



UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Adriana Brito dos Santos

**CONTRIBUTO PARA O ESTUDO DA ESTABILIDADE DE
DROGAS DE ABUSO EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS
ANALISADAS POR CROMATOGRÁFIA DE GÁS ACOPLADA À
ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Forense orientada pela Doutora Cláudia Isabel Reis Margalho e Prof. Doutora Maria Ermelinda Eusébio, e apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra/ Departamento de Química.

setembro de 2023

1 2



9 0

FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Contributo para o estudo da estabilidade de drogas de abuso em amostras biológicas analisadas por cromatografia de gás acoplada à espectrometria de massas

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Química Forense

Contribution to the study of the stability of drugs of abuse in biological samples analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry.

Autor

Adriana Brito dos Santos

Orientadores

Doutora Cláudia Isabel Reis Margalho

Prof. Doutora Maria Ermelinda Eusébio

Colaboração Institucional



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

Coimbra, setembro, 2023

RESUMO

O consumo de drogas de abuso tem vindo a aumentar ao longo dos anos, sendo assim um grave problema de saúde pública e estabilidade social. Face a este problema, o presente estudo tem como objetivo a deteção e confirmação das drogas de abuso, anfetamina, metanfetamina, morfina e benzoilecgonina (metabolito da cocaína), em amostras de fluido oral e soro provenientes de *kits da OraSure Technologies, Inc.* Estas amostras apresentavam, prazos de validade situados entre os anos, de 2021 e 2024 e foram armazenadas, à temperatura de 2-8°C. Foi objetivo de estudo avaliar a estabilidade destas amostras, no que diz respeito a estas drogas de abuso.

As substâncias foram extraídas através da técnica de precipitação proteica com acetonitrilo gelado e quimicamente derivatizadas por aquecimento induzido por microondas durante 90s (soluções de MBTFA para a anfetamina e metanfetamina e de MSTFA com 5% de TMCS para a morfina e benzoilecgonina). A identificação das substâncias foi realizada com um cromatógrafo de gases 7890B equipado com uma coluna cromatográfica HP-5MS (5% de fenilmetilpolisiloxano, 30m x 0,32mm; 0,25µm d.i.) e acoplado a um espectrómetro de massa de quadrupolo simples com uma fonte de impacto eletrónico de alta eficiência 5977A (GC-MS-EI, *Agilent Technologies*). Inicialmente, os cromatogramas foram adquiridos em modo *full SCAN* e após a análise dos padrões de fragmentação de cada substância foi usado o modo SIM (*selected ion monitoring*).

Foi possível confirmar a presença de anfetamina, metanfetamina, benzoilecgonina e morfina, de acordo com os critérios de aceitação da *World Anti-Doping Agency* (WADA) nas amostras de fluido oral e soro. Nas amostras de fluido oral, os resultados obtidos indicam que não há degradação de qualquer das drogas investigadas durante o período de armazenamento estudado. Os resultados do estudo preliminar realizado em soro apontam para o mesmo tipo de comportamento para a anfetamina, metanfetamina e morfina.

Palavras-chave: Drogas de abuso, estabilidade, fluido oral, soro, precipitação proteica, GC-MS-EI

ABSTRACT

The consumption of drugs of abuse has increased over the years, thus being a serious public health and social stability problem. Faced with this problem, the present study aims to detect and confirm the drugs of abuse, amphetamine, methamphetamine, morphine and benzoylecgonine, a cocaine metabolite, in oral fluid and serum samples from OraSure Technologies, Inc kits, with different expiration dates, between 2021 and 2024. All samples were stored under the same conditions, 2-8°C. The objective of this study was to evaluate the stability of these samples concerning these drugs of abuse.

The substances were extracted through the protein precipitation technique with iced acetonitrile and chemically derivatized by microwave-induced heating for 90s (MBTFA solutions for amphetamine and methamphetamine and MSTFA with 5% TMCS for morphine and benzoylecgonine). The identification of the substances was carried out with a 7890B gas chromatograph equipped with an HP-5MS chromatographic column (5% phenylmethylpolysiloxane, 30m x 0.32mm; 0.25µm i.d.) and coupled to a simple quadrupole mass spectrometer with a high-efficiency electronic impact source 5977A (GC-MS-EI, Agilent Technologies). Initially, the chromatograms were acquired in full SCAN mode, and after the analysis of the mass spectrums and fragmentation patterns of each substance, the SIM, selected ion monitoring, mode was used.

It was possible to confirm the presence of amphetamine, methamphetamine, benzoylecgonine and morphine, according to the acceptance criteria of the World Anti-Doping Agency (WADA) in the samples of oral fluid and serum. In the oral fluid samples, the results obtained indicate that there is no degradation of any of the drugs investigated associated with storage time.

Keywords: Drugs of abuse, stability, oral fluid, serum, protein precipitation, GC-MS-EI

Índice

Resumo.....	ii
Abstract	iv
Índice de Figuras.....	viii
Índice de Tabelas	xi
Abreviaturas	xv
1.1. Drogas de abuso.....	3
1.1.1. Opiáceos.....	4
1.1.2. Cocaína.....	5
1.1.3. Anfetaminas.....	7
1.2. Matrizes biológicas	8
1.2.1. Sangue, plasma e soro.....	9
1.2.2. Fluido oral (FO).....	10
1.2.3. Urina	12
1.2.4. Cabelo	13
1.2.5. Amostras colhidas em situações <i>post-mortem</i>	15
1.3. Estabilidade de drogas em matrizes biológicas	17
1.3.1. Resultados obtidos em estudos de estabilidade – revisão da literatura.....	17
1.4. Metodologias analíticas de tratamento de amostra	22
1.4.1. Precipitação proteica (PPE).....	22
1.4.2. Extração em fase sólida e extração líquido-líquido.....	23
1.5. Metodologias de análise cromatográfica.....	24
1.5.1. Cromatografia de Gás-Espetrometria de Massa	25
1.6. Objetivo.....	32
2.1. Padrões e reagentes	35
2.2. Amostras biológicas.....	35
2.3. Preparação de soluções de controlo, soluções de padrões internos, soluções de derivatizantes, amostras brancas e amostras.....	36
2.4. Equipamento.....	38
3.1. Espetros de massa em modo scan e seleção de iões a monitorizar.....	43
3.1.1. Anfetaminas.....	43
3.1.2. Opiáceos.....	47
3.1.3. Cocaína.....	49
3.2. Parâmetros de deteção das substâncias analisadas	53
3.3. Fluido oral	54
3.3.1. Confirmação de tempos de retenção e iões característicos	54
3.3.2. Pesquisa de drogas de abuso analisadas no SQTf-C.....	56
3.3.3. Teste de diferentes volumes de sobrenadante após precipitação proteica	59
3.3.4. Anfetaminas: análise das amostras em estudo e de amostras fortificadas (amostras controlo).....	62
3.3.5. Opiáceos e cocaína: análise das amostras em estudo e de amostras fortificadas (amostras controlo).....	67
3.4. Soro.....	69

3.4.1. Confirmação de tempos de retenção e iões característicos	69
3.4.2. Análise das amostras de soro e de amostras controlo	74
4. Conclusões	79
5. Referências bibliográficas	83
ANEXO A – Teste de diferentes volumes de sobrenadante	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química dos opiáceos morfina, heroína e codeína.	4
Figura 2. Metabolismo da morfina e seus precursores.....	5
Figura 3. Metabolitos da cocaína.....	6
Figura 4. Anfetamina e derivados.....	8
Figura 5. Vias de incorporação das drogas no cabelo [22].	14
Figura 6. Procedimento da extração em fase sólida (SPE) [48].	24
Figura 7. Cromatografia de gás-espectrometria de massa (GC-MS) [52].	26
Figura 8. Reagentes de derivatização por reação de sililação.	27
Figura 9. Reação de derivatização da benzoilecgonina e morfina com MSTFA.	28
Figura 10. Reagente de derivatização por reação de acilação.....	28
Figura 11. Reação de derivatização da anfetamina com MBTFA.....	29
Figura 12. Cromatógrafo de gases.	38
Figura 13. Cromatogramas em modo de varrimento total a) anfetamina (tr = 5,513 min) e metanfetamina (tr = 6,291 min) b) anfetamina-D6 (tr = 5,489 min) e metanfetamina-D9 (tr = 6,251 min).	43
Figura 14. a) Espetros de massa anfetamina (tr = 5,512 min) i. anfetamina-D6 (tr = 5,490 min) b) metanfetamina (tr = 6,291 min) ii. metanfetamina-D9 (tr = 6,247 min). .	44
Figura 15. Proposta de fragmentação da anfetamina (azul) e metanfetamina (vermelho) derivatizadas com MBTFA [70].	45
Figura 16. a) Cromatograma extraído para a anfetamina e metanfetamina com tempos de retenção de 5,5 e 6,3 min, respectivamente (m/z=115;118;140) b) Cromatogramas extraídos para os iões i. m/z= 115; 118 e 140 da anfetamina ii. Iões m/z= 110; 118 e 154 da metanfetamina.....	46
Figura 17. a) Cromatograma extraído para as substâncias anfetamina-D6 e metanfetamina-D9 com tempos de retenção de 5,5 e 6,3 min, respectivamente (m/z=144;161) b) Cromatogramas extraídos para o ião m/z= 144 da anfetamina-D6 e ião m/z= 161 da metanfetamina-D9.	47
Figura 18. Cromatograma em modo de varrimento total de todas as massas do espectro da morfina (tr = 12,1 min).....	47
Figura 19. Espetros de massa a) morfina (tr = 12,1 min) b) morfina-D3 (tr = 12,1 min)....	48
Figura 20. Proposta de fragmentação da morfina derivatizada com MSTFA-TMCS [71]..	48
Figura 21. a) Cromatograma extraído para a morfina, utilizando iões de m/z=236;414;429 b) Cromatogramas extraídos para os iões i. m/z= 236; 414 e 429 da morfina ii. ião m/z= 432 da morfina-D3.	49

Figura 22. Cromatogramas em modo de varrimento total (<i>full SCAN</i>) a) benzoilecgonina (tr = 11,1 min) b) benzoilecgonina-D3 (tr = 11,1 min).....	50
Figura 23. Espectros de massa a) benzoilecgonina (tr = 11,1 min) b) benzoilecgonina-D3 (tr = 11,1 min).....	51
Figura 24. Proposta de fragmentação da benzoilecgonina derivatizada com MSTFA-TMCS [72].	51
Figura 25. a) Cromatograma extraído para a benzoilecgonina com tempo de retenção de 11,1 min (m/z=82;240;361) b) Cromatogramas extraídos para os iões de m/z= 82; 240; 361 da benzoilecgonina.	52
Figura 26. Cromatograma extraído para a benzoilecgonina-D3 com tempo de retenção de 11,1 min (m/z=243).....	52
Figura 27. Cromatogramas extraídos a) para os iões selecionados (tr ≈ 5,7 min e tr ≈ 6,5 min) da amostra CT-FO-ANF a 50 ng/mL b) amostra branca (AB-FO-ANF).	54
Figura 28. Cromatogramas extraídos a) para os iões selecionados (tr ≈ 12,3 min) da amostra CT-FO-OP a 50 ng/mL b) amostra branca (AB-FO-OP).....	55
Figura 29. a) Cromatogramas extraídos a) para os iões selecionados (tr ≈ 11,3 min) da amostra CT-FO-COC a 50 ng/mL b) amostra branca (AB-FO-COC).....	55
Figura 30. Cromatogramas extraídos para os iões selecionados da anfetamina e substâncias relacionadas.....	58
Figura 31. Cromatogramas extraídos para os iões selecionados da morfina, codeína e 6-monoacetilmorfina	58
Figura 32. Cromatogramas extraídos para os iões selecionados da benzoilecgonina, cocaína e éster metílico da ecgonina.....	59
Figura 33. a) Cromatogramas extraídos, nos tempos de retenção e para os iões característicos de cada analito e PI da amostra FO-ANF-23; (I) foi recolhido 1,5 mL de sobrenadante aquando do tratamento da amostra (II) recolha de 1 mL de sobrenadante.	60
Figura 34. a) Cromatogramas extraídos, nos tempos de retenção e para os iões característicos de cada analito e PI da amostra FO-ANF-21; (I) foi recolhido 1,5 mL de sobrenadante aquando do tratamento da amostra (II) recolha de 1 mL de sobrenadante.	61
Figura 35. Cromatogramas extraídos a) para os iões selecionados (tr ≈ 5,5 min e tr ≈ 6,3 min) da amostra CT-SR-ANF a 100 ng/mL b) amostra branca (AB-SR-ANF)....	70
Figura 36. a) Cromatogramas extraídos para os iões selecionados (tr ≈ 12,3 min) da amostra CT-SR-OP a 100 ng/mL b) amostra branca (AB-SR-OP).	70
Figura 37. a) Cromatogramas extraídos para os iões selecionados (tr ≈ 11,3 min) da amostra CT-SR-COC a 100 ng/mL b) amostra branca (AB-SR-COC).	71
Figura 38. Cromatogramas extraídos para os iões selecionados das anfetaminas da amostra SR-ANF-24, sem adição de padrões internos.....	72
Figura 39. Cromatogramas extraídos para os iões selecionados da morfina, codeína e 6-monoacetilmorfina da amostra SR-OP-24, sem adição de padrões internos.....	73

Figura 40. Cromatogramas extraídos para os íões selecionados da cocaína, benzoilecgonina e éster metílico da ecgonina da amostra SR-COC-24, sem adição de padrões internos73

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Vantagens e desvantagens das matrizes biológicas para análise de drogas de abuso [9].	9
Tabela 2. Estabilidade de opiáceos em sangue/plasma/soro e fluido oral em diferentes condições de armazenamento.	18
Tabela 3. Estabilidade da cocaína e metabolitos em sangue, urina e fluido oral em diferentes condições de armazenamento.	20
Tabela 4. Estabilidade de anfetaminas em sangue/soro e urina em diferentes condições de armazenamento.	21
Tabela 5. Literatura sobre métodos de extração e análise instrumental de drogas de abuso em diferentes matrizes biológicas.	30
Tabela 6. Amostras de fluido oral e soro utilizadas neste trabalho com a designação e informação dada pelo fornecedor [66–69].	36
Tabela 7. Preparação das amostras controlo das anfetaminas em soro e fluido oral.	37
Tabela 8. Preparação das amostras controlo dos opiáceos e de cocaína em soro e fluido oral.	37
Tabela 9. Preparação das amostras controlo dos opiáceos e de cocaína em soro e fluido oral.	37
Tabela 10. Condições cromatográficas utilizadas nos ensaios por GC-MS.	38
Tabela 11. Parâmetros de deteção de anfetamina, metanfetamina, morfina e benzoilecgonina, adotados no método desenvolvido no SQTf-C, para a determinação destes compostos em sangue.	53
Tabela 12. Resultados dos tempos de retenção, iões característicos e sinal S/R da anfetamina, metanfetamina, morfina, benzoilecgonina e padrões internos respetivos, nas amostras de controlo.	56
Tabela 13. Substâncias analisadas no SQTf-C no método adotado neste trabalho: tempos de retenção e iões característicos.	57
Tabela 14. Análise das amostras FO-ANF-23 e FO-ANF-21 para teste do efeito de recolha de diferentes volumes de sobrenadante: 1,5 e 1 mL, após precipitação proteica.	60
Tabela 15. Resultados obtidos das razões das áreas do analito e padrão interno das amostras FO-ANF-23;21; FO-OP-23;21 e FO-COC-23;21.	61
Tabela 16. Tolerância máxima para as áreas relativas das transições iónicas [73].	62
Tabela 17. Resultados da análise das amostras FO-ANF-23; FO-ANF-22; FO-ANF-21 por comparação com um controlo a 125 ng/mL (ensaio 1).	63
Tabela 18. Resultados da análise das amostras FO-ANF-23; FO-ANF-22; FO-ANF-21 por comparação com um controlo a 50 ng/mL (ensaio 2).	63

Tabela 19. Resultados da análise das amostras FO-ANF-23; FO-ANF-22; FO-ANF-21 por comparação com um controlo a 50 ng/mL (ensaio 3).	64
Tabela 20. Resultados da análise das amostras FO-ANF-23; FO-ANF-22; FO-ANF-21 por comparação com um controlo a 50 ng/mL (ensaio 4).	65
Tabela 21. Concentrações da anfetamina e metanfetamina registadas para todos os ensaios (kits com prazos de validade de 2023, 2022 e 2021).	65
Tabela 22. Resultados da análise das amostras FO-OP-23; FO-OP-22; FO-OP-21 por comparação com um controlo a 50 ng/mL (ensaio 1).	68
Tabela 23. Resultados da análise das amostras FO-OP-23; FO-OP-22; FO-OP-21 por comparação com um controlo a 50 ng/mL (ensaio 2).	68
Tabela 24. Resultados da análise das amostras FO-COC-23; FO-COC-22; FO-COC-21 por comparação com um controlo a 50 ng/mL (ensaio 1).	68
Tabela 25. Resultados da análise das amostras FO-COC-23; FO-COC-22; FO-COC-21 por comparação com um controlo a 50 ng/mL (ensaio 2).	69
Tabela 26. Resultados dos tempos de retenção, iões característicos e áreas relativas da anfetamina, metanfetamina, morfina, benzoilecgonina e padrões internos respetivos, nas análises amostras de controlo (soro).....	71
Tabela 27. Resultados da análise das amostras SR-ANF-23; SR-ANF-22; SR-ANF-21 por comparação com um controlo a 250 ng/mL.	74
Tabela 28. Resultados da análise das amostras SR-OP-23; SR-OP-22; SR-OP-21 por comparação com um controlo a 250 ng/mL (ensaio 1).	75
Tabela 29. Resultados da análise das amostras SR-OP-23; SR-OP-22; SR-OP-21 por comparação com um controlo a 100 ng/mL (ensaio 2).	75
Tabela 30. Resultados da análise das amostras SR-OP-23; SR-OP-22; SR-OP-21 por comparação com um controlo a 100 ng/mL (ensaio 3).	75
Tabela 31. Resultados da análise das amostras SR-COC-23; SR-COC-22; SR-COC-21 por comparação com um controlo a 100 ng/mL.	76

ABREVIATURAS

6-MAM – 6-acetilmorfina

A_{analito} – Área do pico cromatográfico do analito

AB – Amostra branca

AM – do latim *Ante-mortem*

ANF – Anfetamina

A_{PI} – Área do pico cromatográfico do padrão interno

BE – Benzoilecgonina

BSTFA – *N,O*-bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida

COC- Cocaína

CT - Controlo

ECD – Detetor de Captura Eletrónica (do inglês, *Electron Capture Detector*)

ECO – Cocaetileno

EI – Impacto eletrónico (do inglês, *Electron Impact*)

EME – Éster metílico da ecgonina (do inglês, *Ecgonine Methyl Ester*)

F_{crit} – Valor crítico do parâmetro F de Fisher

FID – Detetor de Ionização de Chama (do inglês, *Flame Ionization Detector*)

FO – Fluído oral

G – Parâmetro de Grubbs

GC – Cromatografia de gás (do inglês, *Gas Chromatography*)

GC-MS - Cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (do inglês, *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*)

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês, *High performance Liquid Chromatography*)

HPLC-DAD/FLD - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detetor de Fotodíodos e Detetor de Fluorescência (do inglês, *High performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector/Fluorescence Detector*)

HV – Humor Vítreo

INMLCF, IP. – Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, Instituto Público

LC-MS – Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa (do inglês, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*)

LC-MS/MS - Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa Sequencial (do inglês, *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*)

LC-PDA - Cromatografia Líquida acoplada a Detetor de Fotodíodos (do inglês, *Liquid Chromatography- photometric diode array*)

LD – Limite de Detecção

LLE – Extração Líquido-Líquido (do inglês, *Liquid-Liquid Extraction*)

LQ – Limite de Quantificação

MBDB – Metilbenzodioxililbutanamina

MBTFA - *N*-metil-bis(trifluoroacetamida)

MDA – Metilenedioxianfetamina

MDMA – 3,4-metilenodioximetanfetamina

MDEA – 3,4-Metilenodioxi-*N*-etilanfetamina

MET – Metanfetamina

MS – Espectrometria de Massa (do inglês, *Mass Spectrometry*)

MSTFA – *N*-metil- *N*-trimetilsilil-trifluoroacetamida

m/z – Razão massa/carga

NCO – Norcocaína

nd – não detetado

NPD – Detetor Nitrogênio-Fósforo (do inglês, *Nitrogen-Phosphorus Detector*)

NSP – Novas Substâncias Psicotrópicas

OP - Opiáceos

PI – Padrão Interno

PM – Do latim, *Post-mortem*

PPE – Precipitação proteica

RPM – Redistribuição *Post-mortem*

s – desvio padrão amostral

SIM – Monitorização iônica simples (do inglês, *Selected Ion Monitoring*)

SNC – Sistema Nervoso Central

SPE – Extração em Fase Sólida (do inglês, *Solid Phase Extraction*)

SPME – Micro-extração em Fase Sólida (do inglês, *Solid-Phase Microextraction*)

spool – desvio padrão interpolado

SR - Soro

SQTF-C – Serviço de Química e Toxicologia Forense, Delegação do Centro

TCA – Ácido tricloroacético (do inglês, *Trichloroacetic acid*)

TCD – Detetor de condutividade térmica (do inglês, *Thermal conductivity detector*)

t_{crit} – Valor crítico do parâmetro t da distribuição de student

TIC – Cromatograma de Iões Totais (do inglês, *Total Ion Chromatogram*)

TMCS – Trimetilclorosilano

TMS – Trimetilsililo

t_r – Tempo de Retenção

$t_{r,r}$ – Tempo de Retenção Relativo

TV – Valor de teste

UE – União Europeia

UPLC-PDA – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Detetor de Fotodíodos (do inglês, *Ultra Performance Liquid Chromatography-photometric diode array*)

WADA – do inglês, *World Anti-Doping Agency*

\bar{x} – Média amostral

x_{ref} – Valor de referência

$\Delta t_{r,r}$ – Diferença relativa do tempo de retenção relativo

Capítulo 1

Introdução



1.1. Drogas de abuso

O consumo de drogas de abuso é um problema grave que ameaça a saúde e estabilidade social. O número global de pessoas que consomem drogas é esperado que cresça 25% até 2050, causando um impacto direto na segurança rodoviária e saúde pública [1].

Segundo o Relatório Europeu sobre Drogas de 2022, o consumo de drogas de abuso atinge números elevados em toda a União Europeia (EU). É estimado que aproximadamente 83,4 milhões de pessoas, constituindo 29% dos adultos (15-64 anos), tenham consumido pelo menos uma vez na vida, uma droga ilícita. Os canabinóides continuam a ser a classe de drogas mais consumida, seguidos da cocaína, das anfetaminas/metanfetaminas e por fim dos opiáceos [1].

Os dados sobre Portugal mostram que as drogas mais utilizadas são os opiáceos (39,4%) e a canábis (33,9%), representando assim o 10º e o 7º lugar, respetivamente, entre os países da UE. Foram registadas, em Portugal, no ano 2022, 72 mortes provocadas pelo consumo de drogas, na faixa etária entre os 15 e os 64 anos de idade [1,2].

Nos registos do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, Instituto Público (INMLCF, IP), em 2021, as perícias a drogas de abuso são as que apresentam um maior número de solicitações nas três delegações do país, comparativamente aos restantes exames efetuados. No ano 2020, somando as análises realizadas nas três delegações, foram registadas 38810 perícias de drogas de abuso. Em 2021 este valor aumentou 9%, passando a um total de 42177 perícias efetuadas [3].

A subida constante de consumo de drogas de abuso reforça a necessidade e importância de avanços nas metodologias analíticas para a identificação e quantificação destas substâncias e dos seus metabolitos em matrizes biológicas. Ao desafio que constitui a análise destas substâncias em amostras biológicas para propósitos forenses, acresce o aumento do número novas drogas psicoativas (NSP), requerendo desenvolvimento contínuo de métodos analíticos robustos.

A morfina, a benzoilecgonina, a anfetamina e a metanfetamina são as substâncias objeto de estudo desta dissertação.

1.1.1. Opiáceos

A primeira menção ao ópio remonta a tempos muito antigos, sendo este extraído de uma planta, a *Papaver somniferum*. A partir desta planta, foram sendo isolados vários tipos de opiáceos, como a morfina, isolada em 1809 por Friedrich Sertürner [4]. Os opiáceos podem ser divididos em opiáceos naturais quando não sofrem nenhuma modificação, como a morfina e a codeína (Figura 1), e semi-sintéticos, quando são resultantes de modificações parciais das substâncias naturais. É o caso da heroína (Figura 1) que é obtida da morfina por meio de uma pequena modificação química. Existem também opiáceos sintéticos, substâncias sintetizadas em laboratório, como o fentanil, carfentanil e metadona.

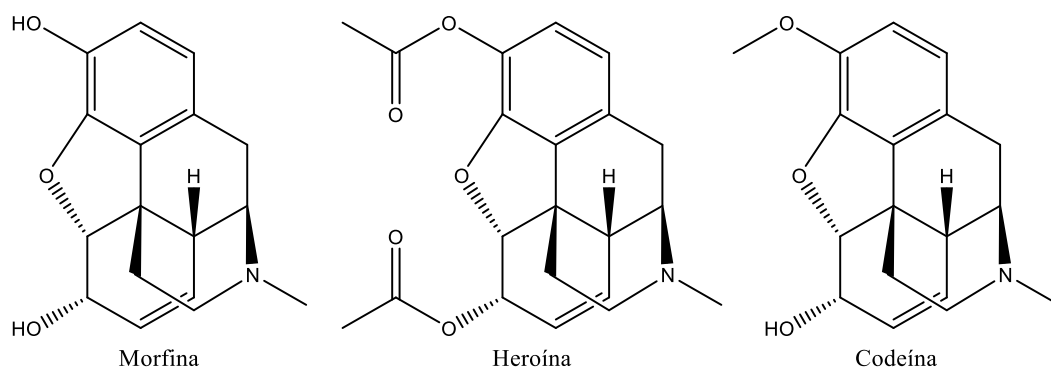


Figura 1. Estrutura química dos opiáceos morfina, heroína e codeína.

Os opiáceos exercem os seus efeitos por interação com os recetores opioides no sistema nervoso central e periférico. Os efeitos farmacológicos provocados incluem analgesia (alívio da dor), miose, sedação, depressão respiratória, ansiedade e dependência física [4].

A morfina é o principal alcaloide do ópio. É utilizada como medicamento para alívio da dor, mas também de forma recreativa ou para preparar outros opiáceos ilícitos. Atua diretamente no sistema nervoso central para induzir analgesia e alterar a percepção e resposta emocional à dor. A dependência física e psicológica pode ser desenvolvida quando ocorre uma administração repetida. O seu efeito máximo é atingido após 20 minutos, quando administrada intravenosamente e 60 minutos quando a administração é oral, os seus efeitos podem durar entre 3 e 7 horas.

A metabolização da morfina ocorre no fígado, e aproximadamente 87% da dose da morfina é excretada na urina nas primeiras 72 horas de administração.

A morfina é também utilizada para preparar codeína, através de um processo de metilação, sendo um precursor de vários outros opiáceos incluindo a heroína (3,6-diacetylmorfina), hidromorfona e oximorfona. A heroína foi sintetizada pela primeira vez em 1898 por Dreser, por reação de acetilação de morfina com anidrido acético. A heroína é

rapidamente metabolizada a 6-monoacetilmorfina (6-MAM) e depois novamente em morfina (Figura 2) [5].

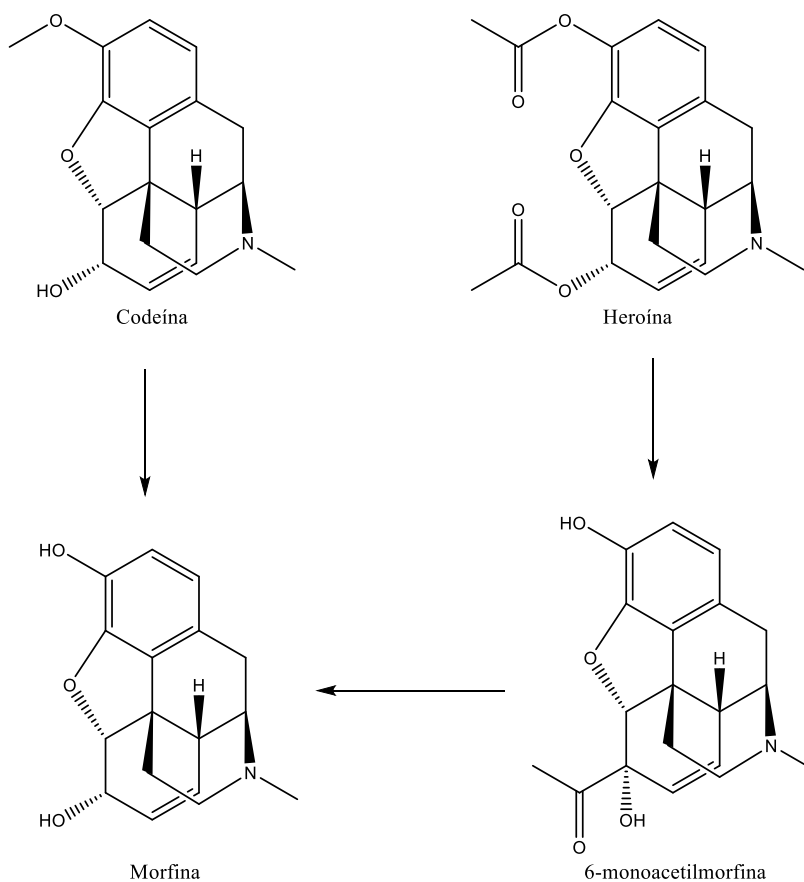


Figura 2. Metabolismo da morfina e seus precursores.

1.1.2. Cocaína

A cocaína (COC) (Figura 3), principal alcaloide encontrado nas folhas do arbusto da coca, é um potente estimulante do sistema nervoso central e uma droga de abuso largamente consumida por todo o mundo, tornando-se muito importante a sua identificação e quantificação em toxicologia forense [6].

A COC é rapidamente inativada no sangue através da hidrólise das ligações éster, transformando-se em benzoilecgonina (BE) e éster metílico da ecgonina (EME) (Figura 3), os seus dois metabolitos principais, que são inativos, mas bastante úteis na detecção de abuso de cocaína devido aos seus tempos de meia-vida elevados nas matrizes biológicas (aproximadamente, 5 vezes superior à cocaína). A COC é hidrolisada a norcocaína (NCO), metabolito ativo, ou a cocaetilenol (ECO) se houver presença de etanol no sangue [6] (Figura 3).

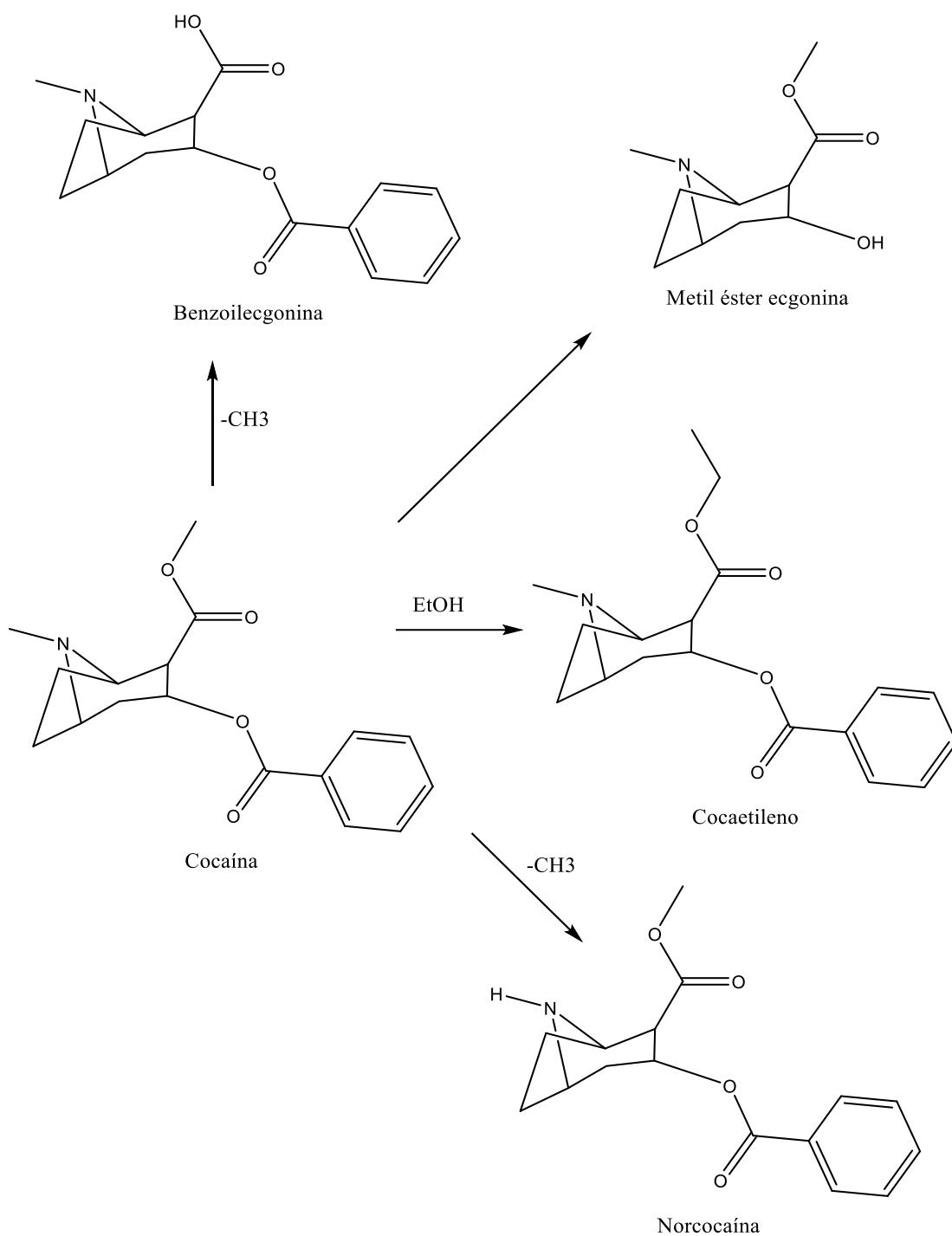


Figura 3. Metabolitos da cocaína.

Os perfis metabólicos e as janelas de detecção são diferentes dependendo da matriz biológica. Após a administração de cocaína, o composto maioritário detetado no sangue e urina é a BE, enquanto a droga mãe possui a maior concentração noutras matrizes como cabelo, saliva e suor. Relativamente às janelas de detecção, a BE pode ser detetada no sangue e saliva até um dia após consumo, na urina por vários dias, no suor por duas a três semanas e no cabelo de meses a anos, dependendo do seu comprimento [5]. A benzoilecgonina pode ser

detetada na urina a níveis de concentração de cerca 300 ng/mL ou superiores, até 22 dias após o último uso de cocaína. Um resultado positivo de benzoilecgonina na urina é considerado evidência de consumo de cocaína.

1.1.3. Anfetaminas

As anfetaminas são substâncias sintéticas, estimulantes do sistema nervoso central (SNC), que possuem a estrutura química da β -fenetilamina. O composto foi sintetizado pela primeira vez em 1887 e vem sendo utilizado desde 1935 no tratamento da obesidade, narcolepsia e hipotensão. A anfetamina é frequentemente consumida pelos seus efeitos estimulantes. É também um metabolito de outras drogas como fenetilina, femproporex e metanfetamina.

A anfetamina é em grande parte inativada durante o metabolismo, sofrendo a perda do grupo amina para originar a fenilacetona, que é posteriormente oxidada em ácido benzoico e excretada como conjugados.

A metanfetamina (MET), um potente estimulante aditivo, foi sintetizada pela primeira vez para uso terapêutico no início dos anos 1900. A MET é maioritariamente (90%) eliminada na urina. Numa urina com pH entre 6-8, cerca de 20% de MET é excretada na forma inalterada e 4-7% como anfetamina [7].

Da anfetamina podem derivar várias drogas, como 3,4-metilenedioxianfetamina (MDA), 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), 3,4-metilenodioxietilanfetamina (MDEA), *N*-metil-1-(3,4-metilenodioxifenil)-2-butanamina (MBDB) (Figura 4). A MDA foi sintetizada pela primeira vez em 1910, uma substância estimulante do SNC, tendo uma ação alucinógena. Também a MDEA, derivado da anfetamina, provoca estimulação do SNC. A MDMA, conhecida como ecstasy, de entre os derivados de anfetamina é a mais utilizada de forma ilícita. O seu consumo está relacionado com a procura de efeitos de euforia, aumento da capacidade de comunicação e autoconfiança [8]. A MBDB é o análogo alfa-etilo da MDMA, possuindo efeitos semelhantes, mas de menor intensidade.

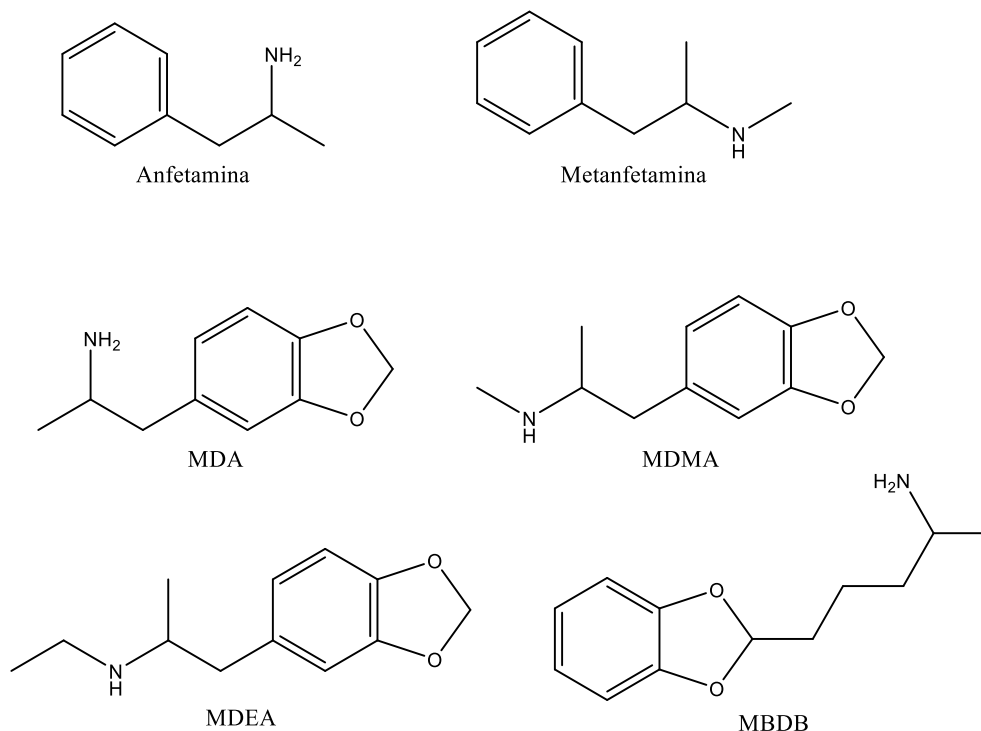


Figura 4. Anfetamina e derivados.

1.2. Matrizes biológicas

A toxicologia forense, conjugando os princípios da química analítica com os da toxicologia, procura dar resposta a questões judiciais relacionadas com a exposição a substâncias tóxicas. Baseia-se na análise de amostras biológicas (fluidos e tecidos) para a deteção, confirmação e quantificação de xenobióticos, onde se incluem as drogas de abuso. O relatório toxicológico providencia informações essenciais quanto ao tipo de substância e a sua concentração, de modo a permitir determinar o estado de influência do indivíduo.

Existem diferentes matrizes biológicas que são utilizadas em toxicologia forense para a deteção de drogas de abuso (Tabela 1). Nas análises toxicológicas de amostras *ante-mortem* (AM) podem ser utilizadas as matrizes sangue, urina, fluido oral e cabelo, sendo a urina e o sangue as matrizes biológicas mais usadas. Em casos de amostras *post-mortem* (PM), poderá estar disponível também humor vítreo, conteúdo gástrico, rim, fígado, bÍlis e líquido pericárdico.

O conteúdo gástrico pode ser útil para a identificação de drogas quando o tempo após ingestão é curto, uma vez que é mais provável ter grande quantidades da forma inalterada da droga ingerida [9].

Em algumas circunstâncias, poderá ser útil utilizar matrizes alternativas como o cabelo, unhas, suor ou pele, de forma a completar a investigação toxicológica porque muitas drogas são excretadas e acumuladas nestas matrizes [9].

Algumas vantagens e desvantagens das diferentes matrizes biológicas, para análise de drogas de abuso, estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1. Vantagens e desvantagens das matrizes biológicas para análise de drogas de abuso [9].

Matriz biológica	Vantagens	Desvantagens
Sangue	Correlação entre as concentrações e efeitos Possibilidade de colheita de sangue periférico, femoral e cardíaco	Concentração da droga sujeita a alterações PM Local de colheita pode influenciar a concentração das drogas Amostras PM apresentam-se com elevada frequência hemolisadas e com coágulos Possível distribuição desequilibrada entre plasma e o sangue total
Urina	Muitas drogas e metabolitos são detetados em concentrações elevadas Maior janela de deteção do que no sangue	Nem sempre é possível estabelecer uma correlação entre as concentrações das drogas detetadas com as presentes no sangue
Fluido oral	Fácil colheita e não invasiva	Drogas são detetadas por períodos mais curtos que no sangue e urina Concentração da droga pode variar consoante o tipo de colheita
Fígado	Muitas drogas e metabolitos estão presentes em altas concentrações	Baixa correlação com os efeitos da droga Preparação da amostra mais complexa
Humor vítreo	Menor risco de contaminação	Boa correlação da concentração da droga com a do sangue apenas após estabelecido equilíbrio
Cabelo	Maior período de deteção Colheita não invasiva	Possibilidade de contaminação externa

1.2.1. Sangue, plasma e soro

O sangue é uma das matrizes de maior interesse toxicológico, uma vez que tem vantagens únicas em relação a outras. A principal vantagem é a possibilidade de correlação entre as concentrações das substâncias presentes e os efeitos no organismo [10].

A amostra de sangue pode ser analisada na sua forma total, plasma (sobrenadante obtido por centrifugação do sangue após adição de anticoagulante) ou soro (plasma sem os fatores de coagulação, obtido por coagulação sanguínea). A utilização do sangue total é a mais indicada quando o objetivo é a quantificação das drogas.

As amostras de soro ou plasma apresentam percentagens de água 12 e 18% superiores a amostras de sangue total, levando assim a diferenças de concentrações entre as matrizes. Em casos PM, a obtenção de soro e/ou plasma é de extrema dificuldade, utilizando-se assim o sangue total [11].

A grande vantagem do sangue como amostra analítica é que os resultados quantitativos obtidos da sua análise podem fornecer informação sobre o estado em que se encontrava o organismo no momento da sua colheita. Por outro lado, existe uma extensa base de dados onde a concentração das drogas no sangue tanto em amostras AM como em PM são correlacionadas com os efeitos relativos a essas concentrações [12].

Um aspeto importante a ter em consideração na colheita de amostras de sangue, particularmente amostras PM, é o local de onde o sangue foi colhido, uma vez que as concentrações das drogas diferem consoante o local da colheita. Esta distribuição heterogénea dos analitos nas amostras de sangue de diferentes locais pode dever-se à falta de equilíbrio de distribuição antes da morte ou ao fenómeno de redistribuição *post-mortem* (RPM). Devido a estes fatores, nos casos PM, é comum efetuar colheitas de sangue periférico (veia femoral) e de sangue cardíaco (recolhidas de ambos os lados do coração). Destas amostras, o sangue periférico é o mais adequado para efetuar quantificações e o sangue cardíaco é usado para a análise qualitativa, uma vez que pode ser afetado pelo fenómeno RPM [12,13].

1.2.2. Fluido oral (FO)

O fluido oral tem vindo a ser estudado como uma matriz alternativa para a quantificação das drogas de abuso desde 1970. O uso desta matriz tem diversas vantagens, que incluem o facto de o procedimento de colheita ser não invasivo, difícil de adulterar e a possibilidade de detetar consumo recente de drogas. Por outro lado, as suas desvantagens incluem: contaminação da mucosa oral e do FO, quando as drogas são fumadas, inaladas ou administradas oralmente (aumento da sua deteção, mas diminuição da correlação com as concentrações do sangue durante 30-60 minutos); a colheita de uma pequena quantidade de volume e uma pequena janela para a deteção de drogas [14].

A saliva é o produto da excreção originado por três grandes glândulas salivares (parótida, submandibular e sublingual). Uma vez que esta excreção é na verdade uma mistura

de fluidos, emprega-se o termo fluido oral. O principal constituinte do fluido oral é a água, representando cerca de 99%, sendo o restante constituído por proteínas (mucinas e enzimas digestivas) e sais minerais [15].

O pH do FO é 6,8 em situações de descanso, contudo um aumento no fluxo salivar torna-o mais básico, aproximando-se ao pH do plasma. Todas estas características são influenciadas por uma variedade de fatores, como estímulos salivares, mudanças hormonais, ansiedade e consumo de drogas terapêuticas, podendo o valor de pH variar de acordo com a literatura em diferentes intervalos: (5,6 - 7,9 e 4 - 6) [15–17].

Vários fatores podem influenciar a concentração das drogas no fluido oral. Os constituintes do sangue podem ser transferidos para a saliva por vias intracelulares (difusão) ou extracelulares (ultrafiltração). A maioria das drogas de abuso utilizam o mecanismo de difusão, que pode ser afetado pelo pH das duas fases, e também pelo pKa, grau de ionização, ligação a proteínas, peso molecular e solubilidade lipídica da droga. A via de administração também pode influenciar a concentração no FO durante a primeira meia-hora após administração [14]. Deste modo, as concentrações das drogas no fluido oral representam a fração livre, não ionizada da presente no sangue, podendo ser assim relacionadas com as concentrações de droga livre no sangue e com os efeitos farmacológicos das drogas [15].

Por outro lado, as drogas que são ingeridas por via oral e as que podem ser fumadas podem ser detetadas em altas concentrações no fluido oral após uso recente, devido a quantidades residuais da droga que permanecem na cavidade oral. Assim, os resultados para estas substâncias podem não ser os mais corretos porque a concentração da droga encontrada no fluido oral pode não refletir a concentração real [15].

As drogas podem ser detetadas no FO por curtos períodos de tempo, normalmente entre 12 a 24 horas após consumo. Assim, o FO é adequado para a deteção de uso recente de drogas, por exemplo suspeita de conduzir sob efeito. Uma das grandes vantagens do FO em oposição ao sangue passa por um procedimento de colheita não invasivo e a possibilidade de ser realizado por pessoas sem prática médica. Deste modo, a colheita de FO pode ser realizada sob observação direta, diminuindo assim o risco de adulterar as amostras [16].

Uma das desvantagens do FO é o volume reduzido de amostra disponível para realizar a análise toxicológica, por isso é crucial possuir um método que analise vários analitos em simultâneo e com baixos limites de deteção [16].

Na detecção de drogas de abuso em FO, frequentemente é a droga mãe que está presente nesta matriz e poderá refletir as concentrações da droga livre no plasma, providenciando uma melhor correlação com os efeitos farmacodinâmicos. Um exemplo de aplicação desta matriz, é dado nos casos de diferenciação de ingestão de heroína, de morfina ou codeína. Em testes de urina, esta diferenciação pode ser difícil devido à metabolização, contudo no FO é frequente detetar 6-acetilmorfina e heroína (Figura 2), marcadores evidentes do consumo de heroína [17]. A detecção de heroína no FO ocorre apenas nas primeiras 5 horas após a última dose tomada [12].

As bases fracas são detetadas em maiores concentrações e por períodos de tempo mais longos no FO do que no plasma devido à protonação. Dependendo do pKa da droga e da lipofilicidade, a protonação ocorre devido às diferenças de pH no sangue (7,4) e no FO (4-6). A fração da droga livre, não ionizada, está em equilíbrio nas membranas que separam o sangue e o FO. No pH mais baixo do FO, as bases fracas ionizam, aumentando assim as concentrações das drogas no FO [17].

No FO, a cocaína pode ser detetada num período de 5 a 12 horas após uma única dose. Através de métodos analíticos capazes de detetar concentrações da ordem de 1 ng/mL, também é possível detetar BE num período de 12 a 24 horas [18].

Uma vez que a cocaína é uma base fraca a protonação no FO é expectável. Em colheitas simultâneas de amostras de plasma e FO, Bosker et al. [17] encontraram concentrações de cocaína maiores no plasma do que no FO, e o oposto para o metabolito BE, mais polar. As concentrações de cocaína e benzoilecgonina são 5 e 2,5 vezes mais altas, respetivamente, na saliva do que no soro em indivíduos que tenham consumido cocaína, dentro das primeiras 24 horas.

As anfetaminas são bases fracas, ocorrendo assim, também, protonação no FO, levando a um aumento das suas concentrações nesta matriz [17].

1.2.3. Urina

A análise de urina possui inúmeras vantagens: a colheita de forma não invasiva; o facto de numerosas drogas e/ou os seus metabolitos serem excretados e detetáveis nesta matriz; a presença de drogas poder ser detetada de horas a vários dias após o seu consumo [12].

Como a urina é principalmente constituída por água e possui quantidades baixas de substâncias orgânicas e inorgânicas, podem ser utilizados métodos analíticos mais simples no que diz respeito à preparação de amostra [12]. Uma das grandes desvantagens da urina é a

possibilidade de ser passível de adulteração. Uma das técnicas de adulteração da urina é a sua diluição.

A urina é a matriz biológica preferencial para testes *screening* uma vez que as drogas e seus metabolitos estão mais concentrados nesta matriz do que no sangue, plasma e soro. Contudo, as concentrações das drogas na urina não têm correlação com as concentrações da droga no sistema circulatório. As matrizes sangue ou plasma/soro são necessárias para determinar o grau de intoxicação e o estado de influência do indivíduo, através da quantificação das substâncias presentes nessas matrizes [19].

As anfetaminas são substâncias lipofílicas e com boa absorção oral. O seu tempo de meia-vida é de aproximadamente 10 horas e podem ser detetadas na urina após 3 horas independentemente da via de administração e manterem-se detetáveis durante 1 até 3 dias após uma única dose e caso seja um uso crônico, entre 7 a 10 dias [20]. Se o pH da urina for normal (5,5 – 7,5), aproximadamente 30% da anfetamina ingerida é eliminada na forma inalterada, contudo se o pH for 5, a quantidade de anfetamina inalterada eliminada é de 74%. [18]. A cocaína é rapidamente metabolizada no sangue e fígado após inalação e apenas pequenas quantidades da droga mãe são excretadas na urina. A BE e EME são os dois metabolitos principais da cocaína. O tempo de meia-vida da cocaína varia de 0,5-1,5 horas, EME de 3-4 horas e BE de 4-7 horas. Uma vez que a BE é o metabolito com maior tempo de meia-vida, é mais facilmente detetado [20].

1.2.4. Cabelo

A análise do cabelo tem adquirido cada vez mais importância por oferecer vantagens únicas em termos de detecção e monitoramento do consumo de várias substâncias. Esta matriz apresenta a grande vantagem de ter uma janela de detecção mais longa quando comparada com outras matrizes biológicas, como o sangue e a urina (meses a anos) [21].

O cabelo é uma estrutura filamentosa constituído por proteínas, maioritariamente queratina (65-95%), água (15-35%), lípidos (1-9%) e minerais (0,25-0,95%) [15]. O mecanismo da incorporação das drogas no cabelo permanece pouco claro. Existem três vias de incorporação das drogas no cabelo: diretamente dos capilares sanguíneos, do sebo e suor, e por contaminação externa (Figura 5) [22,23].

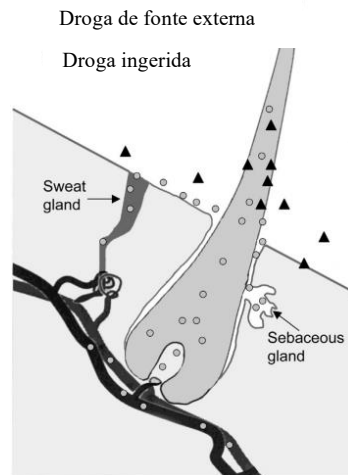


Figura 5. Vias de incorporação das drogas no cabelo [22].

Existem diferentes modelos propostos de incorporação das drogas no cabelo. Um dos modelos aceites assume que as drogas e os seus metabolitos são incorporados no cabelo por difusão passiva através de capilares sanguíneos para as células da matriz crescente, na base do folículo de cabelo. À medida que as células se alongam e envelhecem, elas morrem e aglutinam-se, formando a fibra capilar que transporta a droga incorporada na matriz. Outro mecanismo possível envolve contaminações ambientais (fumo, poeira ou transferência física por contaminação das mãos) [23].

A deposição das drogas no cabelo pode ser influenciada pelo conteúdo da melanina do cabelo, cor do cabelo, origem étnica, lipofilicidade, polaridade e basicidade da droga mãe ou os seus metabolitos. Geralmente, cabelo com pigmentação preta tem tendência a ligar-se em maior quantidade às drogas porque os analitos demonstram uma maior afinidade à melanina no cabelo pintado. A melanina tem uma natureza hidrofóbica e acídica, o que torna este pigmento responsável pela afinidade do cabelo a drogas alcalinas tais como, a cocaína e codeína. Moléculas lipofílicas e básicas incorporam-se melhor que analitos polares [23].

As vantagens da análise do cabelo em relação a outras matrizes biológicas convencionais, para além das já referidas, são a colheita fácil e não invasiva, facilidade de transporte e de armazenamento (estrutura sólida assegura estabilidade longa) e o facto de ser adequada para a deteção de analitos tanto orgânicos como inorgânicos [12]. Em casos PM, na investigação de consumo de drogas, quando já decorreu um período de tempo longo após a morte, uma amostra de cabelo pode ser a única amostra biológica disponível para análise [23].

Contudo esta matriz também apresenta limitações. A deteção de consumo recente de droga, até cerca de 7 dias, não é possível. São necessários métodos que permitem detetar concentrações muito baixas e o custo de análise pode ser superior ao das outras matrizes. A

interpretação dos resultados analíticos é mais difícil, devido à complexidade e variabilidade da incorporação das drogas no cabelo [23].

A detecção de metabolitos da droga nas análises de cabelo confirma o consumo. Contudo, existem dificuldades de interpretação quando os metabolitos não são detetados. No caso dos canabinóides e cocaína, por exemplo, os metabolitos relevantes são incorporados no cabelo em quantidades pequenas em comparação com a droga mãe e podem estar presentes em níveis abaixo do limite de detecção dos métodos analíticos [24].

1.2.5. Amostras colhidas em situações *post-mortem*

1.2.5.1. Humor vítreo

O humor vítreo (HV) é uma matriz alternativa comumente utilizada em análises toxicológicas PM e a sua aplicação na análise forense tem início em 1960. Até aos dias de hoje, muitas análises se realizam no HV para determinar etanol, algumas drogas de abuso e compostos endógenos. Normalmente, esta matriz é de grande importância quando as amostras de sangue e urina não estão disponíveis ou estão em condições inapropriadas para análise, como casos de embalsamento, corpos queimados ou em avançado estado de decomposição, uma vez que esta matriz está mais protegida (situada dentro da cavidade ocular) e assim sujeita a menos contaminações [23].

O HV é um líquido gelatinoso. A sua composição é essencialmente água (cerca de 98%), incluindo outros componentes como lípidos, eletrólitos, proteínas e outras substâncias. As drogas presentes na circulação sanguínea podem atingir o HV através da barreira hemato-retiniana por difusão passiva ou transporte ativo. As drogas que ultrapassam esta barreira estão na sua forma livre (sem ligação a proteínas), assim drogas que possuam baixa ligação às proteínas, estão em maiores níveis no HV [23].

Esta matriz apresenta grandes vantagens comparativamente a outros fluidos. A composição do HV torna-o uma matriz mais limpa, com menos interferentes, aquosa e com baixos conteúdos de proteínas. Situa-se numa região do corpo protegida contra contaminações e atividade microbiana, especialmente por se encontrar afastada do trato gastrointestinal [23].

Esta matriz possui algumas limitações, como um baixo volume disponível de amostra disponível para a realização das análises toxicológicas, e porque a barreira hemato-retiniana restringe a incorporação de algumas drogas [23]. Por exemplo, a cocaína e os seus metabolitos (BE e EME) são facilmente detetados nesta matriz existindo uma boa correlação

das concentrações destas substâncias com as suas concentrações no sangue. O metabolito BE como é mais hidrofílico que a cocaína tem maior dificuldade em atravessar a barreira hemato-retiniana [25,26].

Os opiáceos são uma das classes de drogas de abuso mais analisadas no HV. A 6-MAM possui uma janela de detecção de 1-2 horas no sangue, e no HV este metabolito é detetado por mais tempo. Contudo, a janela de detecção, em ambas as matrizes, depende da dose administrada, da via de administração e da frequência de consumo de heroína [26].

1.2.5.2. Fígado, rim e conteúdo gástrico

Existem várias razões para o fígado ser selecionado como matriz para análise toxicológica PM. O fígado é o órgão principal para onde as drogas são distribuídas e metabolizadas, após administração oral e absorção no trato gastrointestinal. Deste modo, muitas drogas e seus metabolitos são encontradas em maior concentração neste órgão do que em sangue e outras matrizes. Para além disso, é usada como matriz complementar ou alternativa ao sangue quando este não está disponível para a colheita devido a fatores como putrefação, decomposição ou perda significativa de sangue (exsanguinação) [12].

No que diz respeito ao rim, muitas drogas são eliminadas por este órgão através da urina. O rim é uma matriz biológica importante em casos de suspeita de envenenamento por metais pesados, devido à acumulação neste órgão [10].

O conteúdo gástrico é uma amostra útil na detecção de uma ingestão recente de drogas porque as drogas podem estar presentes em quantidades na ordem dos miligramas ou até mesmo do grama ao contrário dos valores da ordem de nanogramas encontrados no sangue e urina [12]. A colheita e análise do conteúdo gástrico é útil mesmo quando há evidência de que a administração da droga tenha sido feita por outra via que não a via oral. As drogas alcalinas podem ser detetadas no conteúdo gástrico independentemente da via de administração porque têm tendência a ficar retidas no compartimento gástrico devido ao seu baixo pH. O conteúdo do estômago colhido deve ser homogeneizado, antes de se realizar a análise, por não se tratar de uma amostra homogénea [12].

Neste trabalho foram apenas estudadas as matrizes biológicas, soro e fluido oral.

1.3. Estabilidade de drogas em matrizes biológicas

A estabilidade de drogas em amostras biológicas pode ser influenciada por vários fatores que podem afetar a integridade e a concentração das drogas presentes nessas matrizes, com conseqüente possibilidade de influenciar significativamente os resultados analíticos. A estabilidade dos analitos presentes em amostras PM pode diferir em relação às amostras AM, devido à maior probabilidade de influência da atividade microbiana no primeiro caso. Alguns dos principais fatores que podem afetar essa estabilidade incluem: o tempo decorrido entre a colheita e a análise, devido à possibilidade de degradação e/ou transformação em metabolitos, a temperatura de armazenamento (congelamento ou calor excessivos pode originar degradação dos analitos); uso (ou a sua ausência) de substâncias de preservação; exposição direta e /ou prolongada à luz solar; pH (alteração de pH pode acelerar o processo de degradação); contaminação por microorganismos; características específicas dos diferentes tipos de amostras biológicas. Devido à complexidade de todos estes fatores, é crucial, para garantir resultados precisos e fiáveis, a utilização de procedimentos adequados de colheita e armazenamento das amostras biológicas e usar métodos analíticos suficientemente sensíveis para detetar os analitos presentes [12].

1.3.1. Resultados obtidos em estudos de estabilidade – revisão da literatura

1.3.1.1. Estabilidade dos opiáceos

Na Tabela 2, estão resumidos vários estudos realizados para determinar a estabilidade dos opiáceos em diferentes matrizes e condições de armazenamento.

Segundo estas investigações da estabilidade dos opiáceos, é possível constatar que as alterações das concentrações da maioria dos opiáceos no sangue e urina, quando armazenados durante meses ou anos a temperaturas iguais ou inferiores a -20°C , são mínimas e aceitáveis.

Contudo, existe uma exceção a esta estabilidade dos opiáceos, os ésteres, heroína e 6-acetilmorfina (6-MAM). A estabilidade da heroína é aumentada quando todas as amostras são armazenadas com fluoreto de sódio (NaF) e congeladas. A maior instabilidade da 6-MAM comparativamente com a morfina e codeína em amostras de sangue armazenadas a -20°C durante meses ou anos é significativa. A deteção da 6-MAM é importante, uma vez que é um indicativo de consumo de heroína [12].

Papoutsis et al. [27] estudaram o impacto dos recipientes de armazenamento (vidro, polipropileno e poliestireno) e adição de preservantes ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$, K_2EDTA e NaF). Constatou-

se que a adição de anticoagulantes ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$, K_2EDTA) não melhorou a estabilidade dos analitos morfina, codeína e 6-MAM, mas a adição de NaF teve impacto. Foi observada uma menor degradação em amostras armazenadas em vials de vidro a -20°C , sendo que o 6-MAM foi o analito mais instável.

Tabela 2. Estabilidade de opiáceos em sangue/plasma/soro e fluido oral em diferentes condições de armazenamento.

Analito e metabolitos	Matriz	Condições de armazenamento	Período de armazenamento	Efeito na concentração do analito	Ref.
Morfina				94% ^(a)	
Morfina-3-glucuronideo	Plasma e sangue	Amostras fortificadas* Sem conservantes -20°C Sem luz	181 dias	93% ^(a)	[28]
Morfina-6-glucuronideo				77% ^(a)	
Morfina	Sangue PM	Com NaF (0,4%) -20°C	124 dias	666 ng/mL ^(b)	
Morfina-3-glucuronideo				24 ng/mL ^(b)	
Morfina-6-glucuronideo				66 ng/mL ^(b)	
Morfina	Sangue PM	Com NaF (0,4%) -20°C	8 anos	-12% ^(c)	[29]
Codeína	Sangue PM	Com NaF (0,4%) -20°C	9 anos	-11% ^(c)	
Codeína Fentanil Hidromorfona Metadona Morfina Oxicodona	Plasma	-18°C	84 dias	< 10% ^(c)	[30]
Morfina Codeína	Sangue PM	-20°C	16-18 anos	+19% ^(c)	[31]
				-4% ^(c)	
Morfina 6-MAM	Fluído oral	25°C	48-72 horas	11,8% ^(a)	[32]
				97,7% ^(a)	
6-MAM	Fluído oral	25°C	7 dias	78% ^(a)	
Morfina	Fluído oral	5°C	30 dias	78 ng/mL ^(d)	[33]
		20°C		77 ng/mL ^(d)	
		40°C		74 ng/mL ^(d)	
Morfina	Soro	-20°C	6 meses	-5% ^(c)	[34]
Morfina Codeína	Sangue	Com NaF Tubos (vidro, polipropileno e poliestireno) 4°C	1 mês	<17,0% ^(c) 14,9% ^(c)	[27]
6-MAM	Sangue	Sem conservantes 4°C	1 mês	94,3% ^(c)	[27]

-20°C	3 meses	72,0% ^(c)
-------	---------	----------------------

^aRecuperação

^bConcentrações iniciais: 564; 460; 190 ng/mL

^cVariação da concentração em %

^dConcentrações iniciais: 81; 79; 77 ng/mL

*Amostras fortificadas com 200 ng morfina e morfina-6-glucuronideo e 1000 ng de morfina-3-glucuronideo

1.3.1.2. Estabilidade da cocaína

Quimicamente a cocaína (metilbenzoilecgonina) é um éster do ácido benzoico e da metilecgonina, sendo a sua estabilidade em amostras biológicas é geralmente baixa. Contudo sob determinadas condições é possível manter uma estabilidade apropriada [12].

A cocaína pode ser degradada por hidrólise química ou enzimática. A hidrólise química ocorre a pH alcalino, enquanto a hidrólise enzimática é o resultado da atividade da enzima esterase. Os produtos das hidrólises químicas e enzimáticas são a benzoilecgonina (BE) e o éster metílico da ecgonina (EME), respetivamente [12].

A cocaína quando é armazenada sem substâncias de conservação apresenta baixa estabilidade, hidrolisando rapidamente a BE. Esta hidrólise para o seu metabolito ocorre mais rapidamente em sangue AM que PM, uma vez que durante o processo de decomposição o pH do sangue PM diminui, aumentando assim a estabilidade da cocaína nessa matriz [35].

Na Tabela 3, estão representados vários estudos da estabilidade da cocaína e os seus metabolitos BE e EME. Os resultados demonstram que o pH é um fator importante na estabilidade da cocaína em amostras biológicas de urina. A azida de sódio não deve ser utilizada como agente de preservação para os ésteres, nomeadamente a cocaína, porque pode aumentar a velocidade de hidrólise em amostras de urina.

Outra evidência retirada dos estudos, é que em amostras de sangue, a estabilidade da cocaína e metabolitos depende, primariamente, da temperatura de armazenamento. O uso de compostos de preservação como o NaF também é um fator importante que influencia a estabilidade.

Tabela 3. Estabilidade da cocaína e metabolitos em sangue, urina e fluido oral em diferentes condições de armazenamento.

Analito e metabolitos	Matriz	Condições de armazenamento	Período de armazenamento	Efeito na concentração do analito	Ref.
Cocaína	Urina	-20°C	1 ano	-37% ^(c)	[36]
Cocaína	Urina	pH=4 4°C	1 ano	107,8% ^(a)	[37]
BE			1 ano	17,4% ^(a)	
EME	Urina	pH=8 4°C	15 dias	nd	[37]
COC			75 dias	nd	
Cocaína	Urina	pH=8 4°C	30 dias	21,1% ^(d)	[37]
BE	Urina	-15°C	1-8 meses	-19% ^(c)	[38]
BE	Urina	-20°C	1 ano	+10% ^(c)	[36]
BE	Sangue	-20°C	1 ano	89,9% ^(a)	[37]
EME		Com NaF		105% ^(a)	
BE	Sangue	-20°C	1 ano	86,7% ^(a)	[37]
EME		Sem NaF		107,1% ^(a)	
BE	Sangue	4°C Com NaF	1 ano	68,5% ^(a)	[37]
Cocaína	Fluído oral	25°C	7 dias	30% ^(a)	[32]
Cocaína	Fluído oral	25°C	48-72 horas	52,1% ^(a)	[32]
BE				40,8% ^(a)	
BE	Fluído oral	5°C	30 dias	93 ng/mL ^(e)	[33]
		20°C		127 ng/mL ^(e)	
		40°C		156 ng/mL ^(e)	
Cocaína	Fluído oral	5°C	30 dias	85 ng/mL ^(e)	[33]
		20°C		48 ng/mL ^(e)	
		40°C		1 ng/mL ^(e)	

^aRecuperação

^cVarição da concentração em %

^dBE como produto de degradação com concentração de 21,1± 0,3%

^eConcentrações iniciais: BE 88; 89; 104 ng/mL; Cocaína 97; 93; 73 ng/mL

nd – não detetado

1.3.1.3. Estabilidade das anfetaminas

Alsenedi et al. [39] estudaram a estabilidade de anfetaminas e derivados em urina num período de 201 dias à temperatura ambiente, refrigeradas (4-8°C) e congeladas (-20°C). Todas as amostras armazenadas a -20°C se mantiveram estáveis com concentrações dentro de ±20% da concentração original fortificada. Quando estiveram refrigeradas ou à temperatura

ambiente, os analitos anfetamina, MDA, MDMA e metanfetamina também permaneceram estáveis por 201 dias.

Noutro estudo, realizado por Giorgi et al. [40], verificou-se, em amostras de sangue positivas para anfetaminas e derivados, reanalisadas após 4 anos, vários níveis de instabilidade para os diferentes compostos, contudo ainda foi possível detetar anfetamina no sangue.

Na Tabela 4, estão compilados vários estudos da estabilidade das anfetaminas e derivados em diferentes matrizes biológicas.

Tabela 4. Estabilidade de anfetaminas em sangue/soro e urina em diferentes condições de armazenamento.

Analito	Matriz	Condições de armazenamento	Período de armazenamento	Efeito na concentração do analito	Ref.
Anfetamina Metanfetamina	Urina	37°C Amostras esterilizadas	3 dias	1,3% ^(c) 0,8%	[41]
			7 dias	0,1% ^(c) -0,5%	
MDA MDMA MDEA	Soro		4 dias	10,1% ^(c) 10,7% 4,14%	
			21 semanas	11,0% 13,7% 13,4%	
MDA MDMA MDEA	Sangue	Sem luz -20°C	4 dias	8,12% 8,77% 18,1%	[42]
			21 semanas	9,59% 4,72% 9,88%	
MDA MDMA MDEA	Urina		4 dias	9,59% 4,72% 9,88%	
			21 semanas	10,3% 7,20% 6,78%	
Anfetamina	Sangue	100 mg NaF/20 mg K ₂ C ₂ O ₄ Temperatura ambiente	4 anos	0,014 µg/mL ^(b)	[40]
Anfetamina	Fluído	5°C	30 dias	81 ng/mL ^(d)	[33]

	oral	20°C		80 ng/mL ^(d)	
		40°C		80 ng/mL ^(d)	
		4°C		65% ^(c)	
Anfetamina	Fluído oral	Temperatura ambiente	1 semana	71% ^(c)	[43]
Anfetamina	Fluído oral	-20°C	3 meses	95% ^(c)	
			11 meses	87% ^(c)	

^bConcentração inicial: 0,013 µg/mL

^cVarição da concentração em %

^dConcentrações iniciais: 84; 83; 83 ng/mL

1.4. Metodologias analíticas de tratamento de amostra

A preparação de amostra é um passo crucial no processo analítico. É o fator limitante na análise química, uma vez que é o passo que consome mais tempo e potencialmente introduz mais erros. Deste modo, é necessário desenvolver e aplicar protocolos adequados de preparação de amostra que garantam a presença dos analitos, durante o processo de eliminação dos interferentes das matrizes.

Serve o procedimento de extração para que os analitos sejam isolados da matriz.

De entre as técnicas extrativas mais utilizadas encontram-se a extração em fase sólida (SPE) e extração líquido-líquido (LLE).

1.4.1. Precipitação proteica (PPE)

A precipitação proteica (PPE) é uma técnica de separação de proteínas por adição de um agente precipitante às amostras. É um passo importante no tratamento de amostras biológicas que pode ser feito em meio ácido, por adição de sais e/ou de solventes orgânicos. A eficiência dos métodos de precipitação depende da solubilidade e estrutura molecular da proteína.

A precipitação ácida baseia-se nas mudanças do pH da solução. Cada proteína possui um ponto isoelétrico definido, logo pequenas mudanças do pH têm impacto na estrutura da proteína, que podem levar à sua precipitação.

O ácido mais utilizado neste método de precipitação é o ácido tricloroacético (TCA), porque é altamente reativo e pode ser utilizado em pequenas quantidades.

Na precipitação com adição de um sal à solução, ocorre uma restrição do número de moléculas de água disponíveis para interação com as proteínas, provocando a quebra das ligações de hidrogénio proteína-água, levando assim a uma agregação das proteínas e

consequentemente à precipitação, efeito de *salting-out*. Alguns exemplos de sais utilizados são o sulfato de zinco e o sulfato de amónia.

A precipitação com solventes orgânicos leva a uma redução da atmosfera protetora das proteínas, através da remoção de água, levando à agregação e precipitação. As proteínas precipitadas podem ser removidas por centrifugação ou filtração. Os solventes mais utilizados são etanol, metanol, acetona e acetonitrilo.

O método selecionado para a remoção das proteínas deve ser bem avaliado de forma a determinar se certas drogas poderão ser perdidas no processo. Por exemplo a cocaína pode ser perdida em soluções alcalinas, ficando retida no precipitado. Nestes casos, a concentração da droga irá diminuir na amostra a analisar [12].

A precipitação com o solvente orgânico acetonitrilo foi o método adotado neste trabalho.

1.4.2. Extração em fase sólida e extração líquido-líquido

A extração em fase sólida (SPE) baseia-se na retenção dos analitos de interesse, remoção dos interferentes por lavagem com solventes aquosos e/ou orgânicos, seguido de eluição das drogas alvo e os seus metabolitos [44]. A escolha da coluna é feita de forma que o analito de interesse tenha forte afinidade para a fase sólida e os restantes componentes da matriz não fiquem retidos e consequentemente sejam expelidos da coluna na etapa da lavagem [45]. Os vários passos dum processo de extração em fase sólida estão ilustrados na Figura 6.

Existem vários tipos de colunas extrativas, a fase normal, fase reversa e de troca iónica. Contudo, podem também ser utilizadas colunas extrativas de modo misto (Oasis MCX), combinando a utilização de adsorventes de troca iónica e fase reversa. Estes tipos de colunas são normalmente mais vantajosas, providenciam uma melhor separação e tornam possível o isolamento de drogas acídicas, neutras e básicas utilizando apenas uma coluna [46]. Colunas extrativas de modo misto tem grupos funcionais não-polares e de troca iónica. A combinação é escolhida para que o analito seja retido por ambos os mecanismos. Isto torna-se útil para extração de compostos lipofílicos com um grupo funcional ionizável. Estes adsorventes têm sido bastante utilizados para análise de drogas [47].

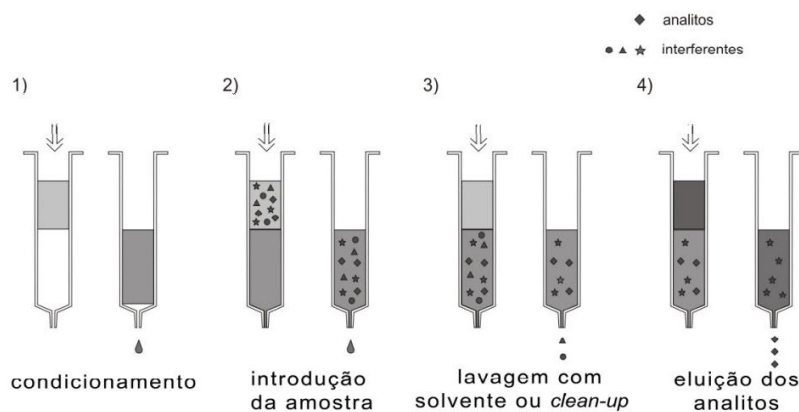


Figura 6. Procedimento da extração em fase sólida (SPE) [48].

A extração líquido-líquido (LLE) é um processo que utiliza duas fases líquidas imiscíveis, tipicamente uma aquosa e uma orgânica, de forma a separar os compostos.

A extração dos analitos para solventes orgânicos ou aquosos pode ser mediada por alteração de pH das amostras: o analito deverá estar na forma não ionizada para extração para um solvente orgânico e na sua forma ionizada para extrações para soluções aquosas [12,49].

A eficiência de extração de uma droga para um solvente orgânico está relacionada com o coeficiente de partição da droga entre o solvente orgânico e fase aquosa. O coeficiente de partição é definido como a concentração do analito no solvente orgânico dividido pela concentração na fase aquosa em equilíbrio, estando relacionado com a polaridade do analito e do solvente [12].

Aquando da escolha do solvente, é necessário ter em consideração alguns fatores de forma a obter os resultados desejados [50]. Deste modo, existem vários critérios que influenciam a escolha dos solventes utilizados na LLE, como polaridade, densidade, segurança, ponto de ebulição e custo do solvente. Os solventes mais comumente utilizados incluem o clorofórmio, éter etílico, diclorometano, acetato de etilo e vários álcoois [12]. Está também descrita a utilização de mistura de solventes.

1.5. Metodologias de análise cromatográfica

Os métodos que se encontram na literatura são o reflexo dos avanços na instrumentação analítica e nas metodologias desenvolvidas, levando os toxicologistas forenses a detetar cada vez mais analitos de interesse forense e em concentrações cada vez mais baixas.

1.5.1. Cromatografia de Gás-Espetrometria de Massa

A cromatografia de gás (GC) é dos métodos cromatográficos mais utilizados nos laboratórios de toxicologia forense. É aplicada a compostos com pressão de vapor adequada na gama de temperaturas de trabalho e termicamente estáveis. A separação envolve o transporte, por uma fase móvel gasosa, através de uma coluna, normalmente, capilar. A coluna contém um material em fase estacionária que tem interações intermoleculares diferentes com os vários componentes da amostra. O transporte da substância está a cargo da fase móvel, que tem de ser um gás inerte (H_2 , N_2 , He ou Ar) em relação à amostra e à fase estacionária. Os coeficientes de distribuição dos componentes da amostra entre a fase móvel e a fase estacionária, devem ser distintos, o que resulta em diferentes tempos de retenção.

Existem vários tipos de detetores para GC e a seleção do detetor apropriado depende das características do analito e também do objetivo do trabalho. Os detetores mais comuns são: detetor de ionização em chama (FID), detetor de captura eletrónica (ECD), detetor de condutividade térmica (TCD), detetor nitrogénio-fósforo (NPD) e espetrometria de massa (MS).

A espetrometria de massa (MS) é uma técnica analítica que permite detetar e identificar moléculas de interesse, a partir da relação massa/carga (m/z) de iões que são formados a partir da molécula. Numa primeira etapa, são gerados iões numa fonte de iões adequada, que são depois direcionados para o analisador de massa onde são separados de acordo com a razão massa/carga (m/z), e enviados a um detetor (deteção qualitativa e quantitativa).

A utilização de uma técnica hifenada GC-MS (Figura 7), permite efetuar a separação dos componentes presentes numa mistura e obter a identidade estrutural dos componentes individuais com alta especificidade molecular e sensibilidade.

Existem dois tipos de fontes de iões, as mais energéticas (hard) que resultam num grau de fragmentação do ião molecular elevado, permitindo assim obter informação estrutural, e fontes de iões menos energéticas (soft), que resultam num grau de fragmentação mais baixo e são importantes para a determinação da massa molecular.

A técnica de ionização mais utilizada em GC-MS, em toxicologia forense, é a ionização por impacto eletrónico (EI) permitindo identificação e análise qualitativa e quantitativa com elevada sensibilidade e seletividade [51]. A ionização por impacto eletrónico é uma técnica que se enquadra nas fontes de iões mais energéticas. Na fonte são emitidos eletrões de elevada energia, tipicamente 70 eV, por um filamento aquecido, que são dirigidos

ao ânodo e colidem com as moléculas da amostra. Algumas moléculas do analito absorvem energia suficiente para que ocorra ionização. Quando um eletrão é perdido, o catião resultante é representado como M^+ , um ião molecular. Após a ionização, o ião M^+ , possui uma energia residual interna suficiente para que se fragmente. Esta fragmentação é útil pois fornece informações estruturais de analitos desconhecidos: o padrão de fragmentação é característico de cada molécula.

O processo de ionização é o resultado de reações intramoleculares e é reprodutível. A fonte de iões por impacto eletrónico aplica-se a moléculas de média e baixa polaridade e baixo peso molecular, voláteis e termicamente estáveis. Deste modo, leva a obtenção de espetros de massa que podem ser comparados com os que estão presentes em livrarias de espetros de massa [51].

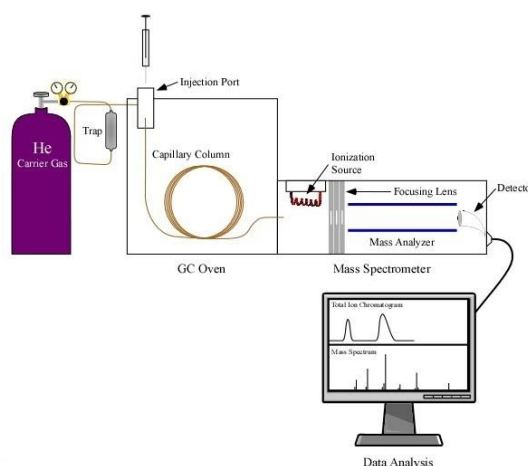


Figura 7. Cromatografia de gás-espetrometria de massa (GC-MS) [52].

1.5.1.1. Derivatização

Numa análise por GC-MS, é por vezes necessário recorrer à derivatização química dos analitos de modo a aumentar a sua estabilidade térmica e/ou, a volatilidade de compostos polares, e de baixa volatilidade [51].

Muitas drogas são moléculas com grupos funcionais polares. O metabolismo (especialmente no fígado) é um passo adicional na introdução de grupos polares e da conversão das moléculas em compostos menos lipofílicos. Antes de serem excretadas na urina, os metabolitos resultantes do metabolismo que a droga mãe sofre, passam por um processo enzimático adicional, formando glucuronídeos, sulfatos e outros conjugados com caráter altamente polar e hidrofílico [5].

Para serem analisáveis por cromatografia de gás, é indispensável a conversão dos analitos polares em compostos suscetíveis de análise por GC, tendo assim de passar por um

passo de derivatização. Tipicamente, os grupos funcionais hidroxilo, ácidos carboxílicos e aminas são os grupos presentes nas drogas de abuso e que são derivatizados.

As três principais reações de derivatização são sililação, alquilação e acilação.

Os derivados sililados são formados quando ocorre a troca de grupos -OH, -SH ou -NH por grupos alquilsililo, por exemplo o grupo trimetilsililo (TMS). As amidas, *N,O*-bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida (BSTFA) e *N*-metil-*N*-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA) (Figura 8), são os derivatizantes de sililação mais comumente utilizados, pois apresentam bom rendimento de reação, resultando em derivados de elevada volatilidade. De modo a aumentar o rendimento de sililação, são utilizados catalisadores como o trimetilclorosilano (TMCS) [5].

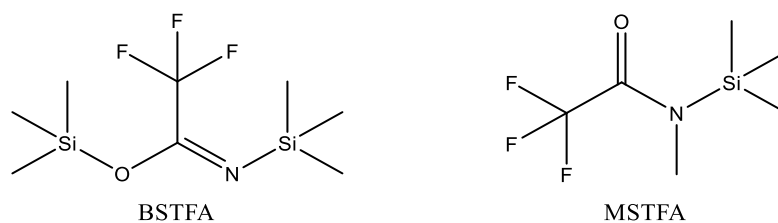


Figura 8. Reagentes de derivatização por reação de sililação.

Neste trabalho o derivatizante utilizado para a morfina e benzoilecgonina foi o MSTFA-TMCS. Na Figura 9, está representado um exemplo da reação de derivatização para cada uma das classes de drogas.

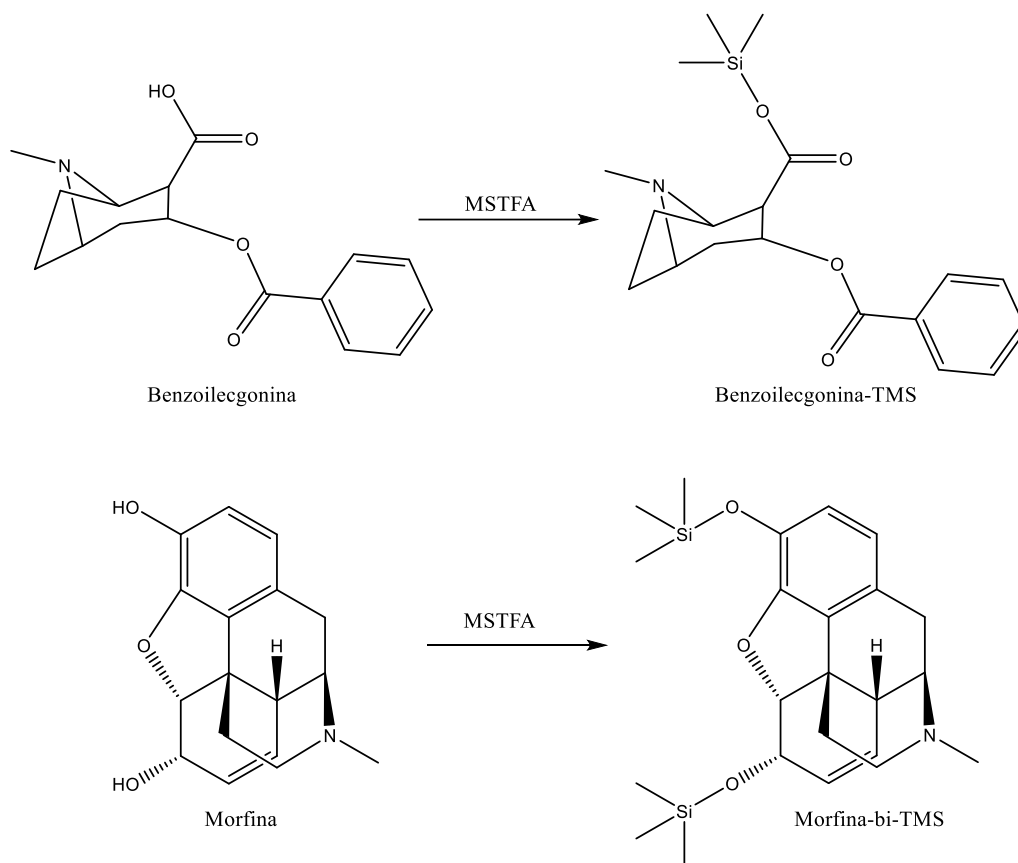


Figura 9. Reação de derivatização da benzoilecgonina e morfina com MSTFA.

A acilação consiste na introdução de um grupo acilo numa molécula com um hidrogénio reativo. Os derivados acilados podem ser obtidos de uma grande variedade de grupos funcionais: álcoois, aminas, amidas, tióis, fenóis, enóis, sulfonamidas, compostos insaturados e anéis aromáticos. A trifluoroacilação de grupos amina, hidroxilo e tiol pode ocorrer com o derivatizante *N*-metil-bis(trifluoroacetamida) (MBTFA) (Figura 10). Este reagente é altamente volátil e não interfere na análise por GC-MS [5].

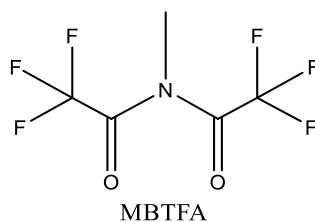


Figura 10. Reagente de derivatização por reação de acilação.

As anfetaminas e seus derivados são derivatizadas com MBTFA (Figura 11).

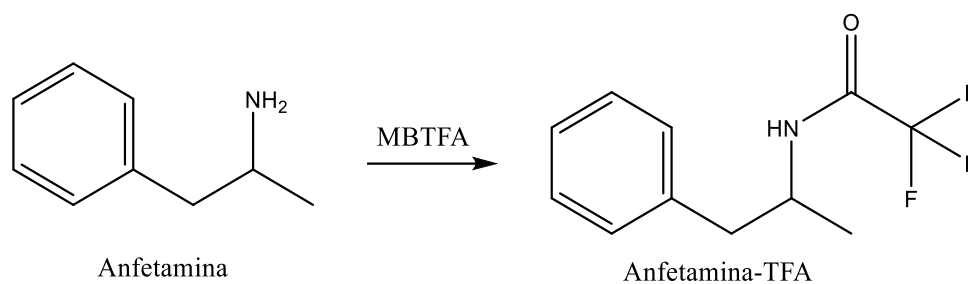


Figura 11. Reação de derivatização da anfetamina com MBTFA.

A alquilação compreende a troca de um hidrogênio por um grupo alquilo ou arilo. Os ácidos carboxílicos, álcoois, tióis, fenóis, amins primárias e secundárias, amidas e sulfonamidas são os grupos funcionais principais que podem sofrer reações de alquilação. Para análises de GC-MS, a alquilação, particularmente a metilação revela-se de grande interesse devido ao pequeno aumento da massa molecular que provoca e da elevada volatilidade dos derivados [5].

Na Tabela 5, estão compilados métodos de extração e de análise instrumental, referidos na literatura para extração e análise instrumental dos vários analitos, opiáceos, cocaína, anfetaminas e os seus respetivos metabolitos, em diferentes matrizes biológicas.

Tabela 5. Literatura sobre métodos de extração e análise instrumental de drogas de abuso em diferentes matrizes biológicas.

Amostra	Analitos	Preparação da amostra	Análise instrumental	LOD/LLOQ (ng/mL)	Ref.
Sangue	Cocaína	SPE	LC-MS/MS	LLOQ:20	[53]
	Metanfetamina	PPE (7% ácido perclórico)	LC-MS/MS	LLOQ:2,03	[54]
	Morfina	SPE	HPLC-DAD/FLD	LLOQ:17,80	[55]
	Cocaína BZE	SPE	LC-MS/MS	3/8 2/8	[6]
Plasma	Cocaína	SPME	LC-MS	0,03/0,10	[56]
	Morfina 6-MAM	MEPS	UPLC-PDA	LOD:25 LLOQ:50	[57]
Soro	Anfetamina			2,5/15	
	Metanfetamina	LLE	GC-MS	3,4/15	[58]
	MDA			5,0/15	
Urina	Codeína	LLE	GC-MS	LOD:7	[59]
	MDA MDMA	SPME	GC-MS	1,3/4,3 0,8/2,7	
	Cocaína	SPE	LC-MS/MS	0,5/2,0	[60]
	Anfetamina Metanfetamina	SPME	GC-MS	0,3/1 0,2/0,7	
Fluído oral	Morfina Anfetamina Cocaína	SPE	LC-MS/MS	LLOQ:0,5	[16]
	Anfetamina Metanfetamina Cocaína	SPE	LC-MS/MS	2,5/5 0,4/0,8	[61]

	Morfina			2/4	
	Anfetamina Metanfetamina Morfina	SPE, LLE	LC-MS/MS	LOD/LLOQ: 10	[62]
	Codeína Morfina	LLE	GC-MS	0,7/2,3 2,0/6,7	[63]
	Heroína	PPE	LC-MS/MS	6/10	[64]
Humor vítreo	Cocaína			10/100	
	Codeína	SPE	LC-PDA	25/100	[65]
	6-MAM			12/100	
	Morfina			LOD:2,0	
	Anfetamina	SPE	GC-MS	LOD:1,0	[25]

1.6. Objetivo

O objetivo deste trabalho é a detecção e confirmação de anfetamina, metanfetamina, morfina e benzoilecgonina em amostras de fluido oral e de soro de *kits da OraSure Technologies, Inc.*, destinados à análise de triagem de drogas de abuso pela técnica imunoenzimática ELISA do sistema *Evolis Twin Plus, Bio Rad*. Pretende-se avaliar a estabilidade das drogas de abuso referidas nas matrizes de FO e soro, referidas. Neste sentido, foram objeto de estudo amostras provenientes de kits que se encontravam dentro do prazo de validade e outras cujo prazo de validade já havia expirado. Todas elas foram armazenadas nas mesmas condições, 2-8°C, sem adição de qualquer agente de preservação.

Para detecção e confirmação das drogas utilizou-se cromatografia de gás acoplada à espectrometria de massa, após tratamento das amostras pela técnica de precipitação proteica com acetonitrilo gelado, utilizando um método previamente desenvolvido no SQTf.

Capítulo 2

Materiais e métodos



2.1. Padrões e reagentes

Todos os padrões de referência (anfetamina, metanfetamina, morfina e benzoilecgonina) e os respectivos análogos deuterados, anfetamina-D6, metanfetamina-D9, morfina-D3 e benzoilecgonina-D3 foram adquiridos à Cerilliant (Round Rock TX, USA) em solução a 1 mg/mL.

Metanol (LiChrosolv®) e acetonitrilo foram adquiridos à Merck (Darmstadt, Germany).

Os reagentes de derivatização *N*-metil-*N*-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA), trimetilclorosilano (TMCS) e *N*-metil-bis(trifluoroacetamida) (MBTFA) foram adquiridos à Sigma-Aldrich e Macherey-Nagel, respetivamente.

2.2. Amostras biológicas

As amostras de fluído oral e soro são provenientes de *kits da OraSure Technologies, Inc.* que se destinam à determinação qualitativa de anfetaminas, metanfetaminas, opiáceos e cocaína em fluído oral, colhido com o dispositivo de colheita de amostras orais Intercept®, e em amostras de soro.

Cada *kit* contém as amostras indicadas na Tabela 6 com a designação do fornecedor. Neste trabalho, foram utilizados os calibradores negativos de fluído oral e soro para a preparação das amostras brancas e controlos. As soluções indicadas na descrição do *kit* como controlos positivos de fluído oral e soro (anfetaminas, metanfetaminas, benzoilecgonina e morfina) para as quais são indicadas as concentrações que constam da tabela 6, foram as amostras avaliadas neste trabalho. No que diz respeito ao fluído oral estavam disponíveis amostras com prazos de validade de 2023 a 2021 (FO23, FO22, FO21) e de soro amostras com validade de 2024 a 2021 (SR24, SR23, SR22, SR21).

Seguindo as instruções de armazenamento e estabilidade indicadas em cada *kit*, todos os materiais foram armazenados a 2-8°C até ao prazo de validade indicado nos rótulos do *kit*, e conservados nas mesmas condições após expirado esse prazo.

Tabela 6. Amostras de fluído oral e soro utilizadas neste trabalho com a designação e informação dada pelo fornecedor [66–69].

Amostras kit OraSure Technologies, Inc.	Conteúdo
FO 23;22;21	
Fluído oral-Calibrador negativo	Negativo Anfetamina, metanfetamina Cocaína Opiáceos
Fluído oral-Controlo positivo	200 ng/mL anfetamina 80 ng/mL metanfetamina 10 ng/mL benzoilecgonina 20 ng/mL morfina
SR 24;23;22;21	
Soro-Calibrador negativo	Negativo Anfetamina, metanfetamina Cocaína Opiáceos
Soro-Controlo positivo	500 ng/mL anfetamina 500 ng/mL metanfetamina 500 ng/mL benzoilecgonina 500 ng/mL morfina

2.3. Preparação de amostras controlo, soluções de padrões internos, soluções de derivatizantes, amostras brancas e amostras

A partir dos padrões de referência preparou-se a amostra controlo da anfetamina e metanfetamina a 0,5 µg/mL e duas de morfina, 5 e 0,5 µg/mL, em metanol. No caso da benzoilecgonina, foram preparadas duas amostras controlo 5 e 0,5 µg/mL em acetonitrilo. Foram ainda preparadas mistura de padrões internos anfetamina e metanfetamina deuteradas a 2 µg/mL em metanol e uma mistura, de igual concentração de benzoilecgonina-D3 e morfina-D3, em acetonitrilo.

Foi preparado um *pool* de soro branco juntando 4 mL dos calibradores negativos (designação indicada no *kit*), de 2021, 2022 e 2023. Procedeu-se do mesmo modo para a preparação de um *pool* de soro, utilizando 4 mL de cada um dos 4 denominados calibradores negativos disponíveis.

As amostras brancas foram obtidas usando 200 µL de *pool* de soro branco (AB-SR) ou *pool* de fluído oral branco (AB-FO), com adição de 20 µL dos padrões internos.

Foram preparadas amostras de controlo, como indicado nas tabelas 7, 8 e 9.

Tabela 7. Preparação das amostras controlo das anfetaminas em soro e fluído oral.

Amostras controlo	Volume pool soro ou FO/ μ L	Volume solução ANF e MET a 0,5 μ g/mL	Volume solução PI a 2 μ g/mL	[ANF]/ (ng/mL)	[MET]/ (ng/mL)
CT100-SR-ANF	200	40 μ L	20 μ L	100	100
CT250-SR-ANF	200	100 μ L	20 μ L	250	250
CT50-FO-ANF	200	20 μ L	20 μ L	50	50
CT150-FO-ANF	200	50 μ L	20 μ L	150	150

Tabela 8. Preparação das amostras controlo dos opiáceos e de cocaína em soro e fluído oral.

Amostras controlo	Volume pool soro ou FO/ μ L	Volume solução COC e OP a 0,5 μ g/mL	Volume solução PI a 2 μ g/mL	[COC]/ (ng/mL)	[OP]/ (ng/mL)
CT100-SR-COC	200	40 μ L	20 μ L	100	100
CT50-FO-COC	200	20 μ L	20 μ L	50	50
CT100-SR-OP	200	40 μ L	20 μ L	100	100
CT50-FO-OP	200	20 μ L	20 μ L	50	50

Tabela 9. Preparação das amostras controlo dos opiáceos e de cocaína em soro e fluído oral.

Amostras controlo	Volume pool soro ou FO/ μ L	Volume solução COC e OP a 5 μ g/mL	Volume solução PI a 2 μ g/mL	[COC]/ (ng/mL)	[OP]/ (ng/mL)
CT250-SR-COC	200	10 μ L	20 μ L	250	250
CT250-FO-COC	200	10 μ L	20 μ L	250	250
CT250-SR-OP	200	10 μ L	20 μ L	250	250
CT250-FO-OP	200	10 μ L	20 μ L	250	250

Nas amostras a analisar neste trabalho, utilizou-se 200 μ L, dos denominados, pelo fabricante, como controlos positivos de soro e fluído oral, com prazos de validade entre 2024-2021 e 2023-2021, respetivamente. A todas as amostras foi adicionado 20 μ L mistura de padrões internos.

Nas amostras brancas, amostras de controlo e nas amostras de ensaio procedeu-se a precipitação proteica, por adição de 1,5 mL de acetonitrilo gelado seguida de centrifugação durante 5 minutos a 5°C. Os sobrenadantes foram decantados para colunas *Captiva ND Lipids* que se encontravam dentro de tubos de vidro, centrifugados a 3000 rpm durante 10

minutos. Foi transferido 1 mL de sobrenadante para tubos de vidro, este volume de sobrenadante foi escolhido após se ter realizado o estudo com 1,5 mL e 1 mL de sobrenadante, não se tendo observado diferenças significativas nos resultados. Após evaporar a 40°C com fluxo N₂ a 2,5 L/min adicionou-se 30 µL dos reagentes de derivatização MSTFA com 5% de TMCS a todas as amostras onde se pretende detetar cocaína e opiáceos, e MBTFA para a derivatização das anfetaminas. A derivatização foi levada a cabo em microondas, a 900W durante 90 segundos. Após arrefecimento até à temperatura ambiente, fez-se a transferência para vials apropriados e injetou-se 2 µL no sistema GC-MS.

2.4. Equipamento

A análise cromatográfica realizou-se num sistema HP 6890 (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany) acoplado a um detetor de massa de quadrupolo 5973 (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany). Foi utilizada uma coluna analítica (30m x 0,32 mm x 0,25 µm) com 5% fenilmetilsiloxano (HP-5MS, Agilent J&W Scientific, Folsom, CA, USA) (Figura 12).



Figura 12. Cromatógrafo de gases.

As condições cromatográficas utilizadas nos ensaios por GC-MS são apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10. Condições cromatográficas utilizadas nos ensaios por GC-MS.

Parâmetros	Condições
Volume e modo de injeção	2 µL, modo split 1:6
Fase móvel	Hélio
Fluxo	1,2 mL/min
Temperatura do injetor	250°C

Temperatura inicial do forno/tempo inicial	90°C/2 min
Gradiente	20°C/min
Temperatura final do forno/tempo final	300°C/3 min
Modo de ionização/aquisição	EI(70 eV)/SIM

Capítulo 3

Resultados e Discussão



3.1. Espectros de massa em modo scan e seleção de íões a monitorizar

Foi realizada a análise por GC-MS em modo varrimento de todas as massas dos espectros (SCAN) modo a identificar os tempos de retenção dos analitos anfetamina, metanfetamina, benzoilecgonina e morfina, registando os respetivos espectros de massa.

3.1.1. Anfetaminas

Os sinais da anfetamina ($t_r = 5,513$ min), anfetamina-D6 ($t_r = 5,489$ min), metanfetamina ($t_r = 6,291$ min) e metanfetamina-D9 ($t_r = 6,251$ min), Figura 13 foram identificados através da análise dos espectros de massa correspondentes (Figura 14).

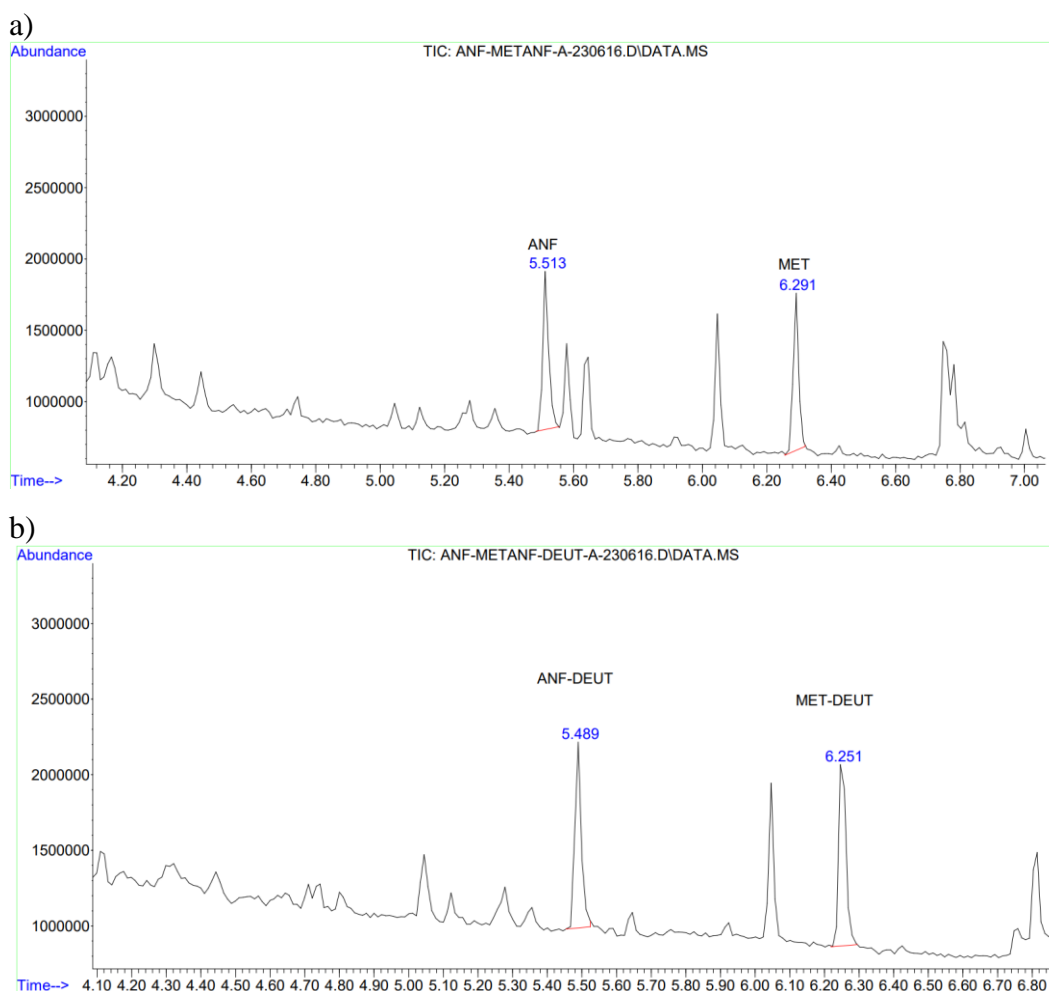


Figura 13. Cromatogramas em modo de varrimento total **a)** anfetamina ($t_r = 5,513$ min) e metanfetamina ($t_r = 6,291$ min) **b)** anfetamina-D6 ($t_r = 5,489$ min) e metanfetamina-D9 ($t_r = 6,251$ min).

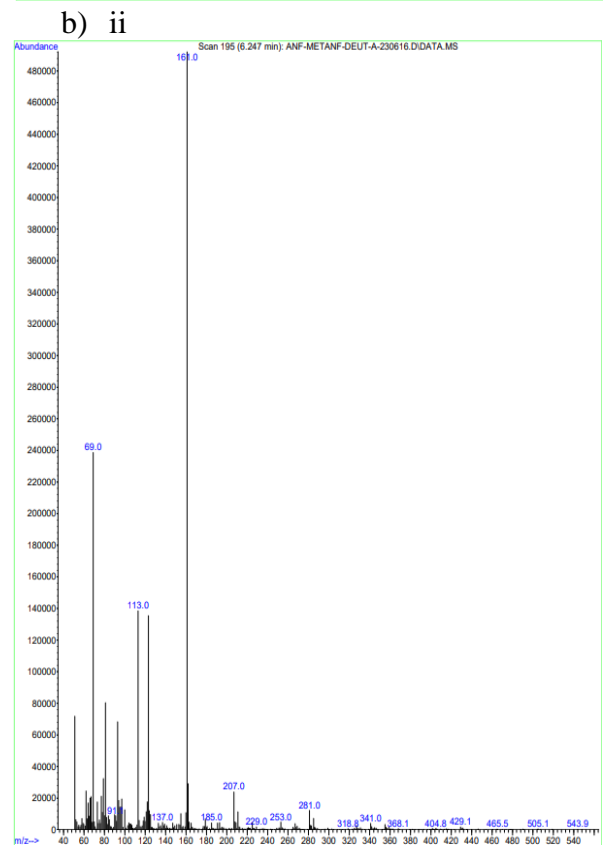
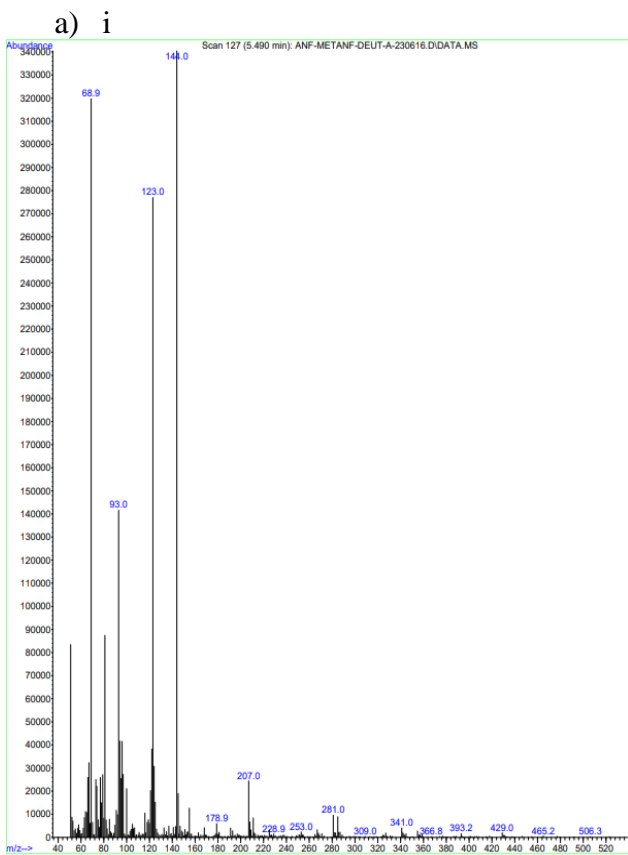
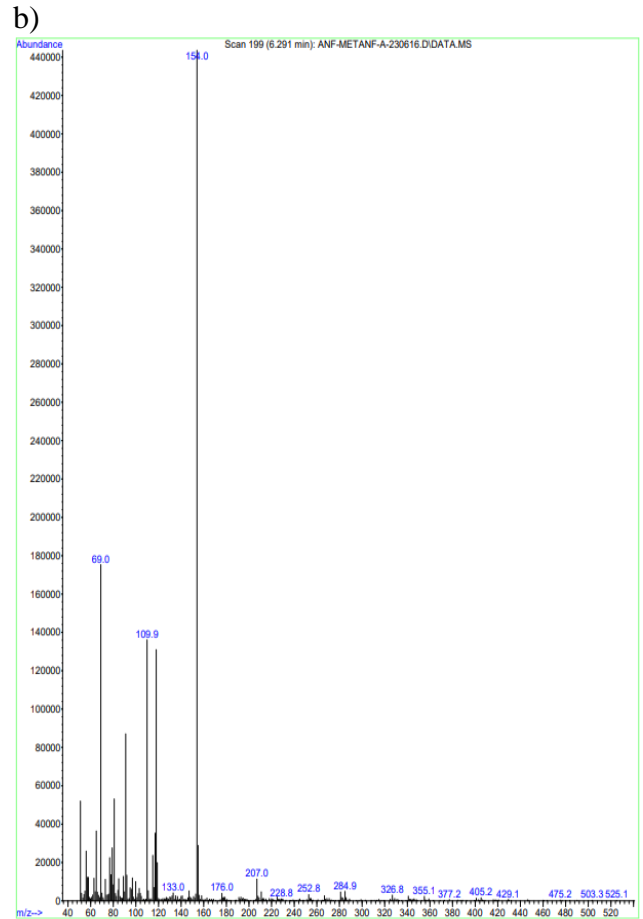
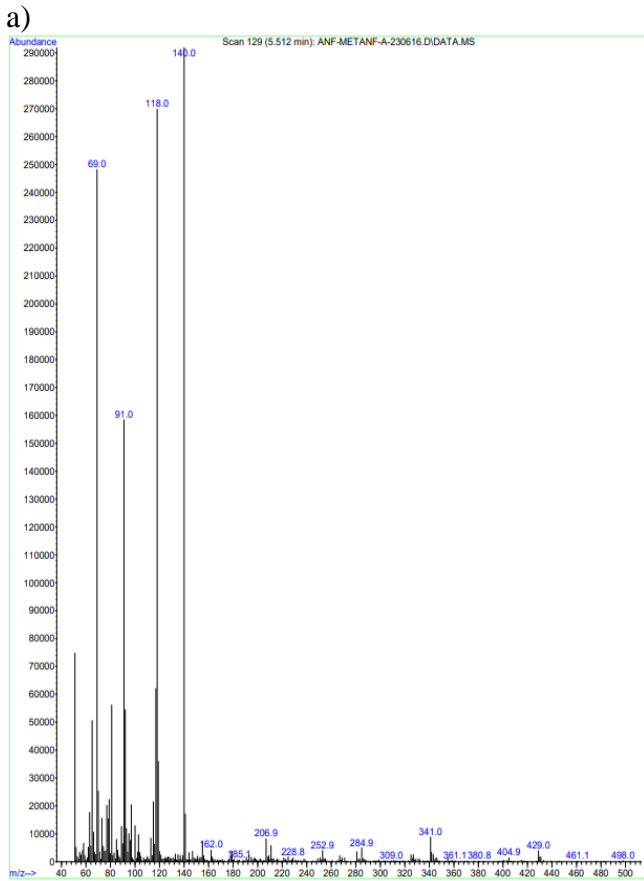


Figura 14. a) Espetros de massa anfetamina (tr = 5,512 min) **i.** anfetamina-D6 (tr = 5,490 min) **b)** metanfetamina (tr = 6,291 min) **ii.** metanfetamina-D9 (tr = 6,247 min).

Na Figura 15 é apresentado um padrão de fragmentação proposto para a anfetamina e a metanfetamina derivatizadas nas condições utilizadas neste trabalho.

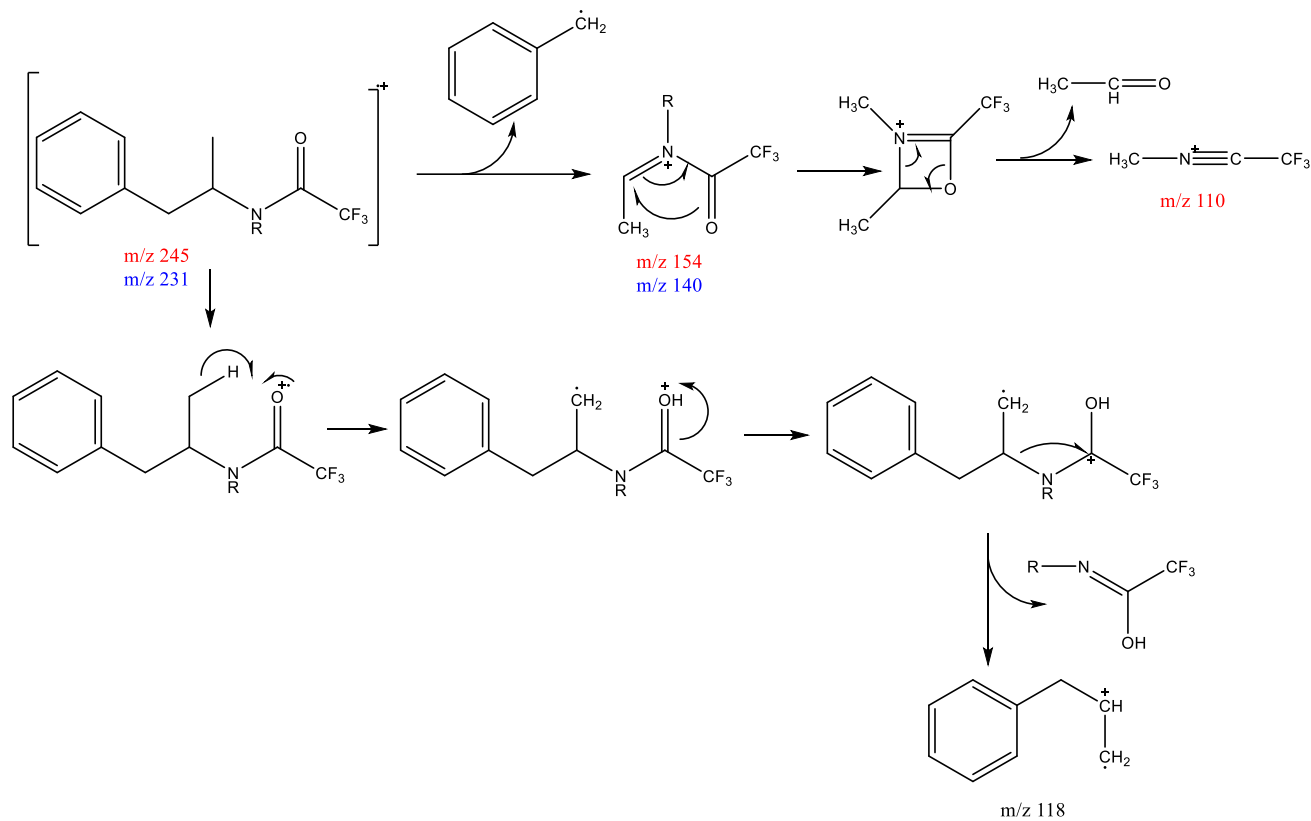
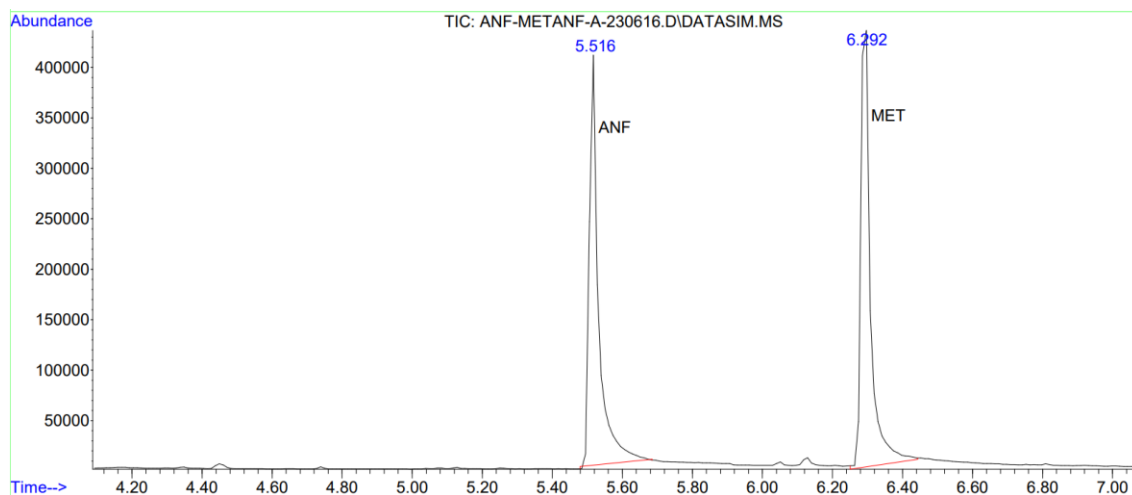


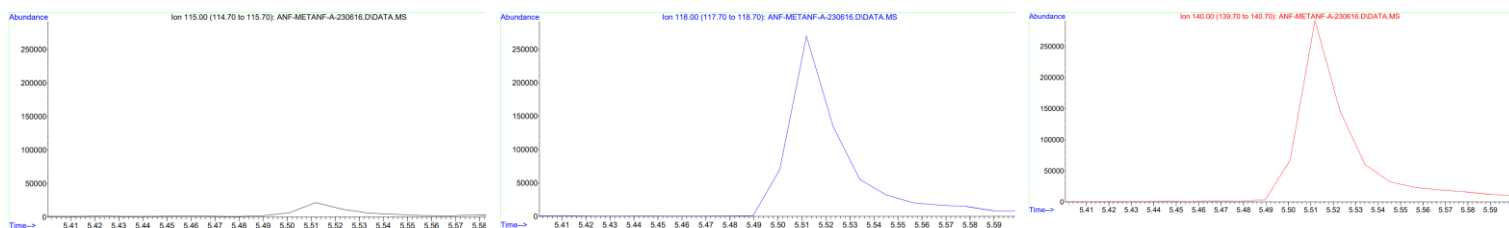
Figura 15. Proposta de fragmentação da anfetamina (azul) e metanfetamina (vermelho) derivatizadas com MBTFA [70].

De acordo com o método desenvolvido para estas substâncias no Serviço de Química e Toxicologia Forense, delegação do centro (SQTF-C), os íões a monitorizar para a anfetamina têm $m/z= 140; 118; 115$ e para a metanfetamina, $m/z= 154; 110; 118$. Os cromatogramas extraídos tomando como base estes íões em conjunto e cada íão individualmente são apresentados na Figura 16, e na Figura 17 apresentam-se os cromatogramas para as substâncias deuteradas ($m/z= 144$ anfetamina-D6, e $m/z= 161$ metanfetamina-D9).

a)



b) i



b) ii

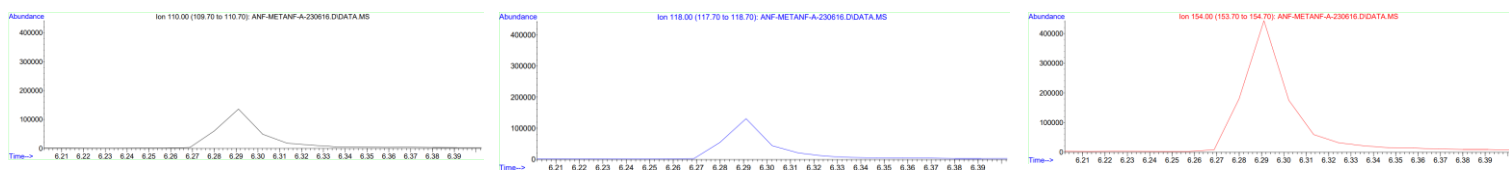
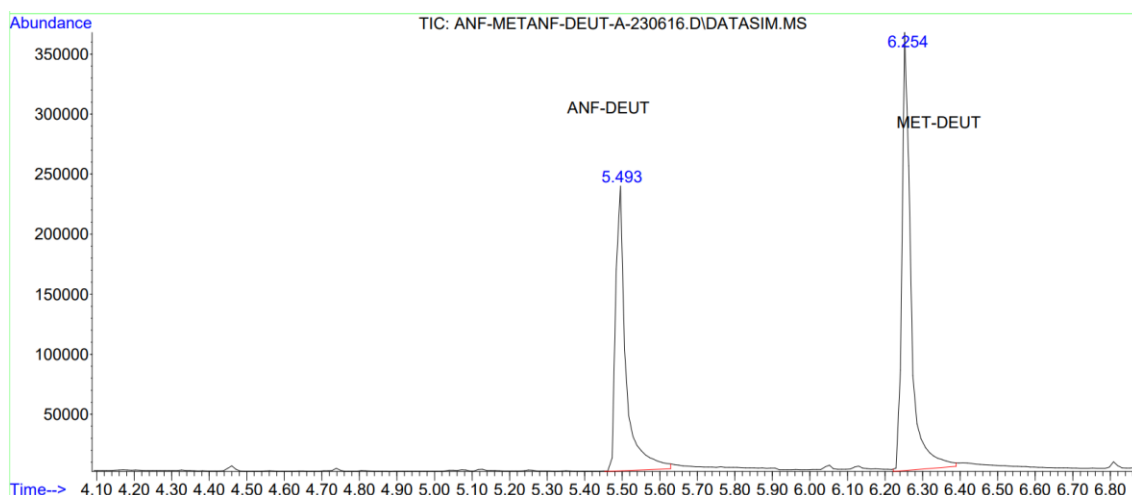


Figura 16. a) Cromatograma extraído para a anfetamina e metanfetamina com tempos de retenção de 5,5 e 6,3 min, respetivamente ($m/z=115;118;140$) **b)** Cromatogramas extraídos para os iões **i.** $m/z= 115; 118$ e 140 da anfetamina **ii.** Iões $m/z= 110; 118$ e 154 da metanfetamina.

a)



b)

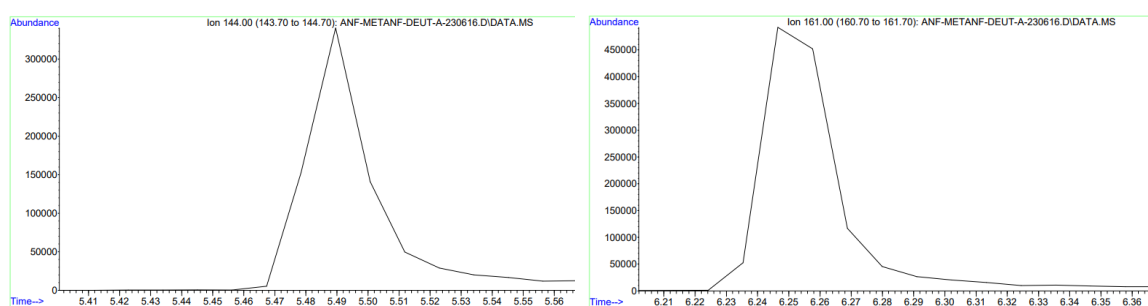


Figura 17. a) Cromatograma extraído para as substâncias anfetamina-D6 e metanfetamina-D9 com tempos de retenção de 5,5 e 6,3 min, respectivamente ($m/z=144;161$) **b)** Cromatogramas extraídos para o íon $m/z=144$ da anfetamina-D6 e íon $m/z=161$ da metanfetamina-D9.

3.1.2. Opiáceos

Para a morfina foi registrado o tempo de retenção ($t_r = 12,1$ min) e para a morfina-D3 ($t_r = 12,1$ min), Figura 18, identificados através da análise dos espectros de massa correspondentes (Figura 19).

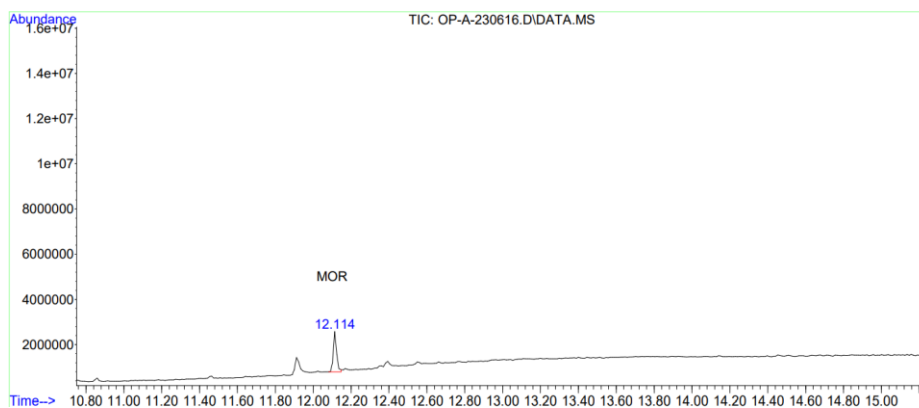
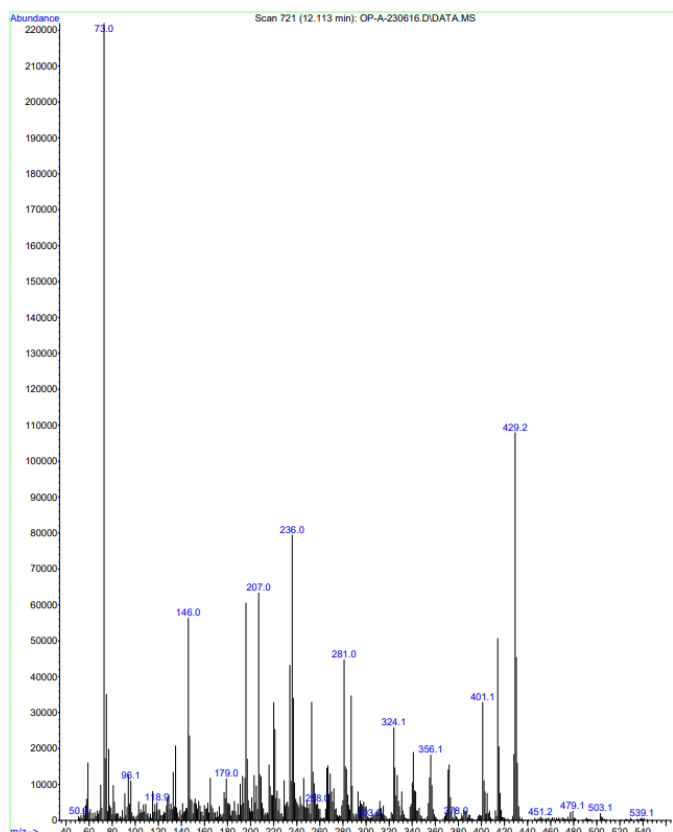


Figura 18. Cromatograma em modo de varrimento total de todas as massas do espectro da morfina ($t_r = 12,1$ min).

a)



b)

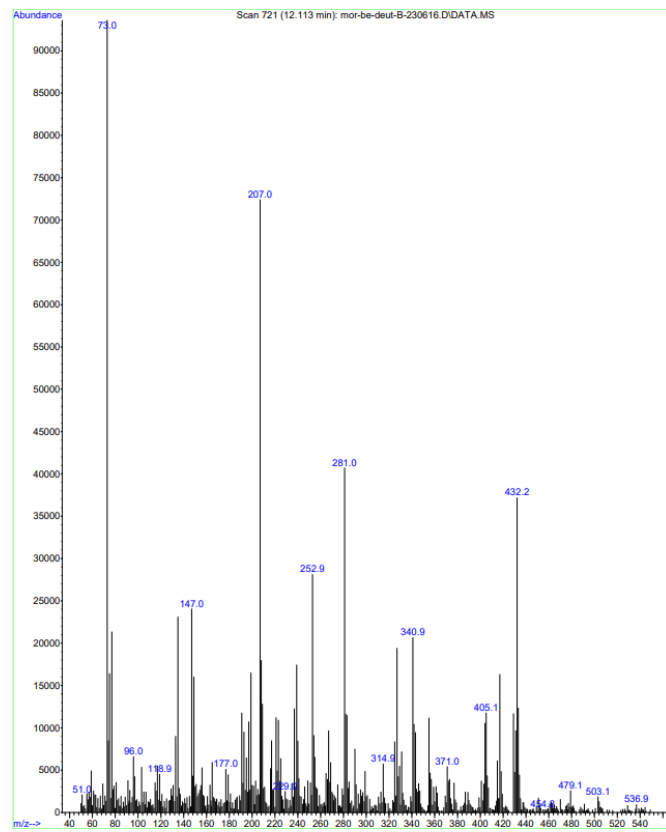


Figura 19. Espectros de massa **a)** morfina ($t_r = 12,1$ min) **b)** morfina-D3 ($t_r = 12,1$ min).

Os íões selecionados para monitorizar a morfina, foram os de $m/z = 429$; 414 ; 236 , e para morfina-D3 o íão de $m/z = 432$. (Proposta de fragmentação apresentada na Figura 20).

Os cromatogramas extraídos para o conjunto de íões selecionados e para cada íão individualmente são apresentados na Figura 21.

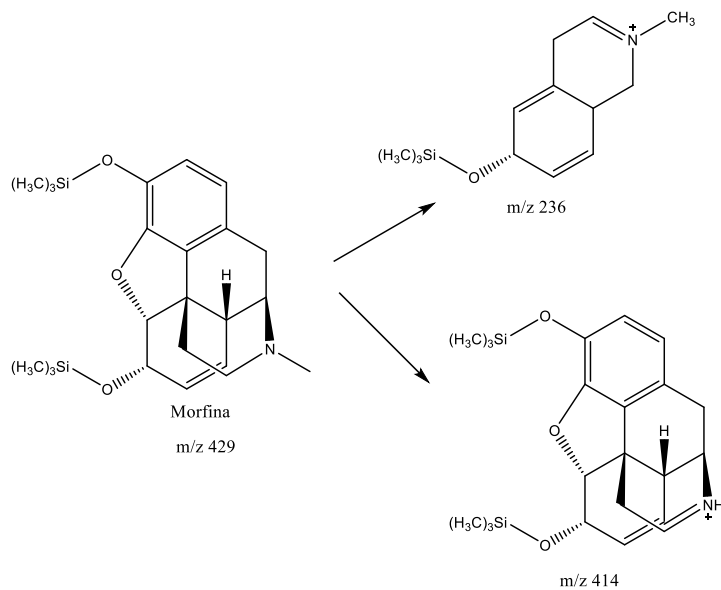
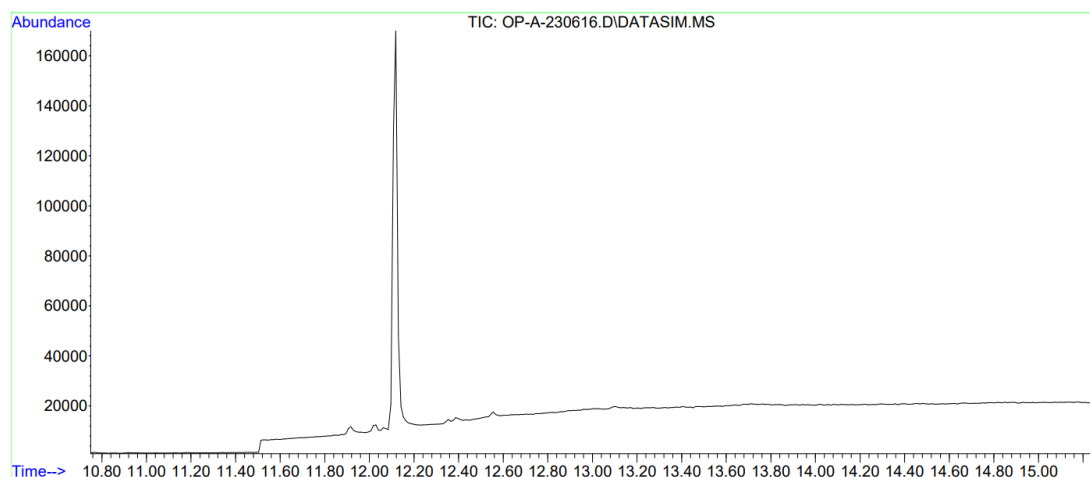
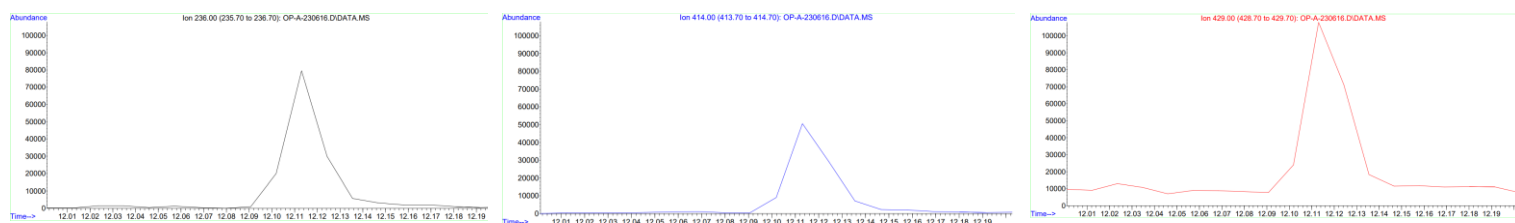


Figura 20. Proposta de fragmentação da morfina derivatizada com MSTFA-TMCS [71].

a)



b) i



b) ii

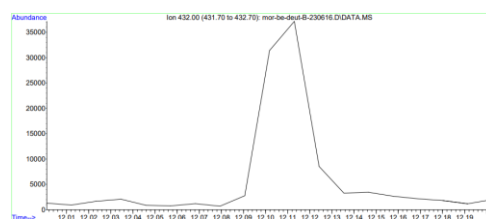
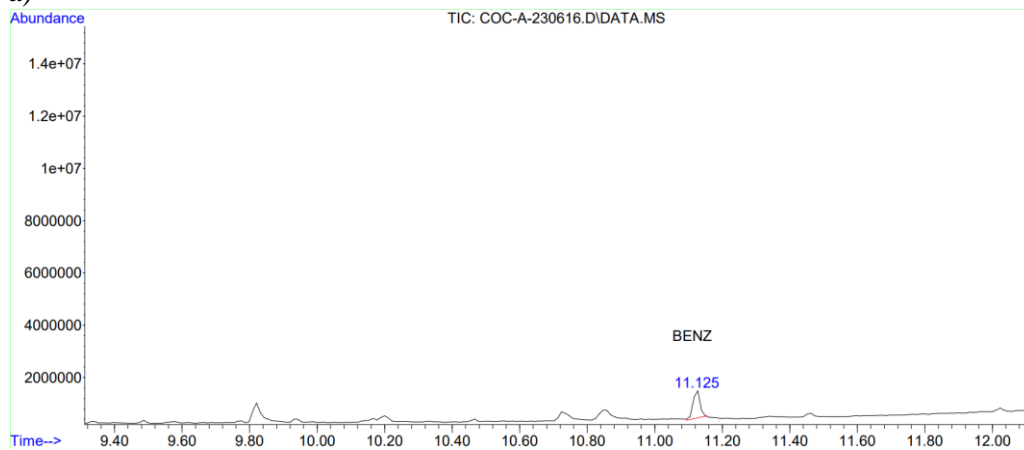


Figura 21. a) Cromatograma extraído para a morfina, utilizando iões de $m/z=236;414;429$ **b)** Cromatogramas extraídos para os iões i. $m/z= 236; 414$ e 429 da morfina ii. ião $m/z= 432$ da morfina-D3.

3.1.3. Cocaína

Procedendo do mesmo modo, foram identificados os sinais da benzoilecgonina ($tr = 11,1$ min) e benzoilecgonina-D3 ($tr = 11,1$ min) (Figura 22), (os espectros de massa correspondentes são apresentados na Figura 23).

a)



b)

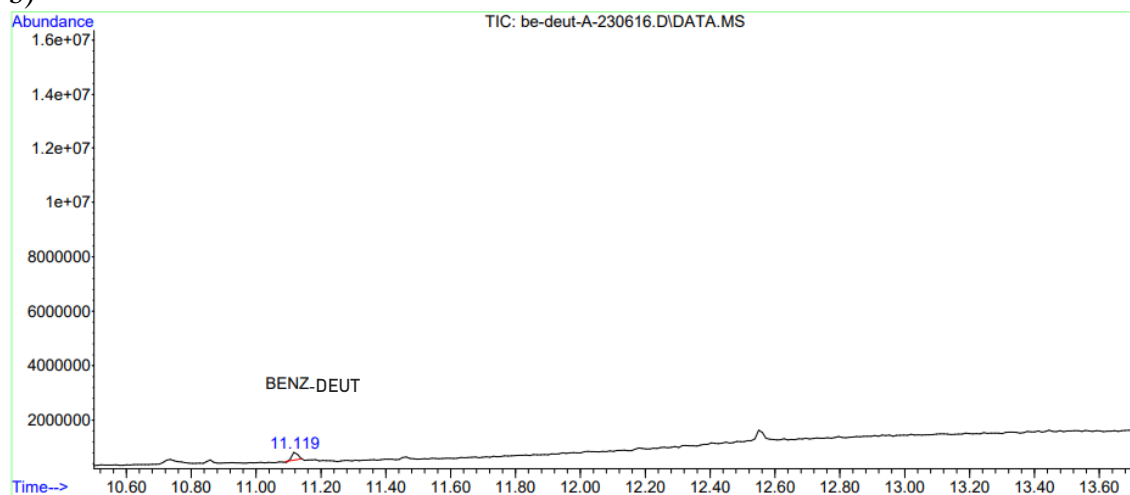


Figura 22. Cromatogramas em modo de varrimento total (*full SCAN*) **a)** benzoilecgonina (tr = 11,1 min)
b) benzoilecgonina-D3 (tr = 11,1 min).

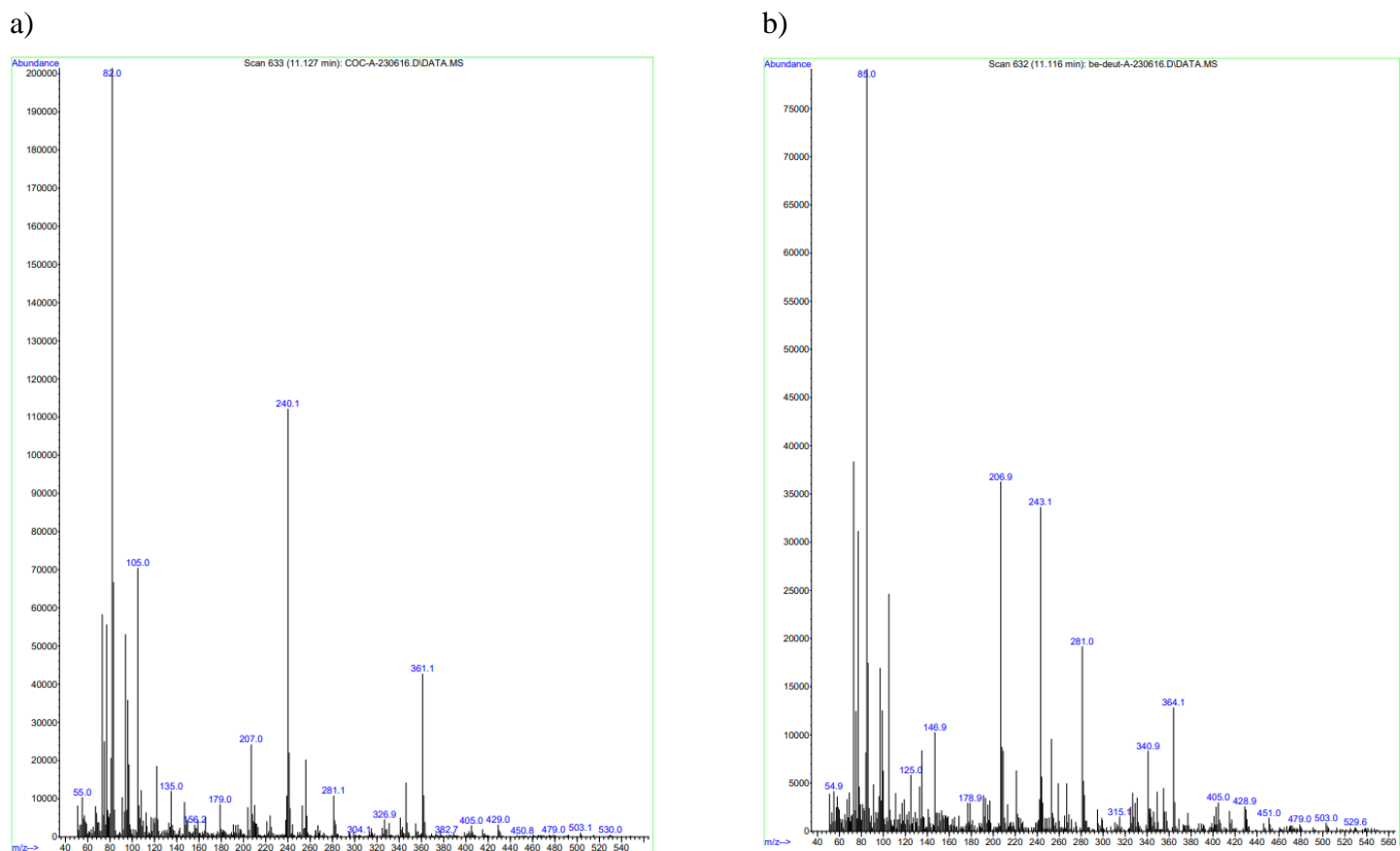


Figura 23. Espectros de massa **a)** benzoilecgonina (tr = 11,1 min) **b)** benzoilecgonina-D3 (tr = 11,1 min).

Para a benzoilecgonina os iões a monitorizar são os de $m/z= 82$; 240 ; 361 e para benzoilecgonina-D3 o ião $m/z= 243$, (proposta de fragmentação apresentada na Figura 24).

Os cromatogramas extraídos, utilizando estes iões são apresentados na Figura 25 e para a benzoilecgonina-D3 na Figura 26.

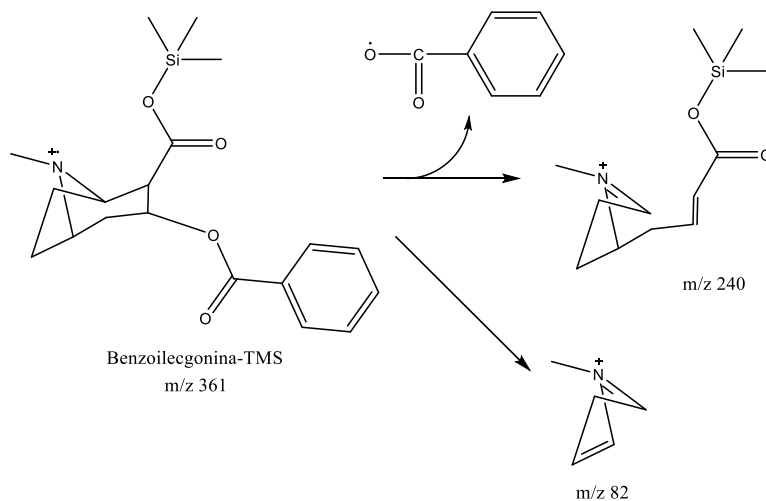
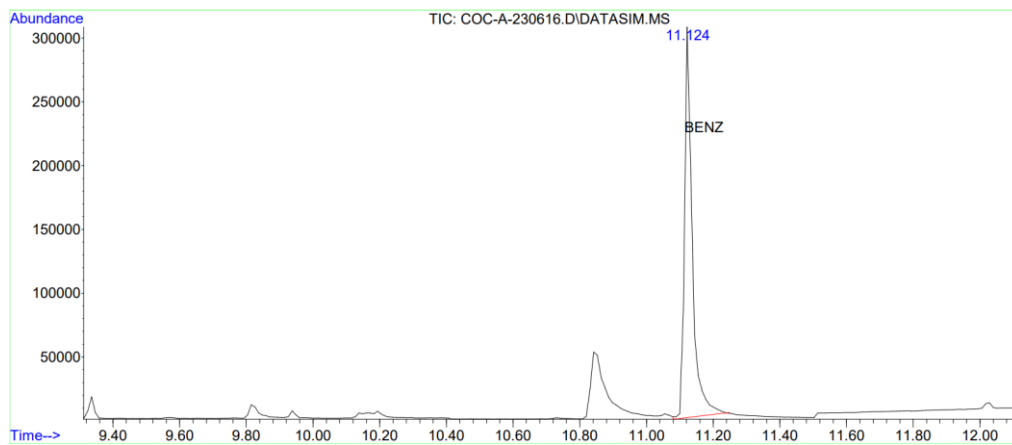


Figura 24. Proposta de fragmentação da benzoilecgonina derivatizada com MSTFA-TMCS [72].

a)



b)

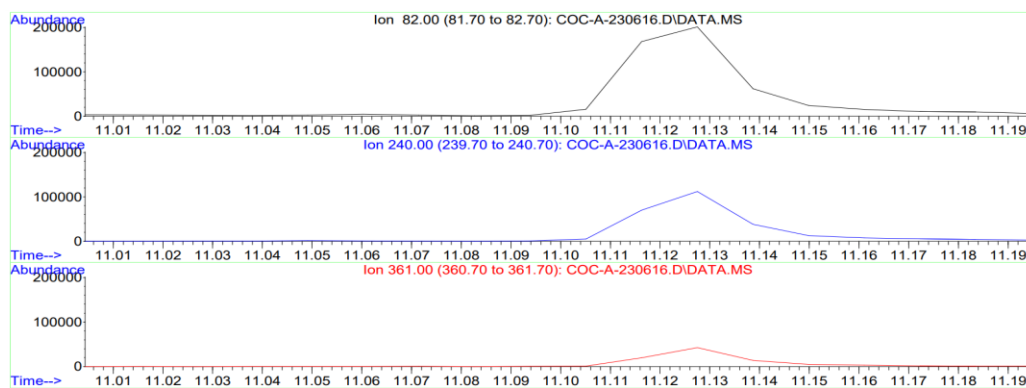


Figura 25. a) Cromatograma extraído para a benzoilecgonina com tempo de retenção de 11,1 min ($m/z=82;240;361$) **b)** Cromatogramas extraídos para os íões de $m/z= 82; 240; 361$ da benzoilecgonina.



Figura 26. Cromatograma extraído para a benzoilecgonina-D3 com tempo de retenção de 11,1 min ($m/z=243$).

3.2. Parâmetros de detecção das substâncias analisadas

O método cromatográfico utilizado neste trabalho para a análise de anfetaminas, opiáceos e cocaína nas matrizes biológicas de soro e fluido oral foi o método previamente desenvolvido e validado que se encontra implementado no SQTf-C para a determinação de anfetaminas e substâncias relacionadas, opiáceos, cocaína e metabolitos, em sangue por GC-MS.

Os parâmetros de detecção são os tempos de retenção, relações iônicas e a razão sinal/ruído (S/R) (Tabela 11).

Tabela 11. Parâmetros de detecção de anfetamina, metanfetamina, morfina e benzoilecgonina, adotados no método desenvolvido no SQTf-C, para a determinação destes compostos em sangue.

Substância	Tempo de retenção/min	Iões característicos/ (m/z)	Razão Sinal/Ruído
Anfetamina	4-6	115; 118; 140*	S/R > 3
Anfetamina-D6 (PI)		144	
Metanfetamina	6-10,9	110;118;154*	
Metanfetamina-D9 (PI)		161	
Morfina		236; 414; 429*	
Morfina-D3 (PI)	11,9-15,5	432	
Benzoilecgonina	10,9-11,9	82; 240*; 361	
Benzoilecgonina-D3 (PI)		243	

PI: Padrão interno; * Ião quantificador

Os métodos de determinação de drogas de abuso em sangue, validados e acreditados, usados na rotina do SQTf-C foram adotados para o desenvolvimento deste trabalho. Os limites de detecção são: 20 ng/mL para a anfetamina e 10 ng/mL para a metanfetamina, morfina e benzoilecgonina. Os limites de quantificação são 25 ng/mL para todas as drogas de abuso analisadas no SQTf-C.

3.3. Fluido oral

3.3.1. Confirmação de tempos de retenção e iões característicos

De forma a confirmar os tempos de retenção e os iões característicos da anfetamina, metanfetamina, morfina e benzoilecgonina foram analisadas amostras de controlo fortificadas a 50 ng/mL e amostras brancas, com adição de padrão interno a 2 µg/mL. As amostras utilizadas para este estudo têm um prazo de validade de 2023.

Na Figura 27 apresentam-se as macros correspondentes aos cromatogramas das amostras de controlo a 50 ng/mL para anfetamina e metanfetamina (a) e também das amostras brancas (b).

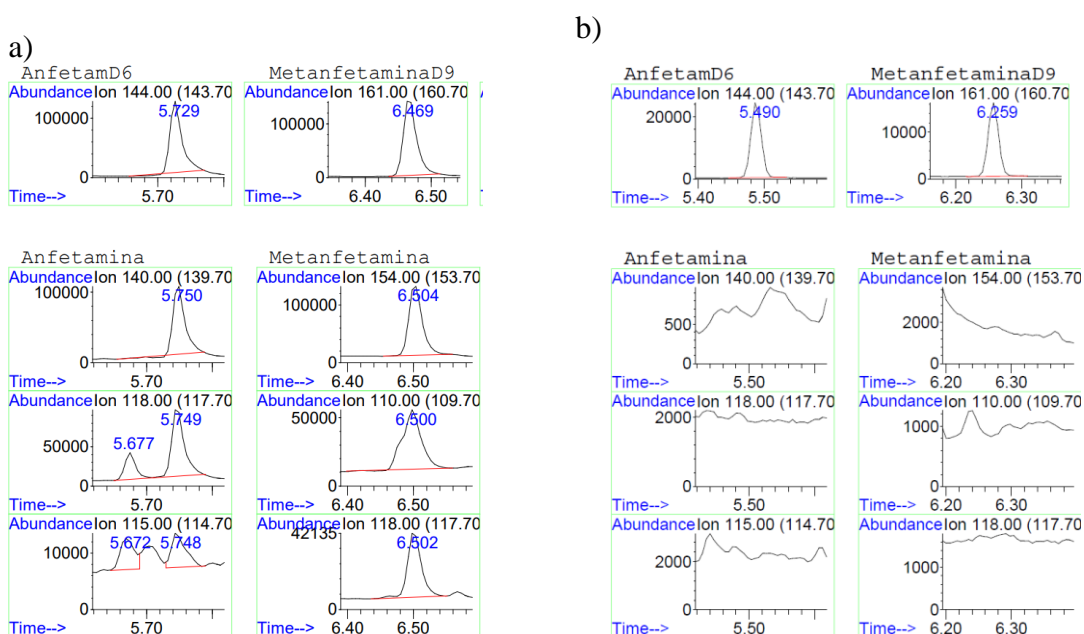


Figura 27. Cromatogramas extraídos a) para os iões selecionados ($tr \approx 5,7$ min e $tr \approx 6,5$ min) da amostra CT-FO-ANF a 50 ng/mL b) amostra branca (AB-FO-ANF).

Na Figura 28 encontram-se representadas as macros correspondentes aos cromatogramas da amostra de controlo fortificada a 50 ng/mL para a morfina (a) e da amostra branca (b).

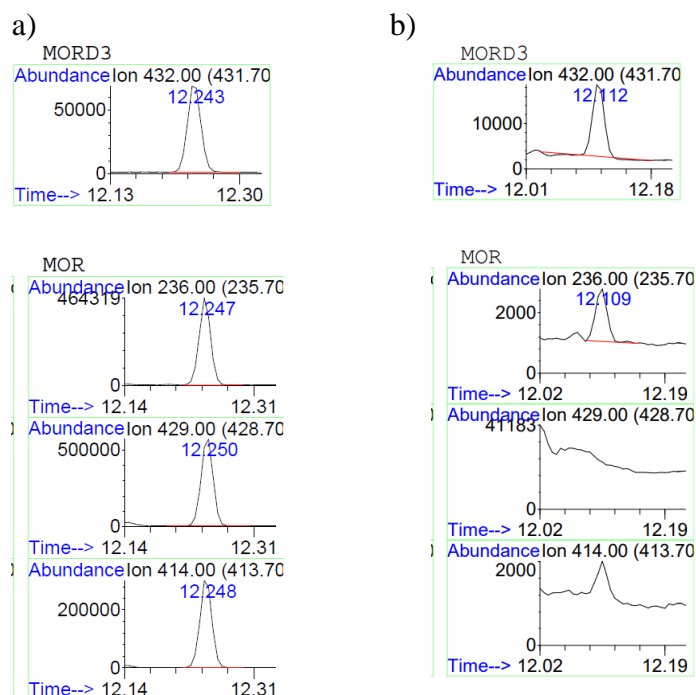


Figura 28. Cromatogramas extraídos **a)** para os iões selecionados ($t_r \approx 12,3$ min) da amostra CT-FO-OP a 50 ng/mL **b)** amostra branca (AB-FO-OP).

Na Figura 29 encontram-se representados os cromatogramas da amostra de controlo fortificada a 50 ng/mL com benzoilecgonina (a) e amostra branca (b).

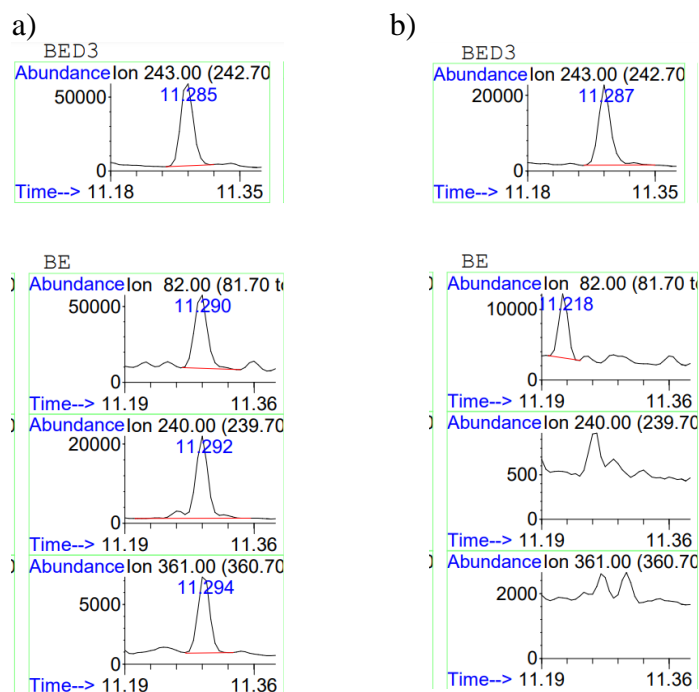


Figura 29. a) Cromatogramas extraídos **a)** para os iões selecionados ($t_r \approx 11,3$ min) da amostra CT-FO-COC a 50 ng/mL **b)** amostra branca (AB-FO-COC).

A partir da análise das amostras de controlo CT-FO-ANF; CT-FO-OP; CT-FO-COC é possível confirmar a presença dos iões característicos de cada substância, os valores de tempo de retenção e a relação sinal/ruído (S/R) (Tabela 12), que estão de acordo com os valores especificados no método desenvolvido no SQTF-C. Os resultados obtidos para as amostras brancas estão também dentro do esperado.

Tabela 12. Resultados dos tempos de retenção, iões característicos e sinal S/R da anfetamina, metanfetamina, morfina, benzoilecgonina e padrões internos respetivos, nas amostras de controlo.

Substância	Tempos de retenção/min	Iões característicos/(m/z)	Sinal S/R
Anfetamina	5,71	140*	> 3
		118	
		115	
Anfetamina-D6	5,56	144	> 3
Metanfetamina	6,46	154*	> 3
		110	
		118	
Metanfetamina-D9	6,32	161	> 3
Morfina	12,25	429*	> 3
		236	
		414	
Morfina-D3	12,18	432	> 3
Benzoilecgonina	11,25	82	> 3
		240*	
		361	
Benzoilecgonina-D3	11,27	243	> 3

*Ião quantificador

3.3.2. Pesquisa de drogas de abuso analisadas no SQTF-C

Numa primeira fase, realizou-se uma análise com as amostras FO-ANF-23, FO-OP-23 e FO-COC-23 sem adição de padrões internos, de forma a pesquisar as substâncias presentes.

No SQTF-C as anfetaminas e metanfetaminas por GC-MS são: anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA, MBDB (Figura 4); no caso dos opiáceos analisam-se: a morfina, codeína e 6-acetilmorfina (Figura 2) e no caso da cocaína pesquisam-se os metabolitos benzoilecgonina e o éster metílico da ecgonina (Figura 3) (Tabela 13). Uma vez que no SQTF-C os métodos para confirmar e quantificar estas drogas em sangue se encontram acreditados, estes foram aplicados ao estudo das amostras de fluido oral.

Tabela 13. Substâncias analisadas no SQTf-C no método adotado neste trabalho: tempos de retenção e íons característicos.

Substância	Tempos de retenção/min	Íons característicos/(m/z)
Anfetamina	4-6	115;118;140*
Metanfetamina	6-7,20	110;118;154*
MDA	7,20-8,2	135;162;275*
MDMA	8,2-15,5	110;154*;162
MDEA	8,2-15,5	140;303;168*
MBDB	8,2-15,5	303;168*;176
Morfina	10-12,4	236;414;429*
Codeína		178;196;371*
6-acetilmorfina	12,4-15,5	287;340;399*
Cocaína	9-15,5	82;182*;303
Benzoilecgonina	9-15,5	82;240*;361
Éster metílico da ecgonina	6-9	82*;96;155

*Íão quantificador

Os cromatogramas obtidos estão representados nas Figura 30 a 32.

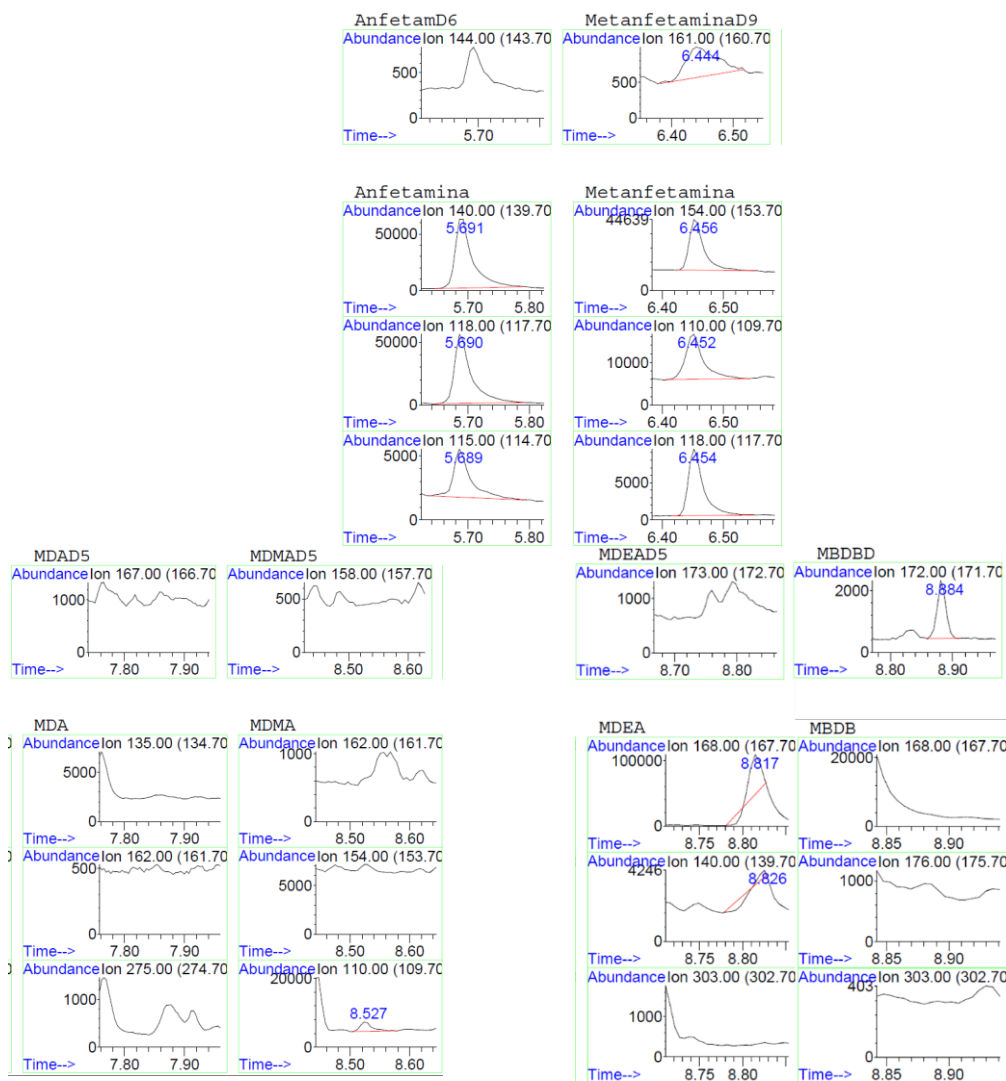


Figura 30. Cromatogramas extraídos para os íões selecionados da anfetamina e substâncias relacionadas.

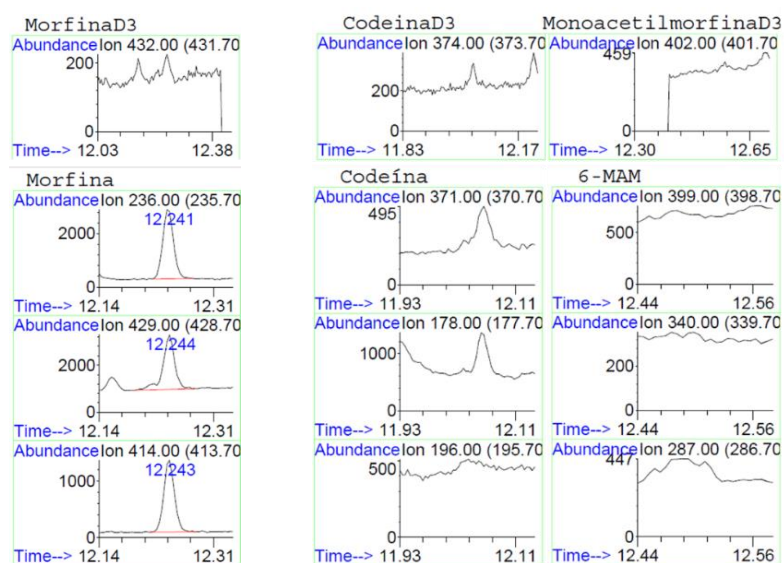


Figura 31. Cromatogramas extraídos para os íões selecionados da morfina, codeína e 6-monoacetilmorfina

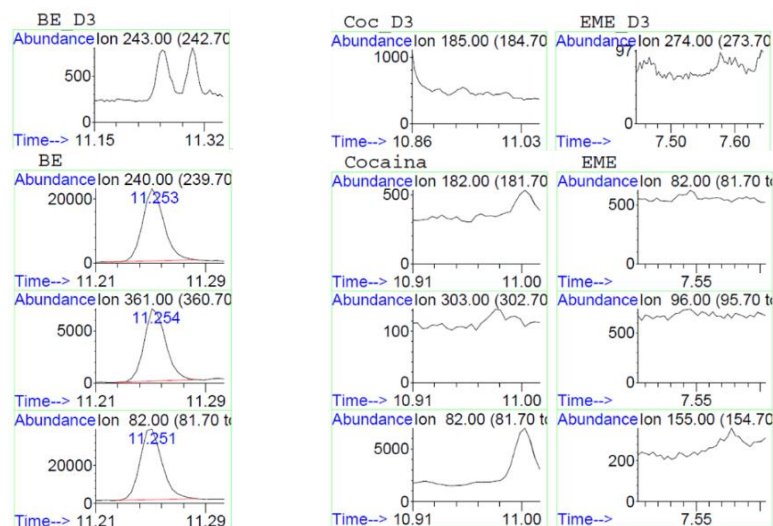


Figura 32. Cromatogramas extraídos para os íons selecionados da benzoilecgonina, cocaína e éster metílico da ecgonina

Analisando a Figura 30 conclui-se que na amostra FO-ANF-23 tem presente a anfetamina e metanfetamina com tempos de retenção de 5,69 e 6,45 min, respectivamente. As outras substâncias pesquisadas não são detetadas na amostra.

Nas amostras FO-OP-23 e FO-COC-23 são detetadas a morfina e benzoilecgonina, com tempos de retenção de 12,24 e 11,25, respectivamente (Figura 31 e Figura 32). Não foram detetadas nas amostras sinais das substâncias relacionadas.

3.3.3. Teste de diferentes volumes de sobrenadante após precipitação proteica

Para avaliar o efeito de recolha de diferentes volumes de sobrenadante após precipitação proteica (Secção 2.3) foram feitos dois grupos de ensaios, nos quais se recolheu 1,5 mL e 1 mL de sobrenadante. As amostras utilizadas foram as de maior e as de menor prazo de validade: 2021 e 2023 (Tabela 14).

Tabela 14. Análise das amostras FO-ANF-23 e FO-ANF-21 para teste do efeito de recolha de diferentes volumes de sobrenadante: 1,5 e 1 mL, após precipitação proteica.

Amostras	Precipitação proteica (ACN)	Volume de amostra	Derivatizante (MBTFA)
FO-ANF-23			
A	1,5 mL	200 µL	30 µL
B			
C	1 mL		
D			
FO-ANF-21			
A	1,5 mL	200 µL	30 µL
B			
C	1 mL		
D			

Os cromatogramas obtidos estão apresentados nas Figura 33 e Figura 34.

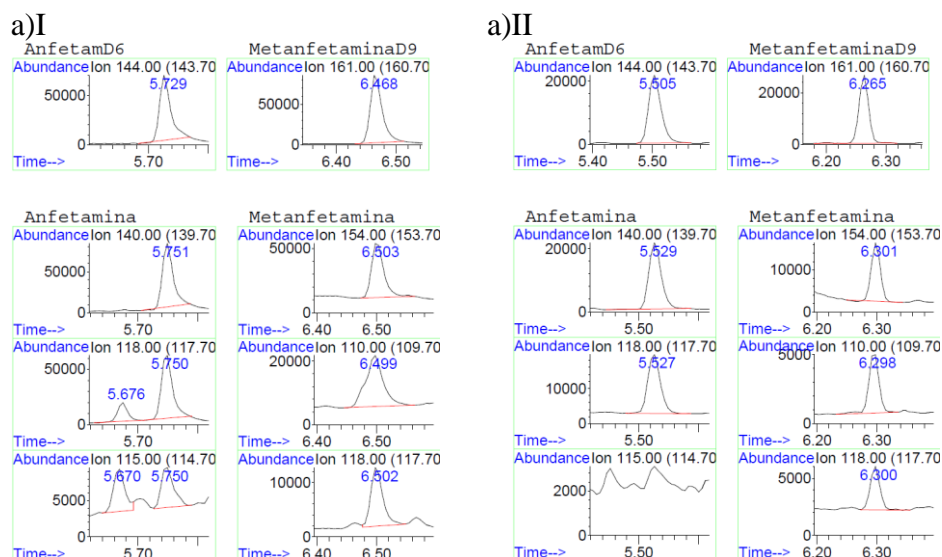


Figura 33. a) Cromatogramas extraídos, nos tempos de retenção e para os iões característicos de cada analito e PI da amostra FO-ANF-23; (I) foi recolhido 1,5 mL de sobrenadante aquando do tratamento da amostra (II) recolha de 1 mL de sobrenadante.

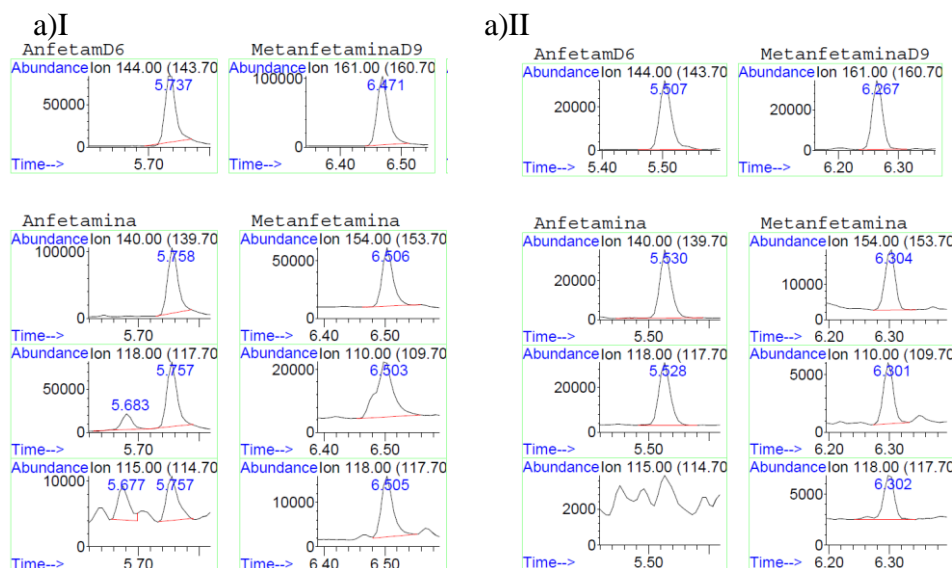


Figura 34. a) Cromatogramas extraídos, nos tempos de retenção e para os iões característicos de cada analito e PI da amostra FO-ANF-21; (I) foi recolhido 1,5 mL de sobrenadante aquando do tratamento da amostra (II) recolha de 1 mL de sobrenadante.

Foram também realizados ensaios para as amostras FO-OP-23;22;21 e FO-COC-23;22;21 (cromatogramas apresentados em anexo). Na Tabela 15 estão representados os resultados para as amostras de anfetaminas, opiáceos e cocaína.

Tabela 15. Resultados obtidos das razões das áreas do analito e padrão interno das amostras FO-ANF-23;21; FO-OP-23;21 e FO-COC-23;21.

Amostras	Razão $A_{\text{analito}}/A_{\text{PI}}$			
	FO-ANF-23		FO-COC-23	FO-OP-23
	Anfetamina	Metanfetamina	Benzoilecgonina	Morfina
A	1,28	0,51	0,06	0,16
B	1,12	0,49	0,06	0,15
C	1,05	0,48	0,07	0,15
D	-	0,52	-	-
	FO-ANF-21		FO-COC-21	FO-OP-21
	Anfetamina	Metanfetamina	Benzoilecgonina	Morfina
A	1,45	0,65	0,07	0,17
B	1,17	0,47	0,04	0,19
C	1,30	0,52	0,10	-
D	1,10	0,51	-	-

Os resultados provam que não há diferenças quando são recolhidos 1,5 ou 1,0 mL do sobrenadante, pelo que se optou por utilizar 1,0 mL em todos os ensaios posteriores.

3.3.4. Anfetaminas: análise das amostras em estudo e de amostras fortificadas (amostras controle)

Foram analisadas contemporaneamente várias amostras de fluido oral provenientes de kits com diferentes prazos de validade (2021, 2022 e 2023) e amostras controle fortificadas com concentrações conhecidas. As condições de preparação das amostras e dos controles estão descritas anteriormente.

Os critérios de aceitação utilizados neste trabalho para os valores das áreas relativas dos sinais cromatográficos dos diferentes fragmentos iônicos e o tempo de retenção relativo foram estabelecidos de acordo com as recomendações da *World Anti-Doping Agency* (WADA) [73].

O critério de aceitação relativo às áreas relativas dos sinais dos vários iões monitorizados em modo SIM por uma dada substância estipula valores de tolerância máxima para diferentes percentagens de áreas relativas. Assim as áreas relativas não podem estar fora do intervalo de tolerância relativamente às registadas na amostra de controle (Tabela 16).

Tabela 16. Tolerância máxima para as áreas relativas das transições iónicas [73].

Áreas relativas	Tolerância máxima
>50 %	± 10 absoluto
25% - 50%	± 20% relativo
5% - 25%	± 5 absoluto

O critério de tempo de retenção relativo (t.r.r) da substância dado pela equação 3.1, indica que este não deve ultrapassar a janela de 1% em comparação com o valor da mesma substância na solução controle, preparada e analisada contemporaneamente.

$$t.r.r = \frac{t.r.r_{amostra}}{t.r.r_{PI}} \quad (\text{Equação 3. 1})$$

Nas tabelas seguintes, Tabela 17 a 20, são apresentados os resultados obtidos em ensaios replicados de análise de anfetamina e metanfetamina em amostras de fluido oral provenientes de kits com diferentes prazos de validade. Nas tabelas é indicado o valor da concentração das duas drogas de abuso em estudo, na amostra de fluido oral.

Tabela 17. Resultados da análise das amostras FO-ANF-23; FO-ANF-22; FO-ANF-21 por comparação com um controle a 125 ng/mL (ensaio 1).

	Iões característicos/ (m/z)	Áreas relativas/ %	Tempo de retenção/ min	Tempo de retenção relativo	Razão $A_{\text{analito}}/A_{\text{PI}}$	Conformidade	Concentração (ng/mL)
Controle 125 ng/mL (ANF)	140*	100	5,75	1,004	0,82	-	-
	118	83,6	PI ^c : 5,73				
	115	4,2					
FO-ANF- 23	140*	100	5,74	1,004	1,28	Conforme	195
	118	90,4	PI: 5,72				
	115	8,0					
FO-ANF- 22	140*	100	5,74	1,004	1,39	Conforme	212
	118	86,6	PI: 5,72				
	115	8,0					
FO-ANF- 21	140*	100	5,74	1,004	1,45	Conforme	222
	118	93,3	PI: 5,71				
	115	5,4					
Controle 125 ng/mL (MET)	154*	100	6,50	1,006	0,86	-	-
	110	49,0	PI ^d : 6,47				
	118	28,5					
FO-MET- 23	154*	100	6,50	1,005	0,51	Conforme	74
	110	57,1	PI: 6,47				
	118	29,6					
FO-MET- 22	154*	100	6,50	1,005	0,55	Conforme	79
	110	51,5	PI: 6,47				
	118	27,8					
FO-MET- 21	154*	100	6,50	1,005	0,65	Conforme	94
	110	56,9	PI: 6,46				
	118	26,9					

Tabela 18. Resultados da análise das amostras FO-ANF-23; FO-ANF-22; FO-ANF-21 por comparação com um controle a 50 ng/mL (ensaio 2).

	Iões característicos/ (m/z)	Áreas relativas/ %	Tempo de retenção/ min	Tempo de retenção relativo	Razão $A_{\text{analito}}/A_{\text{PI}}$	Conformidade	Concentração (ng/mL)
Controle 50 ng/mL (ANF)	140*	100	5,75	1,004	0,24	-	-
	118	72,2	PI ^c : 5,72				
	115	13,2					
FO-ANF- 23	140*	100	5,75	1,004	1,12	Conforme	236
	118	75,2	PI: 5,73				
	115	9,6					
FO-ANF- 22	140*	100	5,79	1,003	1,22	Conforme	256
	118	73,8	PI: 5,77				
	115	10,7					
FO-ANF- 21	140*	100	5,76	1,004	1,17	Conforme	247
	118	73,0	PI: 5,74				
	115	8,7					
Controle 50 ng/mL (MET)	154*	100	6,50	1,005	0,32	-	-
	110	61,4	PI ^d : 6,46				
	118	30,9					
FO-	154*	100	6,50	1,005	0,49	Conforme	77

MET-23	110	53,7	PI: 6,47			Conforme	
	118	26,9				Conforme	
FO-MET-22	154*	100	6,52 PI: 6,48	1,005	0,51	Conforme	80
	110	22,0				Conforme	
	118	23,6				Conforme	
FO-MET-21	154*	100	6,50 PI: 6,47	1,005	0,47	Conforme	74
	110	43,8				Conforme	
	118	31,0				Conforme	

Tabela 19. Resultados da análise das amostras FO-ANF-23; FO-ANF-22; FO-ANF-21 por comparação com um controle a 50 ng/mL (ensaio 3).

	Iões característicos/ (m/z)	Áreas relativas/ %	Tempo de retenção/ min	Tempo de retenção relativo	Razão $A_{\text{analito}}/A_{\text{PI}}$	Conformidade	Concentração /(ng/mL)
Controle 50 ng/mL (ANF)	140*	100	5,51 PI ^c : 5,49	1,004	0,28	-	-
	118	82,9					
	115	2,8					
FO-ANF-23	140*	100	5,51 PI: 5,49	1,004	1,05	Conforme	186
	118	89,0				Conforme	
	115	5,5				Conforme	
FO-ANF-22	140*	100	5,51 PI: 5,48	1,004	1,07	Conforme	188
	118	87,8				Conforme	
	115	5,3				Conforme	
FO-ANF-21	140*	100	5,51 PI: 5,49	1,004	1,26	Conforme	229
	118	85,4				Conforme	
	115	6,3				Conforme	
Controle 50 ng/mL (MET)	154*	100	6,29 PI ^d : 6,26	1,006	0,30	-	-
	110	30,0					
	118	35,7					
FO-MET-23	154*	100	6,29 PI: 6,26	1,006	0,48	Conforme	80
	110	27,7				Conforme	
	118	36,2				Conforme	
FO-MET-22	154*	100	6,29 PI: 6,25	1,006	0,44	Conforme	75
	110	29,8				Conforme	
	118	31,6				Conforme	
FO-MET-21	154*	100	6,29 PI: 6,26	1,006	0,52	Conforme	87
	110	26,9				Conforme	
	118	29,4				Conforme	

Tabela 20. Resultados da análise das amostras FO-ANF-23; FO-ANF-22; FO-ANF-21 por comparação com um controlo a 50 ng/mL (ensaio 4).

	Iões característicos/ (m/z)	Áreas relativas/ %	Tempo de retenção/ min	Tempo de retenção relativo	Razão $A_{\text{analito}}/A_{\text{PI}}$	Conformidade	Concentração (ng/mL)
Controlo 50 ng/mL (ANF)	140*	100					
	118	76,3	5,52	1,004	0,33	-	-
	115	6,7	PI: 5,50				
FO-ANF- 23	140*	1,5	5,53	1,004	0,01	Não conforme	
	118	84,2	PI: 5,50			Conforme	2
	115	100				Não conforme	
FO-ANF- 22	140*	100	5,51	1,004	1,07	Conforme	
	118	81,6	PI: 5,48			Conforme	161
	115	5,3				Conforme	
FO-ANF- 21	140*	100	5,53	1,004	1,10	Conforme	
	118	84,1	PI: 5,50			Conforme	166
	115	8,9				Conforme	
Controlo 50 ng/mL (MET)	154*	100	6,30	1,006	0,37	-	-
	110	37,9	PI: 6,26				
	118	27,2					
FO- MET-23	154*	100	6,30	1,006	0,52	Conforme	
	110	34,7	PI: 6,26			Conforme	70
	118	27,8				Conforme	
FO- MET-22	154*	100	6,29	1,006	0,44	Conforme	
	110	30,8	PI: 6,25			Conforme	60
	118	31,6				Conforme	
FO- MET-21	154*	100	6,30	1,006	0,51	Conforme	
	110	33,0	PI: 6,26			Conforme	68
	118	32,3				Conforme	

Na Tabela 21 estão sumarizadas as concentrações da anfetamina e metanfetamina em todos os ensaios efetuados, para os kits com prazos de validade de 2023, 2022 e 2021.

Tabela 21. Concentrações da anfetamina e metanfetamina registadas para todos os ensaios (kits com prazos de validade de 2023, 2022 e 2021).

	[Anfetamina] (ng/mL)	Anfetamina \bar{x}, s	[Metanfetamina] (ng/mL)	Metanfetamina \bar{x}, s
FO-ANF- 23	195		74	
	236	206±27	77	76±4
	186		80	
			70	
FO-ANF- 22	212		79	
	256	200±40	80	77±9
	188		75	
	161		60	

	222		94	
FO-ANF-21	247	216±35	74	81±12
	229		87	
	166		68	

Atendendo à observação de não-conformidade na amostra FO-ANF-23 do ensaio 4 para a anfetamina, este ensaio não foi considerado para este composto. Os valores da Tabela 21 foram utilizados para os testes estatísticos a seguir apresentados.

De modo a avaliar a estabilidade das amostras FO-ANF-23;22;21, foram realizados testes de significância para comparação das médias amostrais das concentrações das amostras com prazo de validade de 2023 e 2021, ao nível de 5% de significância.

Após verificar que não há outliers usando o teste de Grubbs (Equação 3.2),

$$G = \frac{\max |x_i - \bar{x}|}{s_x} \quad (\text{Equação 3. 2})$$

de forma a avaliar a homogeneidade da variância, utilizou-se um teste baseado na distribuição F de Fischer, teste bilateral, valor de significância 5% (Equação 3.3).

$$TV = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (\text{Equação 3. 3})$$

O valor de teste obtido para a anfetamina foi TV=1,72 com valor crítico de F igual a $F_{\text{crit}}(\text{bilateral};3;2) = 39,17$ e para a metanfetamina TV=7,72 com $F_{\text{crit}}(\text{bilateral};3;3) = 15,44$. Como o valor de teste é inferior ao valor crítico, existe homogeneidade da variância. Havendo homogeneidade da variância, foi calculada uma estimativa do desvio padrão interpolado, *spool*. (Equação 3.4) e o valor de teste, TV, para a comparação das duas médias amostrais (Equação 3.5).

$$spool. = \sqrt{\frac{(n_1-1) \times s_1^2 + (n_2-1) \times s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}} \quad (\text{Equação 3. 4})$$

$$TV = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{spool \times \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (\text{Equação 3. 5})$$

Para a anfetamina, o valor de teste obtido foi TV=0,49, com $t_{\text{crit}} = t_{0,05}^b(5) = 2,02$ e valor de prova $p = 0,647$, para a metanfetamina, obteve-se um valor de teste TV=1,08,

com $t_{crit}=t_{0,05}^b(6) = 1,94$ e valor de prova $p = 0,320$. Como ambos os valores do teste são inferiores ao valor crítico e os valores de prova superiores a 0,05, não existem diferenças significativas das concentrações das amostras de 2023 e 2021. Portanto nas condições de armazenamento, as amostras mantêm-se estáveis.

Num segundo passo realizou-se um teste de comparação de valor de estimativa (\bar{x}), considerando os valores de concentração obtidos para todas as amostras, com o valor de referência (x_{ref}), indicado pelo fornecedor (Equação 3.6). Para a anfetamina o valor de referência é de 200 ng/mL e para a metanfetamina é de 80 ng/mL.

$$TV = \frac{|x_m - x_{ref}|}{s_x} \times \sqrt{N} \leq t_{\alpha}^b(N-1) \quad (\text{Equação 3. 6})$$

De forma a verificar a presença de valores discrepantes (*outliers*), realizou-se o teste de Grubbs (Equação 3.2). O valor de teste obtido para a anfetamina e metanfetamina foi $TV=1,47$, com $G_{crit}(0,05; n=11) = 2,36$ e $TV=1,99$, com $G_{crit}(0,05; n=12) = 2,41$, respetivamente. Conclui-se que não existem valores discrepantes, logo as amostras estão validadas, existindo confiança nas estimativas.

Para a anfetamina o valor de teste obtido foi $TV=0,92$, com $t_{crit}=t_{0,05}^b(10) = 1,81$ e valor de prova $p = 0,378$. Para a metanfetamina, obteve-se um valor de teste $TV=1,38$, com $t_{crit}=t_{0,05}^b(11) = 1,80$ e valor de prova $p = 0,195$. Como ambos os valores do teste são inferiores ao valor crítico e os valores de prova superiores a 0,05, não existe diferenças significativas das concentrações das amostras com prazos de validade de 2023, 2022 e 2021 em relação aos valores de referência, indicados pelo fornecedor.

3.3.5. Opiáceos e cocaína: análise das amostras em estudo e de amostras fortificadas (amostras controlo)

As amostras de fluido oral, provenientes de *kits* com diferentes prazos de validade (2021, 2022 e 2023) foram também analisadas contemporaneamente para avaliação do conteúdo em morfina e em benzoilecgonina. Como no estudo das anfetaminas, para estas amostras foram sempre analisadas amostras controlo fortificadas com concentrações conhecidas.

Os resultados obtidos nos ensaios de determinação de opiáceos estão apresentados nas Tabelas 22 e 23. Nas Tabelas 24 e 25 apresentam-se os resultados referentes à benzoilecgonina.

Tabela 22. Resultados da análise das amostras FO-OP-23; FO-OP-22; FO-OP-21 por comparação com um controle a 50 ng/mL (ensaio 1).

	Iões característicos/ (m/z)	Áreas relativas/ %	Tempo de retenção/ min	Tempo de retenção relativo	Razão $A_{\text{analito}}/A_{\text{PI}}$	Conformidade	Concentração /(ng/mL)
Controle 50 ng/mL (OP)	236	100	12,28	1,000	0,35	-	-
	429*	74,4	PI: 12,27				
	414	49,3					
FO-OP-23	236	100	12,27	1,000	0,16	Conforme	24
	429*	66,3	PI: 12,27				
	414	54,6					
FO-OP-22	236	100	12,27	1,000	0,14	Conforme	20
	429*	67,5	PI: 12,27				
	414	42,4					
FO-OP-21	236	100	12,27	1,000	0,17	Conforme	25
	429*	70,1	PI: 12,27				
	414	53,2					

Tabela 23. Resultados da análise das amostras FO-OP-23; FO-OP-22; FO-OP-21 por comparação com um controle a 50 ng/mL (ensaio 2).

	Iões característicos/ (m/z)	Áreas relativas/ %	Tempo de retenção/ min	Tempo de retenção relativo	Razão $A_{\text{analito}}/A_{\text{PI}}$	Conformidade	Concentração /(ng/mL)
Controle 50 ng/mL (OP)	236	100	12,12	1,000	0,30	-	-
	429*	56,5	PI: 12,11				
	414	45,6					
FO-OP-23	236	100	12,11	1,000	0,15	Conforme	25
	429*	48,9	PI: 12,11				
	414	45,6					
FO-OP-22	236	100	12,11	1,000	0,14	Conforme	24
	429*	47,3	PI: 12,11				
	414	51,6					

Tabela 24. Resultados da análise das amostras FO-COC-23; FO-COC-22; FO-COC-21 por comparação com um controle a 50 ng/mL (ensaio 1).

	Iões característicos/ (m/z)	Áreas relativas/ %	Tempo de retenção/ min	Tempo de retenção relativo	Razão $A_{\text{analito}}/A_{\text{PI}}$	Conformidade	Concentração /(ng/mL)
Controle 50 ng/mL (COC)	82	100	11,29	1,001	0,31	-	-
	240*	36,2	PI: 11,28				
	361	11,4					
FO-COC-23	82	100	11,29	1,000	0,06	Conforme	10
	240*	31,8	PI: 11,28				
	361	11,4					
FO-COC-22	82	100	11,29	1,000	0,07	Conforme	12
	240*	29,4	PI: 11,28				
	361	7,7					
FO-	82	100	11,29	1,000	0,07	Conforme	11
	240*	30,6					

COC-21	361	7,6	PI: 11,28	Conforme
---------------	-----	-----	-----------	----------

Tabela 25. Resultados da análise das amostras FO-COC-23; FO-COC-22; FO-COC-21 por comparação com um controlo a 50 ng/mL (ensaio 2).

	Iões característicos/ (m/z)	Áreas relativas/ %	Tempo de retenção/ min	Tempo de retenção relativo	Razão $A_{analito}/A_{PI}$	Conformidade	Concentração / (ng/mL)
Controlo 50 ng/mL (COC)	82 240* 361	100 51,9 31,5	11,29 PI: 11,28	1,000	0,17	-	-
FO-COC-23	82 240* 361	100 42,5 26,6	11,29 PI: 11,28	1,000	0,06	Conforme Conforme Conforme	19
FO-COC-22	82 240* 361	100 44,8 28,6	11,29 PI: 11,28	1,000	0,07	Conforme Conforme Conforme	20
FO-COC-21	82 240* 361	100 43,5 28,3	11,29 PI: 11,28	1,000	0,04	Conforme Conforme Conforme	21

Os resultados obtidos para a morfina são da ordem de grandeza do limite de quantificação do método, 25 ng/mL, e do valor indicado pelo fornecedor, 20 ng/mL. Não foi registada alteração resultante do tempo de armazenamento, concluindo-se então que as amostras são estáveis, no que diz respeito a esta droga de abuso, nas condições em que foram armazenadas.

No que diz respeito à benzoilecgonina, os valores obtidos estão entre o limite de deteção, 10 ng/mL, e o limite de quantificação, 25 ng/mL do método (o valor indicado pelo fornecedor é 10 ng/mL). O composto foi detetado em todas as amostras analisadas, independentemente do tempo de armazenamento, confirmando a estabilidade da benzoilecgonina nestas amostras, nas condições de armazenamento utilizadas.

3.4. Soro

3.4.1. Confirmação de tempos de retenção e iões característicos

De forma a confirmar os tempos de retenção e os iões característicos da anfetamina, metanfetamina, morfina e benzoilecgonina, no soro, foram analisadas amostras controlo fortificadas a 50 ng/mL e amostras brancas. As amostras utilizadas para este estudo têm um prazo de validade de 2024.

Na Figura 35 encontram-se representados os cromatogramas das amostras controlo a 50 ng/mL da anfetamina e metanfetamina (a) e das amostras brancas (b).

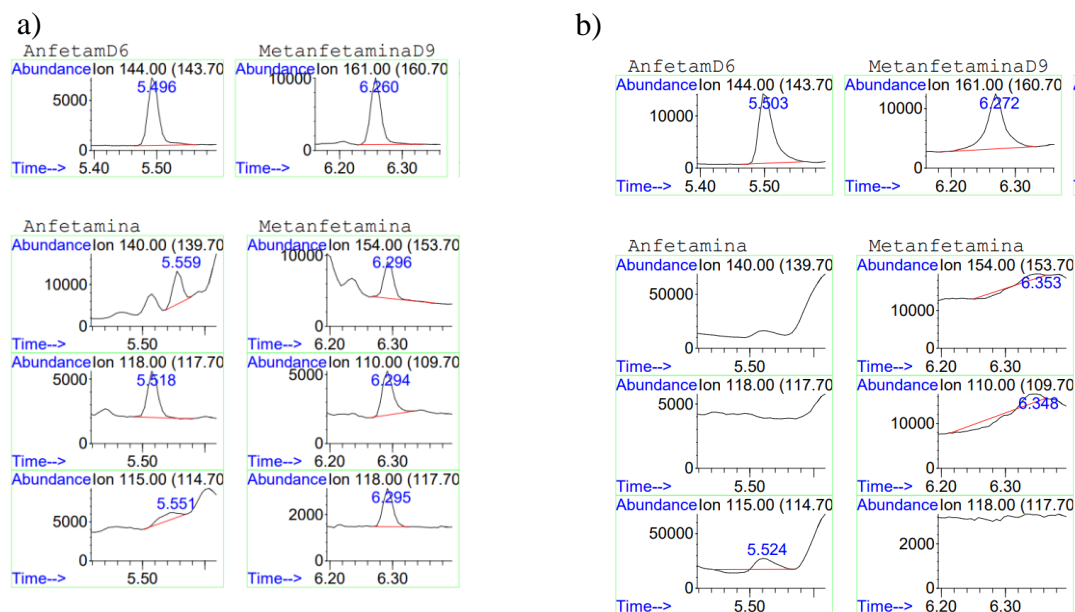


Figura 35. Cromatogramas extraídos **a)** para os iões selecionados ($tr \approx 5,5$ min e $tr \approx 6,3$ min) da amostra CT-SR-ANF a 100 ng/mL **b)** amostra branca (AB-SR-ANF).

Nas Figura 36 e Figura 37 encontram-se representados os cromatogramas da amostra controlo a 100 ng/mL (a) e amostra branca (b) para a morfina e para a benzoilecgonina, respetivamente.

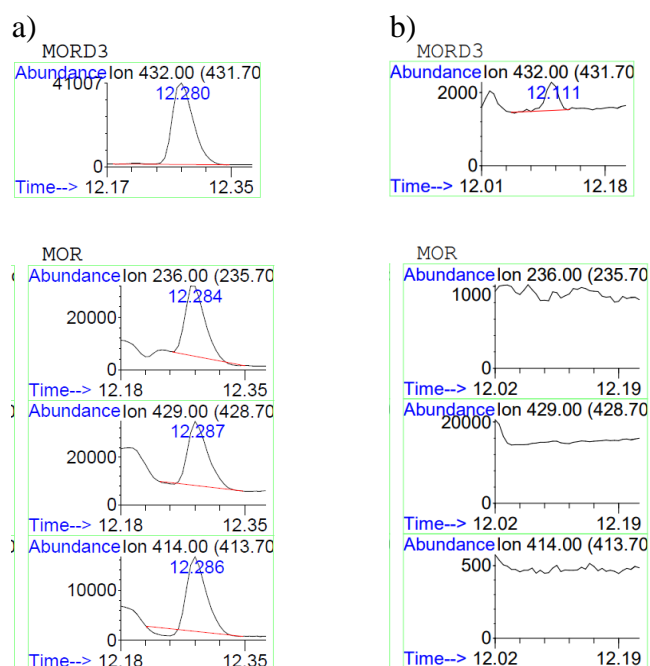


Figura 36. a) Cromatogramas extraídos para os iões selecionados ($tr \approx 12,3$ min) da amostra CT-SR-OP a 100 ng/mL **b)** amostra branca (AB-SR-OP).

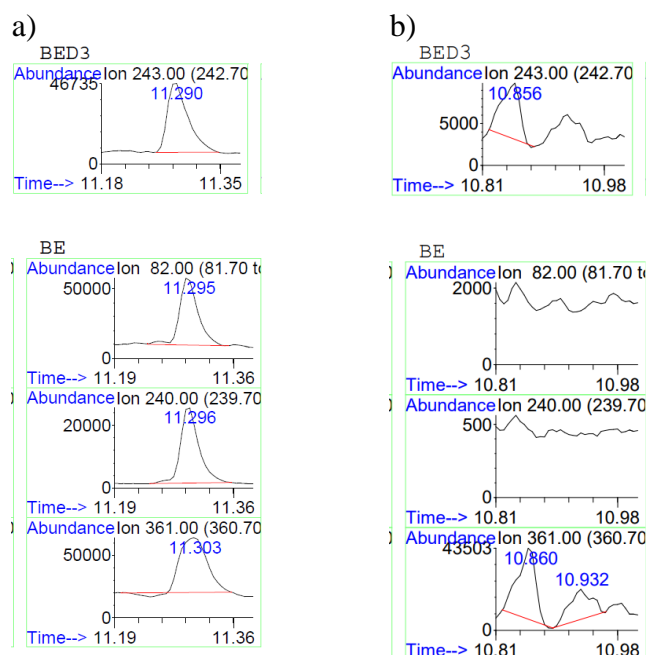


Figura 37. a) Cromatogramas extraídos para os íões selecionados ($t_r \approx 11,3$ min) da amostra CT-SR-COC a 100 ng/mL b) amostra branca (AB-SR-COC).

A partir da análise das amostras CT-SR-ANF; CT-SR-OP e CT-SR-COC (Tabela 26), confirma-se a presença das substâncias (anfetamina, metanfetamina, morfina e benzoilecgonina), com os íões característicos, os tempos de retenção e a relação sinal/ruído, que foram estipuladas no método desenvolvido no SQTf-C (Tabela 11).

Tabela 26. Resultados dos tempos de retenção, íões característicos e áreas relativas da anfetamina, metanfetamina, morfina, benzoilecgonina e padrões internos respectivos, nas análises amostras de controlo (soro).

Substância	Tempos de retenção/min	Íões característicos/(m/z)	Razão Sinal/Ruído
Anfetamina	5,69	140*	> 3
		118	
		115	
Anfetamina-D6	5,55	144	> 3
Metanfetamina	6,45	154*	> 3
		110	
		118	
Metanfetamina-D9	6,32	161	> 3
Morfina	12,29	429*	> 3
		236	
		414	
Morfina-D3 (PI)	12,20	432	> 3

Benzoilecgonina	11,30	82 240* 361	> 3
Benzoilecgonina-D3 (PI)	11,01	243	> 3

*Ião quantificador

3.4.1.1. Pesquisa de drogas de abuso analisadas no SQTf

Numa primeira fase, realizou-se uma análise com as amostras SR-ANF-24; SR-OP-24 e SR-COC-24 sem adição de padrões internos, de forma a avaliar a presença das substâncias alvo de estudo neste trabalho e de outras drogas de abuso analisadas no SQTf-C, no caso dos opiáceos e da cocaína. As drogas pesquisadas foram identificadas na Secção 3.3.2. Os resultados obtidos são apresentados nas Figuras 38-40.

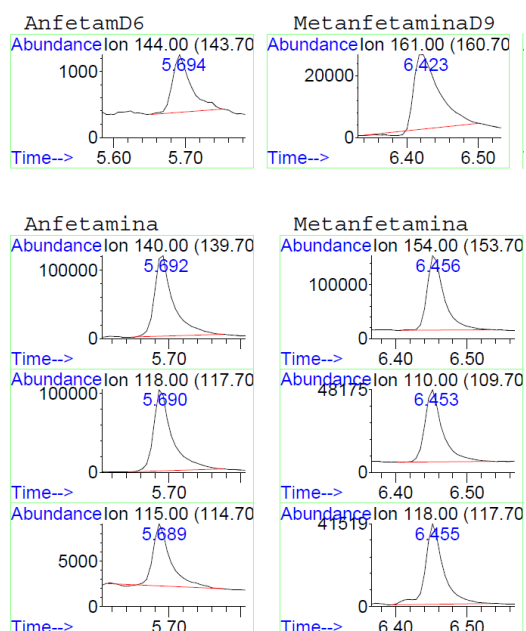


Figura 38. Cromatogramas extraídos para os iões selecionados das anfetaminas da amostra SR-ANF-24, sem adição de padrões internos.

Nas amostras SR-OP-24 e SR-COC-24 é detetada a morfina e benzoilecgonina, com tempos de retenção de 12,24 e 11,25, respetivamente (Figura 39 e Figura 40), não tendo sido detetadas as substâncias relacionadas pesquisadas no SQTF-C.

3.4.2. Análise das amostras de soro e de amostras controlo

Foi realizado um estudo preliminar de amostras de soro, provenientes de *kits* com prazos de validade (2021, 2022, 2023 e 2024) para avaliação do conteúdo em anfetamina, metanfetamina, morfina e benzoilecgonina e da estabilidade das drogas nesta matriz, nas condições de armazenamento utilizadas. Foram analisadas amostras de controlo contemporaneamente.

Os resultados obtidos nos ensaios de determinação de anfetamina e metanfetamina estão apresentados na Tabela 27. Nas Tabelas 28-30 estão apresentados os resultados para a morfina e na Tabela 31 para a benzoilecgonina.

Tabela 27. Resultados da análise das amostras SR-ANF-23; SR-ANF-22; SR-ANF-21 por comparação com um controlo a 250 ng/mL.

	Iões característicos/ (m/z)	Áreas relativas/ %	Tempo de retenção/ min	Tempo de retenção relativo	Razão $A_{\text{analito}}/A_{\text{PI}}$	Conformidade	Concentração (ng/mL)
Controlo 250 ng/mL (ANF)	140*	100	5,73	1,004	2,38	-	-
	118	85,9	PI: 5,71				
	115	5,3					
SR-ANF- 23	140*	100	5,74	1,004	5,04	Conforme	529
	118	89,6	PI: 5,71				
	115	5,9					
SR-ANF- 22	140*	100	5,74	1,004	6,23	Conforme	654
	118	87,1	PI: 5,72				
	115	5,6					
SR-ANF- 21	140*	100	5,74	1,004	5,23	Conforme	550
	118	92,7	PI: 5,72				
	115	4,9					
Controlo 250 ng/mL (MET)	154*	100	6,48	1,003	2,39	-	-
	110	37,5	PI: 6,46				
	118	14,6					
SR-MET- 23	110	100	6,50	1,005	2,11	Conforme	221
	154*	44,5	PI: 6,46				
	118	19,3					
SR-MET- 22	110	100	6,50	1,005	2,88	Conforme	302
	154*	41,4	PI: 6,46				
	118	18,9					
SR-MET- 21	110	100	6,50	1,005	1,74	Conforme	193
	154*	33,2	PI: 6,46				
	118	10,6					

Tabela 28. Resultados da análise das amostras SR-OP-23; SR-OP-22; SR-OP-21 por comparação com um controle a 250 ng/mL (ensaio 1).

	Iões característicos/ (m/z)	Áreas relativas/ %	Tempo de retenção/ min	Tempo de retenção relativo	Razão $A_{\text{analito}}/A_{\text{PI}}$	Conformidade	Concentração (ng/mL)
Controle 250 ng/mL (OP)	236	100	12,11	1,000	2,19	-	-
	414	48,7	PI: 12,11				
	429*	85,4					
SR-OP-24	236	100	12,11	1,000	3,48	Conforme	397
	414	55,0	PI: 12,11				
	429*	93,9					
SR-OP-23	236	100	12,11	1,000	4,22	Conforme	481
	414	55,0	PI: 12,11				
	429*	95,1					
SR-OP-22	236	100	12,11	1,000	3,63	Conforme	414
	414	54,2	PI: 12,11				
	429*	95,1					

Tabela 29. Resultados da análise das amostras SR-OP-23; SR-OP-22; SR-OP-21 por comparação com um controle a 100 ng/mL (ensaio 2).

	Iões característicos/ (m/z)	Áreas relativas/ %	Tempo de retenção/ min	Tempo de retenção relativo	Razão $A_{\text{analito}}/A_{\text{PI}}$	Conformidade	Concentração (ng/mL)
Controle 100 ng/mL (OP)	236	100	12,28	1,001	0,66	-	-
	429*	99,4	PI: 12,28				
	414	58,3					
SR-OP-23	236	92,7	12,28	1,000	3,65	Conforme	552
	429*	100	PI: 12,28				
	414	54,8					
SR-OP-22	236	100	12,29	1,001	3,73	Conforme	565
	429*	97,9	PI: 12,28				
	414	55,9					
SR-OP-21	236	100	12,28	1,000	3,91	Conforme	591
	429*	97,2	PI: 12,28				
	414	53,9					

Tabela 30. Resultados da análise das amostras SR-OP-23; SR-OP-22; SR-OP-21 por comparação com um controle a 100 ng/mL (ensaio 3).

	Iões característicos/ (m/z)	Áreas relativas/ %	Tempo de retenção/ min	Tempo de retenção relativo	Razão $A_{\text{analito}}/A_{\text{PI}}$	Conformidade	Concentração (ng/mL)
Controle 100 ng/mL (OP)	236	100	12,12	1,000	0,96	-	-
	429*	53,8	PI: 12,11				
	414	60,2					
SR-OP-23	236	100	12,12	1,000	3,62	Conforme	379
	429*	94,6	PI: 12,11				
	414	48,9					

SR-OP-22	236	96,0	12,12	1,001	4,45	Conforme	866
	429*	100	PI: 12,11			Não conforme	
	414	52,4				Conforme	
SR-OP-21	236	100	12,28	1,000	3,91	Conforme	409
	429*	97,2	PI: 12,28			Não conforme	
	414	53,9				Conforme	

Tabela 31. Resultados da análise das amostras SR-COC-23; SR-COC-22; SR-COC-21 por comparação com um controlo a 100 ng/mL.

	Iões característicos/ (m/z)	Áreas relativas/ %	Tempo de retenção/ min	Tempo de retenção relativo	Razão $A_{\text{analito}}/A_{\text{API}}$	Conformidade	Concentração / (ng/mL)
Controlo 100 ng/mL (COC)	82	100	11,30	1,001	0,45	-	-
	240*	59,9	PI: 11,29				
	361	27,7					
SR-COC-23	361	100	11,29	1,000	1,17	Conforme	211
	82	66,2	PI: 11,29			Conforme	
	240*	42,1				Conforme	
SR-COC-22	361	100	11,29	1,000	1,32	Conforme	239
	82	77,6	PI: 11,29			Conforme	
	240*	43,1				Conforme	
SR-COC-21	361	82,6	11,29	1,000	1,15	Não conforme	207
	82	41,0	PI: 11,29			Não conforme	
	240*	100				Conforme	

Constatou-se uma maior prevalência de não-conformidades nos ensaios realizados na matriz soro relativamente ao fluido oral, apesar do número de ensaios efetuados ser reduzido para retirar conclusões definitivas.

Os valores indicados pelo fabricante destes *kits* para cada uma destas drogas de abuso é de 500 ng/mL. Para a anfetamina e a morfina os valores obtidos são dessa ordem de grandeza, e apontam para ausência de variações entre as amostras com diferentes prazos de validade. No entanto, não é possível retirar conclusões seguras, atendendo ao número limitado de resultados.

Capítulo 4

Conclusões



4. CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo a detecção e confirmação de anfetamina, metanfetamina, morfina e benzoilecgonina em amostras de fluido oral e de soro, assim como avaliar a estabilidade dessas substâncias em diferentes períodos de armazenamento. As amostras pertenciam a *kits da OraSure Technologies, Inc.* destinados à análise de triagem de drogas de abuso pela técnica imunoenzimática ELISA. No caso, do fluido oral estudaram-se amostras com prazos de validade entre 2023 e 2021 e no soro entre 2024 e 2021. Para o tratamento das amostras foi usada a técnica de precipitação proteica com acetonitrilo gelado, seguida de derivatização e análise por GC-MS, utilizando um método desenvolvido no SQTF-C.

Com base nos parâmetros de detecção definidos no método, (tempos de retenção, iões característicos e a razão sinal/ruído superior a 3) conclui-se a detecção das substâncias em estudo nas duas matrizes. Foi também verificado que não foram detetadas nas amostras, outras drogas pesquisadas no SQTF-C. A presença de anfetamina, metanfetamina, morfina e benzoilecgonina foi confirmada de acordo com os critérios de aceitação da WADA.

No que diz respeito ao estudo de estabilidade em fluido oral para a anfetamina e a metanfetamina, a comparação das médias amostrais das concentrações obtidas para as amostras de 2021 e 2023, permitiu concluir que não há diferenças ao nível de 5% de significância, nas condições de armazenamento, as amostras mantiveram-se estáveis. O valor de concentração obtido é estatisticamente (nível de significância 5%) igual ao indicado pelo fornecedor. Os resultados obtidos para a morfina, em todas as amostras, independentemente do tempo de armazenamento, são da ordem de grandeza do limite de quantificação do método, 25 ng/mL. Conclui-se, portanto, que também no que diz respeito a esta substância, as amostras são estáveis nas condições utilizadas. A mesma conclusão é obtida para a benzoilecgonina: a substância foi detetada em todas as amostras, com valores que estão entre o limite de detecção, 10 ng/mL, e o limite de quantificação, 25 ng/mL do método (o valor indicado pelo fornecedor é 10 ng/mL). Portanto, em fluido oral, anfetamina, metanfetamina, morfina e benzoilecgonina permanecem estáveis nas condições de armazenamento utilizadas por um período de pelo menos 2 anos.

No estudo preliminar feito em amostras de soro, verificaram-se mais resultados de não-conformidade do que no fluido oral, apesar do número reduzido de ensaios não permitir retirar conclusões seguras. Os resultados preliminares obtidos para a anfetamina, a metanfetamina e a morfina apontam para estabilidade das amostras nas condições de armazenamento. É necessária investigação adicional sobre estas amostras e também as de benzoilecgonina para obter resultados conclusivos.

Capítulo 5

Referências Bibliográficas

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] EMCDDA, European Drug Report 2022: Trends and Developments, Publications Office of the European Union, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2022. www.emcdda.europa.eu.
- [2] SICAD, (n.d.).
<https://www.sicad.pt/PT/EstatisticaInvestigacao/Paginas/default.aspx> (accessed November 21, 2022).
- [3] Relatório de atividades | INMLCF.Justica.gov.pt, (n.d.).
<https://inmlcf.justica.gov.pt/Instrumentos-de-gestao/Relatorio-de-atividades> (accessed November 21, 2022).
- [4] D. Vearrier, O. Grundmann, Clinical Pharmacology, Toxicity, and Abuse Potential of Opioids, *J Clin Pharmacol.* 61 (2021) S70–S88.
<https://doi.org/10.1002/JCPH.1923>.
- [5] J. Segura, R. Ventura, C. Jurado, Derivatization procedures for gas chromatographic-mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 713 (1998) 61–90.
[https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(98\)00089-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(98)00089-9).
- [6] S.S. Johansen, H.M. Bhatia, Quantitative analysis of cocaine and its metabolites in whole blood and urine by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 852 (2007) 338–344.
<https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2007.01.033>.
- [7] R.J.F. Schepers, J.M. Oyler, R.E. Joseph, E.J. Cone, E.T. Moolchan, M.A. Huestis, Methamphetamine and amphetamine pharmacokinetics in oral fluid and plasma after controlled oral methamphetamine administration to human volunteers, *Clin Chem.* 49 (2003) 121–132. <https://doi.org/10.1373/49.1.121>.
- [8] SICAD, Comportamentos aditivos, 2006.
<https://www.sicad.pt/PT/Cidadao/Tu-alinhas/ComportamentosAditivos/Paginas/detalhe.aspx?itemId=6&lista=HistoriaLegislacao&bkUrl=/BK/Cidadao/Tu-alinhas/ComportamentosAditivos> (accessed July 13, 2023).
- [9] R.J. Dinis-Oliveira, F. Carvalho, J.A. Duarte, F. Remião, A. Marques, A. Santos, T. Magalhães, Collection of biological samples in forensic toxicology, *Toxicol Mech Methods.* 20 (2010) 363–414.
<https://doi.org/10.3109/15376516.2010.497976>.
- [10] G. Cooper, Sampling, storage and stability, *Clarke's Analytical Forensic Toxicology.* (2013) 335–356.
- [11] M.T. Barnhill, D. Herbert, D.J. Wells, Comparison of Hospital Laboratory Serum Alcohol Levels Obtained by an Enzymatic Method with Whole Blood Levels Forensically Determined by Gas Chromatography, *J Anal Toxicol.* 31 (n.d.). <https://academic.oup.com/jat/article/31/1/23/780657> (accessed April 27, 2023).
- [12] N.T. Lappas, C.M. Lappas, *Forensic Toxicology: Principles and Concepts*, Elsevier Science, 2021. <https://books.google.pt/books?id=e-rJxQEACAAJ>.

-
- [13] C. Margalho, F. Corte-Real, M. López-Rivadulla, E. Gallardo, *Salvia divinorum*: Toxicological aspects and analysis in human biological specimens, *Bioanalysis*. 8 (2016) 1415–1425. <https://doi.org/10.4155/bio-2016-0067>.
- [14] T.R. Fiorentin, J.N. Scherer, M.C.A. Marcelo, T.R.V. Sousa, F. Pechansky, M.F. Ferrão, R.P. Limberger, Comparison of Cocaine/Crack Biomarkers Concentrations in Oral Fluid, Urine and Plasma Simultaneously Collected From Drug Users, *J Anal Toxicol*. 42 (2018) 69–76. <https://doi.org/10.1093/JAT/BKX085>.
- [15] E. Gallardo, J.A. Queiroz, The role of alternative specimens in toxicological analysis, *Biomed. Chromatogr*. 22 (2008) 795–821. <https://doi.org/10.1002/bmc>.
- [16] N. Badawi, K.W. Simonsen, A. Steentoft, I.M. Bernhoft, K. Linnet, Simultaneous screening and quantification of 29 drugs of abuse in oral fluid by solid-phase extraction and ultraperformance LC-MS/MS, *Clin Chem*. 55 (2009) 2004–2018. <https://doi.org/10.1373/CLINCHEM.2008.122341>.
- [17] W.M. Bosker, M.A. Huestis, Oral fluid testing for drugs of abuse, *Clin Chem*. 55 (2009) 1910–1931. <https://doi.org/10.1373/CLINCHEM.2008.108670>.
- [18] A.G. Verstraete, Detection times of drugs of abuse in blood, urine, and oral fluid, *Ther Drug Monit*. 26 (2004) 200–205. <https://doi.org/10.1097/00007691-200404000-00020>.
- [19] K. Tamama, Advances in drugs of abuse testing, *Clinica Chimica Acta*. 514 (2021) 40–47. <https://doi.org/10.1016/J.CCA.2020.12.010>.
- [20] ClinLab, Drug screening test can detect up to 10 drugs of abuse in urine | ClinLab Navigator, (2003). <http://www.clinlabnavigator.com/drug-of-abuse-screen-urine.html> (accessed April 28, 2023).
- [21] N. Mali, M. Karpe, V. Kadam, A review on biological matrices and analytical methods used for determination of drug of abuse, (n.d.).
- [22] G.A.A. Cooper, Anatomy and Physiology of Hair, and Principles for its Collection, *Hair Analysis in Clinical and Forensic Toxicology*. (2015) 1–22. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801700-5.00001-7>.
- [23] E.G. de Campos, B.R.B. da Costa, F.S. dos Santos, F. Monedeiro, M.N.R. Alves, W.J.R. Santos Junior, B.S. De Martinis, Alternative matrices in forensic toxicology: a critical review, *Forensic Toxicology* 2021 40:1. 40 (2021) 1–18. <https://doi.org/10.1007/S11419-021-00596-5>.
- [24] L. Tsanaclis, J.F.C. Wicks, Differentiation between drug use and environmental contamination when testing for drugs in hair, *Forensic Sci Int*. 176 (2008) 19–22. <https://doi.org/10.1016/J.FORSCIINT.2007.08.009>.
- [25] M.D. Peres, F.S. Pelição, B. Caleffi, B.S. De Martinis, Simultaneous quantification of cocaine, amphetamines, opiates and cannabinoids in vitreous humor, *J Anal Toxicol*. 38 (2014) 39–45. <https://doi.org/10.1093/jat/bkt093>.
- [26] S.B.H. GmbH, *Toxicologia Forense*, 2016.
- [27] I. Papoutsis, P. Nikolaou, C. Pistos, A. Dona, M. Stefanidou, C. Spiliopoulou, S. Athanaselis, Stability of morphine, codeine, and 6-acetylmorphine in blood at different sampling and storage conditions, *J Forensic Sci*. 59 (2014) 550–554. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12337>.
- [28] G. Skopp, L. Pötsch, A. Klingmann, R. Mattern, Stability of morphine, morphine-3-glucuronide, and morphine-6-glucuronide in fresh blood and plasma and postmortem blood samples, *J Anal Toxicol*. 25 (2001) 2–7. <https://doi.org/10.1093/JAT/25.1.2>.

- [29] G. Høiseth, B. Fjeld, M.L. Burns, D.H. Strand, V. Vindenes, Long-term stability of morphine, codeine, and 6-acetylmorphine in real-life whole blood samples, stored at -20°C, *Forensic Sci Int.* 239 (2014) 6–10. <https://doi.org/10.1016/J.FORSCIINT.2014.03.008>.
- [30] F. Musshoff, J. Trafkowski, U. Kuepper, B. Madea, An automated and fully validated LC-MS/MS procedure for the simultaneous determination of 11 opioids used in palliative care, with 5 of their metabolites, *JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY J. Mass Spectrom.* 41 (2006) 633–640. <https://doi.org/10.1002/jms.1021>.
- [31] R. Karinen, W. Andresen, A. Smith-Kielland, J. Mørland, Long-term storage of authentic postmortem forensic blood samples at -20°C: measured concentrations of benzodiazepines, central stimulants, opioids and certain medicinal drugs before and after storage for 16-18 years, *J Anal Toxicol.* 38 (2014) 686–695. <https://doi.org/10.1093/JAT/BKU080>.
- [32] M. Ventura, S. Pichini, R. Ventura, S. Leal, P. Zuccaro, R. Pacifici, R.D. La Torre, Stability of drugs of abuse in oral fluid collection devices with purpose of external quality assessment schemes, *Ther Drug Monit.* 31 (2009) 277–280. <https://doi.org/10.1097/FTD.0b013e318198670b>.
- [33] I. Gavrilović, A. Musenga, K. Wolff, A. Woffendin, A. Smart, F. Gong, D. Harding, D. Cowan, Stability of drugs of abuse in synthetic oral fluid investigated using a simple “dilute and inject” method of analysis, *Drug Test Anal.* 14 (2022) 1482–1490. <https://doi.org/10.1002/dta.3279>.
- [34] D. Sartori, T. Lewis, A. Breaud, W. Clarke, The development of a high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for simultaneous quantification of morphine, morphine-3- β -glucuronide, morphine-6- β -glucuronide, hydromorphone, and normorphine in serum, *Clin Biochem.* 48 (2015) 1283–1290. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.05.023>.
- [35] D.S. Isenschmid, B.S. Levine, Y.H. Caplan, A comprehensive study of the stability of cocaine and its metabolites, *J Anal Toxicol.* 13 (1989) 250–256. <https://doi.org/10.1093/JAT/13.5.250>.
- [36] S. Dugan, S. Bogema, N.T. Lappas, Stability of drugs of abuse in urine samples stored at -20 degrees C, *J Anal Toxicol.* 18 (1994) 391–396. <https://doi.org/10.1093/JAT/18.7.391>.
- [37] T. Huertas, C. Jurado, M. Salguero, T. Soriano, J. Gamero, Stability of Cocaine Compounds in Biological Fluids During Post-Analytical Sample Storage, *J Anal Toxicol.* 44 (2020) 864–870. <https://doi.org/10.1093/JAT/BKAA044>.
- [38] R.W. Romberg, M.R. Past, Reanalysis of Forensic Urine Specimens Containing Benzoylcegonine and THC-COOH, *J Forensic Sci.* 39 (1994) 479–485. <https://doi.org/10.1520/JFS13619J>.
- [39] K.A. Alsenedi, C. Morrison, Determination of amphetamine-type stimulants (ATs) and synthetic cathinones in urine using solid phase micro-extraction fibre tips and gas chromatography-mass spectrometry, *Analytical Methods.* 10 (2018) 1431–1440. <https://doi.org/10.1039/C8AY00041G>.
- [40] S.N. Giorgi, J.F. Meeker, A 5-year stability study of common illicit drugs in blood, *J Anal Toxicol.* 19 (1995) 392–398. <https://doi.org/10.1093/JAT/19.6.392>.

-
- [41] C. Jiménez, R. de la Torre, M. Ventura, J. Segura, R. Ventura, Stability studies of amphetamine and ephedrine derivatives in urine, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 843 (2006) 84–93. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2006.05.036>.
- [42] K.M. Clauwaert, J.F. Van Bocxlaer, A.P. De Leenheer, Stability study of the designer drugs “MDA, MDMA and MDEA” in water, serum, whole blood, and urine under various storage temperatures, *Forensic Sci Int.* 124 (2001) 36–42. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(01\)00562-X](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(01)00562-X).
- [43] H.M.E. Lund, E.L. Øiestad, H. Gjerde, A.S. Christophersen, Drugs of abuse in oral fluid collected by two different sample kits - Stability testing and validation using ultra performance tandem mass spectrometry analysis, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 879 (2011) 3367–3377. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.09.002>.
- [44] S.J. Marin, D. Menasco, J. Neifeld, E. Gairloch, Section 1. Practical Considerations for LC/MS Method Development of a Comprehensive Urine Pain Panel Acid Analyte Plot Base Analyte Plot, (2017).
- [45] M.S. Landis, The use of mixed-mode ion-exchange solid phase extraction to characterize pharmaceutical drug degradation, *J Pharm Biomed Anal.* 44 (2007) 1029–1039. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2007.04.029>.
- [46] S. Paterson, R. Cordero, S. McCulloch, P. Houldsworth, Analysis of urine for drugs of abuse using mixed-mode solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry, *Ann Clin Biochem.* 37 (Pt 5) (2000) 690–700. <https://doi.org/10.1258/0004563001899744>.
- [47] V. Walker, G.A. Mills, Solid-phase extraction in clinical biochemistry, 2002.
- [48] F.M. Lanças, *Scientia Chromatographica Revista Trimestral do Instituto Internacional de Cromatografia*, (2008).
- [49] B. Raton, L. New, Y. Washington, D.C. Jehudayinon, *CRC PR E S S Advances in Forensic Applications of Mass Spectrometry*, (2004). www.crcpress.com (accessed November 20, 2022).
- [50] Liquid-Liquid Extraction vs. Solid-Phase Extraction, Aurora Biomed. (n.d.). <https://www.aurorabiomed.com/a-breakdown-of-liquid-liquid-extraction-and-solid-liquid-extraction/> (accessed December 7, 2022).
- [51] S.A. Borden, J. Palaty, V. Termopoli, G. Famigliini, A. Cappiello, C.G. Gill, P. Palma, Mass Spectrometry Analysis of Drugs of Abuse: Challenges and Emerging Strategies, *Mass Spectrom Rev.* 39 (2020) 703–744. <https://doi.org/10.1002/MAS.21624>.
- [52] Gas Chromatography with Mass Spectrometry (GC/MS) - MooreAnalytical, Moore Analytical. (n.d.). <https://www.mooreanalytical.com/gc-ms/> (accessed April 26, 2023).
- [53] D.S. Popa, L. Vlase, S.E. Leucuța, F. Loghin, Determination of cocaine and benzoylecgonine in human plasma by LC-MS/MS, *Farmacia.* 57 (2009) 301–308. <https://www.researchgate.net/publication/228476246>.
- [54] L. Vlase, D.S. Popa, F. Loghin, S.E. Leucuta, High-throughput toxicological analysis of Methamphetamine, MDA and MDMA from human plasma by LC-MS/MS, *Romanian Journal of Legal Medicine.* 17 (2009) 213–220. <https://doi.org/10.4323/RJLM.2009.213>.
- [55] B. Kiss, D.-S. Popa, M. Bojita, F. Loghin, Development and validation of a HPLC-DAD/FLD method for the determination of MDMA, MDA, methamphetamine, morphine, morphine-glucuronides and 6-monoacetylmorphine in human plasma Bio-analytical methods View project

- Special Issue: Antioxidants in Age-Related, *Revue Roumaine de Chimie*. 54 (2009) 833–840. <https://www.researchgate.net/publication/215738497>.
- [56] W. Zhou, M.N. Wiczorek, R.W. Jiang, J. Pawliszyn, Comparison of different approaches for direct coupling of solid-phase microextraction to mass spectrometry for drugs of abuse analysis in plasma, *J Pharm Anal*. 13 (2023) 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2022.10.004>.
- [57] P. Fernández, M. González, M. Regenjo, A.M. Ares, A.M. Fernández, R.A. Lorenzo, A.M. Carro, Analysis of drugs of abuse in human plasma using microextraction by packed sorbents and ultra-high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr A*. 1485 (2017) 8–19. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2017.01.021>.
- [58] E. Hidvégi, P. Fábrián, Z. Hideg, G. Somogyi, GC-MS determination of amphetamines in serum using on-line trifluoroacetylation, *Forensic Sci Int*. 161 (2006) 119–123. <https://doi.org/10.1016/J.FORSCIINT.2006.03.030>.
- [59] M. Grapp, C. Kaufmann, F. Streit, L. Binder, Systematic forensic toxicological analysis by liquid-chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry in serum and comparison to gas chromatography-mass spectrometry, *Forensic Sci Int*. 287 (2018) 63–73. <https://doi.org/10.1016/J.FORSCIINT.2018.03.039>.
- [60] Q.R. Sun, P. Xiang, H. Yan, M. Shen, Simultaneous analyses of cocaine and its metabolite benzoylecgonine in urine by LC-MS/MS, *J. Forensic Sci.* 24 (2008) 268–272.
- [61] D. Fritch, K. Blum, S. Nonnemacher, B.J. Haggerty, M.P. Sullivan, E.J. Cone, Identification and quantitation of amphetamines, cocaine, opiates, and phencyclidine in oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J Anal Toxicol*. 33 (2009) 569–577. <https://doi.org/10.1093/JAT/33.9.569>.
- [62] S. V. Kala, S.E. Harris, T.D. Freijo, S. Gerlich, Validation of analysis of amphetamines, opiates, phencyclidine, cocaine, and benzoylecgonine in oral fluids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J Anal Toxicol*. 32 (2008) 605–611. <https://doi.org/10.1093/JAT/32.8.605>.
- [63] P. Cámpora, A.M. Bermejo, M.J. Tabernero, P. Fernández, Use of gas chromatography/mass spectrometry with positive chemical ionization for the determination of opiates in human oral fluid, *Rapid Commun Mass Spectrom*. 20 (2006) 1288–1292. <https://doi.org/10.1002/RCM.2449>.
- [64] S.G. Phillips, K.R. Allen, Acetylcodeine as a Marker of Illicit Heroin Abuse in Oral Fluid Samples, *J Anal Toxicol*. 30 (2006) 370–374. <https://doi.org/10.1093/JAT/30.6.370>.
- [65] P. Fernández, S. Seoane, C. Vázquez, M.J. Tabernero, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, Chromatographic determination of drugs of abuse in vitreous humor using solid-phase extraction, *Journal of Applied Toxicology*. 33 (2013) 740–745. <https://doi.org/10.1002/jat.2722>.
- [66] Inc. OraSure Technologies, OPIATES INTERCEPT® MICRO-PLATE EIA, 2011. www.orasure.com.
- [67] Inc. OraSure Technologies, AMPHETAMINE-SPECIFIC INTERCEPT® MICRO-PLATE EIA, 2011. www.orasure.com.
- [68] Inc. OraSure Technologies, COCAINE METABOLITE INTERCEPT® MICRO-PLATE EIA, 2011. www.orasure.com.

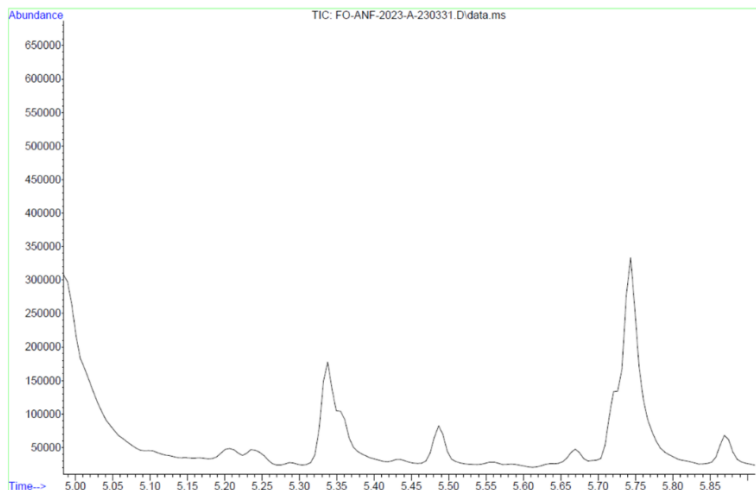
-
- [69] Inc. OraSure Technologies, METHAMPHETAMINE INTERCEPT® MICRO-PLATE EIA, 2011. www.orasure.com.
- [70] T. Kumazawa, Assays for Methamphetamine and Amphetamine in Blood, *Neuropathology of Drug Addictions and Substance Misuse Volume 2: Stimulants, Club and Dissociative Drugs, Hallucinogens, Steroids, Inhalants and International Aspects*. (2016) 360–374. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800212-4.00035-2>.
- [71] C. Poeaknapo, J. Schmid, M. Brandsch, B. Dräger, M.H. Zenk, Endogenous formation of morphine in human cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101 (2004) 14091–14096. https://doi.org/10.1073/PNAS.0405430101/SUPPL_FILE/05430FIG9.JPG.
- [72] R. Montes de Oca Porto, T. Correa Vidal, D. Martínez Brito, S. González Hernández, O.L. Terrero, M. Granda Fraga, Development and validation of an analytical method for the simultaneous determination of benzoylecgonine and ecgonine methyl ester in human urine by gas chromatography/mass spectrometry, *Latin American Journal of Pharmacy*. 29 (2010) 795–799.
- [73] WADA, Identification criteria for qualitative assays incorporating chromatography and mass spectrometry, WADA Technical Document. TD2003IDCR (2003) Accessed 2013.

ANEXO A – Teste de diferentes volumes de sobrenadante

a)I

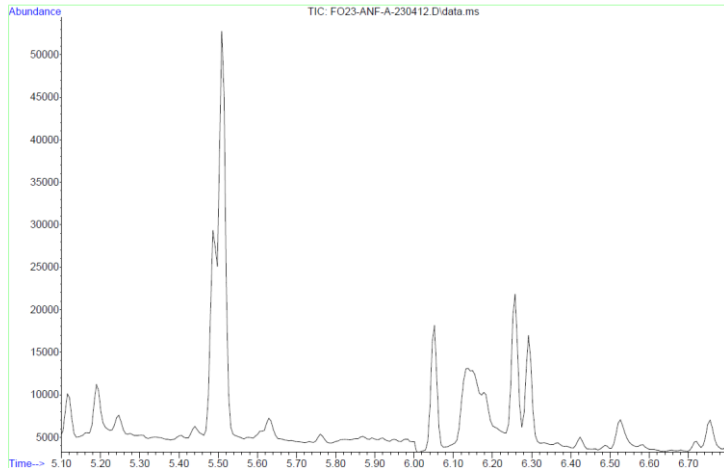
Instrument : GCMS003
 Acquired : 31 Mar 2023 17:30 using AcqMethod PE-SORO FO.M
 Sample Name : LOT2023 PO ANF 31/03/23
 Misc Info :

Anfetamina

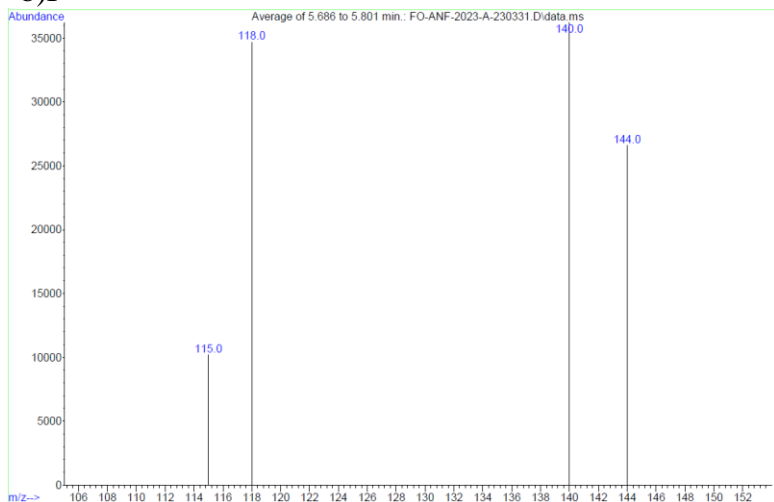


a)II

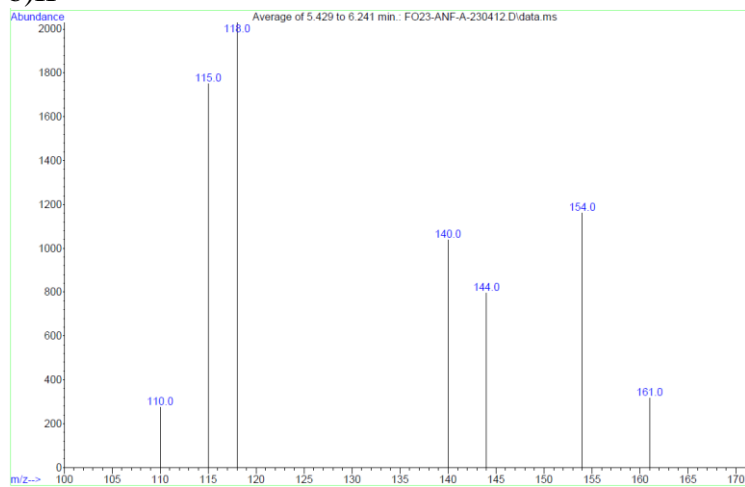
Instrument : GCMS001
 Sample Name : Lt2023ANF PO 1mL PI20
 Misc Info :
 Vial Number : 11



b)I

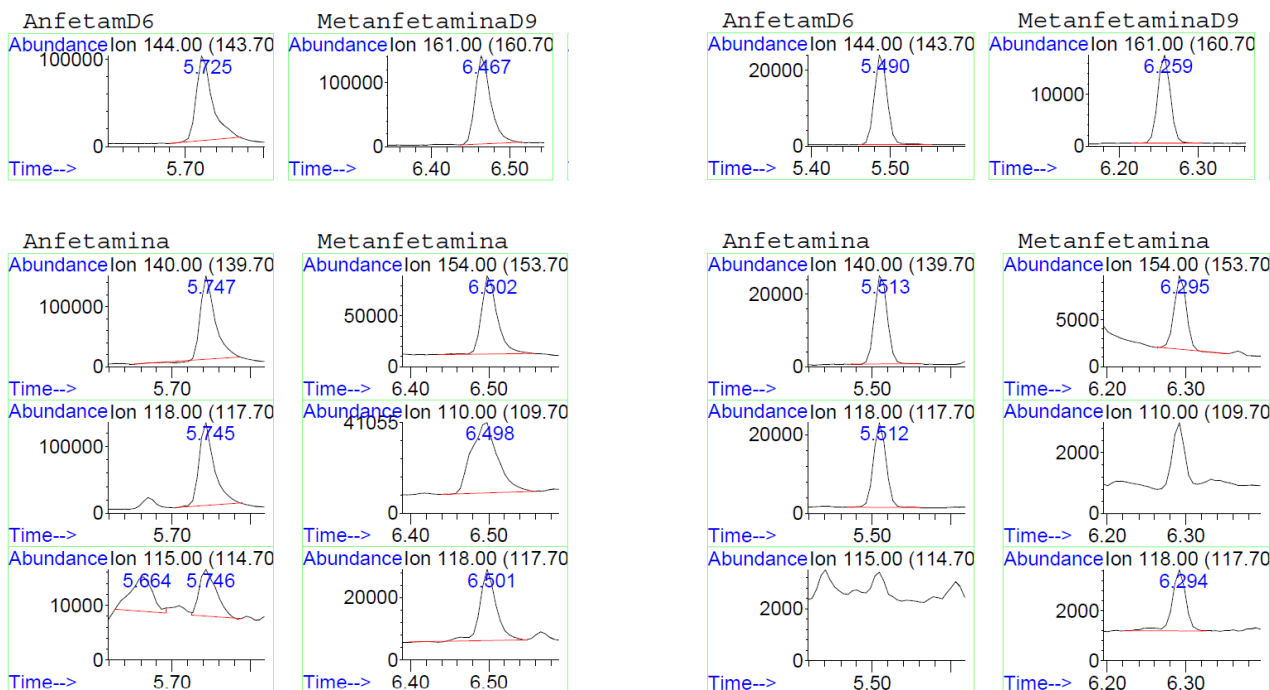


b)II



c)I

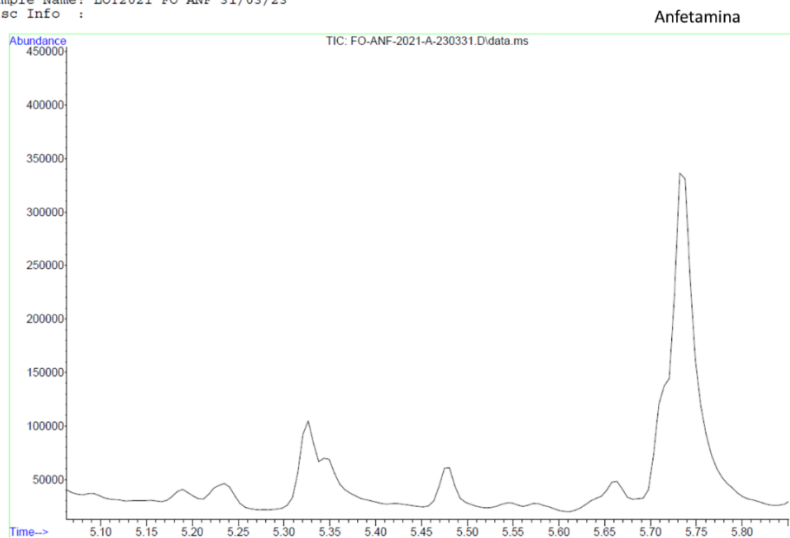
c)II



A 1. a) Cromatogramas (TIC) da amostra FO-ANF-23 **b)** Espetros de massa ($5,69 \leq t_r \leq 5,80$ min) e ($5,43 \leq t_r \leq 6,24$ min) **c)** Cromatogramas extraídos, nos tempos de retenção e para os iões característicos de cada analito e PI; **(I)** foi recolhido 1,5 mL de sobrenadante aquando do tratamento da amostra **(II)** recolha de 1 mL de sobrenadante.

a)I

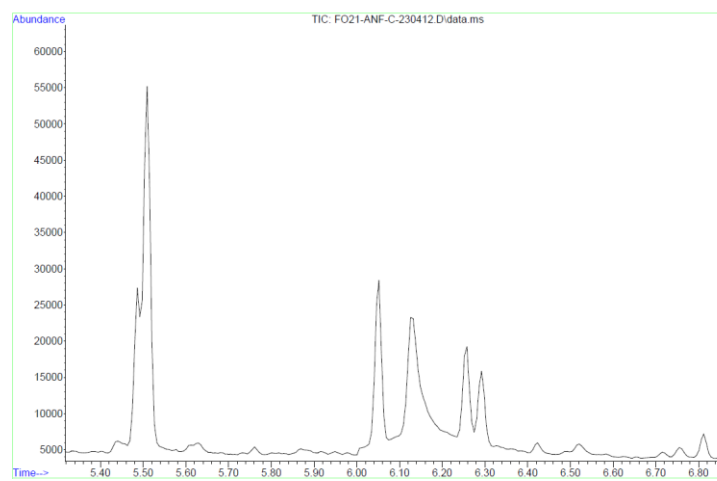
Instrument : GCMS003
 Acquired : 31 Mar 2023 16:49 using AcqMethod PE-SORO FO.M
 Sample Name : LOT2021 FO ANF 31/03/23
 Misc Info :



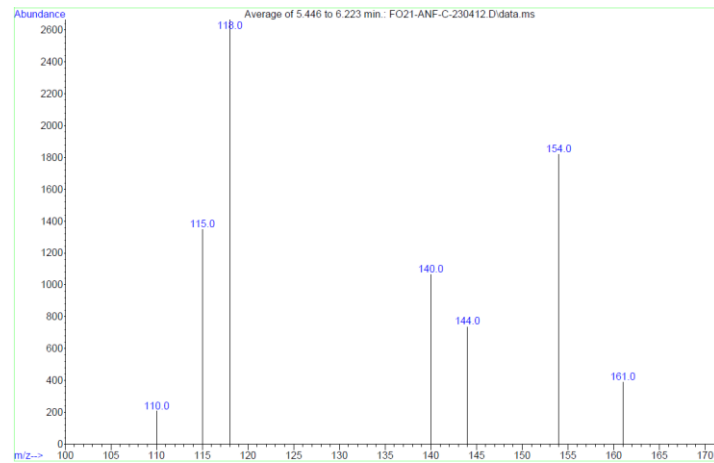
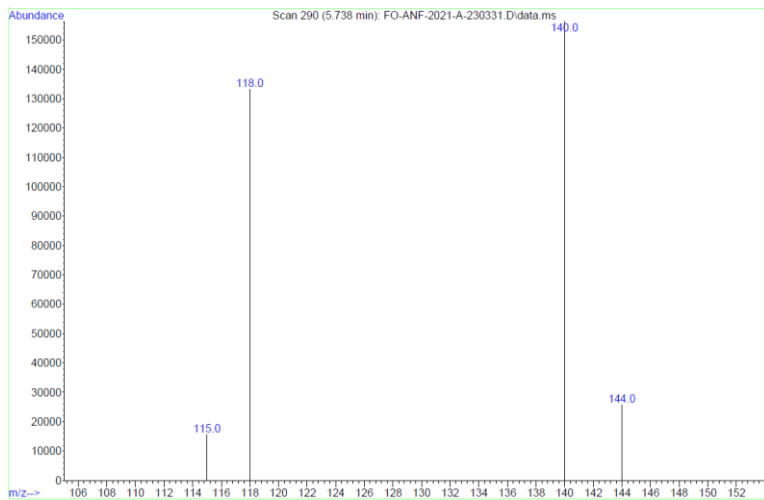
b)I

a)II

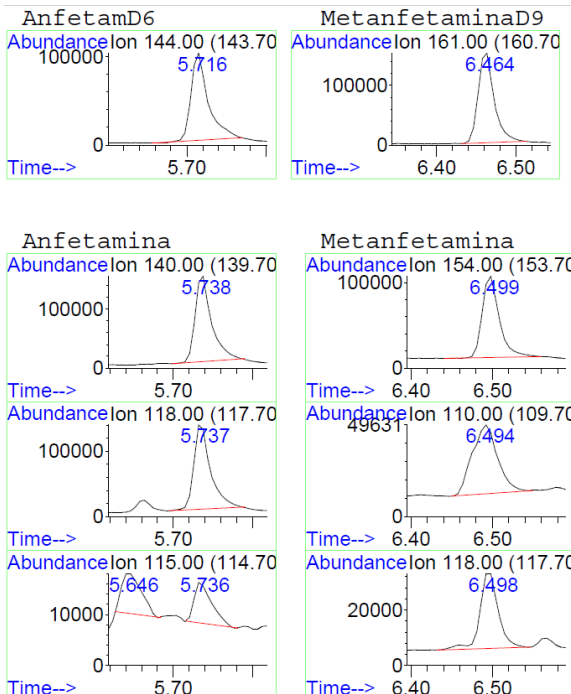
Instrument : GCMS001
 Sample Name : Lt2021ANF FO 1mL PI20
 Misc Info :
 Vial Number: 13



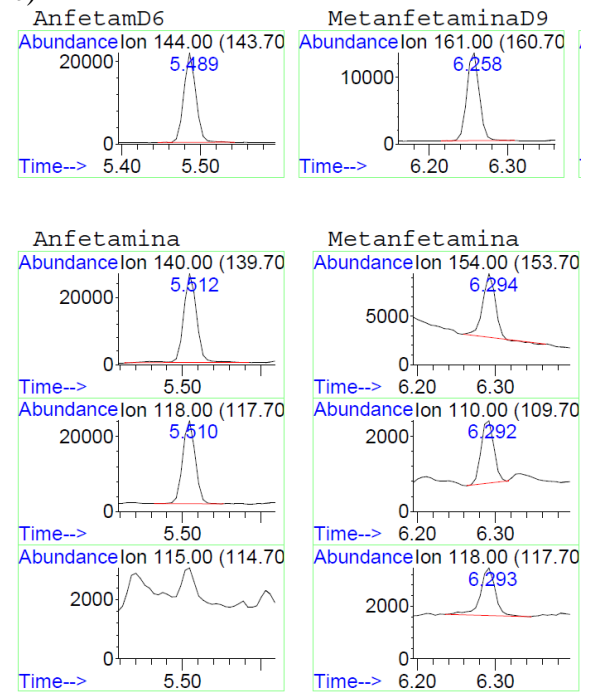
b)II



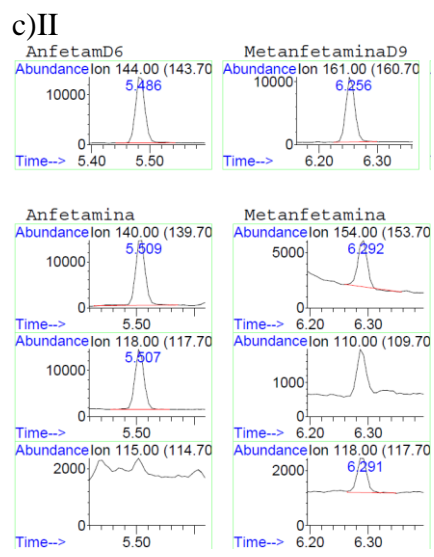
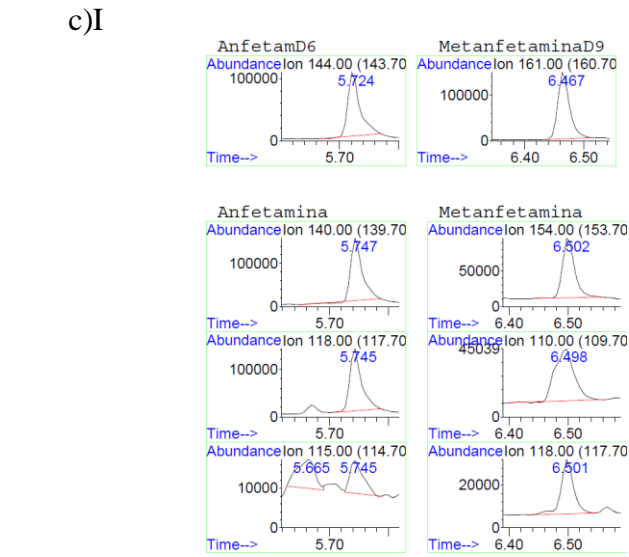
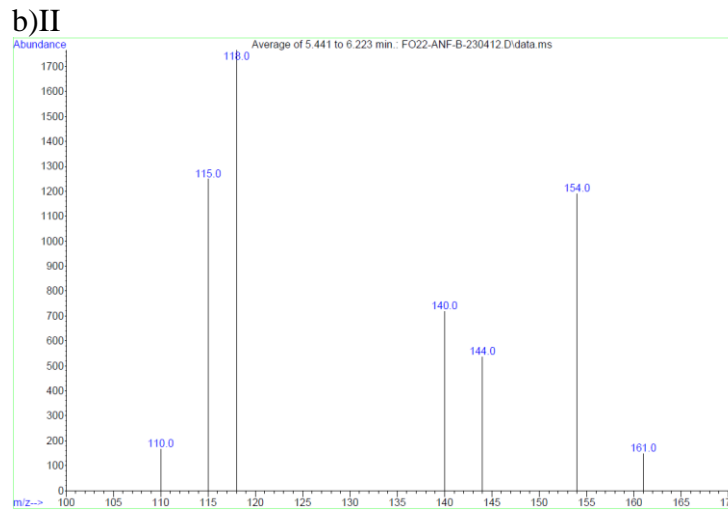
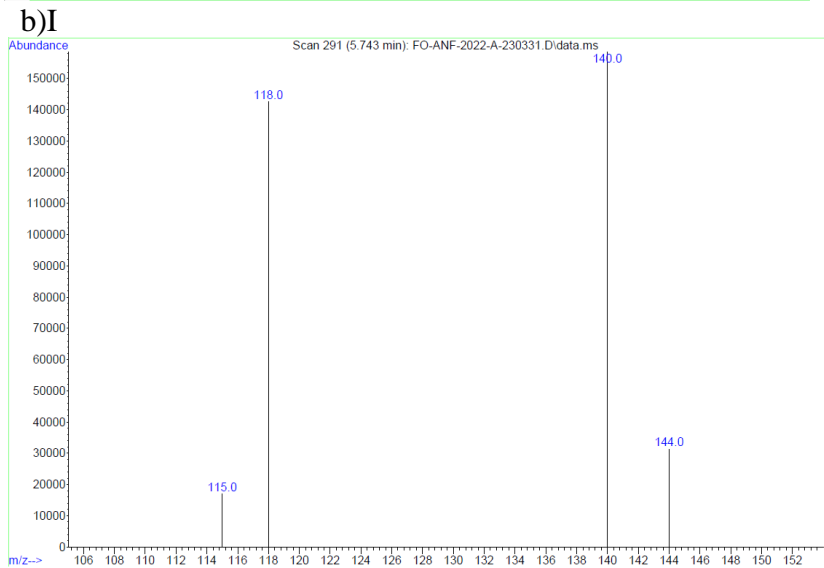
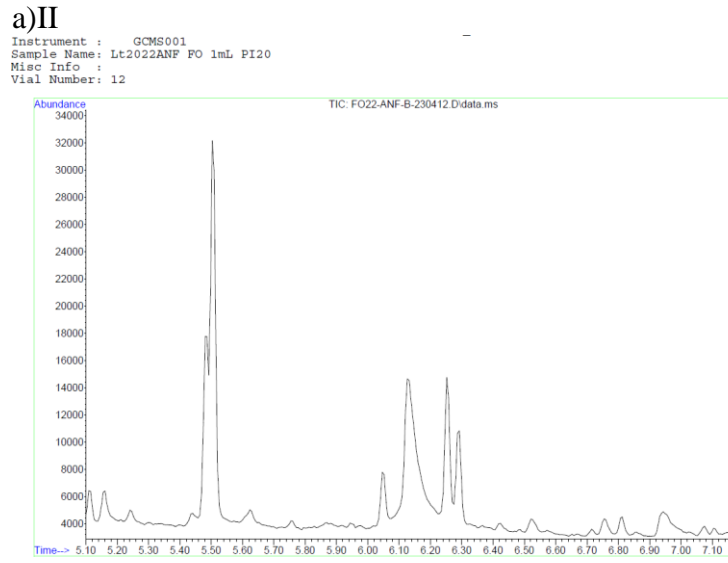
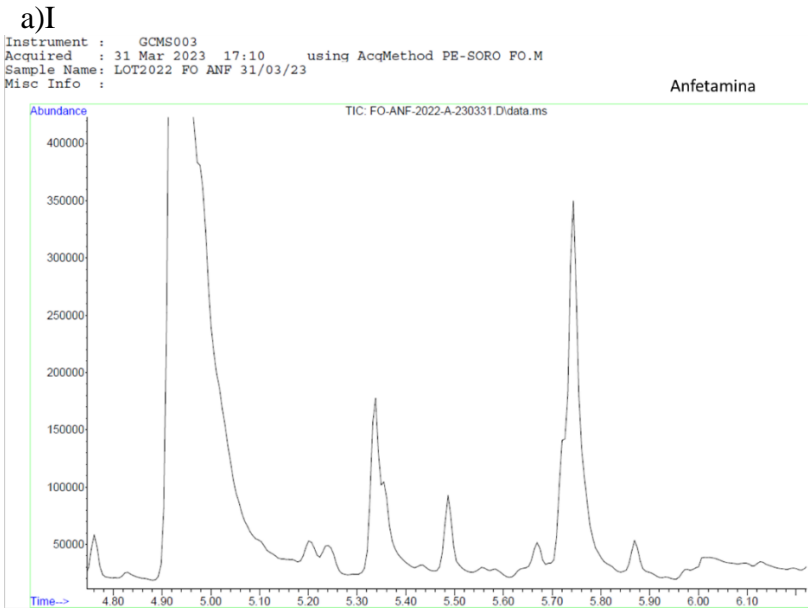
c)I



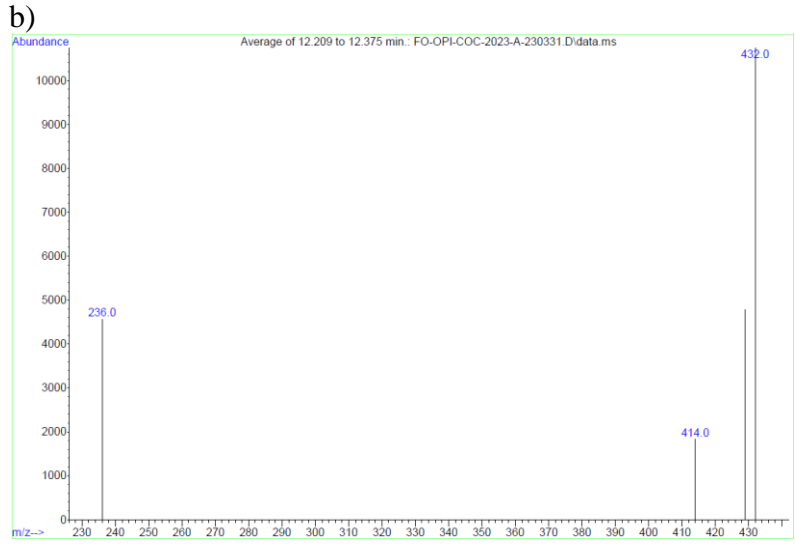
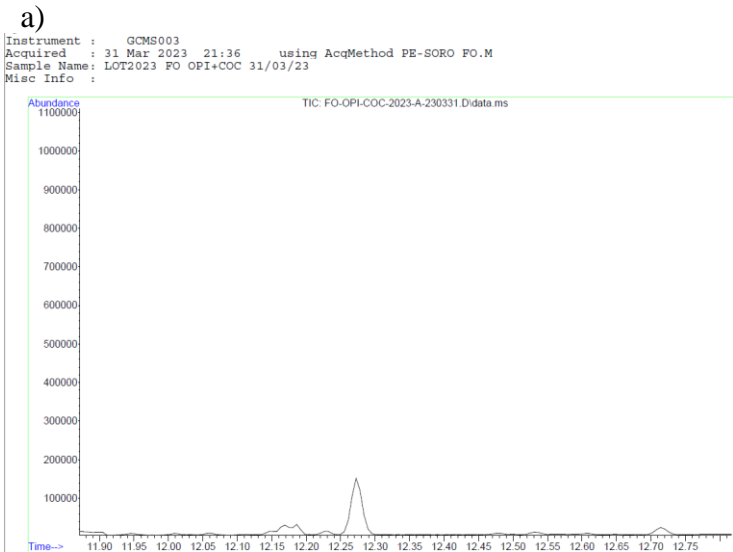
c)II



A 2. a) Cromatogramas (TIC) da amostra FO-ANF-21 **b)** Espetros de massa ($t_r=5,74$ min) e ($5,45 \leq t_r \leq 6,22$ min) **c)** Cromatogramas extraídos, nos tempos de retenção e para os iões característicos de cada analito e PI; **(I)** foi recolhido 1,5 mL de sobrenadante aquando do tratamento da amostra **(II)** recolha de 1 mL de sobrenadante.

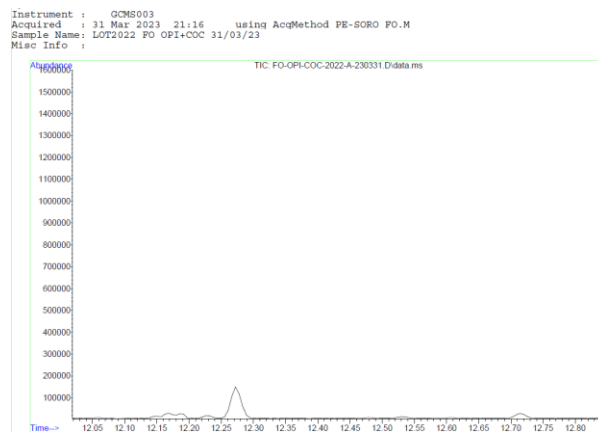


A 3. a) Cromatogramas (TIC) da amostra FO-ANF-22 **b)** Espectros de massa ($t_r=5,74$ min) e ($5,44 \leq t_r \leq 6,22$ min) **c)** Cromatogramas extraídos, nos tempos de retenção e para os iões característicos de cada analito e **PI**; **(I)** foi recolhido 1,5 mL de sobrenadante aquando do tratamento da amostra **(II)** recolha de 1 mL de sobrenadante.

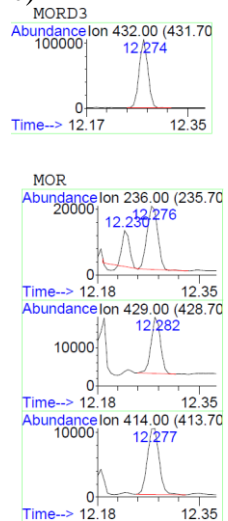


A 4. a) Cromatogramas (TIC) da amostra FO-COC-23 **b)** Espetro de massa 12,21≤tr≤12,38 min com recolha de 1,5 mL de sobrenadante.

a)

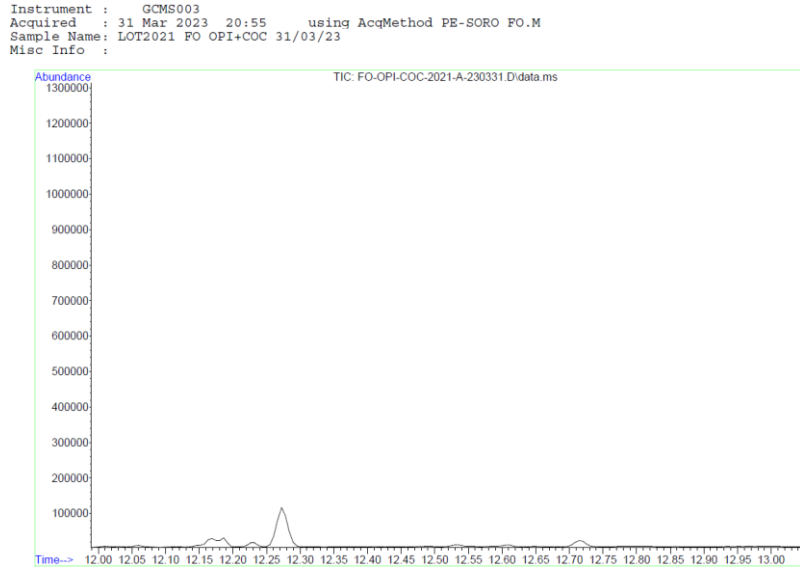


c)



A 5. a) Cromatograma (TIC) da amostra FO-COC-22 **b)** Espectro de massa 12,24≤tr≤12,34 min **c)** Cromatogramas extraídos, nos tempos de retenção e para os iões característicos de cada analito com recolha de 1,5 mL de sobrenadante.

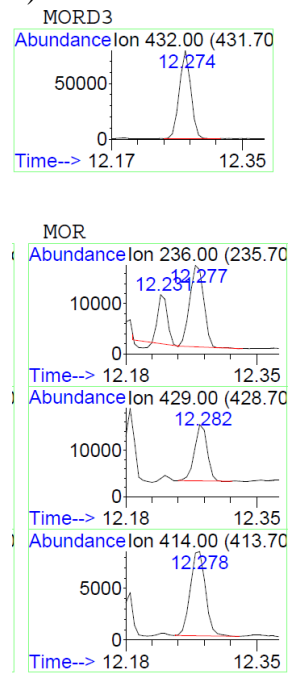
a)



b)



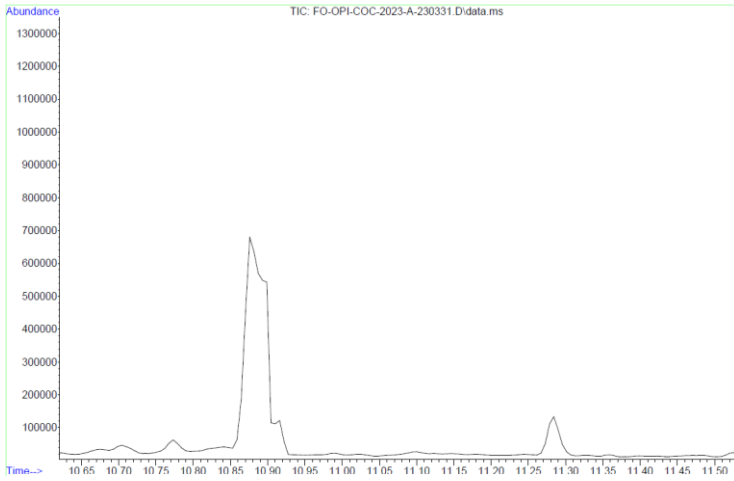
c)



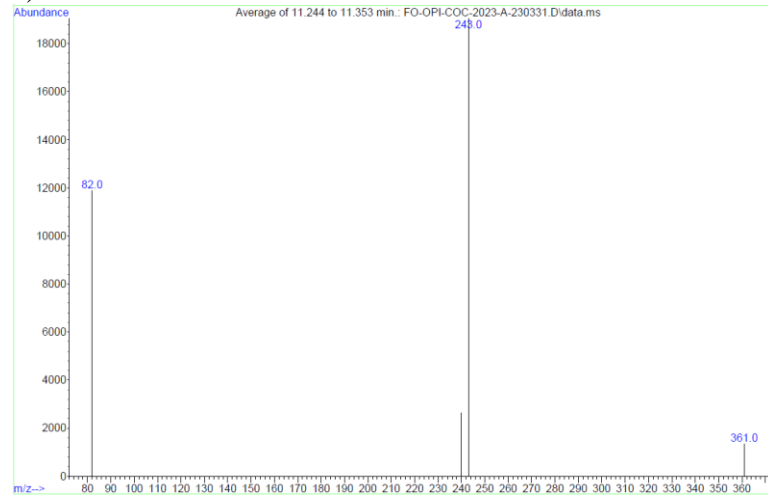
A 6. a) Cromatogramas (TIC) da amostra FO-COC-21 **b)** Espectro de massa 12,21≤tr≤12,36 min **c)** Cromatogramas extraídos, nos tempos de retenção e para os iões característicos de cada analito com recolha de 1,5 mL de sobrenadante.

a)

Instrument : GCMS003
Acquired : 31 Mar 2023 21:36 using AcqMethod PE-SORO FO.M
Sample Name : LOT2023 FO OPI+COC 31/03/23
Misc Info :



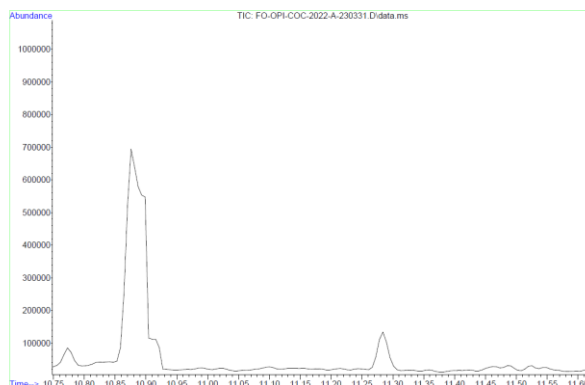
b)



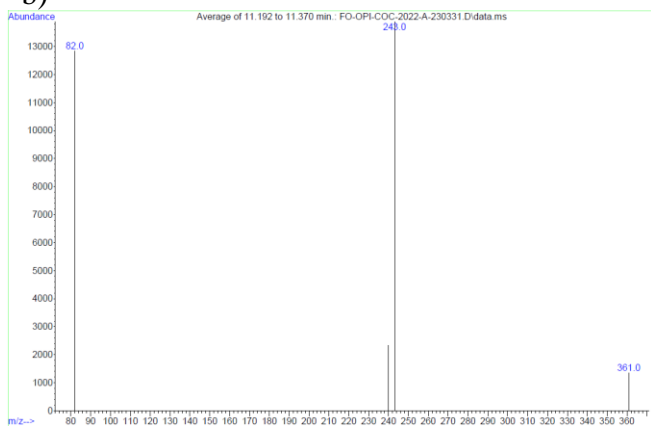
A 7. a) Cromatograma (TIC) da amostra FO-COC-23 **b)** Espetro de massa 11,24 ≤ t ≤ 11,35 min com recolha de 1,5 mL de sobrenadante.

a)

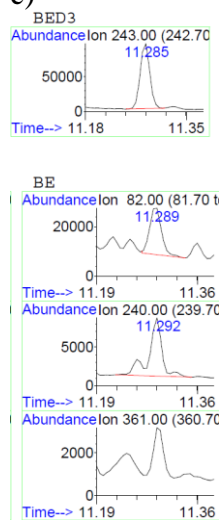
Instrument : GCMS003
Acquired : 31 Mar 2023 21:16 using AcqMethod PE-SORO PO.M
Sample Name: LOT2022 FO OPI+COC 31/03/23
Misc Info :



b)



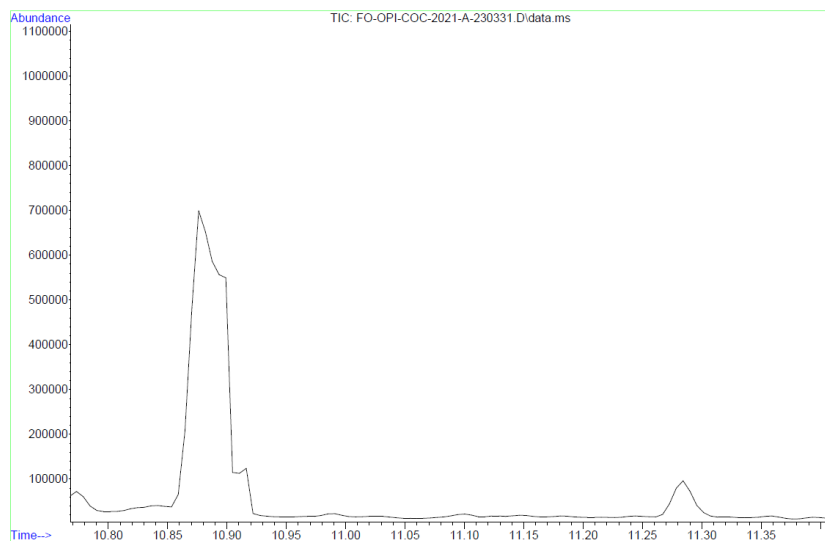
c)



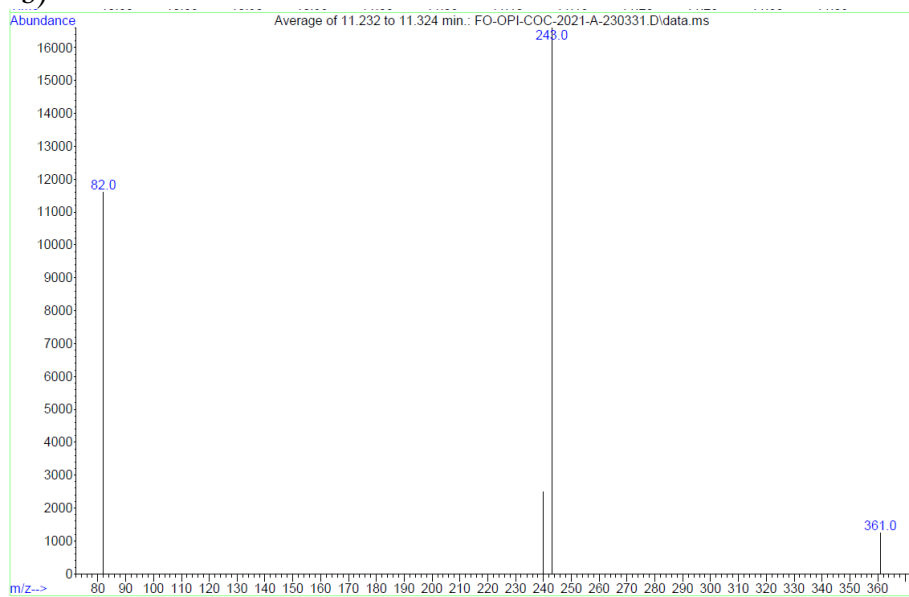
A 8. a) Cromatograma (TIC) da amostra FO-COC-22 **b)** Espectro de massa $11,19 \leq t \leq 11,37$ min **c)** Cromatogramas extraídos, nos tempos de retenção e para os iões característicos de cada analito com recolha de 1,5 mL de sobrenadante.

a)

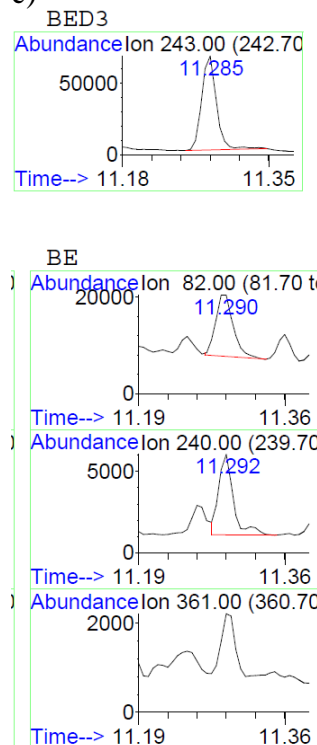
Instrument : GCMS003
Acquired : 31 Mar 2023 20:55 using AcqMethod PE-SORO FO.M
Sample Name: LOT2021 FO OPI+COC 31/03/23
Misc Info :



b)



c)



A 9. a) Cromatograma (TIC) da amostra FO-COC-21 **b)** Espetro de massa 11,23≤tr≤11,32 min **c)** Cromatogramas extraídos, nos tempos de retenção e para os iões característicos de cada analito com recolha de 1,5 mL de sobrenadante.