amostras orgânicas, é possível analisar também amostras inorgânicas.

Por outro lado, existem limitações ao uso da GC-MS, tais como (19,64):

- As amostras devem suportar altas temperaturas e volatilizar rapidamente, sem que haja degradação ou interação com outros compostos;
- A maioria das amostras requerem uma fase prévia de limpeza, pois para além de poderem contaminar o sistema, há também a possibilidade de entupirem a coluna e comprometerem os resultados.

A análise instrumental é programada pelo operador de acordo com o grupo de substâncias a analisar – desde o tempo de cada corrida, às variações de temperatura do equipamento – existindo para cada grupo um método específico de análise, validado internamente no SQTF-C. A sequência analítica deve respeitar uma ordem específica, e incluir vários ciclos de limpeza (com metanol) de modo a assegurar que não houve transferência de analito entre injeções de alíquotas distintas. É feita manutenção regular ao equipamento, de forma a garantir as melhores condições de análise. Terminada a sequência analítica segue-se a avaliação dos resultados obtidos.

2.7.4 Avaliação, cálculo e expressão de resultados

A confirmação qualitativa de drogas de abuso orienta as análises quantitativas subsequentes – visto que fornece uma estimativa da concentração presente nas amostras de rotina quando comparadas com o CQI fortificado nos diferentes níveis de concentração. Com

base nos critérios da Agência Mundial Antidopagem (WADA), são selecionados e monitorizados três íons nas amostras de rotina e nas amostras controle, fazendo-se uma comparação das abundâncias relativas dos mesmos, respeitando os intervalos descritos na Tabela 2. Deve, por isso, ser comprovada a presença dos sinais iônicos selecionados para cada substância nos controles positivos e nas amostras de rotina, com um valor sinal/ruído superior a três (67). Os tempos de retenção do sinal cromatográfico da substância a identificar e da substância de referência (presente nas amostras controle) devem ser idênticos (tR amostra / tR referência = $\pm 1\%$), não devendo a concentração estimada ser inferior ao limite de detecção (LOD) do método. O LOD para as substâncias analisadas é de 10 ng/mL (com exceção da anfetamina, cujo LOD é 20 ng/mL) e o resultado é expresso em “positivo” ou “negativo”.

Abundância relativa na amostra controle (% do pico base)	Tolerância máxima para a abundância relativa na amostra de ensaio
50-100	± 10 (absoluto)
25-50	$\pm 20\%$ (relativo)
1-25	± 5 (absoluto)

Tabela 2: Intervalos máximos de tolerância para a identificação de substâncias.

Já na quantificação de drogas de abuso, a curva de calibração obtida após análise instrumental é constituída com pelo menos 75% dos calibradores – num mínimo de cinco – devendo cada um deles cumprir o critério predefinido de $\pm 20\%$. Deve ainda apresentar um coeficiente de determinação (r^2) superior a 0.99, e o valor dos resíduos não deverá ser superior a 10%. É construída a partir das áreas relativas obtidas para cada um dos calibradores (área do pico do íon quantificador da substância de interesse / área do pico do íon principal do PI). Quando um ponto de calibração for considerado anômalo – isto é, quando possua um valor residual superior a duas vezes o desvio padrão residual da curva de calibração – este pode ser eliminado. Para além disso, desde que sejam suportadas por ferramentas devidamente validadas e controladas, o uso de curvas de calibração ponderadas é permitido.

As amostras de rotina, analisadas em duplicado (x_1 e x_2), têm como resultado de concentração a média aritmética das duas determinações ($x_1 + x_2 / 2$). Quando não exista volume suficiente de amostra para analisar duas alíquotas independentes, o analista pode optar por analisar apenas uma alíquota, ou utilizar um volume de amostra inferior para a análise – devendo estes desvios ser registados e justificados. Nas situações em que sejam

detetadas anomalias, os resultados devem ser reavaliados – quer pela reinjeção, pela reintegração ou mesmo pela repetição da extração – competindo ao analista selecionar a alternativa mais adequada. Podem também ser quantificadas substâncias que estejam presentes nas amostras de rotina em concentrações inferiores ou superiores à dos calibradores de menor e maior concentração, respetivamente, aceitando-se uma tolerância de 10% dentro da qual o resultado pode ser emitido – ou seja, (*calibrador de menor concentração*) – 10% ou (*calibrador de maior concentração*) + 10%.

O limite de quantificação (LOQ) para as substâncias analisadas é de 25 ng/mL. Os resultados devem ser expressos em nanogramas por mililitro (ng/mL), tendo em consideração as regras internas para a apresentação de resultados relativamente a algarismos significativos, operações matemáticas e arredondamentos.

Para a análise de resultados (qualitativos ou quantitativos), recorre-se a folhas de cálculo (Excel) previamente validadas no SQTF, o que facilita e acelera a obtenção de resultados, e evita potenciais erros, sendo posteriormente elaborado um relatório final.

Capítulo 3 – Atividades Formativas

Como referido em capítulos anteriores, para além de atividade pericial o INMLCF, I.P. organiza regularmente ações de formação e de divulgação de informação científica. Ao longo do estágio realizado foi-me possível assistir e participar em duas dessas atividades formativas, brevemente resumidas nos subcapítulos subsequentes.

4.1 19º Congresso Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses

Organizado pelo INMLCF, I.P. de 18 a 20 de novembro de 2021 – de modo remoto devido aos condicionalismos impostos pela situação pandémica COVID-19 – o 19º Congresso Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (19º CNMLFC) contou com a participação de diversos especialistas (nacionais e internacionais) das áreas da medicina legal e das ciências forenses. Foram abordados os mais atuais e relevantes temas no âmbito da Antropologia, Clínica, Genética, Patologia e Toxicologia Forenses, entre outros.

Para além de assistir às palestras e comunicações orais, pude ainda contribuir com a elaboração de um poster científico intitulado “A Importância da Integridade da Amostra de Sangue na Análise Toxicológica” (ANEXO II), juntamente com a criação de um vídeo de apresentação oral com um breve resumo do mesmo. Com a premissa de que as amostras biológicas colhidas, acondicionadas, armazenadas e transportadas em condições inadequadas comprometem o sucesso da análise toxicológica – e consequentemente dos resultados obtidos – foi desenvolvido um trabalho que veio evidenciar as dificuldades sentidas pelo toxicologista no momento da preparação laboratorial e da análise de resultados de amostras que chegam ao SQTFC em inadequado estado de conservação. A qualidade dos procedimentos pré-analíticos e analíticos é um fator determinante para uma análise laboratorial bem-sucedida e, por isso, diminuir ao máximo o número de fatores externos que possam contribuir para a degradação das amostras e, consequentemente, interferir na interpretação dos resultados, é fundamental.

4.2 Formação sobre Medidas de Autoproteção – Edifício da Sede/ Delegação Centro do INMLCF, I.P.

A segurança, como algo que se constrói, deve ser pensada e treinada de forma a prevenir consequências graves de um conjunto de possíveis ocorrências – sejam elas de causa natural (e.g. sismos) ou humana (e.g. atos terroristas). Posto isto, o INMLCF, I.P. teve o cuidado de promover uma ação de formação para informar os seus profissionais e estagiários acerca da

importância da tomada de medidas de segurança a 22 de fevereiro de 2022, no âmbito das medidas de autoproteção.

Em caso de emergência, só existe segurança quando há uma hierarquia definida (com funções atribuídas), uma *checklist* de procedimentos a seguir, e os respetivos meios necessários para o controlo das ocorrências. Uma vez que as consequências vão aumentando à medida que o tempo corre, preparar a resposta é diminuir os impactos negativos e aumentar as chances de sucesso da operação. É de elevada importância o conhecimento profundo da sinalética – que deve estar sempre visível e devidamente colocada – sendo igualmente importante saber identificar (pelo menos) dois percursos de saída e o ponto de encontro fora do edifício. Qualquer que seja a ocorrência na base da situação de emergência, pode ter consequências completamente imprevisíveis e, por esse motivo, deve sempre assegurar-se que o retorno à normalidade pode ser feito de forma segura, inspecionando-se devidamente o local.

Capítulo 4 – Conclusão

Tive, ao longo de um ano, a oportunidade de acompanhar e participar ativamente no desenvolvimento de análises toxicológicas em âmbito forense, no INMLCF, I.P.: desde a familiarização com o SQTF-C e compreensão dos processos gerais que envolvem o processamento de amostras; à preparação de ensaios para a confirmação e quantificação de drogas de abuso, e expressão dos respetivos resultados.

Houve sempre, para além da expectável componente prática, uma componente teórica adjacente sem a qual seria impraticável o desenvolvimento das análises referidas. Na área forense – como em qualquer outra área – o conhecimento é algo que não deve nunca ser desvalorizado. É fulcral entender a teoria por detrás de um conceito para que se o possa aplicar corretamente, tendo havido sempre um acompanhamento nesse sentido.

O toxicologista forense tem um papel fundamental na área da Medicina Legal uma vez que, vastas vezes, é o único capaz de prestar esclarecimentos relativos aos factos, auxiliando na conclusão dos casos. O estágio realizado permitiu, em primeiro lugar, preencher lacunas na formação maioritariamente teórica. Existe, efetivamente, uma notável oscilação entre o conhecimento teórico e a imprevisível realidade do trabalho prático.

O contacto direto com o dia-a-dia dos profissionais da área foi um processo enriquecedor que contribuiu para um crescimento a nível académico e pessoal, servindo também de preparação para os desafios do mercado de trabalho ao estimular a autonomia, responsabilidade e autoconfiança no trabalho desempenhado. As dificuldades sentidas surgiram da natural falta de prática, tendo-se atenuado com o passar do tempo. O objetivo estipulado para o estágio foi alcançado, e considero sair desta etapa uma pessoa mais apta como futura profissional na área.

Referências Bibliográficas

1. Marcos Passagli. Toxicologia Forense: Teoria e Prática. 3ª Ed. Campinas: Millennium; 2011.
2. Levine BS, Kerrigan S, editors. Principles of Forensic Toxicology. 5th Ed. Springer; 2020.
3. Decreto-Lei nº 96/2001, de 26 de Março. Diário da República n.º 72/2001, Série I-A de 2001-03-26.
4. Decreto-Lei n.º 166/2012, de 31 de Julho. Diário da República n.º 147/2012, Série I de 2012-07-31, páginas 3951 - 3957.
5. INMLCF. “Valores” [Internet]. [cited 2022 Jun 20]. Available from: https://www.inmlcf.mj.pt/index.php?option=com_content&view=article&id=123
6. INMLCF. “Missão” [Internet]. [cited 2022 Jun 20]. Available from: https://www.inmlcf.mj.pt/index.php?option=com_content&view=article&id=122&Itemid=288
7. Portaria nº 19/2013, de 21 de Janeiro. Diário da República n.º 14/2013, Série I de 2013-01-21, páginas 427 - 431.
8. INMLCF. “Serviço de Química e Toxicologia Forenses” [Internet]. [cited 2022 Jun 20]. Available from: https://www.inmlcf.mj.pt/index.php?option=com_content&view=article&id=129:servico-de-quimica-e-toxicologia-forenses&catid=37&Itemid=292
9. Decreto-Lei nº 53/2021, de 16 de junho. Diário da República n.º 115/2021, Série I de 2021-06-16, páginas 6 - 26.
10. INMLCF. “Clínica Forense” [Internet]. [cited 2022 Jun 20]. Available from: https://www.inmlcf.mj.pt/index.php?option=com_content&view=article&id=181&catid=45&Itemid=299
11. INMLCF. “Patologia Forense” [Internet]. [cited 2022 Jun 20]. Available from: https://www.inmlcf.mj.pt/index.php?option=com_content&view=article&id=182&catid=45&Itemid=299
12. INMLCF. “Genética e Biologia Forense” [Internet]. [cited 2022 Jun 20]. Available from: https://www.inmlcf.mj.pt/index.php?option=com_content&view=article&id=183&catid=45&Itemid=299
13. Karch SB. Drug abuse handbook. CRC Press; 1998. 1138 p.
14. Drummer OH. Postmortem toxicology of drugs of abuse. Forensic Sci Int. 2004 Jun;142(2-3):101-13.
15. Tomlinson JJ, Elliott-Smith W, Radosta T. Laboratory information management system chain of custody: Reliability and security. Vol. 2006, Journal of Automated Methods and Management in Chemistry. 2006.
16. Margalho C, Franco J, Corte-Real F, Vieira DN. Illicit drugs in alternative biological specimens: A case report. J Forensic Leg Med. 2011 Apr;18(3):132-5.

17. Mantinieks D, Gerostamoulos D, Glowacki L, di Rago M, Schumann J, Woodford NW, et al. Postmortem Drug Redistribution: A Compilation of Postmortem/Antemortem Drug Concentration Ratios. *J Anal Toxicol.* 2021 Apr 12;45(4):368–77.
18. De E, Gil S, Kubota LT, Yamamoto YI. *ALGUNS ASPECTOS DE IMUNOENSAIOS APLICADOS À QUÍMICA ANALÍTICA.* 1999.
19. Flanagan RJ, Cuypers E, Maurer HH, Whelpton R. *Fundamentals of Analytical Toxicology : Clinical and Forensic.* 2nd Ed. 2020.
20. Nunes LM, Jólluskin G. *O USO DE DROGAS: BREVE ANÁLISE HISTÓRICA E SOCIAL.*
21. Dinis-Oliveira RJ, Carvalho FD, Bastos M de L. *Toxicologia Forense.* PACTOR, editor. Lisboa: Lidel; 2015.
22. Belcher HME, Shinitzky HE. Substance Abuse in Children: Prediction, Protection, and Prevention. *Arch Pediatr Adolesc Med* [Internet]. 1998 Oct;152. Available from: <http://archpedi.jamanetwork.com/>
23. United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). *World Drug Report 2022.* United Nations publication. 2022;
24. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). *European Drug Report 2022: Trends and Developments.* Publications Office of the European Union, Luxembourg [Internet]. 2022; Available from: www.emcdda.europa.eu
25. Decreto-lei 15/93, de 22 de Janeiro. *Diário da República n.º 18/1993, Série I-A de 1993-01-22, páginas 234 - 252.*
26. Lei n.º 25/2021, de 11 de maio. *Diário da República n.º 91/2021, Série I de 2021-05-11, páginas 2 - 10.*
27. Lei n.º 30/2020, de 29 de novembro. *Diário da República n.º 124/2020, 1º Suplemento, Série I de 2020-06-29, páginas 2 - 3.*
28. Baselt RC. *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man.* 12th edition. Seal Beach, California Biomedical Publications; 2020.
29. Dinis-Oliveira RJ. Metabolism and metabolomics of opiates: A long way of forensic implications to unravel. *J Forensic Leg Med.* 2019 Feb;61:128–40.
30. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). *Heroin drug profile* [Internet]. [cited 2022 Jul 11]. Available from: https://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/heroin_en
31. Stout PR, Farrell LJ. Opioids - Effects on Human Performance and Behavior. *Forensic Sci Rev.* 2003 Jan;15(1):29–59.
32. Ferrari A, Coccia C, Bertolini A, Sternieri E. Methadone—metabolism, pharmacokinetics and interactions. *Pharmacol Res.* 2004 Dec;50(6):551–9.
33. Carapinha L. *Comportamentos Aditivos em tempos de COVID: Alterações no consumo de drogas. Resultados do Inquérito Online Europeu sobre Drogas – Padrões de Consumo Portugal 2021* [Internet]. Serviço de Intervenção nos Comportamentos Aditivos e nas Dependências (SICAD), editor. Available from: <http://www.sicad.pt>.

34. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. Cocaine and crack drug profile [Internet]. [cited 2022 Jul 11]. Available from: https://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/cocaine_en
35. Isenschmid DS. Cocaine - Effects on Human Performance and Behavior. *Forensic Sci Rev.* 2002 Feb;14(1–2):61–100.
36. Miller NS, Gold MS, Millman RL. Cocaine. *Am Fam Physician.* 1989 Feb;39(2):115–20.
37. Huestis MA. Cannabis (Marijuana)-Effects on Human Behavior and Performance. *Forensic Sci Rev.* 2002;
38. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). Cannabis drug profile [Internet]. [cited 2022 Jul 29]. Available from: <https://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/cannabis>
39. Grotenhermen F. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cannabinoids. *Clin Pharmacokinet.* 2003;42(4):327–60.
40. Fleckenstein AE, Volz TJ, Riddle EL, Gibb JW, Hanson GR. New insights into the mechanism of action of amphetamines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47:681–98.
41. Logan BK. Amphetamines: An Update on Forensic Issues. *J Anal Toxicol* [Internet]. 2001;25. Available from: www.samhsa.gov.
42. Kraemer T, Maurer HH. Toxicokinetics of Amphetamines: Metabolism and Toxicokinetic Data of Designer Drugs, Amphetamine, Methamphetamine, and Their N-Alkyl Derivatives. 2002;
43. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). Amphetamine drug profile [Internet]. [cited 2022 Jul 29]. Available from: <https://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/amphetamine>
44. Shafi A, Berry AJ, Sumnall H, Wood DM, Tracy DK. New psychoactive substances: a review and updates. *Ther Adv Psychopharmacol.* 2020 Jan;10:204512532096719.
45. SICAD. NOVAS SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS.
46. UNODC. World Drug Report 2022 [Internet]. 2022 [cited 2022 Jul 28]. Available from: <https://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/world-drug-report-2022.html>
47. Conselho da União Europeia. Decisão n.º 2005/387/JAI, de 10 de maio de 2005. *Jornal Oficial da União Europeia.* 2005 May 20;
48. Decreto-Lei n.º 54/2013, de 17 de abril. *Diário da República n.º 75/2013, Série I de 2013-04-17, páginas 2250 - 2254.*
49. Lei n.º 25/2021, de 11 de Maio. *Diário da República n.º 91/2021, Série I de 2021-05-11.*
50. Coelho R. Polícias alarmadas com surtos psicóticos nas ilhas causados por novas drogas [Internet]. *Novo Seminário Original e Livre.* 2021 [cited 2022 Sep 7]. Available from: <https://onovo.pt/pais/policias-alarmadas-com-surtos-psicoticos-nas-ilhas-causados-por-novas-drogas-ED7555565>
51. Branco C. Homem detido nos Açores por tráfico de “branca sintética”. Droga foi criminalizada há uma semana [Internet]. *Observador.* 2021 [cited 2022 Sep 9].

- Available from: <https://observador.pt/2021/05/20/homem-detido-nos-aco-res-por-traf-ico-de-branca-sintetica-droga-foi-criminalizada-ha-uma-semana/>
52. Agência Lusa. Homem condenado a seis anos de prisão por tráfico de droga da Holanda para os Açores [Internet]. Observador. 2022 [cited 2022 Sep 9]. Available from: <https://observador.pt/2022/02/24/homem-condenado-a-seis-anos-de-prisao-por-traf-ico-de-droga-da-holanda-para-os-aco-res/>
 53. Freitas RD, Rodrigues C. PJ deteve cinco pessoas e apreendeu mais de 10 quilos de drogas sintéticas na Madeira [Internet]. Diário de Notícias da Madeira. 2022 [cited 2022 Sep 7]. Available from: <https://www.dnoticias.pt/2022/7/5/318480-pj-deteve-cinco-pessoas-e-apreendeu-mais-de-10-quilos-de-drogas-sinteticas-na-madeira/>
 54. ANSI/ASB Standard 036. Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. 2019; Available from: www.asbstandardsboard.org.
 55. Dolan JW. When Should an Internal Standard be Used? [Internet]. LCGC North America. 2012 [cited 2022 Jul 19]. p. 474–80. Available from: <https://www.chromatographyonline.com/view/when-should-internal-standard-be-used-0>
 56. Smith RM. Before the injection - Modern methods of sample preparation for separation techniques. Vol. 1000, Journal of Chromatography A. Elsevier; 2003. p. 3–27.
 57. Chia DT, Gere JA. Rapid Drug Screening Using Toxi-Lab® Extraction Followed by Capillary Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Vol. 20, Clin Biochem. 1987.
 58. Pirnay S, Bouchonnet S, Hervé F, Libong D, Milan N, D’Athis P, et al. Development and validation of a gas chromatography-mass spectrometry method for the simultaneous determination of buprenorphine, flunitrazepam and their metabolites in rat plasma: Application to the pharmacokinetic study. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2004 Aug 5;807(2):335–42.
 59. Orata F. Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis [Internet]. 2012. Available from: www.intechopen.com
 60. Rosado T, Gonçalves A, Margalho C, Barroso M, Gallardo E. Rapid analysis of cocaine and metabolites in urine using microextraction in packed sorbent and GC/MS. Anal Bioanal Chem. 2017 Mar 1;409(8):2051–63.
 61. Margalho C, Castanheira A, Real FC, Gallardo E, López-Rivadulla M. Determination of “new psychoactive substances” in postmortem matrices using microwave derivatization and gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2016 May 1;1020:14–23.
 62. HimaBindu LM, Parameswari AS. A Review on GC-MS and Method Development and Validation [Internet]. Vol. 4, Available online on www.ijpqa.com International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance. 2013. Available from: www.ijpqa.com
 63. Khan JI, Kennedy TJ, Christian Jr. DR. Basic Principles of Forensic Chemistry. 2012.
 64. McNair HM, Miller JM. Basic Gas Chromatography. New York; 1997.
 65. McMaster MC. GC/MS A Practical User’s Guide. 2008.
 66. World Anti-Doping Agency (WADA). Minimum Criteria for Chromatographic Mass-Spectrometric Confirmation of the Identity of Analytes for Doping Control Purposes

[Internet]. WADA Technical Document - TD2015DCR. 2015. Available from:
https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2015idcr_-_eng.pdf

Anexos

ANEXO I: *Grupos de substâncias analisadas no SQTF-C e respectivas equipas responsáveis pelas análises, organizadas de acordo com a metodologia analítica utilizada.*

Drogas de Abuso Equipa II (GC-MS-EI)	<ul style="list-style-type: none">- Opiáceos;- Cocaína e metabolitos;- Anfetaminas/Metanfetaminas e substâncias relacionadas;- Canabinóides.
Drogas de Substituição Equipa II (GC-MS-EI)	<ul style="list-style-type: none">- Metadona e EDDP;- Buprenorfina e Norbuprenorfina.
Novas Substâncias Psicoativas Equipa II (GC-MS-EI)	<ul style="list-style-type: none">- Catinonas sintéticas;- Fenetilaminas e derivados.- Triptaminas e derivados;- Arilciclohexilaminas (Metoxetamina, Ketamina, Norketamina);- Salvinorina A (plantas e seus componentes);- Canabinóides sintéticos;- Piperazinas e derivados.
Pesticidas Equipa II (GC-MS-EI)	<ul style="list-style-type: none">- Organofosforados;- Organoclorados;- Carbamatos;- Piretróides;- Outros.
Medicamentos Equipa III (UPLC-MS/MS)	<ul style="list-style-type: none">- Antidepressores, Ansiolíticos, Antipsicóticos;- Sedativos e Hipnóticos;- Anticonvulsionantes;- Antiepiléticos;- Analgésicos;- Anestésicos;- Outros.
Compostos Voláteis Equipa IV (GC-FID)	<ul style="list-style-type: none">- Etanol;- Acetaldeído;- Metanol;- Acetona;- Acetato de etilo;- Acetonitrilo;- Clorofórmio;- Éter dietílico;- 2-Propanol;- 1-Butanol;- Tolueno;- Xileno.
Outras Substâncias Equipa V (EAM e EAA)	<ul style="list-style-type: none">- Monóxido de Carbono;- Metalóides.

ANEXO II: Póster científico apresentado no 19º CNMLCF.



SERVIÇO DE QUÍMICA E TOXICOLOGIA FORENSES - DELEGAÇÃO DO CENTRO



A IMPORTÂNCIA DA INTEGRIDADE DA AMOSTRA DE SANGUE NA ANÁLISE TOXICOLÓGICA FORENSE

Francisca Machado*, Alice Castanheira*, Fernando Castanheira*, João Franco*, Duarte Nuno Vieira**, Cláudia Margalho*

*Serviço de Química e Toxicologia Forenses da Delegação do Centro (SQTF) do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, INMLCF, I.P.

**Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC)

INTRODUÇÃO

A principal missão do Serviço de Química e Toxicologia Forenses (SQTF) é detetar, confirmar e quantificar as substâncias que se encontrem presentes nas amostras biológicas pertencentes a cada caso sob investigação, sendo o sangue a matriz mais adequada para o efeito. Assim, é fundamental que o número de fatores externos que possam contribuir para a degradação das amostras e, conseqüentemente, interferir na interpretação dos resultados, seja o mais reduzido possível durante todo o processo pré-analítico e analítico.

As amostras biológicas colhidas, acondicionadas, armazenadas e transportadas em condições inadequadas comprometem o sucesso de toda a análise toxicológica.

OBJETIVO

Evidenciar as dificuldades sentidas durante todo o processo de preparação das amostras que chegam ao SQTF em inadequado estado de conservação.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados processos referentes aos anos de 2020 e 2021 (Patologia Forense e Autoridade Nacional de Segurança Rodoviária - ANSR) com pedidos de análises toxicológicas de drogas de abuso, medicamentos e pesticidas, sem indicação de putrefação.

As metodologias analíticas usadas foram:

- Extração em fase sólida (Colunas Oasis® MCX para drogas de abuso e Oasis® HLB para medicamentos e pesticidas).
- Derivatização química por micro-ondas:
 - ✓ MBTFA para anfetaminas/metanfetaminas e derivados;
 - ✓ MSTFA/TMCS para opiáceos, cocaína e seus metabolitos.
- Análise instrumental por GC/MS-EI em modo SIM e SCAN.



Figura 1: Extração em fase sólida.



Figura 2: Cromatografia de gases acoplada à espectrometria de massas (GC/MS-EI).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No SQTF são desenvolvidas e validadas metodologias analíticas sensíveis (seguindo normas internacionalmente aceites para a validação de métodos bioanalíticos) para detetar, identificar, confirmar e quantificar baixas concentrações de substâncias presentes nas amostras de sangue.

No entanto, para que as metodologias funcionem eficazmente, é necessário assegurar a integridade das amostras biológicas. Apresentam-se alguns exemplos, nos quais a alteração do estado da amostra de sangue interferiu com o procedimento analítico e com o resultado obtido.



Figura 3: Amostras de sangue provenientes de (1) autópsias médico-legais e (2) ANSR.

CONCLUSÃO

Foi possível verificar que a qualidade dos resultados das perícias toxicológicas está intimamente ligada à fase pré-analítica.

Uma das maiores dificuldades relaciona-se com uma ineficaz homogeneização das amostras de sangue provenientes de solicitações da ANSR, o que leva à formação de coágulos em mais de 50% das amostras analisadas.

Relativamente às amostras provenientes de autópsias médico-legais, verifica-se que o tempo e condições de armazenamento temporário (nos locais onde são realizadas as colheitas), bem como as condições de refrigeração durante o transporte até ao SQTF, afetam significativamente o estado das amostras biológicas.

Todas estas situações interferem com o processo analítico, levando a repetições frequentes devido à dificuldade em confirmar os analitos (presença de interferentes e/ou alteração da estabilidade das substâncias). Conseqüentemente, todos estes fatores vão contribuir para o aumento de gastos de material, de reagentes e do tempo de análise, repercutindo-se numa inevitável diminuição da capacidade de resposta do laboratório.

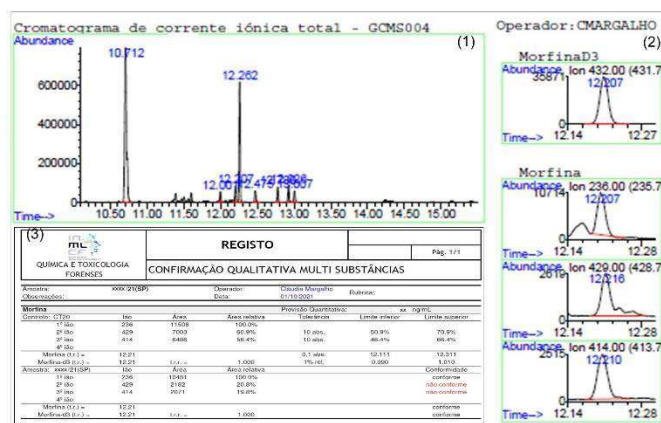


Figura 4: (1) Cromatograma de corrente iónica total (TIC) e respetiva (2) macro da morfina; (3) folha em Excel para confirmação de resultados (documento validado no SQTF).

Devido às dificuldades apresentadas no momento da preparação da amostra e à presença de interferentes nos iões 236 (ião de maior abundância) e 429 (ião quantificador), não foi possível confirmar a presença de morfina. A análise foi posteriormente repetida, após uma preparação mais elaborada da amostra, tendo-se obtido resultados semelhantes.

ANEXO III: *Artigo científico intitulado “Development and Validation of a Quantitative GC-MS-EI Method to Determine α -PHP in Blood: Application to Samples Collected During Medico-Legal Autopsies”.*

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A GC-MS-EI METHOD TO DETERMINE
 α -PHP IN BLOOD: APPLICATION TO SAMPLES COLLECTED DURING MEDICO-
LEGAL AUTOPSIES**

Francisca Machado^{1,2}, João Franco³, Duarte Nuno Vieira², Cláudia Margalho^{1*}

¹ Serviço de Química e Toxicologia Forenses, Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses - Delegação do Centro, Pólo das Ciências da Saúde (Pólo III), Azinhaga de Santa Comba, 3000-548 Coimbra, Portugal

² Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Pólo das Ciências da Saúde (Pólo III), Azinhaga de Santa Comba, 3000-548, Coimbra, Portugal.

³ Serviço de Química e Toxicologia Forenses, Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses - Delegação do Sul, Rua Manuel Bento de Sousa, 3, Lisboa, Portugal.

*Author to whom correspondence should be addressed: E-mail:
claudia.i.margalho@inmlcf.mj.pt (Cláudia Margalho, PhD)

ABSTRACT

New Psychoactive Substances (NPS) still represent an issue of great concern worldwide despite efforts made by national and international control systems to limit the spread of these substances. α -PHP is a fairly recent synthetic cathinone (the second largest group of monitored substances in Europe) with only a few published studies on the substance. Though there is a low incidence of NPS consumption in Portugal, a recent increase in apprehensions and detection in biological matrices of the substance was verified. An analytical methodology was developed and validated for determining and quantitating α -PHP in blood. Solid phase extraction was employed for sample preparation (500 μ L), further analysed by GC-MS-EI in selected ion monitoring mode, with cocaine-d3 as the internal standard. Method validation followed the guidelines of the American National Standards Institute / AAFS Standards Board (ANSI/ASB) Standard 036. The procedure was linear between 10 and 1000 ng/mL, with determination coefficients (r^2) higher than 0.999. Carryover was not observed. A limit of detection of 5ng/mL and a limit of quantitation of 10 ng/mL were achieved. Intraday and intermediate precision and bias assessment showed satisfactory results ($CV < 17.7\%$; bias $< 11.6\%$), and extraction efficiency ranged from 98.5% to 103.3%. The stability of the substance was considered acceptable for at least 6h at room temperature, 48h in the autosampler, and 21 days after five freeze/thaw cycles. The developed methodology was applied to fifteen real samples from the Chemistry and Forensic Service of Toxicology of the National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences, Centre Branch, Portugal. Available information for each case is also detailed in the present article.

KEYWORDS

Alpha-PHP; GC-MS-EI; New Psychoactive Substances; SPE; Synthetic Cathinones.

INTRODUCTION

There has been a notorious diversification in available substances in drug markets over the last decades. The use of recreational drugs – despite its illegality in most countries – still poses a serious socio-economic concern worldwide (1). The emergence of New Psychoactive Substances (NPS) was appealing to consumers due to a lack of legal status of these substances and their large availability on the Internet, leading to increased popularity (1–3). Current national and international control systems have helped limit the spread of NPS in high-income countries by either adopting general legislation covering possible future variants of controlled substances or allowing courts to apply analogue legislation to substances with similar structures and effects to the ones already under control (4). Regardless, this did not stop NPS from rapidly spreading to poorer regions of the globe with deficient control systems, as described by the 2022 World Drug Report (1). Moreover, although the lockdown restrictions adherent to the COVID-19 pandemic would presumptively have a significant impact on drug supply and trafficking, the market quickly recovered and adapted to this new reality proving to be resilient to the adopted measures. During this period online drug purchases increased, drug use patterns changed, and aggravated health consequences were verified (1). The most recent drug report published by the European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) in June 2022 stated that drug seizures in Europe have generally been increasing, with 880 NPS currently being monitored (5). Both the continuous introduction of novel compounds on the market each year and the low concentrations typically found in biological samples – due to the small doses necessary for the desired psychoactive effects – pose a serious analytical challenge in identifying and quantitating NPS (6).

Synthetic cathinones – also known as “bath salts” – are currently the second largest group of monitored substances in Europe (3,5). It is well known that consumption of these substances causes long-lasting toxic effects, and the fact that users cannot know for sure the content of the

purchased product and its purity poses an imminent hazard to public health and safety (3,6,7). Making part of the synthetic cathinones group, alpha-pyrrolidinohexanophenone (α -PHP) – a pyrovalerone derivative – is commonly presented in the form of whitish crystals or in the form of a brownish powder. It is generally consumed nasally, orally, or sublingually (although it can also be smoked or injected), has strong abuse potential and no therapeutic or medical use (2,3,6). Detection of this substance has been reported in various biological samples (3,7–15). Studies suggest that α -PHP is absorbed and distributed into body tissues, released into the blood and continuously absorbed into the brain due to its high blood-brain barrier permeability – inhibiting monoamine transporters in the brain. It is extensively metabolized in the liver to form OH- α -PHP and 2"-oxo- α -PHP, has a half-life of 37 hours, and is mainly eliminated in urine in both its unaltered and metabolized forms over a period of 150 hours (four times its half-life) (7,8,12). Clinically, α -PHP users present with psychiatric, neurological, gastrointestinal, cardiovascular, and muscular symptoms, which can range from increased energy and libido, improved mood, empathy, and openness in communication, to euphoria, hallucinations, anxiety, and insomnia (3,7,16).

Whilst there's a low incidence of NPS consumption in Portugal, as part of day-to-day routine work at the Forensic Chemistry and Toxicology Service of the National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences, Centre Branch, the authors verified a particular increase in cases of α -PHP from a particular region of the national territory. National news articles regarding the apprehension of α -PHP in that region kept coming up throughout the conducted study (17,18), which was consistent with the increase in cases detected at the laboratory. Thus, a validation study has been conducted to quantitate α -PHP in blood using GC-MS-EI.

MATERIAL AND METHODS

Reagents and standard solutions

A stock solution of α -PHP was acquired from Cerilliant (Round Rock, TX, USA) at the concentration of 1 mg/mL, from which additional working solutions were prepared by dilution with methanol to the appropriate concentrations (50, 5, 0.5 and 0.05 μ g/mL). The deuterated internal standard (IS) used, cocaine-d₃, was acquired from Sigma-Aldrich (Lisbon, Portugal) at a concentration of 1 mg/mL and a working solution was prepared in acetonitrile at the concentration of 5 μ g/mL. The potassium dihydrogen phosphate 0.1 M solution was prepared by diluting 100 mL of potassium dihydrogen phosphate 1 M in 1000 mL of water. Dichloromethane:methanol (70:30, v/v) and dichloromethane:2-propanol:ammonium hydroxide (78:20:2, v/v/v) were prepared daily. All these referred solutions were protected from light and stored at a temperature between 2 and 8 °C. Deionized water, methanol, dichloromethane, 2-propanol and *n*-hexane were in accordance with the specifications of the American Chemical Society (ACS) grade. Ammonium hydroxide, hydrochloric acid and potassium dihydrogen phosphate were of analytical grade. The extraction cartridges (Oasis® MCX 3cc, 60 mg) were acquired from Waters (Milford, MA, USA).

Biological samples

Blank blood samples used for calibration purposes and validation experiments were obtained from a local blood donation bank. These samples were stored at -15°C after being screened to verify that they were drug-free.

Regarding authentic samples, these were collected during autopsies performed at the Forensic Clinic and Pathology Service of the National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences, Centre Branch, Portugal. The samples were sent to the laboratory for toxicological

analysis, normally requested for clarification of the cause of death, as part of day-to-day routine work. Details for each case are described in Table I.

Sample preparation and extraction procedure (SPE)

Volumes of 500 μL of biological samples were mixed with 4 mL of 0.1 M phosphate buffer at pH 4.4 and 20 μL of IS at the concentration of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The samples were then centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes after homogenization and the obtained aqueous phase was added to the solid phase extraction (SPE) cartridges, initially conditioned with 2 mL of methanol, followed by 2 mL of deionized water. Once the samples passed through, the cartridges were washed with 2 mL of deionized water, 2 mL of hydrochloric acid 0.1M, 2mL of dichloromethane:methanol (70:30, v/v) and 1 mL of n-hexane, sequentially.

Finally, after drying the filling of the cartridges under a full vacuum, the analytes were eluted from the cartridges with 2 mL of dichloromethane:2-propanol:ammonium hydroxide (78:20:2, v/v/v) and the collected eluates were taken to dryness under a nitrogen stream at 40°C. The samples were reconstituted in methanol (60 μL) and transferred to vials for injection of a 1 μL aliquot in the GC-MS-EI system.

Gas chromatographic-mass spectrometric conditions

Chromatographic analysis was performed using an Agilent Technologies 7890B gas chromatograph coupled to a 5977A mass-selective detector and equipped with a capillary column (30.0 m \times 320 μm I.D., 0.25 μm film thickness) with 5% phenylmethyl siloxane (HP-5 MS), supplied by J&W Scientific (Folsom, CA, USA).

The gas chromatograph oven temperature started at 90°C for 2 minutes, followed by an increase at 20°C/min until reaching 280°C temperature which was maintained for 3 minutes. Splitless

mode injection was used with a constant flow rate of helium (carrier gas) at 1.2 mL per minute. Inlet and transfer line temperatures were set at 250°C and 280°C, respectively. Data was acquired in the selected ion monitoring (SIM) mode. The mass spectrometer was operated with a filament current of 34.6 μ A and electron energy of 70.0 eV in the positive electron ionization mode.

The monitored ions were 77, 105 and 140 (quantitation ion) for α -PHP and 185 for the IS, selected based on the selectivity and abundance to maximize the signal-to-noise ratio in matrix extracts.

Validation parameters

The authors followed the recommendations of the American National Standards Institute / AAFS Standards Board (ANSI/ASB) Standard 036 for method validation (19). The following parameters were studied: selectivity, linearity, limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ), carryover, precision (intraday and intermediate) and bias, recovery, and stability (bench-top, autosampler, and freeze/thaw cycles).

Selectivity

Selectivity was studied to investigate the presence of matrix interferences at the retention time (RT) of the monitored ions for α -PHP and respective IS, and to evaluate the method's ability to identify the analyte of interest in the presence of other substances routinely analysed in the laboratory. To do so, 6 different pools from independent sources of blank blood were analysed. Two sets of samples were prepared: one positive set of samples spiked with the analyte of interest at 10 ng/mL, of which one sample was further spiked at 100 ng/mL with a mixture of other substances routinely analysed in the laboratory (drugs of abuse, pesticides, and medical substances); and a negative set of blank blood samples only fortified with the IS. Five positive

samples and five negative samples were obtained and submitted to the above-mentioned methodologies.

Linearity, LOD, LOQ and carryover

The calibration curves were achieved by linear regression, with the peak area ratio between the analyte of interest and the IS being plotted against corresponding theoretical concentrations. The determined linear range was of 10-1000 ng/mL (10, 25, 100, 300, 500, 750, and 1000 ng/mL). A blank blood sample with added IS, and four different concentration levels (10, 25, 100, and 500 ng/mL) of quality control (QC) samples ($n = 3$) were simultaneously analysed with each calibration curve. The acceptance criteria included coefficients of determination (r^2) ≥ 0.99 , and the calibrators were quantitated within $\pm 20\%$.

For LOD determination, blank blood samples were fortified with decreasing concentrations of α -PHP. A LOD value was then set at the lowest concentration obtained with a signal-to-noise ratio of at least 3. The LOQ was defined as the minimum concentration quantitated with adequate precision [coefficient of variation (CV) $< 20\%$] and bias (within a $\pm 20\%$ interval).

Carryover was evaluated by injecting a blank sample immediately after the highest point of the calibration curve and then assessing the presence of eventual ionic signals at the RT of the analyte of interest.

Precision and bias

Intraday precision and bias were evaluated by analysing five QC samples at different concentration levels (10, 25, 100 and 500 ng/mL) on the same day. Intermediate precision and bias were calculated by the analysis of these same concentration levels over the course of five days. Precision was considered acceptable when $CV < 20\%$, with a bias variability of $\pm 20\%$ – calculated as the [(mean of measured concentrations – theoretical concentration) / theoretical concentration x 100] – for all QC samples.

Recovery

Extraction efficiency was evaluated by comparing 2 sets of low, medium, and high concentration levels (10, 25, 200 ng/mL) of QC samples (n = 6). Blank blood samples were spiked before the extraction procedure for set 1, while set 2 was spiked after the extraction procedure (100% recovery). The IS was added after the extraction procedure for both sets. The mean peak area ratios obtained were compared to assess extraction efficiency, as follows: $(\text{Set1}/\text{Set2}) \times 100\%$.

Stability

The stability parameter (bench-top, autosampler and freeze/thaw cycles) was studied in positive blood samples resulting from cases analysed in our laboratory and previously quantitated (n = 9). For benchtop stability, one group of samples was left at room temperature for 6 hours, and the obtained results were compared with the first quantitation data. The stability of processed samples was evaluated by reinjecting the extracts left in the autosampler for 48 h and comparing the concentration obtained against the original calibration curve with the corresponding first injection data. Lastly, the effect of freeze/thaw cycles on stability was assessed by freezing samples at -15 °C and completely thawing them (5 cycles) over a period of 14 and 21 days; comparisons were then made against the first quantitation data. The stability of α -PHP was considered acceptable if the percentage of analyte loss was within $\pm 20\%$ of the corresponding initial quantitation values.

RESULTS AND DISCUSSION

No significant interferences at the RT and at the respective m/z values of the monitored ions for α -PHP were observed after the analysis of the negative set of samples (Figure 1).

Furthermore, the analyte was successfully identified in all spiked samples, and the added compounds did not interfere with the assay. This suggests that the described method is selective for the determination of α -PHP, as neither the endogenous matrix constituents nor the exogenous compounds added to samples interfered with the analysis.

Linearity was verified between 10 and 1000 ng/mL, with all acceptance criteria being accomplished for calibration data. The achieved mean values \pm standard deviation were as follows ($n = 5$): $2.8E-02 \pm 3.7E-03$ for slope; $-5.1E-02 \pm 2.1E-02$ for interception; and $r^2 \geq 0,999$. The LOD attained for α -PHP was 5 ng/mL and the LOQ was determined at 10 ng/mL (Figure 2). Carryover was not observed throughout validation experiments.

As shown in Table II, the attained values for both intraday precision ($CV < 16.7\%$) and bias ($0.0 - 11.6\%$), and intermediate precision ($CV < 7.6\%$) and bias ($0.0 - 5.8\%$) were satisfactory for all the studied concentration levels. Recovery ranged between 98.5% and 103.3% with the described extraction procedure for all concentration levels.

No relevant degradation was observed during stability studies, as shown in Table III. Regarding freeze/thaw stability, higher overall analyte loss was found in low concentration levels when compared to higher concentration levels. Even so, the results were still within the range established by the ANSI/ASB Standard 036 ($\pm 20\%$). Assessing stability in real samples adds value to the developed method as it mirrors the day-to-day reality faced at the laboratory. It is very common to analyse postmortem samples with signs of putrefaction, which can interfere with analyte stability and compromise analysis results. Thus, it can be presumed that putrefaction influenced faster analyte degradation (20,21), which can affect the low concentration samples more rapidly. Bench-top stability values were also acceptable though a slight loss of analyte was observed. Auto-sampler stability, on the other hand, showed an overall increase in analyte concentration, which could be attributed to solvent evaporation on the autosampler, resulting in sample concentration. Though we can consider that there is

stability of α -PHP under the described conditions in compliance with the acceptance criteria, results are not expected to be acceptable on samples left in the autosampler for periods longer than 48 hours.

Lagoutte-Renosi, *et al.*, who developed an LC-MS/MS method for α -PHP quantitation in 100 μ L of blood (10), presented results for LOD and LOQ equal to those reported in this article (5 ng/mL and 10 ng/mL, respectively). Vignali, *et al.* also performed LC-MS/MS analysis, achieving a LOD of 0.2 ng/mL and a LOQ of 0.5 ng/mL in 500 μ L of blood (3). Woźniak, *et al.* reported a LOD of 0.3 ng/mL and a LOQ of 1 ng/mL using for such 200 μ L of blood, analysed by GC-MS/MS (22). Results for other validation parameters were somewhat similar to those reported in the present article.

CONCLUSION

Tracking of synthetic cathinones is a difficult task due to their rapid mutability and adaptability to drug markets, representing an overwhelming health and safety hazard to populations worldwide. α -PHP is a fairly recent substance with few published studies despite the increased frequency in reported abuse cases. This matter highlights the need for toxicological laboratories to adapt to this reality and invest in the study of this type of substances, despite the posed analytical challenge.

Fifteen postmortem cases were described and analysed in the present study. To the authors' knowledge, this is the first report on the development and validation of a quantitative method for the determination of α -PHP in blood using GC-MS-EI analysis. Because previously published studies on the subject were performed using more sensitive instrumentation, better results for LOD and LOQ were obtained when compared to the ones herein described. Nevertheless, GC-MS-EI is a simple useful tool and is still widely used in forensic toxicology

laboratories worldwide, hence the relevance of this study. Moreover, the validated methodology turned out to be sensitive, selective, and therefore adequate for qualitative and quantitative determinations of the substance, preparing the laboratory for future handling of routine casework suspected of α -PHP. The analysed cases were all unexpected since they did not have any information about the consumption of α -PHP. This situation demonstrates that the validated methodology is sufficiently sensitive and adequate for qualitative and quantitative determinations of α -PHP in *postmortem* cases that involved the consumption of this highly toxic NPS. The presented cases reflect the underlying difficulty in anticipating the entry of NPS into the illicit drug market, which consequently makes it unpredictable and difficult to control their consumption.

REFERENCES

1. United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). World Drug Report 2022 (Set of 5 Booklets). United Nations publication; 2022.
2. Sarpong I, Jones F. A critical analysis of national policy relating to legal highs. Nursing Standard. 2014;
3. Vignali C, Moretti M, Groppi A, Osculati AMM, Tajana L, Morini L. Distribution of the synthetic cathinone α -pyrrolidinohexiophenone in biological specimens. J Anal Toxicol. 2019 Jan 1;43(1):E1–6.
4. The Council of the European Union. Council Decision 2005/387/JHA of 10 May 2005. Official Journal of the European Union. 2005;
5. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). European Drug Report: Trends and Developments [Internet]. Publications Office

of the European Union. 2022. Available from:
https://www.emcdda.europa.eu/publications/edr/trends-developments/2022_en

6. World Health Organization (WHO). Critical Review Report: alpha-PHP (α -Pyrrolidinohexanophenone) or PV-7 Expert Committee on Drug Dependence Forty-second Meeting. 2019.
7. Fujita Y, Mita T, Usui K, Kamijo Y, Kikuchi S, Onodera M, et al. Toxicokinetics of the Synthetic Cathinone α -Pyrrolidinohexanophenone. *J Anal Toxicol*. 2018 Jan 1;42(1):e1–5.
8. Paul M, Bleicher S, Guber S, Ippisch J, Poletini A, Schultis W. Identification of phase I and II metabolites of the new designer drug α -pyrrolidinohexiophenone (α -PHP) in human urine by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS). *Journal of Mass Spectrometry*. 2015 Nov 1;50(11):1305–17.
9. Beck O, Bäckberg M, Signell P, Helander A. Intoxications in the STRIDA project involving a panorama of psychostimulant pyrovalerone derivatives, MDPV covecats. *Clin Toxicol*. 2018 Apr 3;56(4):256–63.
10. Lagoutte-Renosi J, Richeval C, Phanithavong M, Wiart JF, Castex E, Vanhoy X, et al. Hair analysis can support the follow-up addiction care after acute New Psychoactive Substances intoxication: Illustration by two cases. *Drug Test Anal*. 2021 Jan 1;13(1):227–34.
11. Adamowicz P, Hydzik P. Fetal death associated with the use of 3,4-MDPHP and α -PHP. *Clin Toxicol*. 2019 Feb 1;57(2):112–6.

12. Matsuta S, Shima N, Kakehashi H, Kamata H, Nakano S, Sasaki K, et al. Metabolism of α -PHP and α -PHPP in humans and the effects of alkyl chain lengths on the metabolism of α -pyrrolidinophenone-type designer drugs. *Forensic Toxicol.* 2018 Jul 1;36(2):486–97.
13. Klavž J, Gorenjak M, Marinšek M. Suicide attempt with a mix of synthetic cannabinoids and synthetic cathinones: Case report of non-fatal intoxication with AB-CHMINACA, AB-FUBINACA, α -PHP, α -PVP and 4-CMC. *Forensic Sci Int.* 2016 Aug 1;265:121–4.
14. Fels H, Lottner-Nau S, Sax T, Roider G, Graw M, Auwärter V, et al. Postmortem concentrations of the synthetic opioid U-47700 in 26 fatalities associated with the drug. *Forensic Sci Int.* 2019 Aug 1;301:e20–8.
15. Freni F, Bianco S, Vignali C, Groppi A, Moretti M, Osculati AMM, et al. A multi-analyte LC–MS/MS method for screening and quantification of 16 synthetic cathinones in hair: Application to postmortem cases. *Forensic Sci Int.* 2019 May 1;298:115–20.
16. Zawilska JB, Wojcieszak J. α -Pyrrolidinophenones: a new wave of designer cathinones. Vol. 35, *Forensic Toxicology*. Springer Tokyo; 2017. p. 201–16.
17. Freitas RD, Rodrigues C. PJ deteve cinco pessoas e apreendeu mais de 10 quilos de drogas sintéticas na Madeira [Internet]. *Diário de Notícias da Madeira*. 2022 [cited 2022 Sep 7]. Available from: <https://www.dnoticias.pt/2022/7/5/318480-pj-deteve-cinco-pessoas-e-apreendeu-mais-de-10-quilos-de-drogas-sinteticas-na-madeira/>
18. Coelho R. Polícias alarmadas com surtos psicóticos nas ilhas causados por novas drogas [Internet]. *Novo Seminário Original e Livre*. 2021 [cited 2022 Sep 7].

Available from: <https://onovo.pt/pais/policias-alarmadas-com-surtos-psicoticos-nas-ilhas-causados-por-novas-drogas-ED7555565>

19. ANSI/ASB Standard 036. Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. 2019; Available from: www.asbstandardsboard.org.
20. Mantinięks D, Gerostamoulos D, Glowacki L, di Rago M, Schumann J, Woodford NW, et al. Postmortem Drug Redistribution: A Compilation of Postmortem/Antemortem Drug Concentration Ratios. *J Anal Toxicol*. 2021 Apr 12;45(4):368–77.
21. Drummer OH. Postmortem toxicology of drugs of abuse. *Forensic Sci Int*. 2004 Jun;142(2–3):101–13.
22. Woźniak MK, Banaszkięwicz L, Wiergowski M, Tomczak E, Kata M, Szpiech B, et al. Development and validation of a GC–MS/MS method for the determination of 11 amphetamines and 34 synthetic cathinones in whole blood. *Forensic Toxicol*. 2020 Jan 1;38(1):42–58.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Ion chromatogram of a blank blood sample.

Figure 2. Ion Chromatogram of a spiked blood sample at the LOQ (10 ng/mL).

TABLES

Table I. α -PHP cases reported at the Chemistry and Forensic Toxicology Service of the National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences, Centre Branch, Portugal.

Sex / Age	Case data	Concentration of α -PHP	Other drugs confirmed in blood
Male, 35	Suspected intoxication with mephedrone (“bloom”). 15-hour hospital stay. Drug addict, with hepatitis C.	PB: 190 ng/mL	Fentanyl, Haloperidol, Levetiracetam, Propofol, Paracetamol and Metoclopramide
		CB: 76 ng/mL	
Male, 52	Apparent road accident with a motorcycle, with no exuberant traumatic injuries. The cause of death is currently unknown.	PB: 21 ng/mL	Ketamine and Ethanol
		CB: 53 ng/mL	
Male, 55	Undetermined cause of death. The cadaver was found at home. Drug consumer (“bloom”).	PB: 108 ng/mL	Ibuprofen, Caffeine and Cotinine
		CB: 170 ng/mL	
Male, 28	The cause of death was a traumatic injury resulting from falling from a building, from an unknown height. Hospital admission for cardiac arrest, an open fracture in the left lower limb, and fractures in the pelvis. History of consumption of illicit substances.	PB: 15 ng/mL	Citalopram, Olanzapine, Ethanol, MPHP, Cotinine, Caffeine, Theobromine and 1,7-dimethylxanthine
Female, 56	Undetermined cause of death. Drug addict, with a background of alcoholism, addiction, and depression. Cadaver found at home.	PB: 63 ng/mL	Diazepam, Nordiazepam and Ethanol
		CB: 84 ng/mL	
Male, 36	Undetermined cause of death. Hepatitis C positive. Found on the public road, with signs of intoxication. Resuscitation manoeuvres were unsuccessful.	PB: 16 ng/mL	6-monoacetylmorphine, Codeine, Morphine, Diazepam and Nordiazepam
		CB: 27 ng/mL	
Male, 41	Undetermined cause of death. Drug addict. Consumption of synthetic drugs. Chronic medication is unknown.	PB: 227 ng/mL	Diazepam and Nordiazepam
Male, 24	Suicide by hanging; mechanical asphyxia. Possible consumption of drugs of abuse, not specified in the police report.	PB: 160 ng/mL	Alprazolam and Diazepam
		CB: 88 ng/mL	
Male, 57	Homicide: traumatic injury caused by assault with a knife. Drug addict, medicated with methadone.	PB: 109 ng/mL	EDDP, Methadone and MPHP
		CB: 61 ng/mL	
Male, 40	Undetermined cause of death. Multiple intestinal and stomach adhesions; intestines with purulent content and signs of necrosis.	PB: 47 ng/mL	Phenytoin, Levomepromazine and Mephenytoin
		CB: 51 ng/mL	

Male, 36	Suspected intoxication with "bloom". Drug addict, with a history of assiduous consumption of narcotics ("bloom"). The cadaver was found at home.	PB: 128 ng/mL	Methadone, Olanzapine, Paracetamol, Tramadol and metabolites, EDDP, Temazepam, Oxazepam, Nordiazepam, Diazepam and o-desmethyltramadol
		CB: 53 ng/mL	
Male, 37	Suicide by jumping off a bridge; traumatic injury (polytrauma).	CB: 60 ng/mL	Meconin, Codeine, and Morphine
Male, 31	The cause of death was a traumatic injury from falling from a high place with another individual; it is unknown whether by accident or in the context of aggression. Drug addict, regular consumer of "synthetic drugs".	PB: 100 ng/mL	Alprazolam, Diazepam, Nordiazepam, Oxazepam and Temazepam
		CB: 61 ng/mL	
Male, 47	Unknown cause of death. Drug addict.	PB: 215 ng/mL	EDDP and Methadone
Male, 53	The cause of death was a traumatic injury from falling from 15-20 meters height (domestic accident). Drug addict.	PB: 195 ng/mL	Ethanol, Diazepam, Nordiazepam and Temazepam

PB, peripheral blood; CB, cardiac blood.

Table II. Intraday precision (n = 5) and intermediate precision (n = 20).

	Spiked Concentration (ng/mL)											
	10			25			100			500		
	Measured Concentration (ng/mL)	CV (%)	Bias (%)	Measured Concentration (ng/mL)	CV (%)	Bias (%)	Measured Concentration (ng/mL)	CV (%)	Bias (%)	Measured Concentration (ng/mL)	CV (%)	Bias (%)
Intraday Precision	11.2	16.7	11.6	26.3	2.5	5.1	106.0	2.8	6.0	516.1	1.7	3.2
Intermediate Precision	10.4	2.4	4.3	26.3	7.0	5.3	105.8	7.6	5.8	520.8	7.3	4.2

Table III. Stability data (% difference) after storage at room temperature for 6 hours, after 48 hours on the autosampler, and after five freeze/thaw cycles.

Sample concentration (ng/mL)	Matrix	Bench-top (room temp.) (6 hours)	Autosampler (48 hours)	Freeze/Thaw (-15 °C) 14 days (5 cycles)	Freeze/Thaw (-15 °C) 21 days (5 cycles)
27.2	CB	-8.1	1.7	-11.1	-18.3
53.0	CB	-6.8	5.6	-12.3	-18.2
60.9	CB	-8.2	2.2	-10.2	-17.5
76.0	CB	-9.3	-9.8	-9.2	-17.7
100.2	PB	-5.4	9.5	-7.3	-12.3
127.2	PB	-1.7	14.7	-2.5	-4.2
132.7	PB	-1.9	13.9	-1.3	-3.1
170.4	CB	-0.6	6.9	-9.5	-10.0
226.4	CB	-1.1	17.4	-2.3	-3.4

FIGURE 1

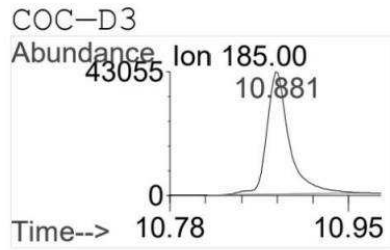
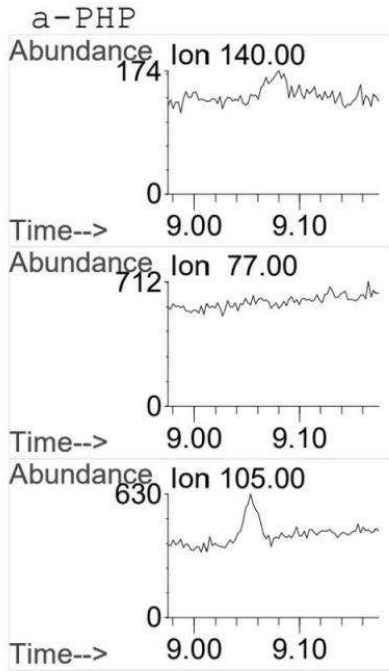
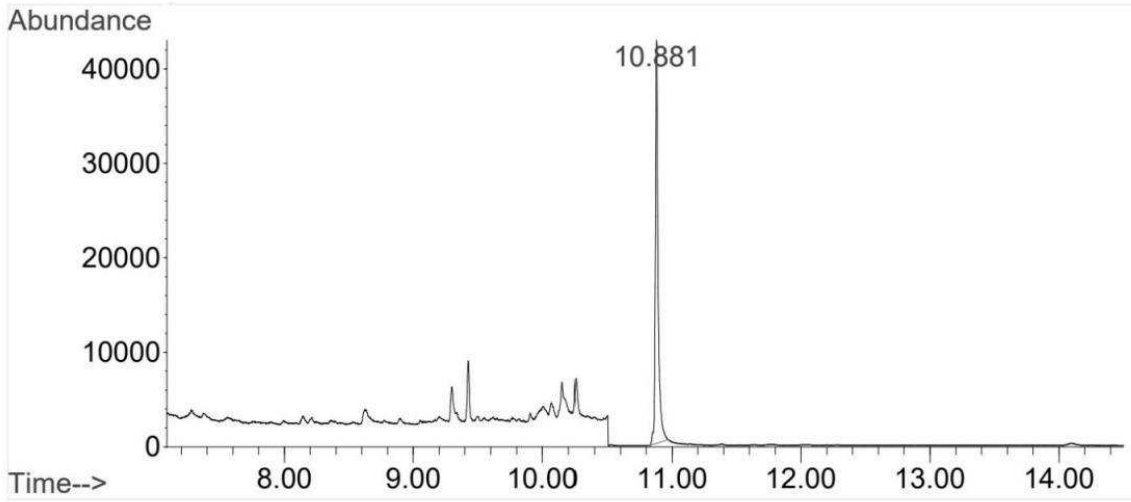


FIGURE 2

