



**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO EM TECNOLOGIAS LABORATORIAIS EM  
CIÊNCIAS FORENSES**

**ANÁLISE DE SUBSTÂNCIAS DE ABUSO UTILIZANDO NOVAS  
CONFIGURAÇÕES DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E  
CROMATOGRAFIA GASOSA-ESPETROMETRIA DE MASSA:  
ESTUDO DE PROVA DE CONCEITO**

Trabalho submetido por  
**Beatriz Mateus Rodrigues**  
para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologias Laboratoriais em  
Ciências Forenses

**outubro de 2021**





**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO EM TECNOLOGIAS LABORATORIAIS EM  
CIÊNCIAS FORENSES**

**ANÁLISE DE SUBSTÂNCIAS DE ABUSO UTILIZANDO NOVAS  
CONFIGURAÇÕES DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E  
CROMATOGRAFIA GASOSA-ESPECTROMETRIA DE MASSA:  
ESTUDO DE PROVA DE CONCEITO**

Trabalho submetido por  
**Beatriz Mateus Rodrigues**  
para a obtenção do grau de **Mestre** em Tecnologias Laboratoriais em  
Ciências Forenses

Trabalho orientado por  
**Professor Doutor Eduardo Pires Mateus**

e coorientado por  
**Professor Doutor Samir Marcos Esmail Ahmad**  
e coorientado por  
**Professor Dr. Mário João Dias**

**outubro de 2021**







## Dedicatória

*Para os meus avós e pais.*



## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, quero agradecer ao Prof. Doutor Eduardo Mateus, por todo o apoio, orientação, disponibilidade, mostrando-me sempre o caminho correto a ser seguido, de forma única, admirável e exemplar.

Ao Instituto Universitário Egas Moniz, por ter sido a minha casa durante 5 anos e por ter contribuído para a minha formação enquanto profissional.

Ao Laboratório *Resolution Lab*, uma infraestrutura localizada no CENSE – *Center for Environmental and Sustainability Research*, da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa (FCT), onde desenvolvi este projeto de dissertação.

Ao meu coorientador, Prof. Doutor Samir Ahmad, por todo o apoio que me deu, principalmente na fase inicial deste projeto, onde passei momentos difíceis

Ao meu coorientador Prof. Doutor Mário João Dias pela disponibilidade e apoio prestado no decorrer deste projeto.

Aos meus pais, para quem não há agradecimentos que cheguem, obrigada pelo apoio incondicional, pelo esforço e pela confiança que depositam em mim todos os dias.

A todos os meus colegas da FCT, pelo apoio, dedicação, espírito de equipa e amizade criada durante estes tão poucos meses. Não posso deixar de mencionar o nome das pessoas que mais me ajudaram nesta fase, mostrando-me sempre que o caminho não era fácil, mas que iria conseguir, com força e dedicação.

À Cátia Santos, por tudo o que fez por mim, pela ajuda constante e acima de tudo por não me teres deixado ir abaixo nos momentos mais difíceis e de maior dúvida. Desejo o melhor para ti e para a tua pequenina.

Ao João Brinco, por toda a transmissão de conhecimento ao longo deste percurso, mas acima de tudo pela amizade, tinhas sempre uma palavra carinhosa. Foste um exemplo para mim a todos os níveis.

À Sara Pinheiro e ao Bruno António, pelo apoio e amizade. Tornaram os meus dias de laboratório em algo satisfatório, nunca me senti tão em “casa”. Por fim não posso deixar de vos agradecer todo o repertório musical que adquiri neste espaço de tempo e pela caracterização musical diária da minha tese, ficará sempre presente. Obrigado.

Às minhas melhores amigas, Carolina Doroteia e Mariana Carvalho, por tudo. Não tenho palavras para descrever o quão importantes são e significam para mim.

Por fim, agradeço a mim mesma. Pela resiliência e dedicação, voltando a acreditar em mim mesma. Foi difícil, mas eu consegui.



## Preâmbulo

Na realização do projeto de dissertação, houve a necessidade de ultrapassar algumas limitações decorrentes da situação de pandemia de COVID-19 e da dificuldade inicial na obtenção de padrões analíticos de qualidade para a realização do estudo.

O trabalho laboratorial foi desenvolvido no Laboratório *Resolution Lab*, uma infraestrutura localizada no CENSE – *Center for Environmental and Sustainability Research*, da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa, que está equipado com sistemas de GC/MS com analisadores de tempo-de-voo (TOF/MS) e de um triplo quadrupolo (TQ/MS), equipamentos com elevada sensibilidade e seletividade, que permitiram a deteção dos analitos nas condições operacionais utilizadas e o conseqüentemente desenvolvimento deste projeto.

Um fator limitante importante no desenvolvimento deste projeto de dissertação, prendeu-se com o tempo de acesso presencial ao laboratório, sendo uma consequência direta da situação pandémica. O trabalho experimental foi desenvolvido em apenas quatro meses, sendo que os primeiros dois meses, coincidiram com o confinamento geral e o estado de emergência derivados da pandemia, sendo apenas permitido, por questões de segurança e logísticas, o acesso presencial ao laboratório uma a duas vezes por semana, no período da tarde e mediante marcação prévia. Adicionalmente, pelos mesmos motivos, os tempos que mediarão a requisição de material/reagentes e a sua chegada, tiveram um intervalo de 4 a 8 semanas, em claro contraste com o normal período de 1-2 semanas que se verificava antes da pandemia.

Pelos motivos enunciados, o desenvolvimento do projeto focou-se na avaliação da viabilidade da extração de cocaína, fentanilo e dos seus metabolitos maioritários, éster metílico da ecgonina, cocaetileno, benzoilecgonina e norfentanilo em matrizes biológicas, utilizando novas configurações e revestimentos de fibras de SPME (OC-PDMS/DVB e SPME-LC *tips*), para análise qualitativa por GC/MS, utilizando diferentes analisadores de massa. Os ensaios experimentais foram realizados em soluções aquosas, matrizes biológicas fortificadas (amostra controlo), assim como em amostras reais (amostra positiva), contendo os compostos alvo do estudo. Foi igualmente estudada a aplicação de diferentes tipos de analisadores TOF/MS e TQ/MS na determinação em matrizes biológicas dos analitos estudados.

No final do trabalho, tendo sido verificado o potencial da SPME, utilizando as novas configurações e revestimentos de fibras, como uma técnica de preparação de

amostra, para os compostos estudados em matrizes biológicas, foi então criada uma secção no final do trabalho, onde são detalhados todos os passos necessários para a otimização e posterior validação deste método analítico estudado como prova de conceito no decorrer do projeto.

## Resumo

O consumo de substâncias de abuso é considerado um problema de saúde pública de grande importância, uma vez que limita a vida dos seus consumidores e desvia recursos de várias áreas da sociedade.

Tendo em conta os problemas relacionados com o consumo das substâncias de abuso e os seus efeitos negativos consequentes, justifica-se cada vez mais o seu estudo, bem como o desenvolvimento de novos métodos analíticos, que permitam uma melhor monitorização das mesmas em contexto clínico, legal ou epidemiológico.

Neste sentido, na presente dissertação realizaram-se diversos ensaios experimentais com o objetivo de avaliar a adequabilidade de novos métodos de preparação de amostras, baseadas em microextração em fase sólida (SPME), para a deteção de substâncias de abuso em matrizes biológicas, visando a sua potencial introdução como metodologias alternativas verdes.

A análise quantitativa e qualitativa foi realizada por duas técnicas cromatográficas utilizando analisadores de massa diferentes: cromatografia gasosa hifenada à espectrometria de massa utilizando um analisador de tempo de voo (GC-TOF/MS) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa em tandem (GC-TQ/MS), utilizando um triplo quadrupolo.

Os dados obtidos indicam que a técnica de SPME com fibras de configuração clássicas e configuração *tips* é um método seletivo para a determinação dos compostos cocaína, cocaetileno, fentanilo e norfentanilo. Os resultados experimentais indicam igualmente que esta técnica de preparação de amostra é promissora para estas substâncias de abuso, sendo necessários estudos adicionais de otimização do método. Globalmente, os resultados demonstraram que as metodologias propostas são operacionalmente simples, amigas do ambiente e com um custo-benefício vantajoso.

O investimento inicial na aquisição dos dispositivos baseados em SPME é rapidamente compensado pela sua capacidade de reutilização e baixo consumo de amostra e solventes orgânicos durante o ciclo analítico. Por outro lado, os métodos de preparação de amostra desenvolvidas ao longo do projeto de investigação, demonstram ser eficazes para o enriquecimento dos analitos alvo em matrizes biológicas, ao mesmo tempo que não descumpram os princípios da química analítica verde e performance analítica.

Palavras-chave: Substâncias de abuso; Preparação de amostras; SPME com fibras clássicas e *tips*; Matrizes biológicas.

## **Abstract**

Substance abuse is considered a public health problem of great importance, since it limits the lives of its users and diverts resources from various areas of society.

Considering the problems related to substance abuse and its consequent negative effects, there is a growing need to study it and to develop new analytical methods that allow a better monitoring of these substances in clinical, legal or epidemiological context.

In this sense, in the present dissertation several experimental tests were carried out to evaluate the suitability of new sample preparation methods, based on solid phase microextraction (SPME), for the detection of substances of abuse in biological matrices, aiming at their potential introduction as alternative green methodologies.

Quantitative and qualitative analysis was performed by two chromatographic techniques using different mass analyzers: gas chromatography hyphenated to mass spectrometry using a time-of-flight analyzer (GC-TOF/MS) and gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry (GC-TQ/MS) using a triple quadrupole.

The data obtained indicate that the SPME technique with classic configuration fibers and tips configuration is a selective method for the determination of the compounds cocaine, cocaethylene, fentanyl and norfentanyl. The experimental results also indicate that this sample preparation technique is promising for these substances of abuse, but further method optimization studies are required. Overall, the results demonstrated that the proposed methodologies are operationally simple, environmentally friendly and cost-effective.

The initial investment in purchasing the SPME-based devices is quickly offset by their reusability and low consumption of sample and organic solvents during the analytical cycle. On the other hand, the sample preparation methods developed throughout the research project, prove to be effective for the enrichment of target analytes in biological matrices, while not neglecting the principles of green analytical chemistry and analytical performance.

Keywords: Substances of abuse; Sample preparation; SPME with classical and tip fibers; Biological matrices.

## Estudo Prova de Conceito

**Objetivo:** Avaliar a viabilidade da extração de substâncias de abuso em matrizes biológicas, utilizando novas configurações e revestimentos de fibras de SPME (OC-DVB/PDMS e SPME-LC *tips*) para análise qualitativa por GC/MS, utilizando diferentes analisadores de massa.

**Projeto Experimental:** Estudo de "prova de princípio" no qual foram utilizadas duas técnicas de extração: SPME com fibras clássicas, com novo revestimento das fibras clássicas OC-PDMS/DVB e com novas configurações de fibras LC-*tips* (revestimentos C18 e PDMS/DVB), em amostras aquosas; SPE, aplicando uma abordagem convencional (com cartuchos MCX e HLB), em amostras brancas fortificadas (sangue, urina, saliva e plasma). Comparação qualitativa numa amostra de urina positiva, analisada em dois sistemas de GC/MS (GC-TOF/MS e GC-TQ/MS) para avaliar o desempenho de diferentes analisadores na análise qualitativa dos analitos nesta matriz real em estudo.

**Material:** Soluções padrão de cocaína, éster metílico da ecgonina, benzoilecgonina, cocaetileno, fentanilo e norfentanilo; Fibras de configuração clássica; Fibras de configuração clássica com o novo revestimento OC-PDMS/DVB; Fibras de configuração LC-*tips* com revestimentos C18 e PDMS/DVS; SPE com cartuchos OASIS MCX e HLB; Amostras brancas fortificadas de sangue, urina, saliva e plasma; Amostra de urina positiva.

**Resultados:** Fibras Clássicas - a extração dos compostos depende da afinidade dos mesmos com os diferentes revestimentos;

Fibras Clássicas: OC-PDMS/DVB - a extração dos analitos é dependente do tempo, mas o equilíbrio de extração não é atingido nos 45 min de extração experimentais. A cocaína e o cocaetileno apresentam uma boa linearidade, não sendo observado o mesmo para o fentanilo, o que poderá estar relacionado com um potencial efeito de saturação do sinal do detetor ou da capacidade da fibra;

Fibras *Tips* – nas condições experimentais ( $t \geq 15$ min), a extração com o revestimento C18 está diretamente relacionado com a agitação, mas com o PDMS/DVB, apenas o fentanilo é fortemente dependente da agitação. Para ambos os revestimentos, a extração dos compostos é uma função direta do tempo de extração, atingindo os patamares cinéticos em  $t = 10$  min, com exceção da cocaína em C18. Os compostos apresentam uma boa relação linear com PDMS/DVB, não sendo observada a mesma relação linear com C18, podendo estar indiretamente relacionada com um efeito de

saturação do solvente. O sistema de extração em função do tempo, pode não precisar de agitação, se forem considerados como operacionalmente aceitáveis maiores tempos de extração;

Amostra de urina positiva– quando utilizadas as fibras OC-PDMS/DVB e as *tips* (C18 e PDMS/DVB), os compostos extraídos por ambas foram a cocaína e o cocaetileno. Comparativamente com a extração por SPE, utilizando o cartucho OASIS MCX, foi detetada nesta extração adicionalmente a presença do éster metílico da ecgonina.

**Conclusões:** Os métodos analíticos desenvolvidos baseados em técnicas de extração miniaturizadas, demonstraram ser alternativas analíticas mais verdes em relação aos métodos convencionais na determinação das substâncias de abuso estudadas, uma vez que necessitam de menores quantidade de solvente orgânico e de amostra, ao mesmo tempo que possibilitam a reutilização. Por outro lado, a performance analítica das metodologias propostas comparam-se favoravelmente com as baseadas em SPE.

De um modo geral, e tendo como finalidade a aplicação do método como de rotina em laboratórios, no futuro próximo, será necessária uma otimização aprofundada dos parâmetros abordados, bem como de outros que sejam relevantes no processo de microextração como o estudo da adição de modificadores da matriz, modo de agitação, entre muitos outros. Por fim, é igualmente proposto a validação das metodologias ensaiadas por forma a determinar a sua precisão, exatidão, linearidade, limiares analíticos, recuperação, efeito de matriz, entre outros.

## Índice

Resumo	1
Abstract	2
Estudo Prova de Conceito	3
Índice	5
Índice de Figuras	7
Índice de Tabelas	12
1. Introdução	17
1.1. Consumo de Substâncias de Abuso	17
1.2. Objetivos do trabalho	19
2. Enquadramento teórico	21
2.1. Substâncias de Abuso	21
2.2. Drogas de abuso alvo	22
2.2.1. Cocaína	23
2.2.2. Fentanilo	25
3. Metodologias Analíticas	27
3.1. Preparação da Amostra	27
3.1.1. Extração Líquido-Líquido.	27
3.1.2. Extração em fase sólida	28
3.1.3. Microextração em Fase Sólida	30
3.2. Química Verde	36
3.3. Métodos Cromatográficos	38
3.3.1. Cromatografia Gasosa	39
3.3.2. Analisadores de Massa	41
3.3.2.1. Quadruplo	41
3.3.2.2. Triplo Quadrupolo	41
3.3.2.3. Tempo de Voo	43
3.4. Revisão Bibliográfica	44
4. Materiais e Métodos	45
4.1. Produtos Químicos e Padrões	45
4.2. Preparação de soluções	46
4.3. Extração por SPE	48
4.3.1. OASIS HLB	48
4.3.2. OASIS MCX	48
4.4. Extração por SPME	49

4.4.1.	Fibras SPME -----	49
4.4.2.	Procedimento Experimental Fibras clássicas-----	49
4.4.3.	Procedimento Experimental por Fibras <i>TIPS</i> -----	50
4.5.	Condições Cromatográficas -----	51
5.	Resultados e Discussão -----	53
5.1.	Considerações para a extração dos Analitos em Estudo-----	53
5.2.	Estudo em GC-TOF/MS -----	62
5.2.1.	Extração SPE-----	62
5.2.2.	Microextração SPME-----	64
5.2.2.1.	SPME com Fibras Clássicas-----	64
5.2.2.2.	SPME com Fibra Clássica OC-PDMS/DVB -----	66
5.2.2.3.	SPME com Fibras <i>TIPS</i> -----	68
5.3.	Estudo em GC/MS/MS -----	73
5.3.1.	Ensaio Cromatográfico -----	73
5.3.2.	Amostras Brancas Fortificadas -----	74
5.4.	Amostra de Urina Positiva -----	76
5.4.1.	Extração SPME com Fibra OC_PDMS/DVB-----	76
5.4.2.	Extração SPME com Fibra LC- <i>Tips</i> -----	77
5.4.3.	Extração SPE-----	78
5.4.4.	Análise da Eficiência de Extração entre Fibras-----	79
5.4.5.	Sensibilidade dos Sistemas Cromatográficos -----	79
6.	Aplicação da Metodologia na Química Analítica Verde -----	81
7.	Conclusões-----	83
8.	Perspetivas Futuras: Otimização e Validação do Método-----	87
9.	Referências -----	89

## Índice de Figuras

Figura 1 Prevalência global do uso de drogas e distúrbios de uso de drogas, entre 2006-2018. Adaptado de: (UNODC, 2020). .....	17
Figura 2 Dados relativos ao consumo de drogas de abuso em 2018 pela UNODC. Adaptado de (UNODC, 2020). .....	17
Figura 3 Dados reportados pela EMCDDA, relativamente ao consumo de drogas em 2020. Adaptado de (EMCDDA, 2020). .....	18
Figura 4 Estimativas de consumo da cocaína na Europa. Adaptado de (EMCDDA, 2020). .....	22
Figura 5 Estimativas de consumo de opióides na Europa. Adaptado de ((EMCDDA, 2020)). .....	22
Figura 6 Planta <i>Erythroxylum coca</i> ( <a href="https://www.magic-plants.com/erythroxylum-coca.html">https://www.magic-plants.com/erythroxylum-coca.html</a> ). .....	23
Figura 7 Crack, forma de consumo da cocaína ( <a href="https://www.gettyimages.pt/fotos/crack">https://www.gettyimages.pt/fotos/crack</a> ). .....	24
Figura 8 Principais vias de metabolização da cocaína ( <a href="https://chemicalize.com/welcome">https://chemicalize.com/welcome</a> ) .....	24
Figura 9 Estrutura química do fentanilo e do seu metabolito principal norfentanilo ( <a href="https://chemicalize.com/welcome">https://chemicalize.com/welcome</a> ). .....	25
Figura 10 Ampola de separação (LLE). Adaptado de (Ferreira, 2015). .....	28
Figura 11 Esquema do processo SPE. Adaptado de ( <a href="https://screeningdevices.com/spe-development-protocols/">https://screeningdevices.com/spe-development-protocols/</a> ). .....	28
Figura 12 Cartuchos e discos utilizados em SPE. Adaptado de (Ferreira, 2015). .....	29
Figura 13 estrutura da fase polimérica OASIS HLB ( <a href="https://www.waters.com/nextgen/us/en.html">https://www.waters.com/nextgen/us/en.html</a> ). .....	30
Figura 14 Cartuchos de SPE HLB e MCX ( <a href="https://www.waters.com/nextgen/us/en.html">https://www.waters.com/nextgen/us/en.html</a> ). .....	30
Figura 15 Técnica de SPME por imersão direta (DI-SPME) e por amostragem por <i>headspace</i> (HS-SPME). Adaptado de: (Murtada, 2020).....	31
Figura 16 Técnica de SPME por A) imersão direta (DI-SPME) B) <i>headspace</i> (HS-SPME). Adaptado de (Luiz, Maciel, Lanças, 2015).....	31
Figura 17 Dispositivo SPME. Adaptado de (Merkle, Kleeberg, Fritsche, 2015).....	32

Figura 18 Tipos de Fibras (Design). 1- SPME <i>Classic</i> ; 2 - SPME <i>LC Probe</i> ; 3- SPME <i>LC Tips</i> ; 4 - SPME <i>Arrow</i> ( <a href="https://www.sigmaaldrich.com/PT/en">https://www.sigmaaldrich.com/PT/en</a> ). .....	32
Figura 19 Configuração das fibras para SPME ( <a href="https://www.sigmaaldrich.com/PT/en">https://www.sigmaaldrich.com/PT/en</a> ). .....	32
Figura 20 Diferentes fases do revestimento das fibras SPME e respectivas cores ( <a href="https://www.sigmaaldrich.com/PT/en">https://www.sigmaaldrich.com/PT/en</a> ). .....	33
Figura 21 Design da nova fibra OC-PDMS/DVB ( <a href="https://www.sigmaaldrich.com/PT/en">https://www.sigmaaldrich.com/PT/en</a> ). .....	33
Figura 22 Diferenças entre fibras PDMS/DVB ( <i>non overcoated</i> ) e OC-PDMS/DVB ( <i>overcoated</i> ) ( <a href="https://www.sigmaaldrich.com/PT/en">https://www.sigmaaldrich.com/PT/en</a> ).....	34
Figura 23 SPME <i>LC Tips</i> com manipulação robótica e utilização manual ( <a href="https://www.sigmaaldrich.com/PT/en">https://www.sigmaaldrich.com/PT/en</a> ). .....	34
Figura 24 Vantagens da microextração em fase sólida, SPME. Adaptado de (Billiard, Dershem, Gionfriddo, 2020).....	35
Figura 25 AGREE - Abordagem Analítica GREENness Métrica e Software. Adaptado de (Pena-Pereira et al., 2020). .....	37
Figura 26 Representação gráfica das funções aplicadas para converter as variáveis em pontuações de 0-1. ....	37
Figura 27 Separação dos compostos ao longo da coluna. Adaptado de .....	38
Figura 28 Ilustração do tempo morto ( $t_M$ ), do tempo de retenção ajustado ( $t_E$ ) e do tempo de retenção ( $t_R$ ) num cromatograma. Adaptado de (Skoog <i>et al</i> , 2006) .....	39
Figura 29 Diagrama de blocos de um GC convencional. Adaptado de (Ahmad, 2020). .....	39
Figura 30 Sistema de GC/MS de quadrupolo simples versus Sistema de GC/MS/MS de triplo quadrupolo.....	41
Figura 31 Imagem representativa e equipamento utilizado em laboratório. Adaptado de (Hubschmann, 2015).....	42
Figura 32 Esquema de funcionamento do GC/MS/MS. ....	42
Figura 33 Funcionamento do TOF e equipamento utilizado em laboratório. Adaptado de (Hubschmann, 2015).....	43
Figura 34 Esquema da preparação das soluções mãe de mistura padrão MP1-1, preparadas a partir de soluções individuais de cada compostos MP1, para o estudo das fibras clássicas. ....	47

Figura 35 Esquema da preparação das soluções de trabalho ST1 e ST2, a partir de soluções individuais de cada composto MP2, para o estudo das fibras clássica OC-PDMS/DVB e das fibras <i>tips</i> ST1, e para o estudo em SPE ST2.....	47
Figura 36 Esquema da preparação das soluções calibradores C-ST1, por diluição a partir da solução de trabalho ST1 utilizadas para o estudo da linearidade em SPME com as fibras clássicas OC-PDMS/DVB e com as fibras <i>tips</i> . .....	47
Figura 37 Esquema do procedimento experimental, aplicado nas amostras de água fortificadas e na amostra de urina positiva, com indicações das diferentes variáveis estudadas e das condições operacionais da extração com as fibras de configuração clássica e <i>tips</i> . .....	50
Figura 38 Procedimento experimental desenvolvido para SPME com fibras clássicas como novo revestimento OC-PDMS/DVB e com fibras <i>tips</i> , com revestimentos <i>C18 e PDMS/DVB</i> .....	51
Figura 39 pKa obtido para a cocaína, pela plataforma <i>Chemicalize</i> . .....	56
Figura 40 pKa obtido para o éster metílico da ecgonina, pela plataforma <i>Chemicalize</i> . 56	
Figura 41 pKa obtido para a benzoilecgonina, pela plataforma <i>Chemicalize</i> . .....	57
Figura 42 pKa obtido para o cocaetileno, pela plataforma <i>Chemicalize</i> .....	57
Figura 43 pKa obtido para o fentanilo, pela plataforma <i>Chemicalize</i> . .....	58
Figura 44 pKa obtido para o norfentanilo, pela plataforma <i>Chemicalize</i> . .....	58
Figura 45 Ponto isoelétrico dos compostos, obtido através da plataforma <i>Chemicalize</i> .59	
Figura 46 Hidrofobicidade dos compostos, obtido através da plataforma <i>Chemicalize</i> . 59	
Figura 47 Solubilidade dos compostos, obtido através da plataforma <i>Chemicalize</i> .....	59
Figura 48 Solubilidade dos compostos com exceção do éster metílico da ecgonina, obtido através da plataforma <i>Chemicalize</i> . .....	59
Figura 49 Cromatograma Iónico Total (TIC), em modo <i>Full Scan</i> da solução MP2-ST1 (500 ng/mL).....	62
Figura 50 Cromatograma Iónico Total (TIC), em modo <i>Full scan</i> da matriz biológica de sangue, sem fortificação, após a aplicação dos protocolos de extração por SPE, com OASIS HLB e MCX, redissolvido em 100µL de ACN. ....	63
Figura 51 Cromatograma da matriz biológica de sangue fortificada com a solução MP2-ST2 a 900 ng/mL, após a aplicação do protocolo por SPE, com o cartucho OASIS HLB. ....	63
Figura 52 Cromatograma da matriz de sangue fortificada com a solução MP2-ST2 a 900 ng/mL, após a aplicação do protocolo por SPE, com o cartucho OASIS MCX. ....	64

Figura 53 Cromatograma representativo: Solução MP1, contendo uma concentração estimada de 100 µg/mL.....	65
Figura 54 Resultados da capacidade de extração dos diferentes revestimentos das fibras de SPME.....	66
Figura 55 Comportamento dos compostos na fibra OC-PDMS/DVB nos diferentes tempos de extração.....	67
Figura 56 Curva de calibração obtidas para as fibras OC-PDMS/DVB.....	68
Figura 57 Extração dos compostos com a fibra SPME <i>tips</i> , com revestimento C18, em relação à agitação.....	69
Figura 58 Extração dos compostos com a fibra SPME <i>tips</i> com revestimento PDMS/DVB em relação à agitação.....	69
Figura 59 Curva de calibração para os compostos extraídos com fibras <i>tips</i> com revestimentos C18 e PDMS/DVB.....	70
Figura 60 Tempo de extração em ambos os revestimentos das fibras <i>tips</i> (C18 e PDMS/DVB).....	71
Figura 61 Diferenças da eficiências de extração em função do tempo de contacto, para as fibras <i>tips</i> com revestimentos C18 e PDMS/DVB.....	72
Figura 62 Cromatograma Iônico Total (TIC), em modo <i>Full Scan</i> dos compostos, presentes na solução mistura MP2-ST2, com uma concentração de 900 ng/mL.....	73
Figura 63 Comparação do espectro de massa, relativamente ao <i>full scan</i> e <i>SIM</i> , para a cocaína.....	74
Figura 64 Estudo dos iões produto e das energias de ionização para a cocaína.....	74
Figura 65 Diferenças entre SIM e MRM e comparação entre matriz de urina fortificada e não fortificada, nos diferentes cartuchos (HLB e MCX), para a cocaína. Tempo de retenção do composto - 17,68 min.....	75
Figura 66 Cromatograma representativo: <i>Full scan</i> da amostra de urina positiva, após a sua extração com uma nova fibra de SPME, OC-PDMS/DVB. Detecção dos compostos cocaína e cocaetileno.....	76
Figura 67 Cafeína extraída pela fibra OC-PDMS/DVB na amostra positiva.....	77
Figura 68 Triclosan extraído pela fibra OC-PDMS/DVB na amostra de urina positiva.....	77
Figura 69 Ibuprofen extraído pela fibra OC-PDMS/DVB na amostra de urina positiva.....	77
Figura 70 Compostos detetados pela fibra <i>tips</i> , com revestimento C18, na amostra de urina positiva.....	77

Figura 71 Compostos detetados pela fibra <i>tips</i> , com revestimento PDMS/DVB, na amostra de urina positiva.....	78
Figura 72 Compostos detetados pelo método SPE, utilizando os dois cartuchos (HLB e MCX), na amostra de urina positiva. Legenda: 1-Éster metílico da ecgonina; 2-cocaína; 3-cocaetileno.....	78
Figura 73 Diferenças na extração da cocaína e cocaetileno, na amostra de urina positiva com dois tipos de fibras, OC (revestimento PDMS-DVB-PDMS) e TIPS (com revestimento C18 e DVB).....	79
Figura 74 Dados obtidos para a avaliação da sensibilidade, através do S/N para cada compostos nos diferentes métodos, na amostra de urina positiva. ....	80
Figura 75 Pictogramas obtidos, através do programa AGREE, para SPME-LC/MS (1), SPE-MCX-GC/MS (2), SPE-HLB-GC/MS (3), SPME-GC/MS (4). ....	81
Figura 76 Espetro de massa do éster metílico da ecgonina.....	93
Figura 77 Espetro de massa do norfentanilo .....	93
Figura 78 Espetro de massa da cocaína.....	93
Figura 79 Espetro de massa do cocaetileno.....	94
Figura 80 Espetro de massa da benzoilecgonina. ....	94
Figura 81 Espetro de massa do fentanilo. ....	94

## Índice de Tabelas

Tabela 1 Caracterização das drogas de abuso de acordo com a sua origem, mecanismos de ação, efeito no SNC e as suas principais vias de administração (Gomes, 2013).....	21
Tabela 2 Abordagens baseadas nas técnicas de microextração para a análise dos compostos em estudo cocaína, éster metílico da ecgonina, cocaetileno, benzoilecgonina, fentanilo e norfentanilo em matrizes biológicas. Adaptado de (Ahmad, <i>et al</i> , 2021; Lizot, <i>et al</i> , 2020; Maiti, Bidinger, 1981; Saraji, Boroujeni, Bidgoli, 2011).....	44
Tabela 3 Propriedades químicas das drogas de abuso e dos seus metabolitos, em estudo, obtidas através da plataforma digital <i>Chemicalize</i> ( <a href="https://chemicalize.com">https://chemicalize.com</a> ). .....	45
Tabela 4 Procedimento experimental do método de extração SPE, utilizando cartuchos OASIS HLB.....	48
Tabela 5 Procedimento experimental do método de extração SPE, utilizando cartuchos OASIS MCX.....	48
Tabela 6 Condições cromatográficas dos equipamentos utilizados, GC/MS/MS e do GC-TOF/MS .....	51
Tabela 7 Diferentes fibras SPME, revestimento, espessura, polaridade e pH. ....	53
Tabela 8 LogP e LogD obtidos para a hidrofobicidade dos compostos em estudo, através do programa <i>Chemicalize</i> .....	53
Tabela 9 Estrutura química e pKa da cocaína. ....	56
Tabela 10 Estrutura química e pKa do éster metílico da ecgonina.....	56
Tabela 11 Estrutura química e pKa da benzoilecgonina. ....	57
Tabela 12 Estrutura química e pKa do cocaetileno. ....	57
Tabela 13 Estrutura química e pKa do fentanilo. ....	58
Tabela 14 Estrutura química e pKa do norfentanilo. ....	58
Tabela 15 Resumo do estudo dos iões produto e das energias de ionização para a cocaína. ....	73
Tabela 16 Relação custo/benefício para as técnicas de preparação de amostra SPE e SPME. ....	82
Tabela 17 Tempo de retenção e <i>m/z</i> para os compostos em estudo por GC-TOF/MS... ..	95
Tabela 18 Tabela esquematizada do estudo feito para os analitos em GC-TQ/MS. ....	95

## Abreviaturas

ACN	Acetonitrilo
C18	Octadecilo
CID	Dissociação induzida por colisão (do inglês <i>Collision Induced Dissociation</i> )
DI-SPME	Microextração em fase sólida por imersão direta (do inglês <i>Direct Immersion Solid-Phase Microextraction</i> )
EMCDDA	Centro Europeu de Monitorização de Drogas e Toxicodependência (do inglês <i>European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction</i> )
GAC	Química analítica verde (do inglês <i>Green Analytical Chemistry</i> )
GC/MS	Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (do inglês <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> )
GC/MS/MS	Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa em Tandem (do inglês <i>Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry</i> )
GC-TOF/MS	Cromatografia gasosa hifenada à espectrometria de massa utilizando um analisador de tempo de voo (do inglês <i>Gas Chromatography-Time-Of-Flight/Mass Spectrometry</i> )
HS-SPME	Microextração em fase sólida por headspace (do inglês <i>Headspace Solid-Phase Microextraction</i> )
INFARMED	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P.
LLE	Extração Líquido- Líquido (do inglês <i>Liquid-Liquid Extraction</i> .)
LVI	Injeção de grandes volumes (do inglês <i>Large Volume Injection</i> )
MeOH	Metanol
MMI	Injetor multimodo (do inglês, <i>Multimodo inlet</i> )
MRM	Monitorização de Reações Múltiplas (do inglês <i>Multiple Reaction Monitoring</i> )
NPS	Novas substâncias psicoativas (do inglês <i>New Psychoactive Substances</i> )
OC	<i>Overcoated</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Poliacrilato

PDMS	Polidimetilsiloxano
PDMS/CAR/DVB	Polidimetilsiloxano-carbowax-divinilbenzeno
PDMS/DVB	Polidimetilsiloxano-divinilbenzeno
PTV	Vaporização com temperatura programada (do inglês <i>Programmed Temperature Vaporization</i> )
SIM	Monitorização de iões seleccionados (do inglês <i>Selected Ion Monitoring</i> )
SNC	Sistema nervoso central
SPE	Extração em fase sólida (do inglês <i>Solid-Phase Extraction</i> )
SPME	Microextração em fase sólida (do inglês <i>Solid Phase Microextraction</i> )
UNODC	<i>United Nations Office on Drugs and Crime</i>

## **Glossário**

Amostra Branca	Amostra isenta dos analitos em estudo
Amostra Controlo	Amostra branca ao qual foram adicionados os analitos em estudo
Amostra Positiva	Amostra real que contém os analitos em estudo



## 1. Introdução

### 1.1. Consumo de Substâncias de Abuso

A utilização e o consumo excessivo de substâncias psicoativas são considerados nos dias de hoje um problema de saúde pública de grande importância.

O uso destas substâncias advém da antiguidade, onde eram utilizadas para alterar o estado de consciência e emocional, de modo, a promover sensações de prazer ao consumidor.

O Relatório Mundial sobre Drogas de 2020 relata que em 2018 cerca de 269 milhões de pessoas a nível mundial, consumiram uma substância ilícita, pelo menos uma vez no último ano (figura 1). Isto corresponde a 5,4% da população mundial com idades compreendidas entre os 15 e os 64 anos, representando quase 1 em cada 19 pessoas (UNODC, 2020).

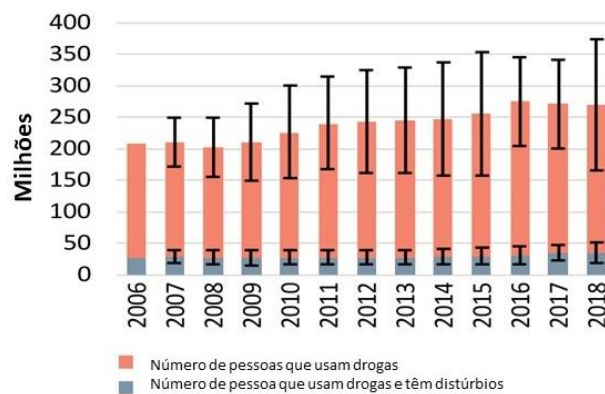


Figura 1 Prevalência global do uso de drogas e distúrbios de uso de drogas, entre 2006-2018. Adaptado de: (UNODC, 2020).

De acordo com os dados do referido relatório, a droga mais consumida é a canábis, seguida de opióides, anfetaminas, *ecstasy* e cocaína (figura 2).

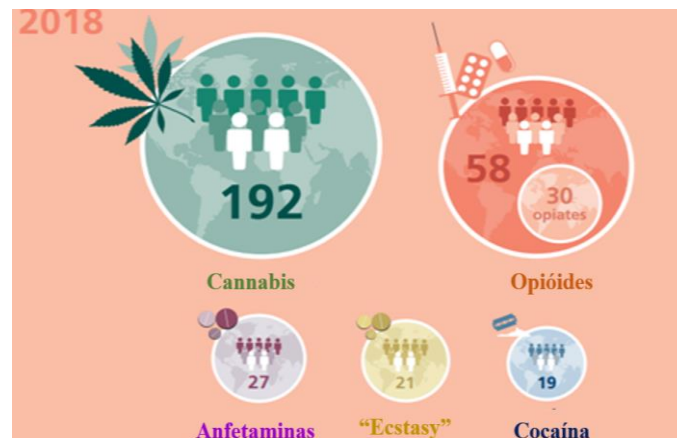


Figura 2 Dados relativos ao consumo de drogas de abuso em 2018 pela UNODC. Adaptado de (UNODC, 2020).

Segundo as estimativas do Observatório Europeu da Droga e da Toxicod dependência (do inglês, *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction* - EMCDDA), em 2018 o consumo e a apreensão de cocaína aumentou, em relação a anos anteriores, sendo a segunda droga mais consumida a seguir à canábica (figura 3) (EMCDDA, 2020).

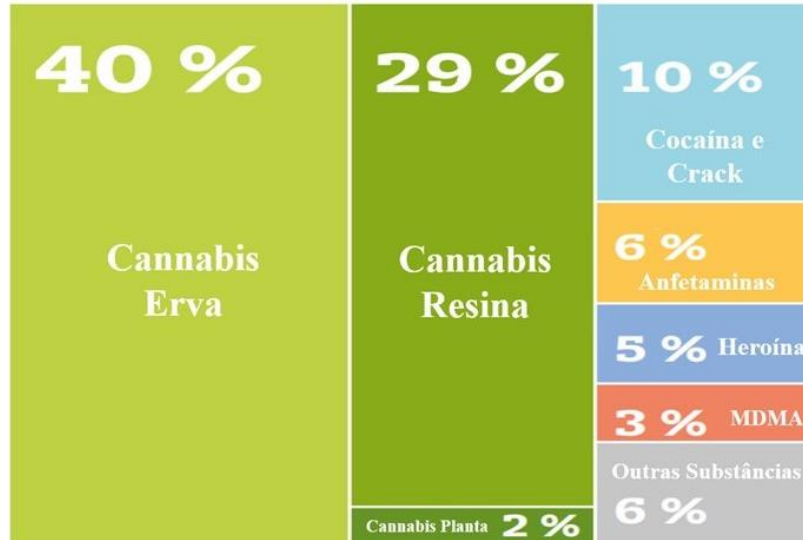


Figura 3 Dados reportados pela EMCDDA, relativamente ao consumo de drogas em 2020. Adaptado de (EMCDDA, 2020).

Em Portugal, o regime jurídico aplicável ao tráfico e consumo de estupefacientes e substâncias psicotrópicas está regulamentado pelo Decreto-lei nº 15/93 de 22 de janeiro, e visa prosseguir três objetivos fundamentais, tais como “privar aqueles que dedicam ao tráfico de estupefacientes do produto das suas atividades criminosas”, “adotar medidas adequadas ao controlo e fiscalização” e “reforçar e complementar as medidas previstas na Convenção sobre Estupefacientes de 1961 (Decreto-Lei n.º 15/93 de 22 de janeiro do Conselho de Ministros, 1993).

## 1.2. Objetivos do trabalho

Tendo em conta os problemas relacionados com uso das substâncias de abuso e os efeitos negativos consequentes do seu consumo, torna-se cada vez mais necessário o seu estudo, bem como o desenvolvimento de novos métodos analíticos, que permitam uma melhor deteção e quantificação em amostras biológicas.

Neste sentido, a presente dissertação, tem como foco principal a avaliação em prova de conceito de abordagens inovadoras em técnicas de microextração, visando a sua potencial introdução como metodologias alternativas verdes para análise de substâncias de abuso emergentes em matrizes biológicas, apresentando como principais objetivos:

- Estudo de uma técnica de microextração em fase sólida para a preparação da amostra, utilizando vários tipos de fibras;
- Estudo de uma técnica de extração em fase sólida para a preparação de amostra utilizando dois tipos de cartuchos;
- Análise qualitativa, de cocaína e fentanilo, bem como os seus metabolitos maioritários (éster metílico da ecgonina, cocaetileno, benzoilecgonina e norfentanilo), por cromatografia gasosa hifenada à espetrometria de massa utilizando um analisador de tempo de voo (GC-TOF/MS) e por cromatografia gasosa hifenada à espetrometria de massa em *tandem* (GC-TQMS), utilizando um triplo quadrupolo.



## 2. Enquadramento teórico

### 2.1. Substâncias de Abuso

A designação específica de droga não é homogénea entre diferentes áreas científicas tornando a sua definição e a clarificação dos conceitos um processo complexo e nem sempre consensual (Valério, 2014).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o termo “droga” é definido como “qualquer substância química ou mistura de substâncias, não produzida pelo organismo, desnecessárias para a manutenção da saúde normal (como os alimentos), cuja administração altera a função biológica e, possivelmente, a estrutura, produzindo alterações no seu funcionamento” (Fonte, 2006). Esta definição é ambígua, sendo que não considera a finalidade destas substâncias, nem os efeitos por elas gerados.

Por outro lado, o termo “droga de abuso” é definido como “qualquer substância que tenha a capacidade de produzir um estado de dependência através da estimulação ou depressão do sistema nervoso central, provocando alucinações ou distúrbios nas funções motoras, cerebrais, comportamentais ou na percepção” (Gomes, 2013; Valério, 2014)

As drogas podem ser classificadas como drogas licitas e ilícitas, de origem natural, semissintética ou sintética, que, de acordo com os seus efeitos farmacológicos, se podem classificar como substâncias estimulantes, depressoras do sistema nervoso central (SNC) ou ainda como alucinógenas (Gomes, 2013). A tabela 1, apresenta um resumo da caracterização das drogas de abuso.

Tabela 1 Caracterização das drogas de abuso de acordo com a sua origem, mecanismos de ação, efeito no SNC e as suas principais vias de administração (Gomes, 2013).

<b>Drogas</b>	<b>Origem</b>	<b>Categoria</b>	<b>Mecanismos de Ação</b>	<b>Efeitos no SNC</b>	<b>Vias de administração</b>
Álcool Barbitúricos Benzodiazepínicos	Diversas	Depressores	Deprimem os centros de estimulação	Sedação	Oral
Morfina Heroína Metadona	Semi-sintética (ópio)	Narcóticos	Reduzem a transmissão neural	Entorpecimento dos sentidos e alívio da dor	Injetada Inalada Fumada
Cocaína Cafeína Nicotina Anfetaminas	Natural	Estimulantes	Ativam transmissão neural	Estimulação	Injetada Inalada Fumada
Canabinóides LSD	Natural	Alucinógenas	Variável dependente da droga	Distorção sensorial e preceptiva	Fumada Oral Ingerida

## 2.2. Drogas de abuso alvo

Os compostos alvo a estudar no presente projeto foram a cocaína e o fentanilo, bem como os seus metabolitos maioritários. No caso da cocaína o éster metílico da ecgonina, a benzoilecgonina, e o cocaetileno, formado quando existe um consumo associado de etanol. No caso do fentanilo o metabolito avaliado será o norfentanilo. A escolha destes compostos deve-se ao aumento do consumo de cocaína e de opióides que vem sendo relatado por várias instituições e suportado por os dados estatísticos anteriormente mencionados. As figuras 4 e 5, ilustram os últimos dados do relatório do EMCDDA, relativamente ao consumo da cocaína e de opióide na Europa.



Figura 4 Estimativas de consumo da cocaína na Europa. Adaptado de (EMCDDA, 2020).

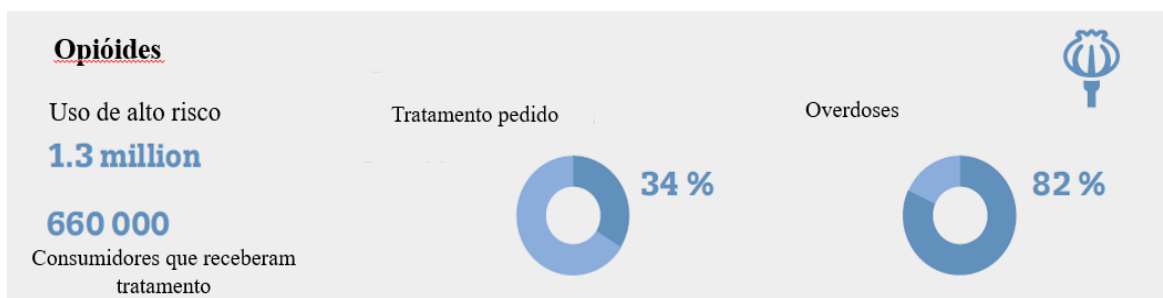


Figura 5 Estimativas de consumo de opióides na Europa. Adaptado de ((EMCDDA, 2020)).

### 2.2.1. Cocaína

A cocaína é uma das drogas mais consumidas nos dias de hoje. É um alcalóide extraído a partir das folhas de *Erythroxylum coca* e um dos estimulantes mais potentes do SNC, de origem natural (Simões, 2016; Martins, 2019), figura 6.



Figura 6 Planta *Erythroxylum coca* (<https://www.magic-plants.com/erythroxylum-coca.html>).

A utilização desta substância psicoativa, já vem de um passado longínquo como revelaram escavações arqueológicas no Peru e na Bolívia que indicam que as grandes civilizações pré-colombianas dos Andes já consumiam esta substância, há mais de 4500 anos (Isralowitz, Myers, 2011; Ferreira, Martini, 2001).

A cocaína pode ser injetada ou inalada sob a forma de cloridrato de cocaína (sal), ou fumada na sua forma livre (base) (Gomes, 2013).

A forma como é administrada é um fator muito importante relativamente às consequências do seu consumo. A cocaína de rua é apresentada sobre a forma de um pó branco, que é produzido de uma pasta obtida das folhas de coca, e uma solução de ácido clorídrico, formando um sal (cloridrato de cocaína) (Gomes, 2013; Karch, 1997). A cocaína que chega aos consumidores, apresenta cerca de 70 a 90% de grau de pureza, sendo os contaminantes mais comuns anestésicos locais ou açúcares (Basílio, 2009; Gomes, 2013).

O *crack*, figura 8, é um derivado da cocaína que aparece sob a forma de cristais, sendo cinco a sete vezes mais potente do que a cocaína, causando efeitos de transtorno de personalidade, atuando num curto prazo e criando uma enorme dependência psicológica (Basílio, 2009; Gomes, 2013; Oliveira, 2015; Karch, 1997).



Figura 7 Crack, forma de consumo da cocaína (<https://www.gettyimages.pt/fotos/crack>).

O uso frequente destas substâncias, conduz a sintomas de excitação, autoconfiança e irritabilidade, passando por quadros de agitação, agressividade, psicose e síncope cardíaca, como consequências de uma sobredosagem (Basílio, 2009; Oliveira, 2015).

No que diz respeito à metabolização da cocaína, as principais vias metabólicas são a hidrólise pela enzima colinesterase e a hidrólise hepática mediada pela carboxilesterase, formando metabolitos inativos. A enzima colinesterase, converte a cocaína no éster metílico da ecgonina, enquanto a enzima carboxilesterase a converte em benzoilecgonina. Por outro lado, através de um processo de *N*-desalquilação, a cocaína dá origem à norcocaína (metabolito ativo, muito potente). O consumo conjunto da cocaína e de álcool, provoca o aumento dos níveis plasmáticos da cocaína e norcocaína, reduzindo as concentrações de benzoilecgonina e formando o cocaetileno, outro metabolito ativo. A figura 9, exemplifica as principais vias de metabolização da cocaína.

Uma vez que o metabolismo da cocaína é bastante rápido, a confirmação do seu consumo é normalmente obtida a partir da deteção do seu principal metabolito, a benzoilecgonina (Simões, 2016).

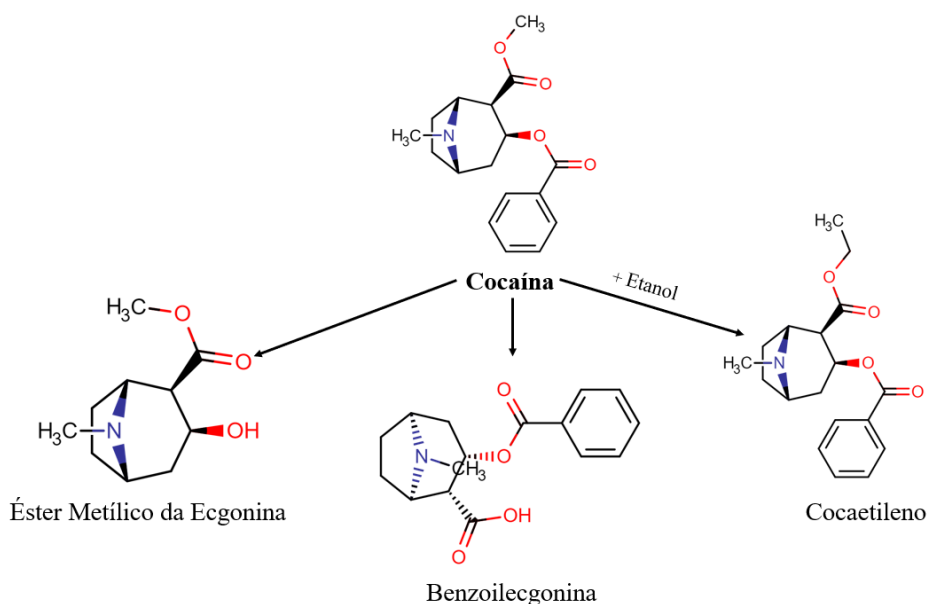


Figura 8 Principais vias de metabolização da cocaína (<https://chemicalize.com/welcome>)

### 2.2.2. Fentanilo

O fentanilo (*N*-(1-fenetil-4-piperidil)propionanilida) é um opióide sintético com efeito analgésico 50 a 100 vezes mais potente que a morfina.

Este composto foi sintetizado pela primeira vez na Bélgica pela farmacêutica Janssen e introduzido nos anos 60 na Europa e nos anos 70 nos EUA, como anestésico, para o alívio de dor pós-operatória. Quase 70% de todos os procedimentos cirúrgicos nos EUA utilizavam fentanilo.

A partir do final dos anos 70, apareceram ilicitamente no mercado, nove homólogos e um análogo (excluindo enantiómeros) de fentanilo. As potências dos derivados de fentanilo, são muito mais elevados do que os do composto precursor (Karch, 1997).

Em comparação com outros opiáceos, o fentanilo tem um potencial de dependência mais elevado devido às suas elevadas propriedades lipofílicas que promovem um início rápido e uma curta duração de ação (Tiscione, Wegner, 2017).

O uso desta substância de forma ilícita, aumentou ao longo do tempo, tornando-a muito popular, o que levou ao desenvolvimento de procedimentos de rastreio rápidos, seletivos e sensíveis para amostras biológicas com intuito forense (DEA, 2019; Mounteney, Giraudon, Denissov, Griffiths, 2015).

A via principal da metabolização do fentanilo é a *N*-desalquilação pela CYP3A4 para norfentanilo e hidroxifentanilo. O tempo médio para a eliminação do fentanilo é de aproximadamente sete dias, enquanto que para o norfentanilo é de aproximadamente 13 dias após a última utilização (Baldo, 2018).

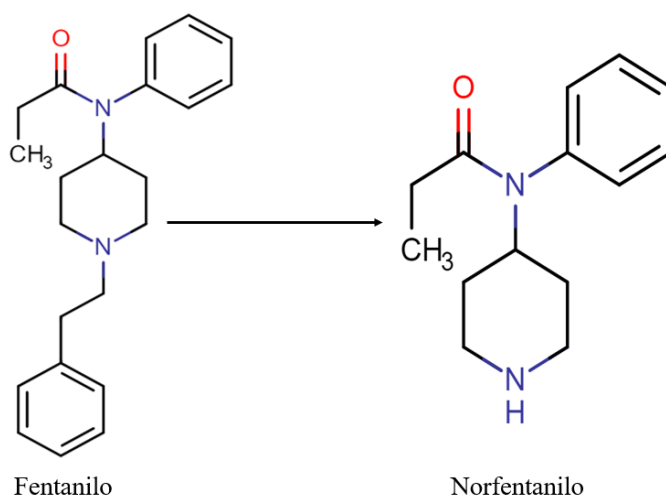


Figura 9 Estrutura química do fentanilo e do seu metabolito principal norfentanilo (<https://chemicalize.com/welcome>).

### 2.3 Matrizes Biológicas

O estudo e análise de substâncias de abuso, em amostras biológicas, como o sangue, urina, saliva, plasma, etc., num contexto de aumento de consumo e uso generalizado, é essencial (Ahmad, 2020). O estudo e análise têm como principais objetivos:

- Diagnóstico inicial de dependência de drogas;
- Monitorização em alguns programas de tratamento, nomeadamente no local de trabalho;
- Controlo de consumo em contexto laboral;
- Controlo antidopagem;
- Triagem como método de monitorização dos efeitos de medicamentos;
- Identificação da substância em caso de sobredosagem;
- Identificação/quantificação da substância em casos forenses;

No entanto, a análise de substâncias de abuso em matrizes biológicas constitui um enorme desafio devido à complexidade destas matrizes. Os compostos alvo deste estudo encontram-se geralmente presentes em concentrações muito baixas ( $\text{ng mL}^{-1}$  a  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), requerendo por isso enriquecimento no extrato final (Cassiano, Lima, Oliveira, De Pietro, Cass, 2006; Vandevenne, Vandebussche, Verstraete, 2000; Verstraete, 2004). A presença de interferentes endógenos, como proteínas no plasma ou no soro ou sais inorgânicos na urina, poderá exigir uma etapa de purificação/limpeza (*clean-up*) na preparação das amostras antes da análise instrumental. Por este motivo, métodos eficientes de preparação da amostra tornam-se cruciais por forma a obter resultados analíticos credíveis e confiáveis.

### 3. Metodologias Analíticas

#### 3.1. Preparação da Amostra

As amostras biológicas são matrizes bastante complexas, não podendo estas serem introduzidas diretamente no sistema analítico utilizado para realizar a sua análise quantitativa e qualitativa. Por esta razão, antes da análise instrumental é normalmente necessário um passo prévio de preparação da amostra, que permita que os compostos sejam isolados (extraídos) seletivamente da matriz em que se encontram e/ou que a sua concentração seja incrementada (enriquecimento/concentração) por forma a garantir os limiares analíticos de deteção e quantificação que tornem possível a sua identificação e quantificação (Ahmad, 2020).

O procedimento de preparação da amostra deve procurar atingir uma elevada reprodutibilidade, uma boa recuperação dos analitos e deve envolver um número mínimo de etapas, que idealmente devem ser passíveis de automatização (Ferreira, 2015).

##### 3.1.1. Extração Líquido-Líquido.

A extração líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*) também designada de extração por solventes, foi uma das primeiras abordagens implementadas na preparação de amostras para matrizes aquosas (Ahmad, 2020). Consiste num processo de partição onde há transferência de um soluto de uma fase para outra, sendo ambas imiscíveis ou parcialmente miscíveis entre si (figura 10). A LLE apresenta algumas vantagens como a possibilidade de escolha de uma ampla variedade de solventes que melhor pudessem promover a extração de solutos de matrizes aquosas. No entanto, a LLE, também apresentava algumas desvantagens como o uso de volumes muito elevados de solventes orgânicos, alguns dos quais tóxicos, tornado a sua eliminação um problema para o ambiente. É também uma operação demorada, uma vez que é geralmente realizada manualmente, exigindo também elevada manipulação o que limita o trabalho de rotina.

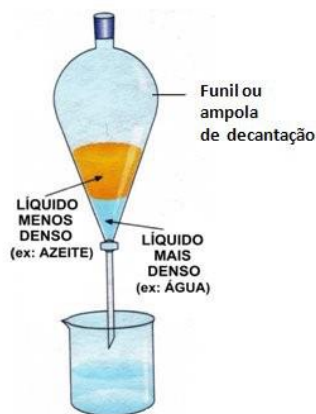


Figura 10 Ampola de separação (LLE). Adaptado de (Ferreira, 2015).

### 3.1.2. Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid-Phase Extraction*) foi introduzida em meados da década de 70 e tem sido genericamente usada desde 1985 (Thurman, Mills, 1998), sendo hoje a técnica de preparação de amostras mais popular. Os princípios da SPE são semelhantes aos da LLE e da cromatografia líquida (LC), onde envolve a partição de solutos entre duas fases, no entanto, em vez de duas fases líquidas imiscíveis, envolve a interação entre um líquido (matriz/amostra ou solvente com analitos; fase móvel) e uma fase sólida (adsorvente; fase estacionária), figura 11. Em relação à LLE, proporciona uma diminuição do tempo de análise e de custos, é menos morosa e requer menos manuseamento. Esta técnica permite igualmente, uma diminuição do consumo e eliminação de solventes orgânicos, minimizando a exposição do analista a solventes orgânicos e uma potencial eliminação da formação de emulsões (Ferreira, 2015).

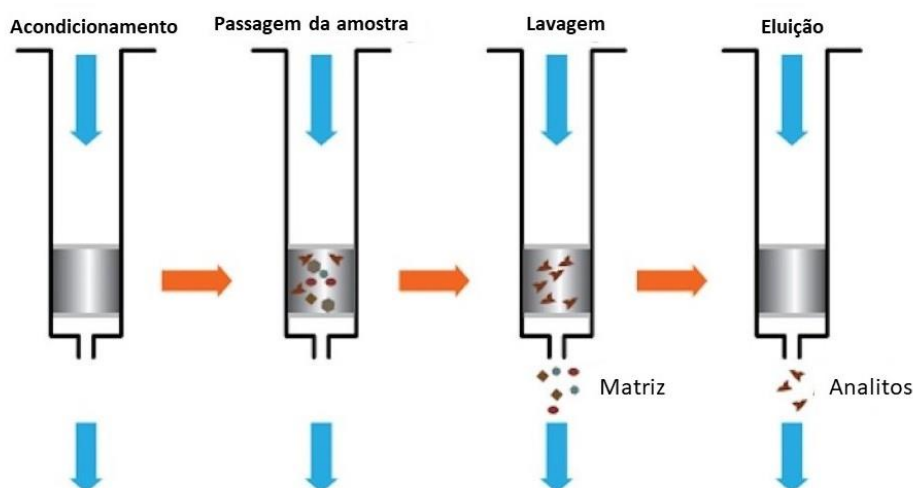


Figura 11 Esquema do processo SPE. Adaptado de (<https://screeningdevices.com/spe-development-protocols/>)

A SPE pode ser realizada em dois tipos de formato de empacotamento: cartuchos (e/ou colunas) e discos (figura 12). Os cartuchos e as colunas, são o formato de utilização

mais comum, sendo que permitem a utilização de volumes maiores. Os discos de SPE foram a primeira tentativa de miniaturização, ao que seguiram outras tentativas de miniaturização, como o empacotamento de material adsorvente em pontas de pipeta (*Zip-tips*) e as placas multi-poços (*96-Well Plates*) (Altun *et al.* 2004).



Figura 12 Cartuchos e discos utilizados em SPE. Adaptado de (Ferreira, 2015)

A escolha da fase sólida é uma das variáveis mais importantes no processo de SPE. Existem diversos tipos de fases estacionárias (fase reversa, fase normal, fases de troca-iônica, fases poliméricas, etc.). A seleção da fase, vai depender da natureza dos analitos a analisar e do objetivo analítico. Nos processos de SPE em que se pretende o enriquecimento de analitos, das matrizes aquosas, as fases mais importantes são as de fase reversa, como a C18 (sílica modificada) e as fases reversas poliméricas como o OASIS da Waters (HLB - *Hydrophilic-Lipophilic Balance*; poli(*N*-vinilpirrolidona-divinilbenzeno)) e o Strata-X da Phenomenex (estireno-divinilbenzeno) (Ferreira, 2015).

Os adsorventes poliméricos como é o caso do OASIS, podem ter maior capacidade de retenção que os adsorventes de sílica ligada. Estas fases têm um melhor desempenho, devido ao seu carácter hidrofóbico e a uma maior área superficial. Além disso os adsorventes poliméricos possibilitam operacionalmente maiores intervalos de pH, entre 0 e 14 (Hercegová, Dömötöróvá, Matisová, 2007; Miguel, Ferreira, 2015).

O OASIS HLB, é um copolímero macroporoso que consiste em dois monómeros, o lipofílico *m*-divinilbenzeno e o hidrofílico *N*-vinilpirrolidona (figura 13). A sua composição proporciona uma capacidade de adsorção e de retenção superior às das fases reversas tradicionais de sílica (C18) e ao conter um "gancho" polar-neutro que permite uma maior retenção de compostos polares aumentando a gama de analitos de "trabalho".

Outras vantagens advêm da sua elevada estabilidade nos extremos de pH, numa vasta gama de solventes.

O OASIS MCX é um polímero de troca catiónica forte e de fase inversa (figura 13). O absorvente tem uma área de superfície superior a outras fases tradicionais, apresentando uma alta capacidade de troca iônica que pode reter compostos alcalinos eficientemente. A sua resistência e estabilidade em meio ácido é forte, permitindo uma faixa de pH operacional estável entre 0-14. Esta fase é utilizada para separar os compostos alcalinos das matrizes biológicas.

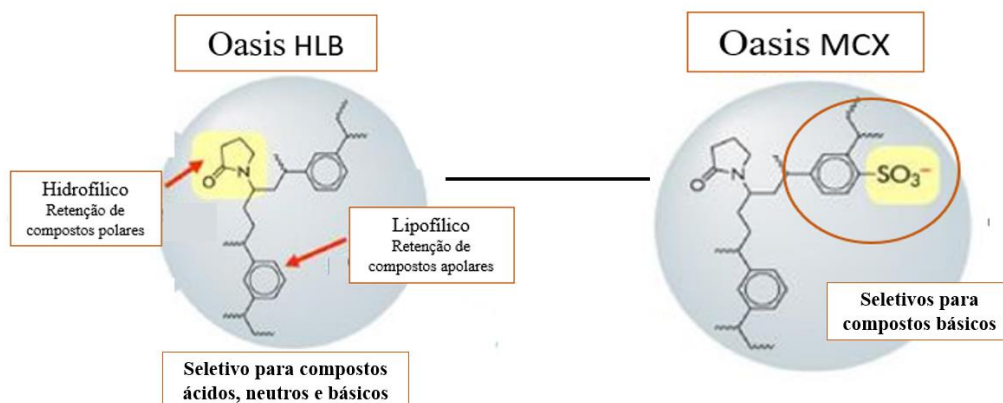


Figura 13 estrutura da fase polimérica OASIS HLB (<https://www.waters.com/nextgen/us/en.html>).



Figura 14 Cartuchos de SPE HLB e MCX (<https://www.waters.com/nextgen/us/en.html>).

Uma alternativa promissora para metodologias de preparação de amostras é a microextração em fase sólida (SPME). Esta técnica, na sua gênese, dispensa o uso de solventes orgânicos e o seu procedimento envolve menos etapas.

### 3.1.3. Microextração em Fase Sólida

A microextração em fase sólida (SPME, do inglês *Solid Phase Microextraction*), foi introduzida por Arthur e Pawlizyn em 1990, e é atualmente um método de preparação de amostras bastante popular, com várias aplicações relatadas para a extração e análise de um grande número de analitos em diversas áreas (Ahmad, 2020; Ferreira, 2015).

A SPME é uma técnica de extração e pré-concentração baseada no equilíbrio e na cinética de transferência entre os analitos presentes na matriz em estudo e uma fibra de sílica fundida revestida com uma fase “extratora”. A eficiência de extração da SPME depende de diversos fatores como o pH, a temperatura, a concentração de sais (*salting out*), o tempo de extração e a agitação (Ahmad, 2020; Heberle, 2003; Ferreira, 2015).

A técnica de SPME envolve duas etapas. A primeira consiste na extração dos analitos por imersão direta da fibra na matriz aquosa que os contém (DI-SPME) ou indiretamente por amostragem do *headspace* de matrizes sólidas ou aquosas (HS-SPME). Na segunda etapa, os analitos podem ser desorvidos da fibra por “retroextração” com solventes compatíveis ou termodinamicamente por dessorção térmica, dependendo essencialmente dos analitos alvo e do sistema instrumental (e.g. GC vs LC) a usar para realizar a separação e quantificação dos analitos extraídos. Nas figuras 15 e 16, estão presentes os principais modos de extração em SPME.

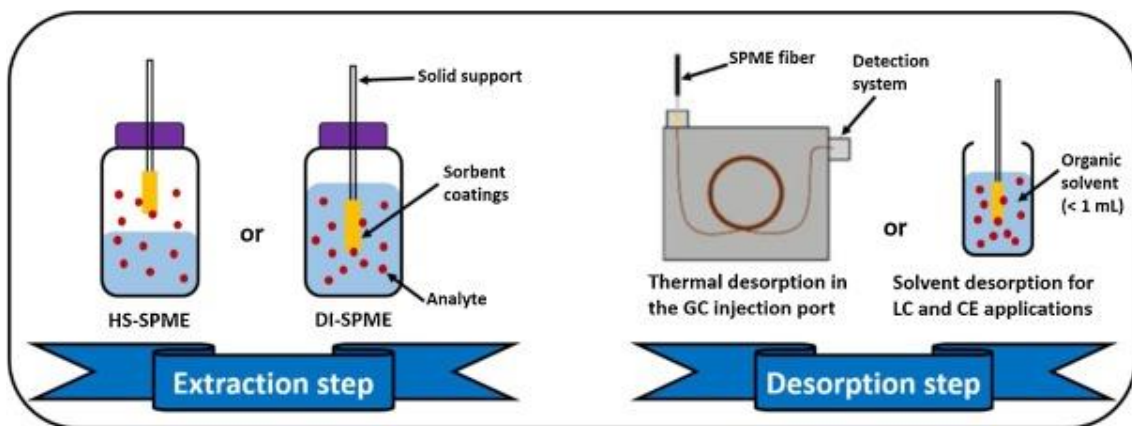


Figura 15 Técnica de SPME por imersão direta (DI-SPME) e por amostragem por *headspace* (HS-SPME). Adaptado de: (Murtada, 2020)

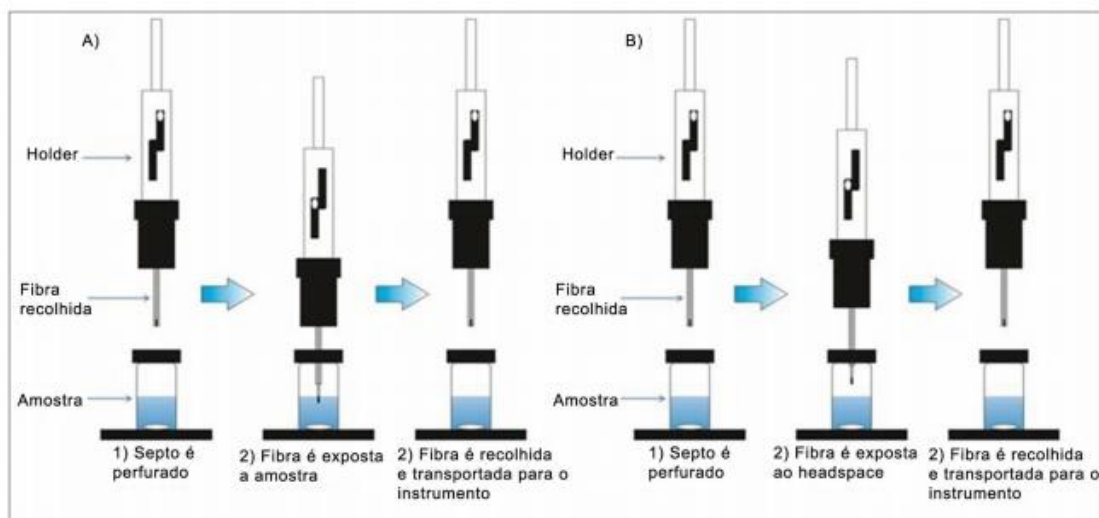


Figura 16 Técnica de SPME por A) imersão direta (DI-SPME) B) *headspace* (HS-SPME). Adaptado de (Luiz, Maciel, Lanças, 2015)

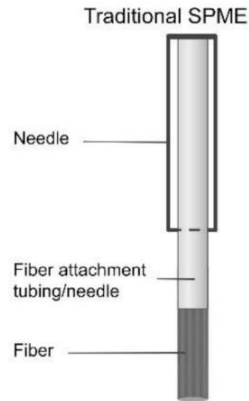


Figura 17 Dispositivo SPME. Adaptado de (Merkle, Kleeberg, Fritsche, 2015)

Relativamente ao design das fibras, atualmente existem as SPME *Classic* (1), a SPME-LC *Probe* (2), a SPME-LC *Tips* (3) e a SPME-*Arrow* (4), figura 18.

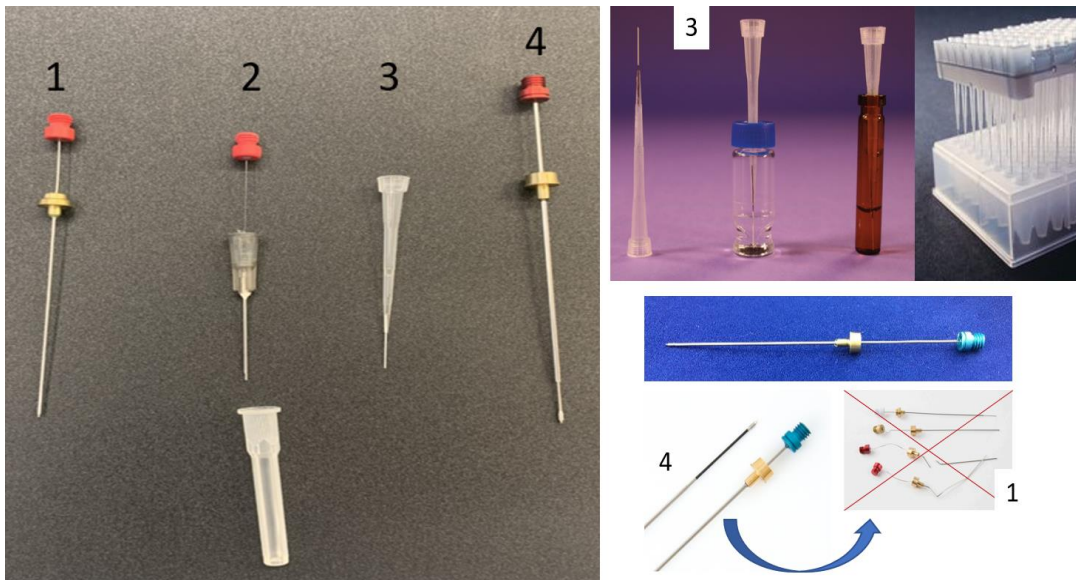


Figura 18 Tipos de Fibras (Design). 1- SPME *Classic*; 2- SPME LC *Probe*; 3- SPME LC *Tips*; 4- SPME *Arrow* (<https://www.sigmaaldrich.com/PT/en>).

A configuração padrão das fibras permite a sua utilização manual, bem como a sua automatização, figura 19.



Figura 19 Configuração das fibras para SPME (<https://www.sigmaaldrich.com/PT/en>).

A escolha da fase de revestimento é muito importante para alcançar uma boa seletividade dos analitos alvo, sendo geralmente feita com base na afinidade do polímero que a reveste para um determinado tipo de compostos, os que se espera/quer obter. Na figura 20 estão representadas, algumas fibras comerciais de SPME. É de realçar que diferentes fases, apresentam diferentes cores, facilitando a sua identificação, no entanto as cores podem mudar de marca para marca.



Figura 20 Diferentes fases do revestimento das fibras SPME e respetivas cores (<https://www.sigmaaldrich.com/PT/en>).

Dentro das fibras clássicas, foi desenvolvido uma nova configuração, utilizando um revestimento extra de polidimetilsiloxano (PDMS), numa fibra divinilbenzeno (OC-DVB; OC, do inglês *overcoated*), figura 21. O sobre-revestimento de PDMS, resulta numa maior proteção da camada DVB da contaminação pela matriz, aumentando a durabilidade e a robustez física da fibra e o desempenho e reprodutibilidade dos métodos. A redução da coextração dos interferentes da matriz, diminui a competição entre os interferentes e os analitos para a camada adsortiva, resultando numa maior capacidade de extração da fibra OC. Adicionalmente, o material interferente que adere ao revestimento é mais facilmente removido mediante uma fase de lavagem (Merkle et al., 2015).



Figura 21 Design da nova fibra OC-PDMS/DVB (<https://www.sigmaaldrich.com/PT/en>).

As fibras OC-PDMS/DVB são fisicamente mais robusta, que permite um melhor desempenho e durabilidade do método, necessitando de menos manutenção e troca de fibra. Reduz a competição entre matriz e analitos para camada adsortiva, tendo uma maior capacidade devido a menor coextração da matriz, figura 22 e 23 (Merkle et al., 2015).

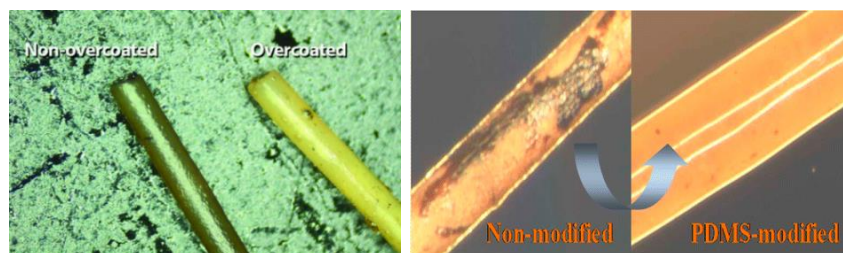


Figura 22 Diferenças entre fibras PDMS/DVB (*non overcoated*) e OC-PDMS/DVB (*overcoated*) (<https://www.sigmaaldrich.com/PT/en>).

A SPME-LC *tips*, são uma configuração mais recente, que consiste numa microfibras revestida, mantida no lugar de uma ponta de micropipeta. Existem dois tipos de revestimento desta fibra, a C18 e as PDMS/DVB. As C18, foram recentemente desenvolvidas e contêm partículas de sílica incorporadas num polímero patenteado, não-inflamável e biocompatível. O benefício deste desenho permite a extração da maioria dos pequenos analitos de interesse, minimizando a coextração de macromoléculas interferentes, tais como proteínas e fosfolípidos. As PDMS/DVB, são favoráveis para a extração de analitos semi-voláteis ou voláteis moderadamente polares.

As pontas podem ser operadas quer por equipamento robótico quer manualmente. As SPME LC *tips*, podem ser utilizada em sistemas de 96 poços, em formato de bandeja, permitindo “extrações em escala”, figura 23 (Tips et al., 2015).



Figura 23 SPME LC *Tips* com manipulação robótica e utilização manual (<https://www.sigmaaldrich.com/PT/en>).

A eficiência de extração por SPME pode ser calculada teoricamente, sendo que ocorre por equilíbrio entre duas fases. Quando o equilíbrio é alcançado e, considerando o volume de amostra como substancialmente superior ao volume do material sorvente, a quantidade de massa dos analitos extraídos pode ser calculada, de acordo com a equação (Ahmad, 2020):

$$n = K_{fs} \times V_f \times C_0$$

Onde  $n$  é a massa dos analitos extraídos,  $K_{fs}$  o coeficiente de partição do analito entre o sorvente da fibra e a amostra,  $V_f$  o volume do sorvente e  $C_0$  a concentração inicial do analito na amostra.

Desde o seu desenvolvimento, que esta técnica, demonstrou inúmeras vantagens para a análise de compostos orgânicos em diferentes matrizes, nomeadamente: redução ou eliminação do uso de solventes; necessidade de pequenas quantidades de amostra; necessidade de menores tempos de preparação de amostra; ser facilmente passível de automatização, permitindo análises de alto rendimento; permite a extração e pré-concentração direta e indireta de analitos em matrizes sólidas, líquidas ou gasosas; permitir a implementação de análises no local de amostragem ou in vivo (Ahmad, 2020), figura 24. A SPME, também apresenta algumas desvantagens, como a incompleta recuperação dos analitos, a fragilidade das fibras traduzida na sua frequente incapacidade para resistirem fisicamente a uma série completa (padrões, brancos, controlo de qualidade das amostras e amostras a analisar) e a impossibilidade de realizar extrações em solventes orgânicos (Ferreira, 2015).

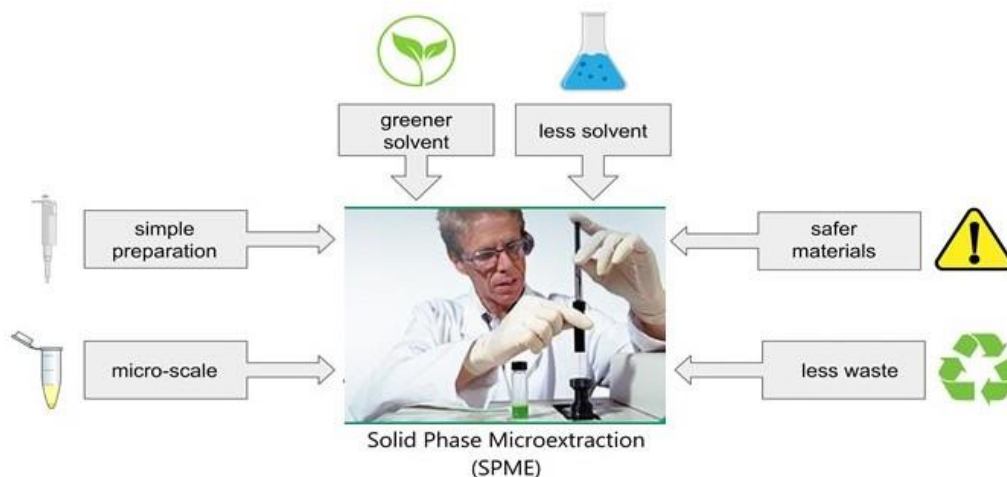


Figura 24 Vantagens da microextração em fase sólida, SPME. Adaptado de (Billiard, Dershem, Gionfriddo, 2020).

### 3.2. Química Verde

O termo “Química Verde” foi introduzido em 1994 por Anastas, que remete ao facto de que deveria existir uma maior responsabilização e consciencialização para a poluição ambiental derivada da eliminação de resíduos produzidos em laboratório, por parte da comunidade científica (Ahmad, 2020). Posteriormente, Namiesnik (1999) introduziu o termo “Química Analítica Verde” (GAC, do inglês *Green Analytical Chemistry*), que integrando a redução da produção de resíduos e a diminuição da quantidade e toxicidade dos reagentes como critérios importantes para a escolha da metodologia analítica a utilizar (Tobiszewski, Mechlińska, Zygmunt, Namieśnik, 2009).

Os 12 princípios da GAC incluem:

1. A aplicação de técnicas de análise direta por forma a evitar metodologias de preparação da amostra;
2. A minimização da quantidade e número de amostras;
3. A realização de medições *in situ*;
4. A integração de processos e procedimentos analíticos que reduzam o consumo de energia e de reagentes;
5. A seleção de métodos automatizados e miniaturizados;
6. Evitar processos de derivatização;
7. A redução da produção de um volume alargado de resíduos analíticos e a realização de uma gestão adequada dos mesmos;
8. A escolha de métodos multi-analitos, multi-resíduos ou multi-parâmetros invés de métodos que analisem um analito de cada vez;
9. A minimização do consumo de energia;
10. A escolha de reagentes obtidos de fontes renováveis;
11. A eliminação ou substituição de reagentes tóxicos;
12. A incrementação da segurança do operador.

Na maioria dos casos, as matrizes em estudo, são demasiado complexas e/ou os analitos alvo encontram-se presentes em concentrações vestigiais, juntamente com interferentes. Por estas razões, é necessário incluir quase sempre um passo de preparação da amostra na metodologia analítica (Ahmad, 2020).

Atualmente, as abordagens de amostragem miniaturizadas como a SPME, são cada vez mais aceites no meio científico e técnico, devido à sua relação custo-benefício, facilidade de manuseamento simplificação, redução acentuada ou mesmo ausência de

solventes orgânicos tóxicos e permitirem a utilização de baixos volumes de amostra (Tobiszewski et al., 2009).

A *Analytical GREENness*, desenvolveu uma abordagem de avaliação abrangente, flexível e direta, que pretende fornecer um resultado facilmente interpretável e informativo, relativamente ao quão “verde” é o método desenvolvido. Têm sido desenvolvidas várias abordagens à métrica GAC, figura 25. No entanto, o mais recente é o RGB, um modelo de cor aditiva que inclui não só critérios verdes (representados pela cor verde), como também de desempenho analítico (representada pela cor vermelha), e de produtividade (representada pela cor azul). O resultado é de fácil interpretação, uma vez que é a combinação das cores resultantes do desempenho do método em cada categoria, figura 26 (Pena-Pereira, Wojnowski, Tobiszewski, 2020).

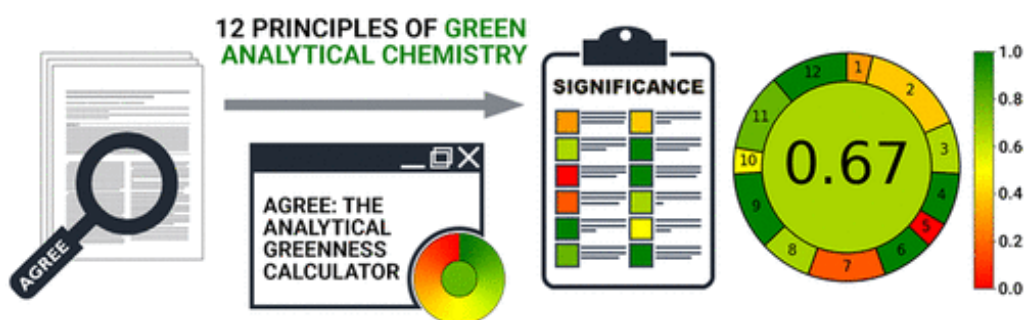


Figura 25 AGREE - Abordagem Analítica GREENness Métrica e Software. Adaptado de (Pena-Pereira et al., 2020).

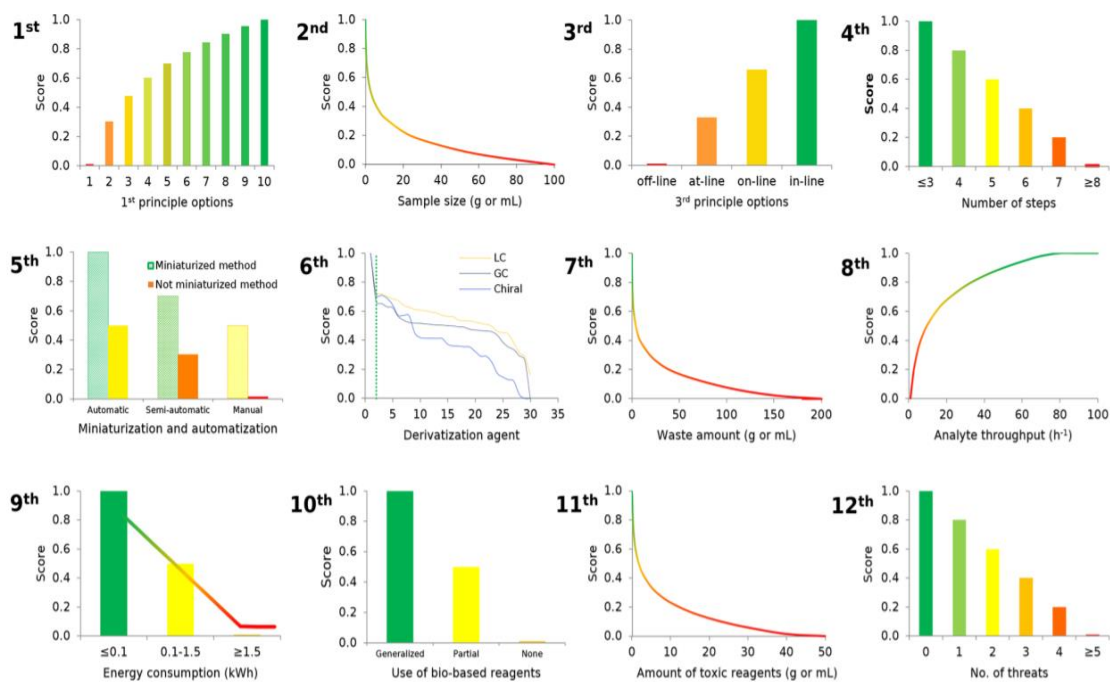


Figura 26 Representação gráfica das funções aplicadas para converter as variáveis em pontuações de 0-1. Adaptado de (Pena-Pereira et al., 2020).

### 3.3. Métodos Cromatográficos

O termo “cromatografia” foi introduzido e utilizado pela primeira vez pelo botânico russo Mikhail S. Tswett em 1906 no jornal da sociedade alemã de botânica (Ahmad, 2020; Ettre, 2000).

As técnicas cromatográficas, como a cromatografia em fase gasosa (GC) e a cromatografia em fase líquida de alta eficiência (HPLC), fruto do avanço tecnológico em instrumentação ao longo dos tempos, foram-se impondo como as principais técnicas de separação utilizadas para caracterizar qualitativamente e quantitativamente diversos tipos de misturas complexas, tendo tido um papel decisivo em diversas descobertas científicas. (Ahmad, 2020).

A distribuição dos componentes numa mistura, ocorre entre duas fases, uma fase estacionária, que pode ser sólida ou líquida (fixada numa coluna ou numa superfície sólida) e por uma fase móvel, que pode ser líquida, gasosa ou um fluido supercrítico. As concentrações relativas de um componente na fase estacionária ( $c_S$ ) e na fase móvel ( $c_M$ ) relacionam-se através do coeficiente de distribuição ( $K$ ), dado pela equação.

$$K = \frac{c_S}{c_M}$$

A separação dos compostos é realizada através das diferenças de afinidade dos mesmos com a fase estacionária presente na coluna e com a fase móvel, figura 27. Compostos com menor afinidade à fase estacionária, eluem mais rapidamente, saindo em primeiro lugar, enquanto compostos com maior afinidade, eluem mais lentamente, saindo posteriormente.

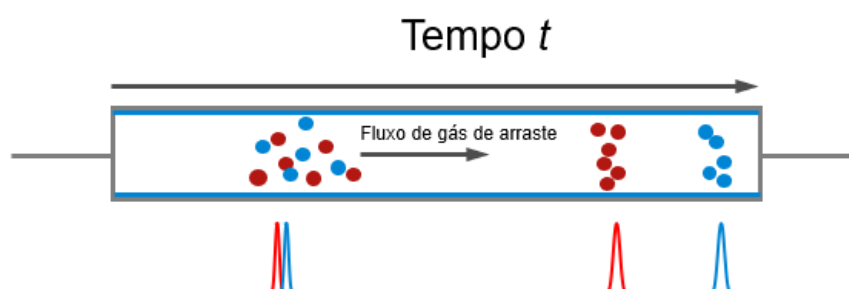


Figura 27 Separação dos compostos ao longo da coluna. Adaptado de <https://www.agilent.com>

Um composto, quando não é retido na coluna, será eluído no tempo morto ( $t_M$ ), enquanto um composto retido eluirá posteriormente, atravessando a coluna num tempo de retenção ( $t_R$ ) superior, sendo o tempo de retenção ajustado ( $t_E$ ) o tempo que o composto depende na fase estacionária, figura 28.

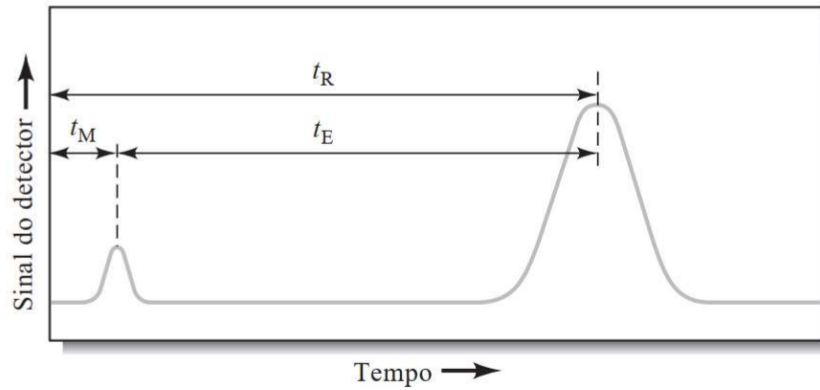


Figura 28 Ilustração do tempo morto ( $t_M$ ), do tempo de retenção ajustado ( $t_E$ ) e do tempo de retenção ( $t_R$ ) num cromatograma. Adaptado de (Skoog *et al*, 2006)

### 3.3.1. Cromatografia Gasosa

Em cromatografia de fase gasosa (GC), a fase móvel consiste num gás inerte (gás de arraste; *carrier gas*) que transporta a amostra através da coluna que contém a fase estacionária sem interagir com esta. Os gases normalmente utilizados são o hélio, o azoto e o hidrogénio. Um sistema de GC é basicamente constituído por um injetor, uma coluna cromatográfica inserida num forno e um detetor, controlados por software adequado, figura 29 (Ahmad, 2020).

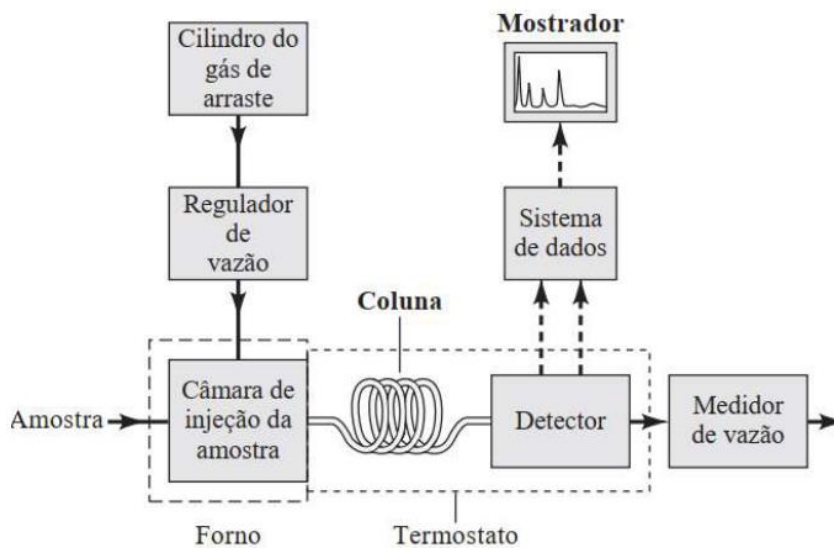


Figura 29 Diagrama de blocos de um GC convencional. Adaptado de (Ahmad, 2020)

Para a introdução da amostra em GC existem diferentes tipos de sistemas de injeção. Os modos de injeção mais usados são os sistemas por temperatura constante (isotérmica), com (*split*) ou sem (*splitless*) repartição da amostra e o modo de vaporização com temperatura programada (PTV, do inglês *Programmed Temperature Vaporization*). No modo *split*, por intermédio dum sistema de válvulas, apenas uma parte da amostra é introduzida na coluna, sendo a divisão da amostra determinada por meio da relação entre

a quantidade de gás de arraste que deixa o injetor pela válvula de *split* e o fluxo deste na coluna (razão de *split*). No modo *splitless* toda a amostra injetada é arrastada para a coluna. O modo de injeção PTV oferece uma maior sensibilidade analítica devido à possibilidade de permitir a injeção de grandes volumes (LVI, do inglês *Large Volume Injection*) de amostra.

Relativamente às colunas para GC, existem dois tipos, as de empacotamento e as capilares, sendo que as capilares, face à sua elevada eficiência e resolução, têm vindo a substituir as colunas de empacotamento, tornando-se dominantes na maioria dos laboratórios. As colunas capilares são constituídas por um tubo de sílica fundida, com revestimento exterior em poliamida e a fase estacionária a revestir a parede interna. As fases estacionárias líquidas mais utilizadas são baseadas em polissiloxano, sendo que o tipo e a percentagem de grupos substituintes diferenciam cada fase e ditam as suas características de polaridade e seletividade. O polidimetilsiloxano (PDMS), com características apolares, é a fase estacionária mais comum.

Uma vez que as interações dos analitos com a fase estacionária, de que resulta a sua separação, são dependentes da temperatura, a coluna encontra-se localizada dentro dum forno com temperatura programável, podendo operar no modo isotérmico ou em gradiente de temperaturas. O modo de operação mais utilizado é o modo gradiente mediante rampas de temperatura, no qual ocorre um aumento térmico progressivo constante ou a diferentes velocidades e tempos distintos com possibilidade de etapas isotérmicas no início, meio ou no fim da análise.

O último componente essencial para operação do sistema de GC é o detetor, que é responsável pela emissão do sinal, traduzindo a variação da resposta em função da composição e/ou propriedades dos componentes eluídos.

Atualmente, uma ampla gama de detetores está disponível conforme as necessidades de aplicações pretendidas, destacando-se os detetores de ionização de chama, de condutividade térmica, de captura eletrónica, de azoto-fósforo e ainda o MS (Ahmad, 2020; Skoog *et al*, 2006; Ettre, 2000).

### 3.3.2. Analisadores de Massa

#### 3.3.2.1. Quadruplo

O acoplamento de um cromatógrafo gasoso (GC) a um espectrômetro de massa (MS) resulta numa combinação das vantagens de duas técnicas separativas, juntando a alta seletividade e eficiência de separação da cromatografia com a informação estrutural da espectrometria de massa, que permite não só a identificação dos analitos, como fruto da adição uma nova dimensão -  $m/z$  (razão massa/carga) - ao sinal analítico, permite quantitativamente uma seletividade adicional por seleção de ião/iões a monitorizar (SIM - Monitorização de Ião Seleccionado ou MRM - Monitorização de Reações Múltiplas). (Truta, 2011).

Atualmente, a GC acoplada à espectrometria de massa em *tandem* (GC/MS/MS) é uma das técnicas mais vantajosas como método de deteção ultra seletivo de compostos-alvo em matrizes complexas a níveis residuais, para amostras biológicas, metabolitos, vestígios de drogas e obtenção de provas forenses. Este método apresenta como vantagens um aumento da sensibilidade, uma redução da interferência espectral dos compostos presentes na matriz e um aumento da quantidade de informação estrutural possível de ser obtida (Skoog, *et al*, 2006; Hubschmann, 2015; Truta, 2011).

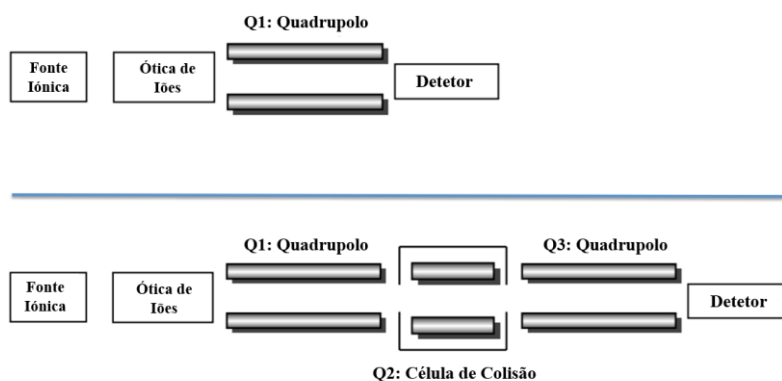


Figura 30 Sistema de GC/MS de quadrupolo simples versus Sistema de GC/MS/MS de triplo quadrupolo.

#### 3.3.2.2. Triplo Quadrupolo

A espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS) consiste numa técnica espectrométrica que, em vez de utilizar apenas um analisador de massas para separar os iões com a mesma razão  $m/z$  gerados na fonte de ionização, utiliza dois estágios de espectrometria de massas, MS1 e MS2, separados por uma “célula de reação”. Um deles é utilizado para isolar o ião de interesse (ião-pai, também designado por ião-precursor) e o outro é usado para estabelecer uma relação entre este ião e os iões gerados a partir da

sua decomposição induzida (iões-filho, também designados por iões-produto)(Truta, 2011).

O analisador do tipo triplo quadrupolo é um instrumento constituído por três quadrupolos em série, colocados em sucessão (Figura 31). Quando operado em modo tandem, o equipamento utiliza o primeiro (Q1) e o terceiro (Q3) quadrupolo como analisadores de massa e o segundo (Q2), como célula de colisão, onde os iões, ao saírem do Q1, sofrem dissociação por colisão, na presença de um gás inerte(Sparkman, Penton, Kitson, 2011; Truta, 2011).

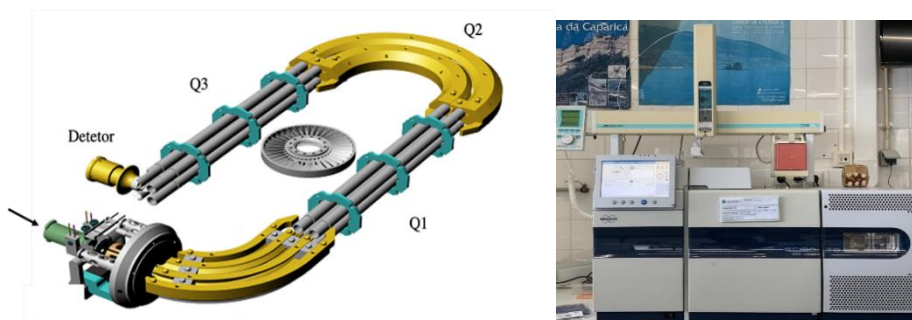


Figura 31 Imagem representativa e equipamento utilizado em laboratório. Adaptado de (Hubschmann, 2015)

O modo de scan do ião produto utiliza Q1 como um filtro de massa, permitindo apenas a passagem da razão  $m/z$  pretendida. O Q3 opera em modo full scan e obtém-se um espectro de massa do ião pretendido. Este modo, também conhecido como Selected Reaction Monitoring (SRM) é fundamental para o desenvolvimento e otimização de condições de operação para o modo de Multiple Reaction Monitoring (MRM). Este modo, muito semelhante ao SIM, monitoriza a transição do ião precursor e ião produto.

Em MRM, os dois analisadores são utilizados em modo SIM. Em Q1 passa apenas o ião precursor (de  $m/z$  específica), seguindo-se para Q2, onde sofre dissociação por colisão e, ao chegar a Q3, o ião produto com  $m/z$  pretendido passa para chegar ao detetor (Truta, 2011).

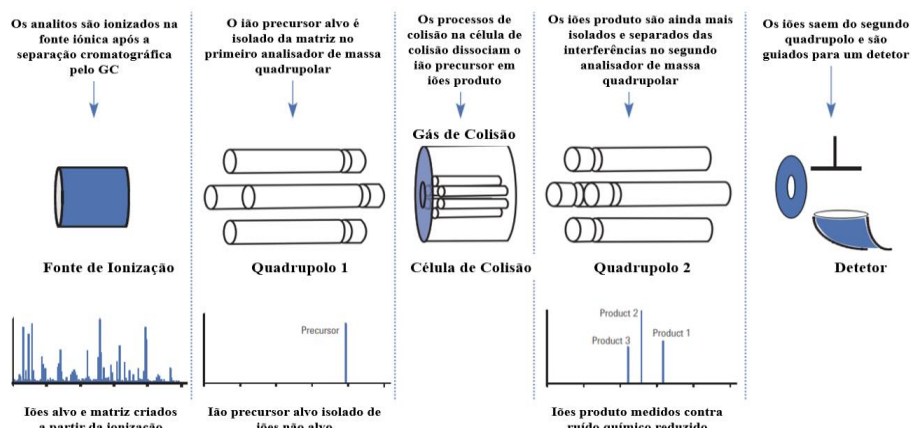


Figura 32 Esquema de funcionamento do GC/MS/MS.

### 3.3.2.3. Tempo de Voo

Este analisador de massas, separa os iões pelo tempo que demoram a percorrer o analisador. Este tempo está relacionado com a seu  $m/z$  (quanto menor, mais rápidos são).

Os sistemas TOF/MS podem apresentar uma alta taxa de aquisição de espectros, no qual é possível obter até duzentos e cinquenta espectros de compostos por segundo, sem distorção espectral, permitindo a reconstrução dos cromatogramas e a obtenção de espectros de alta qualidade. Estes sistemas são muito mais sensíveis em varrimento total (*full scan*) do que os analisadores de quadrupolo.

Os iões da fonte de iões são acelerados e concentrados num feixe paralelo que entra continuamente na região moduladora de iões do analisador. Inicialmente, todos os iões recebem a mesma energia cinética, permitindo avaliar a rapidez com que os iões viagem pelo detetor. Iões com baixa massa molecular viajam mais depressa, chegando ao detetor em primeiro lugar (Hubschmann, 2015). Atualmente, todos os instrumentos GC-MS/TOF encontram-se equipados com um refletor, cuja função é concentrar a distribuição da energia cinética, originada pelas pequenas diferenças na velocidade inicial (Hubschmann, 2015).

Os sistemas de GC-TOF/MS (figura 33) apresentam como vantagens: a produção de espectros não distorcidos, uma consequência de todos os iões serem recolhidos virtualmente através do mesmo intervalo de tempo dos cromatogramas; uma distorção espectral mínima ao longo dos picos cromatográficos, que permite a utilização de algoritmos de desconvolução espectral (*NonTarget Deconvolution*) e a deteção automática de picos.

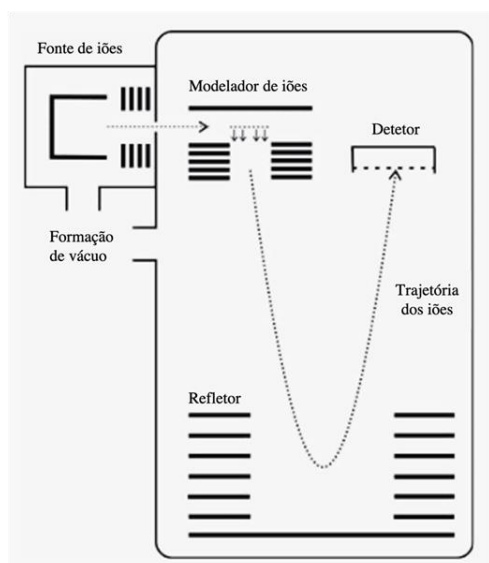


Figura 33 Funcionamento do TOF e equipamento utilizado em laboratório. Adaptado de (Hubschmann, 2015)

### 3.4. Revisão Bibliográfica

Foi realizada uma revisão bibliográfica das técnicas de microextração existentes em literatura para o rastreio dos compostos alvo. A Tabela 3, mostra algumas técnicas de microextração existentes para os compostos em estudo, bem como a matriz biológica, o instrumento utilizado para a detecção dos compostos e o seu limite de detecção (LOD).

Tabela 2 Abordagens baseadas nas técnicas de microextração para a análise dos compostos em estudo cocaína, éster metílico da ecgonina, cocaetileno, benzoilecgonina, fentanilo e norfentanilo em matrizes biológicas. Adaptado de (Ahmad, *et al.*, 2021; Lizot, *et al.*, 2020; Maiti, Bidinger, 1981; Saraji, Boroujeni, Bidgoli, 2011)

<b>Droga</b>	<b>Matriz</b>	<b>Técnica de Microextração</b>	<b>Sistema Instrumental</b>	<b>LOD (µg/L)</b>
CCE COC NC	Leite materno	HF-LPME	GC-MS	5-7
BE COC ECGME	Urina	MEPS	GC-MS	25 (LLOQ)
BE CCE COC ECGME	Plasma	µSPE	LC-MS/MS	0,000013-0,0036
BE CCE COC EME NC	Plasma	DI-SPME	UHPLC-MS/MS	0,5
CCE CO	Plasma	DI-SPME	GC/MS	11-19
FE	Plasma Urina	HS-SPME	GC-NPD	1,4
FE	Plasma Urina	HS-SPME	GC/MS	0,03
FE	Plasma	DI-SPME	GC/MS	0,1
FE	Plasma Urina	LLE-	LC/MS/MS	0,1

BE: benzoilecgonina; CCE: cocaetileno; COC: cocaína; \_microextração de fase sólida de imersão direta; ECGME: éster metílico de ecgonina; FE: fentanilo; GC: cromatografia gasosa; HF-LPME: microextração de fase líquida de fibra oca; LC: cromatografia líquida; HS-SPME: microextração em fase sólida por headspace; MEPS: microextração por sorventes embalados; MS/MS: espectrometria de massa em tandem; MS: espectrometria de massa; NC: norcocaína; NPD: detetor de fósforo de nitrogéniorcocaína;

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1. Produtos Químicos e Padrões

Para a realização deste projeto, foram utilizadas soluções padrão existentes no Laboratório de Patologia Molecular e Bioquímica Forense do Centro de Investigação Interdisciplinas Egas Moniz (CiiEM). Foram utilizadas soluções padrão em metanol ou acetonitrilo a 1 mg/mL de cocaína, éster metílico da ecgonina, benzoilecgonina, cocaetileno, fentanilo e norfentanilo, da Cerrilliant, Lipomed e LG Standards. As propriedades das drogas de abuso e metabolitos selecionados são mostradas na tabela 3.

Tabela 3 Propriedades químicas das drogas de abuso e dos seus metabolitos, em estudo, obtidas através da plataforma digital *Chemicalize* (<https://chemicalize.com>).

Compostos	Nome IUPAC	Fórmula Química	Massa Molar (g/mol)
Cocaína	methyl (1R,2R,3S,5S)-3-(benzoyloxy)-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]octane-2-carboxylate	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	303.358
Éster Metílico da Ecgonina	methyl (1R,2R,3S,5S)-3-hydroxy-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]octane-2-carboxylate	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub>	199.25
Benzoilecgonina	(1R,2R,3S,5S)-3-(benzoyloxy)-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]octane-2-carboxylic acid	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>	289.331
Cocaetileno	ethyl (1R,2R,3S,5S)-3-(benzoyloxy)-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]octane-2-carboxylate	C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>4</sub>	317.385
Fentanilo	N-phenyl-N-[1-(2-phenylethyl)piperidin-4-yl]propanamide	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O	336.479
Norfentanilo	N-phenyl-N-(piperidin-4-yl)propanamide	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O	232.327

Foram utilizadas neste projeto amostra de sangue, urina, saliva e plasma de voluntários que providenciaram o seu consentimento informado e que afirmaram não ter consumido nenhuma das substâncias em estudo e que serão designadas como “amostras brancas”. Foi igualmente utilizada uma amostra de urina previamente confirmada como contendo cocaína e os seus principais metabolitos e que será designada como “amostra de urina positiva”.

Todos os solventes utilizados foram da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha), ou da Panreac (Barcelona, Espanha). O acetonitrilo (ACN) e o metanol (MeOH) utilizados foram *gradient grade*. A água utilizada para as extrações dos analitos e nas suas determinações analíticas é tipo I e foi desionizada e purificada com um sistema Milli-Q *plus* da Millipore (Massachusetts, EUA). As micropipetas utilizadas foram de vidro com volume de 100 e 10  $\mu\text{L}$ , da marca Mariendfeld, Laboratory Glassware (Lauda-Königshofen, Alemanha). As pipetas utilizadas foram da marca linex – Laborspirit (Loures, Portugal).

#### 4.2. Preparação de soluções

Foram preparadas várias soluções padrão. Estas tiveram as seguintes designações:

**MP1 - Solução mãe de mistura padrão 1 contendo 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cocaína, éster metílico da ecgonina, benzoilecgonina, fentanilo e norfentanilo em acetonitrilo, preparada a partir de solução padrão de cada composto, figura 34.**

**MP2 - Solução mãe de mistura padrão 2 contendo 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cocaína, éster metílico da ecgonina, benzoilecgonina, cocaetileno, fentanilo e norfentanilo em acetonitrilo, preparada a partir de solução padrão de cada composto, figura 35.**

**ST1 - Solução de trabalho 1 de mistura padrão contendo 500  $\text{ng}/\text{mL}$  de cocaína, éster metílico da ecgonina, benzoilecgonina, cocaetileno, fentanilo e norfentanilo em acetonitrilo preparada a partir da solução MP2, figura 35**

**ST2 - Solução de trabalho 2 de mistura padrão contendo 900  $\text{ng}/\text{mL}$  de cocaína, éster metílico da ecgonina, benzoilecgonina, cocaetileno, fentanilo e norfentanilo em acetonitrilo preparada a partir da solução MP2, figura 35.**

**C- ST1 - Calibradores 500; 250; 125; 63; 32 e 16  $\text{ng}/\text{mL}$  de cocaína, éster metílico da ecgonina, benzoilecgonina, fentanilo e norfentanilo em acetonitrilo preparados por diluição a partir da solução de trabalho ST1, figura 36.**

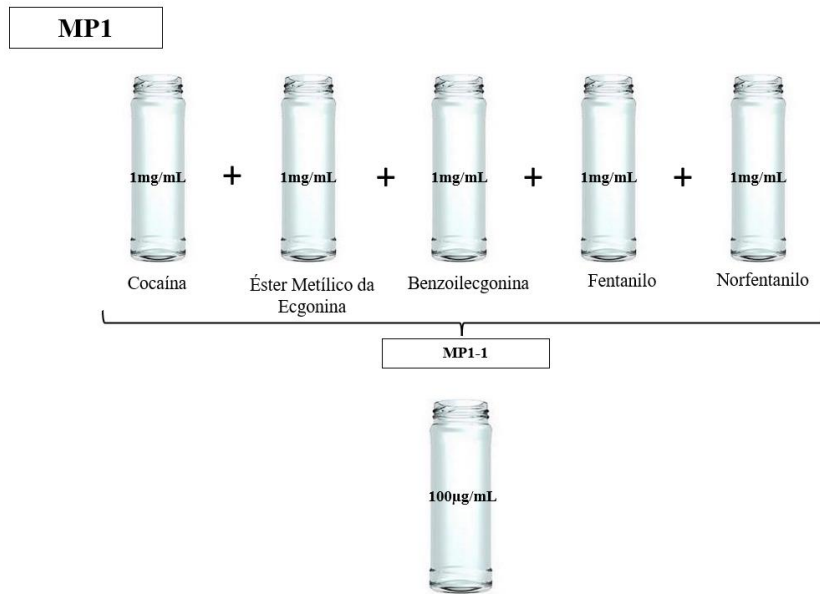


Figura 34 Esquema da preparação das soluções mãe de mistura padrão MP1-1, preparadas a partir de soluções individuais de cada compostos MP1, para o estudo das fibras clássicas.

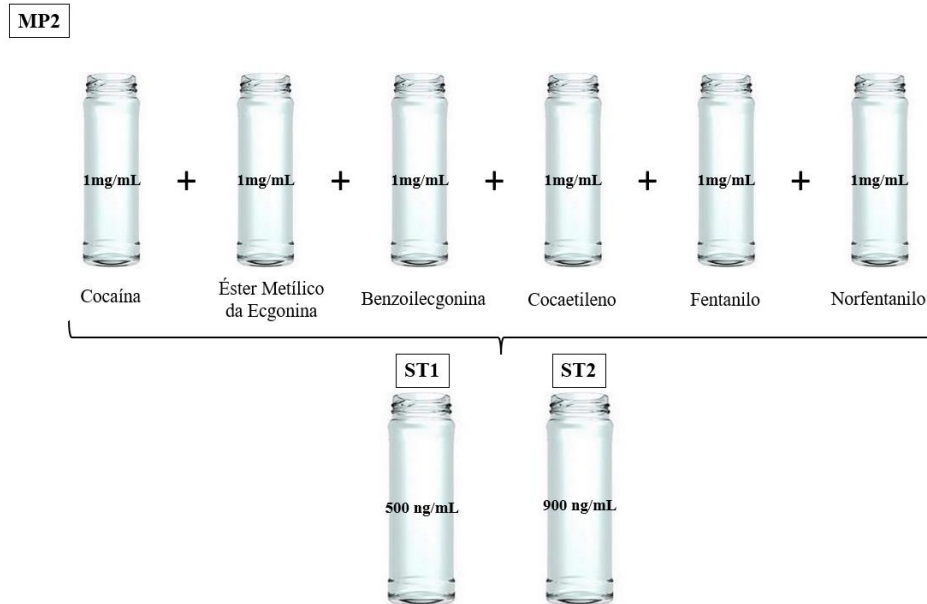


Figura 35 Esquema da preparação das soluções de trabalho ST1 e ST2, a partir de soluções individuais de cada composto MP2, para o estudo das fibras clássica OC-PDMS/DVB e das fibras *tips* ST1, e para o estudo em SPE ST2.

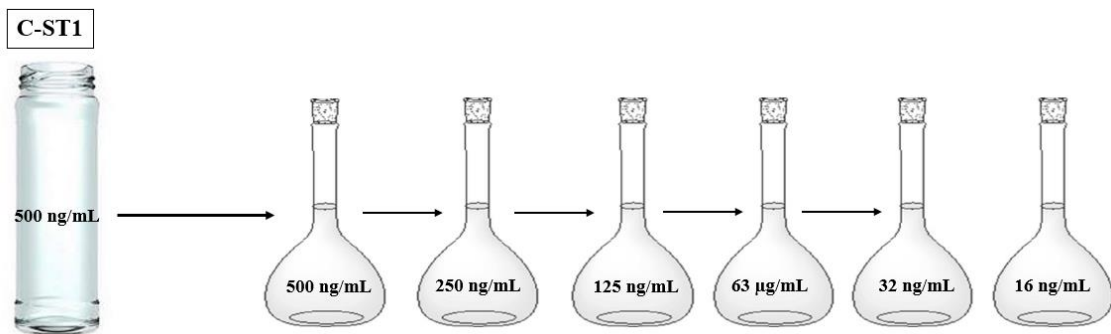


Figura 36 Esquema da preparação das soluções calibradores C-ST1, por diluição a partir da solução de trabalho ST1 utilizadas para o estudo da linearidade em SPME com as fibras clássicas OC-PDMS/DVB e com as fibras *tips*.

### 4.3. Extração por SPE

Neste método de extração, foram seguidos dois protocolos, cada um com diferentes cartuchos de SPE, OASIS® da Waters (Saint-Quentin En Yvelines Cedex, France). Ambos os protocolos utilizados (tabela 4 e 5), são uma adaptação do protocolo tradicional, utilizado pelo Laboratório de Química e Toxicologias Forenses do Instituto de Medicina Legal e Ciências Forenses. Para esta extração foram utilizadas inicialmente amostras brancas de sangue, urina, saliva e plasma, fortificadas com a solução MP2-ST2 (amostras controlo). Posteriormente, também foi feito o estudo numa amostra de urina positiva.

#### 4.3.1. OASIS HLB

Tabela 4 Procedimento experimental do método de extração SPE, utilizando cartuchos OASIS HLB.

OASIS® HLB (200 mg, 30 µm, 30/pK)	
Ativação/Acondicionamento	2 mL de metanol
Reequilíbrio	2 mL de água ultra-pura
Aplicação da amostra	5 mL da amostra
Lavagem	2 mL de metanol a 5%
Secagem das colunas	Secar as colunas sob vácuo (10min)
Eluição para frascos de vidro	2 mL de metanol
Secagem do extrato/eluato	Secar em azoto
Redissolução	Redissolver em 100µL de acetoneitrilo

#### 4.3.2. OASIS MCX

Tabela 5 Procedimento experimental do método de extração SPE, utilizando cartuchos OASIS MCX.

OASIS® MCX (30 mg, 30 µm, 100/pK)	
Ativação/Acondicionamento	2 mL de metanol
Reequilíbrio	2 mL de água desionizada
Aplicação da amostra	5 mL da amostra
Lavagem Sequencial	2 mL de água desionizada
	2 mL de ácido clorídrico 0,1N
	3 mL de diclorometano/metanol (70:30, v/v)
	3 mL de n-Hexano
Secagem das colunas	Secar as colunas sob vácuo (10min)
Eluição para frascos de vidro	2 mL de diclorometano/2-Propanol/Amónia (78:20:2, v/v/v)
Secagem da amostra	Secar em azoto
Redissolução	Redissolver em 100µL de acetoneitrilo

#### 4.4. Extração por SPME

##### 4.4.1. Fibras SPME

O dispositivo de suporte de SPME (*holder*), e as fibras clássicas com revestimentos de poliacrilato (PA; 85  $\mu\text{m}$ ), polidimetilsiloxano (PDMS; 100 e 30  $\mu\text{m}$ ), divinilbenzeno-carbowax- polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS; 50/30  $\mu\text{m}$ ) e polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS/DVB 65  $\mu\text{m}$ ) foram adquiridos à Supelco (Bellefonte PA, EUA). As fibras com o revestimento OC-PDMS/DVB (75  $\mu\text{m}$ ; 65  $\mu\text{m}$  de revestimento + 10  $\mu\text{m}$  revestimento extra) foram adquiridas à Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha). As fibras de SPME LC-*tips* com os revestimentos PDMS/DVB e C18 foram fornecidas pela Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha), nas quantidades de 8 fibras por revestimento.

Antes da primeira utilização, as fibras com a configuração clássica foram condicionadas no bloco de injeção do GC/MS a 260 ° C de acordo com a instruções do fornecedor. As LC-*tips* foram lavadas com MeOH e com ACN durante 30 segundos em cada solvente, e posteriormente reequilibradas em água ultrapura antes de serem utilizadas.

##### 4.4.2. Procedimento Experimental Fibras clássicas

Para a realização dos ensaios de extração por SPME, com as fibras de configuração clássica, foram utilizados frascos de 4 mL da marca Supelco, Bellefonte PA, EUA, selados com tampas de orifício com septos de silicone revestidos com politetrafluoretilenoPTFE (Supelco, PA, EUA).

Os frascos foram preenchidos até um volume de 2 mL com amostras de água fortificada. Na extração, foram ensaiadas vários tempos de extração (45; 30; 15; 10; 5 min), para o novo revestimento OC-PDMS/DVB, utilizando um agitador magnético a uma velocidade constante (260 rpm) e a uma temperatura controlada ( $24 \pm 2$  ° C). Para as fibras clássicas PA; PDMS, DVB/CAR/PDMS e PDMS/DVB, o tempo de extração foi constante, 45 min, mantendo igual as restantes variáveis. Após o processo de extração as fibras foram colocadas no sistema cromatográfico onde os compostos sofrem de dessorção térmica

A amostra de urina positiva, foi usada sem tratamento prévio ou filtração.

#### 4.4.3. Procedimento Experimental por Fibras *TIPS*

Para a realização dos ensaios de extração por SPME, com as fibras-*tips*, foram utilizados *eppendorfs* de 2 mL da marca ABDOS LABTECH (Uttrakhand, Índia). Estes foram preenchidos até um volume de 2 mL com amostras de água fortificadas e de 1 mL com a amostra de urina positiva. Na extração, foram ensaiadas várias velocidades de agitação (300, 500, 750, 1000 e 1400 rpm) e diferentes tempos de extração (15; 10; 5min), utilizando um agitador térmico da Thermomixer Comfort (Alfragide, Portugal). Posteriormente, as fibras foram colocadas em frascos, que foram selados com tampas de orifício com septos de silicone revestidos com PTFE (Supelco, PA, EUA), anteriormente furados, devido à fragilidade das fibras. A retroextração foi realizada por dessorção líquida, submergindo as fibras por 5 min em ACN, a temperatura controlada ( $24 \pm 2^\circ \text{C}$ ). A amostra de urina positiva, foi usada sem tratamento prévio ou filtração.

A figura 37, ilustra o procedimento tipo feito para a microextração utilizando as diferentes fibras em estudo.

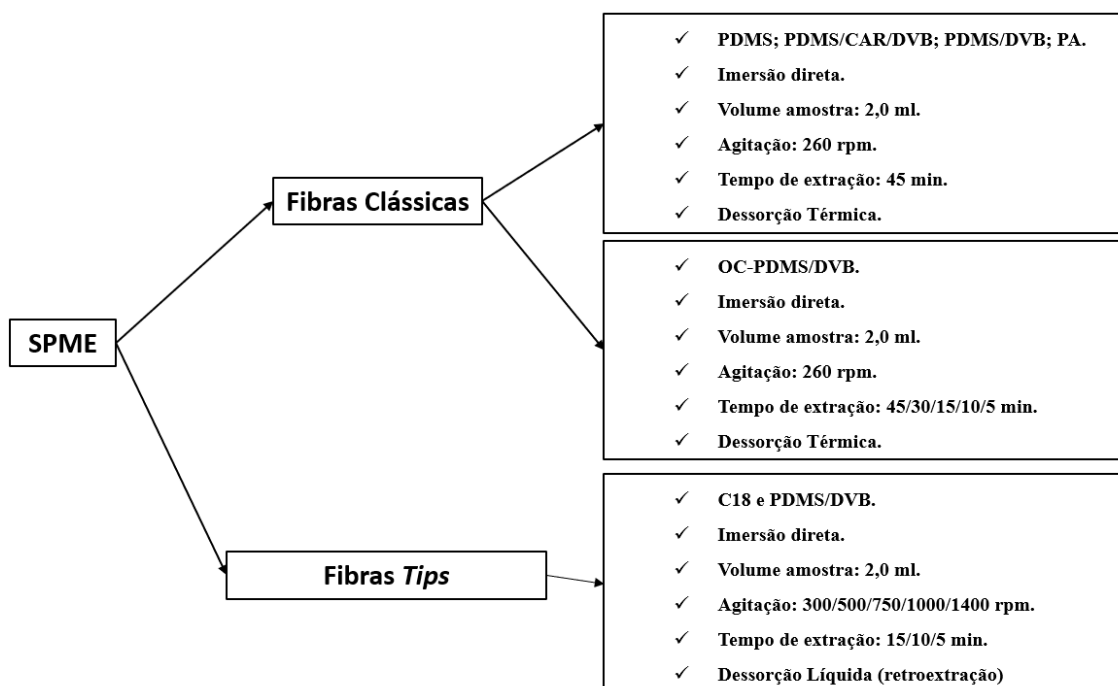


Figura 37 Esquema do procedimento experimental, aplicado nas amostras de água fortificadas e na amostra de urina positiva, com indicações das diferentes variáveis estudadas e das condições operacionais da extração com as fibras de configuração clássica e *tips*.

O procedimento experimental para as fibras clássicas com o novo revestimento OC-PDMS-DV e para as fibras *tips* com revestimento C18 e PDMS/DVB, encontra-se ilustrado na figura 38.

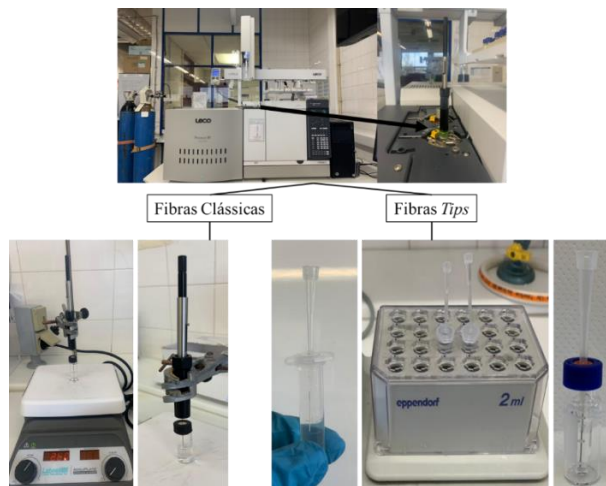


Figura 38 Procedimento experimental desenvolvido para SPME com fibras clássicas como novo revestimento OC-PDMS/DVB e com fibras *tips*, com revestimentos C18 e PDMS/DVB.

#### 4.5. Condições Cromatográficas

A tabela 6, apresenta as condições cromatográficas dos equipamentos utilizados, no decorrer do desenvolvimento deste projeto.

Tabela 6 Condições cromatográficas dos equipamentos utilizados, GC/MS/MS e do GC-TOF/MS

GC/MS/MS		GC-TOF/MS	
<b>Sistema</b>	Bruker Scion SCION TQ GC-MS (Bruker Daltonics) Massachusetts, EUA	<b>Sistema</b>	LECO Pegasus® BT GC- TOFMS TOF (LECO Corp., Saint Joseph, MI, USA)
	<i>Software</i> : MSWS 8.2 w/ Bruker MS Data Review 8.0 (Bruker Daltonics)		<i>Software</i> : ChromaTof (LECO Corp., Saint Joseph, MI, EUA)
<b>Injetor</b>	CTC–CombiPAL (CTC Analytics AG, Zwingen, Suíça)	<b>Injetor</b>	PAL3 (CTC Analytics AG, Zwingen, Suíça)
	Volume de injeção: 1 µL		Volume de injeção: 1 µL
	Solvente de lavagem: Acetona		Solvente de lavagem: Acetona
<b>Split/Splitless</b>	Gás de arraste: Hélio	<b>Split/Splitless</b>	Gás de arraste: Hélio
	Fluxo: 1,2 mL/min		Fluxo: 1,2 mL/min
	Modo: Splitless com purga 1:10		Modo: Splitless com purga 1:10
	Temperatura: 260°C		Temperatura: 260°C
	Liner: Single Taper Inlet Liner (4,0 mm ID; Topaz UI)		Liner: Single Taper Inlet Liner (0,75; 4,0 mm ID; Topaz UI)
<b>Coluna</b>	Tipo: DB-5-MS UI -30 m × 0,25 µm d.i. e 0,25 µm	<b>Coluna</b>	Tipo: DB-5-MS UI -30 m × 0,25 µm d.i. e 0,25 µm
	Fluxo: 1,8 mL/min		Fluxo: 1,8 mL/min
	Temperatura Inicial: 100°C (1min)		Temperatura Inicial: 100°C (1min)
	Temperatura Final: 300 °C (10min)		Temperatura Final: 300 °C (10min)
	Tempo de Corrida: 35min		Tempo de Corrida: 35min



## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Considerações para a extração dos Analitos em Estudo

Por forma a projetar as eficiências de extração dos analitos, em relação ao revestimento das fibras, foi estudada a polaridade e a gama de pH de cada tipo de revestimento (tabela 7).

Tabela 7 Diferentes fibras SPME, revestimento, espessura, polaridade e pH.

Revestimento	Espessura	Polaridade	pH
PDMS	30 $\mu$ m	Apolar	2-11
C18	1 cm	Apolar	2-8
PDMS/DVB	65 $\mu$ m	Bipolar	2-11
OC-PDMS/DVB	65 $\mu$ m	Bipolar	2-9
PDMS/CAR/DVB	50/30 $\mu$ m	Bipolar	2-11
PA	85 $\mu$ m	Polar	2-11

Tendo em conta a informação da polaridade dos vários tipos de revestimentos das fibras para SPME (tabela 7) e a polaridade dos compostos (tabela 8), é possível postular sobre alguns resultados experimentais, nomeadamente sobre a afinidade das fibras em relação a cada composto em particular.

Tabela 8 LogP e LogD obtidos para a hidrofobicidade dos compostos em estudo, através do programa *Chemicalize*.

Compostos	Log P	Log D
Fentanilo	3,815	pH 6 = 1,57
		pH 7 = 2,43
Cocaetileno	2,639	pH 6 = 0,39
		pH 7 = 1,25
Cocaína	2,282	pH 6 = -0,04
		pH 7 = 0,83
Norfentanilo	1,419	pH 6 = 1,64
		pH 7 = -1,11
Benzoilecgonina	-0,595	pH 6 = -0,59
		pH 7 = -0,60
Éster Metílico da Ecgonina	-0,213	pH 6 = -2,71
		pH 7 = -1,86

Através deste estudo verifica-se que os compostos mais apolares como são o caso do fentanilo, cocaetilenó e cocaína, irão ter maior afinidade com as fibras e por consequência uma maior eficiência de extração, uma vez que os revestimentos são maioritariamente apolares ou bipolares. Relativamente ao pH, uma vez que as fibras apresentam uma gama de pH alargada, não haverá nenhuma limitação para a extração destes compostos no pH das matrizes biológicas em estudo (pH= 6-7). O norfentanilo, poderá apresentar uma melhor eficiência de extração para a fibra com revestimento PA. No entanto, vai depender do volume de extração, sendo que esta fibra necessita de uma maior área de extração comparativamente com as restantes (Queiroz, 2009).

Segundo a literatura as melhores eficiências de extração, são normalmente obtidas quando as substâncias de abuso e fármacos encontram-se na sua forma neutra (Follador, *et al*, 2004; Queiroz, 2009; Raikos *et al*, 2009). Neste sentido, torna-se necessário determinar os valores de pH das matrizes biológicas seleccionadas que favorecessem as interações com as fibras.

Numa primeira fase, foi determinada as propriedades físico-químicas de cada analito, utilizando a plataforma online *Chemicalize* (<https://chemicalize.com>).

Os critérios seleccionados, para cada analito, foram o pKa, o ponto isoelétrico, o logP/logD e a solubilidade. Esta informação permite projetar as eficiências de extração relativas das fibras de SPME para cada nas matrizes biológicas. No entanto, os valores de recuperação deverão ser verificados.

O pKa indica o grau de dissociação de um composto e permite indiretamente prever a sua solubilidade. Os gráficos individuais de pKa descrevem para cada analito a proporção, em toda a gama de pH, das suas respetivas formas iónicas e neutras. A constante de dissociação, pKa, é o pH no qual um analito se encontra 50% na sua forma ionizada (geralmente mais hidrofílica) e 50% na sua forma neutra, não ionizada (mais lipofílica).

O ponto isoelétrico de um composto é o valor de pH ao qual apresenta carga eléctrica zero. Por outras palavras, é usualmente o valor de pH ao qual o composto encontra-se na sua forma neutra, maximizando a sua lipofilicidade/hidrofobicidade.

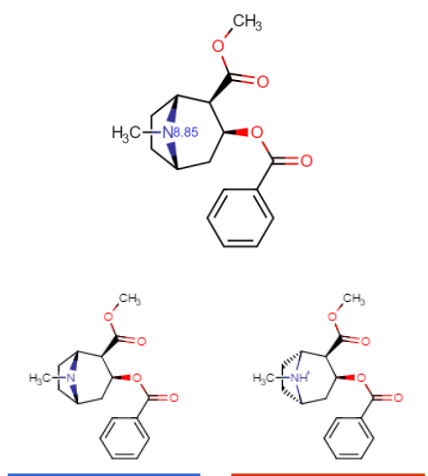
Para o estudo da hidrofobicidade, a plataforma digital utilizou duas constantes, como descritores, o log P que é coeficiente de partição dos compostos entre duas soluções (água e octanol) e o log D, que pode ser visto como a variação do Log P em função do pH da matriz e do pKa dos analitos. Sempre que o valor de log D é positivo, podemos assumir que o analito apresenta um carácter mais hidrofóbico a esse valor de pH, o que

potencialmente favorece a sua extração. Por outro lado, se for negativo o carácter apresentado é hidrofílico, favorecendo no equilíbrio a sua presença em meio aquoso.

A solubilidade é a quantidade máxima de uma substância que pode ser dissolvida num líquido. Na solubilidade, o carácter polar ou apolar de uma substância é importante, pois devido à polaridade, estas substâncias serão mais ou menos solúveis em fases aquosas ou orgânicas. Dessa forma, substâncias polares tendem a dissolver-se em líquidos polares e substâncias apolares, em líquidos apolares.

As figuras 39, 40, 41, 42, 43 e 44, ilustram o pKa para cada composto em estudo e as tabelas 9, 10, 11, 12, 13 e 14, apresentam a sua estrutura química e pKa.

Tabela 9 Estrutura química e pKa da cocaína.

Cocaína	pKa
	pKa básico = 8,85

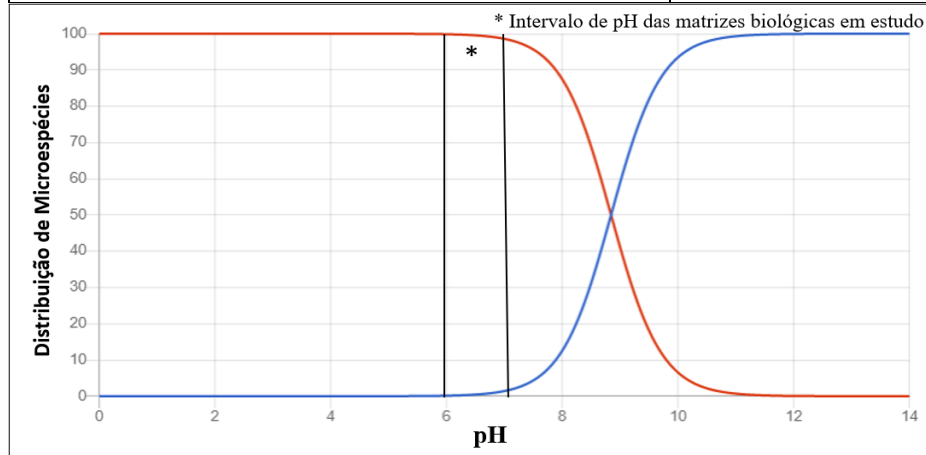
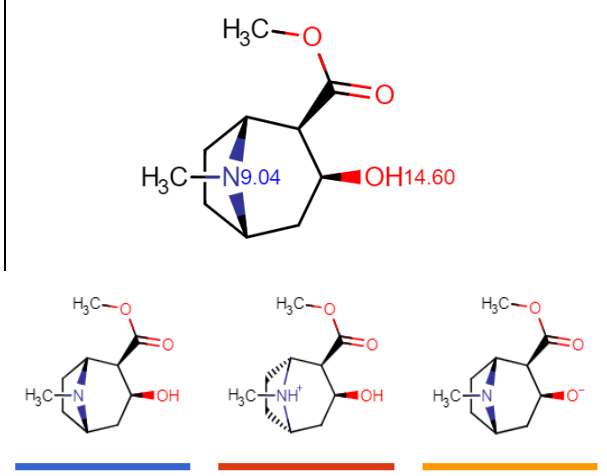


Figura 39 pKa obtido para a cocaína, pela plataforma *Chemicalize*.

Tabela 10 Estrutura química e pKa do éster metílico da ecgonina.

Éster Metílico da Ecgonina	pKa
	pKa ácido = 14,6 pKa básico = 9,04

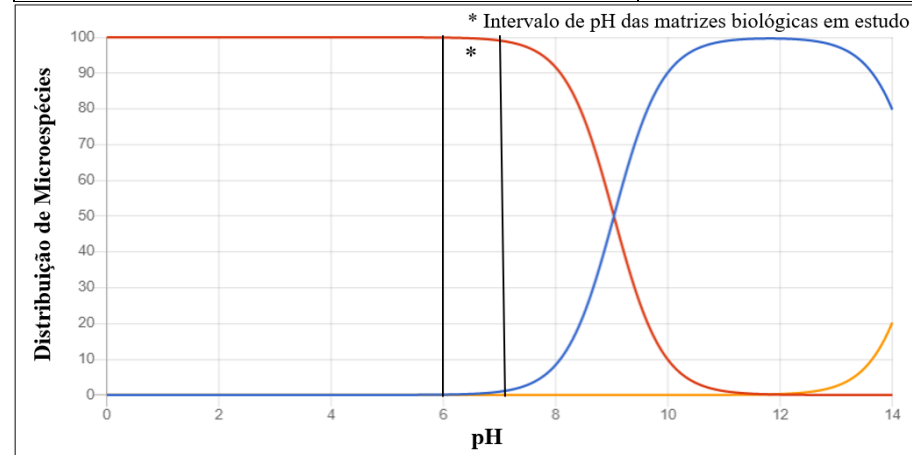
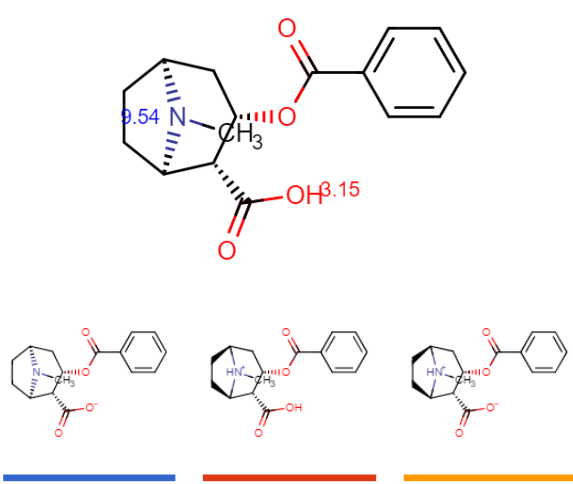


Figura 40 pKa obtido para o éster metílico da ecgonina, pela plataforma *Chemicalize*.

Tabela 11 Estrutura química e pKa da benzoilecgonina.

Benzoilecgonina	pKa
	<p>pKa ácido = 3,15 pKa básico = 9,54</p>

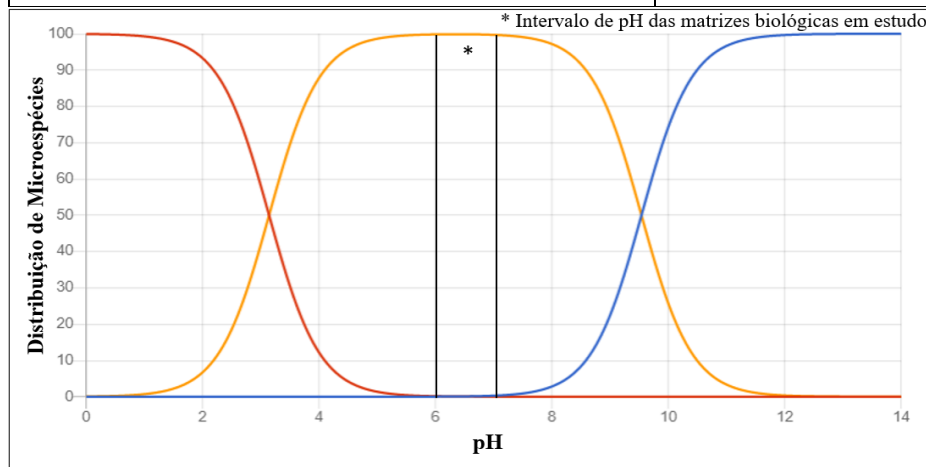
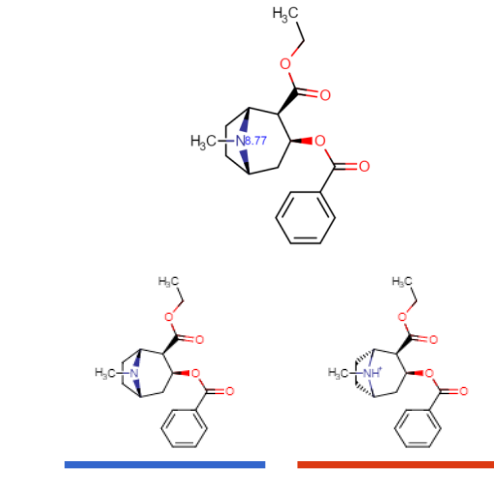


Figura 41 pKa obtido para a benzoilecgonina, pela plataforma *Chemicalize*.

Tabela 12 Estrutura química e pKa do cocaetileno.

Cocaetileno	pKa
	<p>pKa básico = 8,77</p>

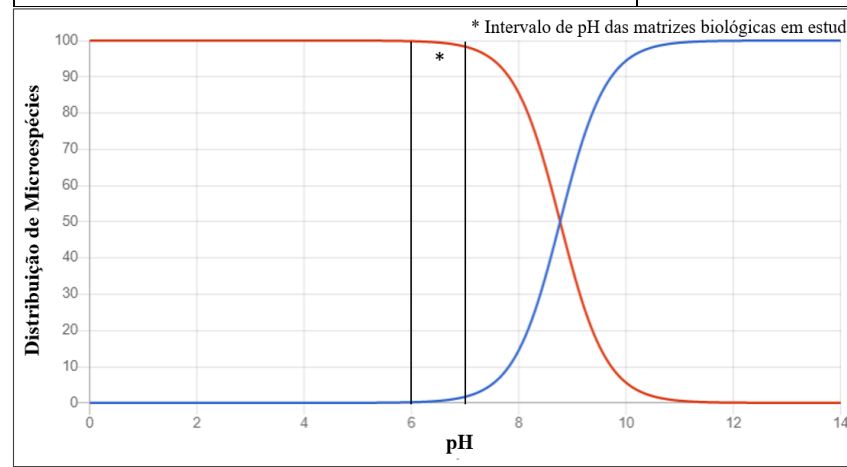
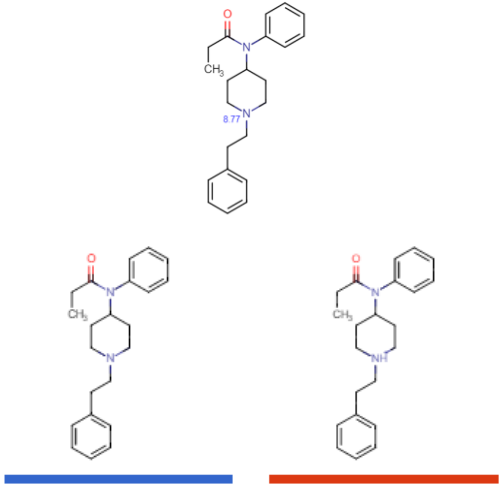


Figura 42 pKa obtido para o cocaetileno, pela plataforma *Chemicalize*.

Tabela 13 Estrutura química e pKa do fentanilo.

Fentanilo	pKa
	<p>pKa básico = 8,77</p>

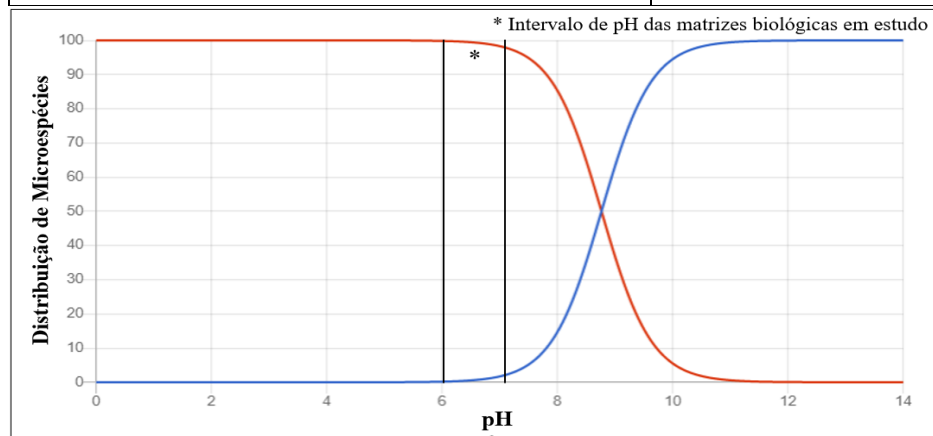
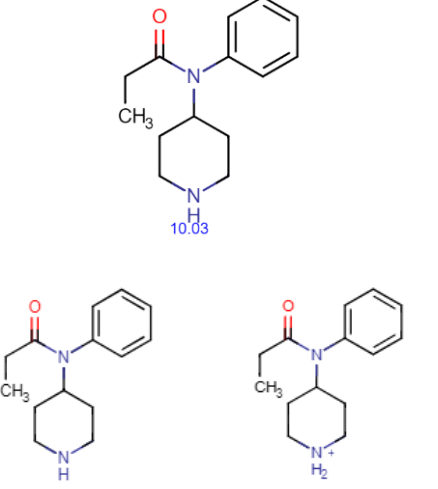


Figura 43 pKa obtido para o fentanilo, pela plataforma *Chemicalize*.

Tabela 14 Estrutura química e pKa do norfentanilo.

Norfentanilo	pKa
	<p>pKa básico = 10,03</p>

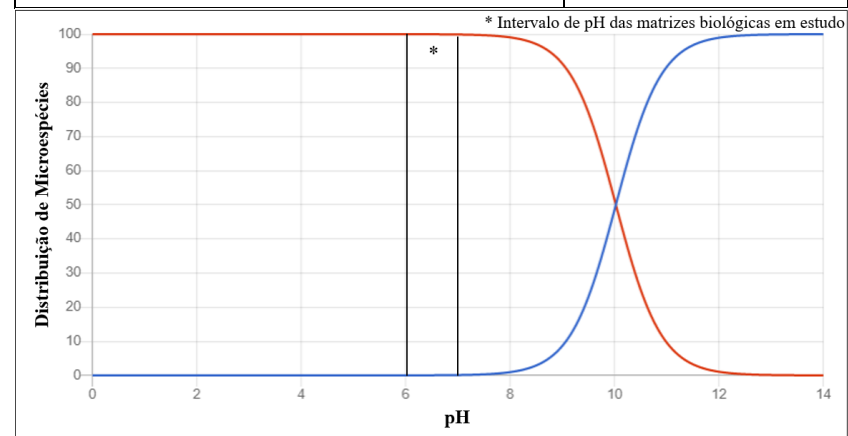


Figura 44 pKa obtido para o norfentanilo, pela plataforma *Chemicalize*.

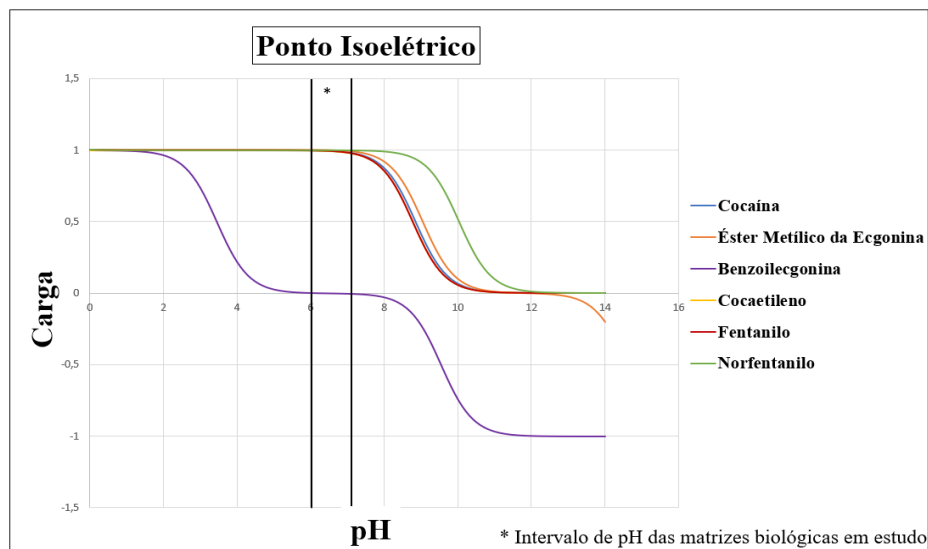


Figura 45 Ponto isoelétrico dos compostos, obtido através da plataforma *Chemicalize*.

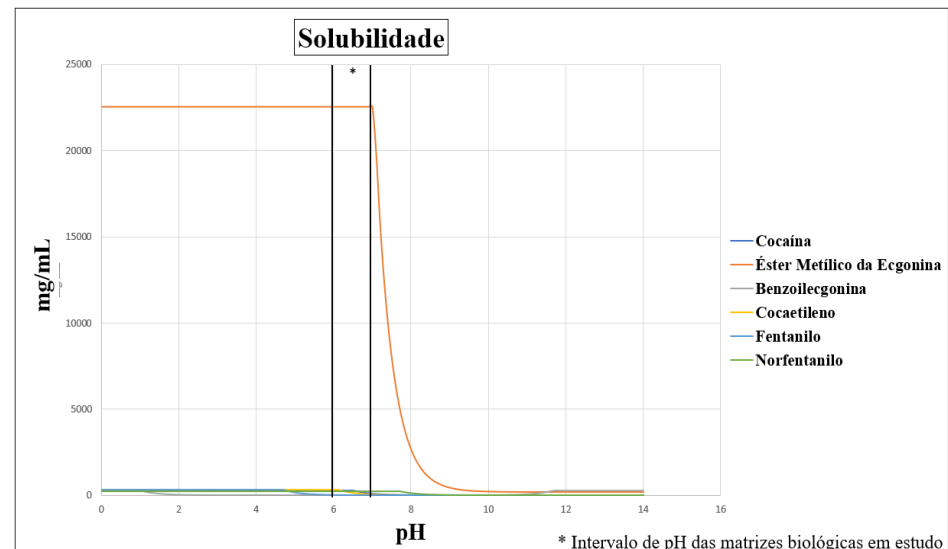


Figura 47 Solubilidade dos compostos, obtido através da plataforma *Chemicalize*.

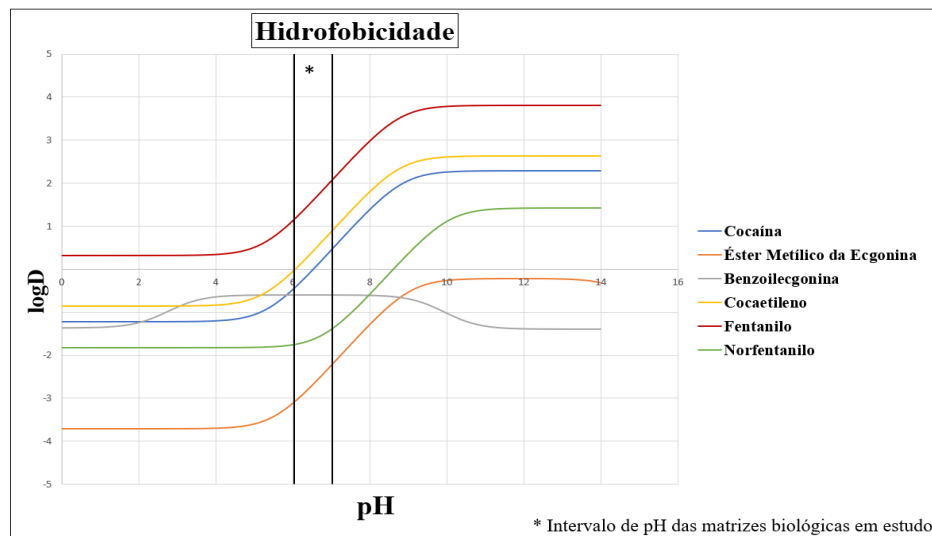


Figura 46 Hidrofobicidade dos compostos, obtido através da plataforma *Chemicalize*.

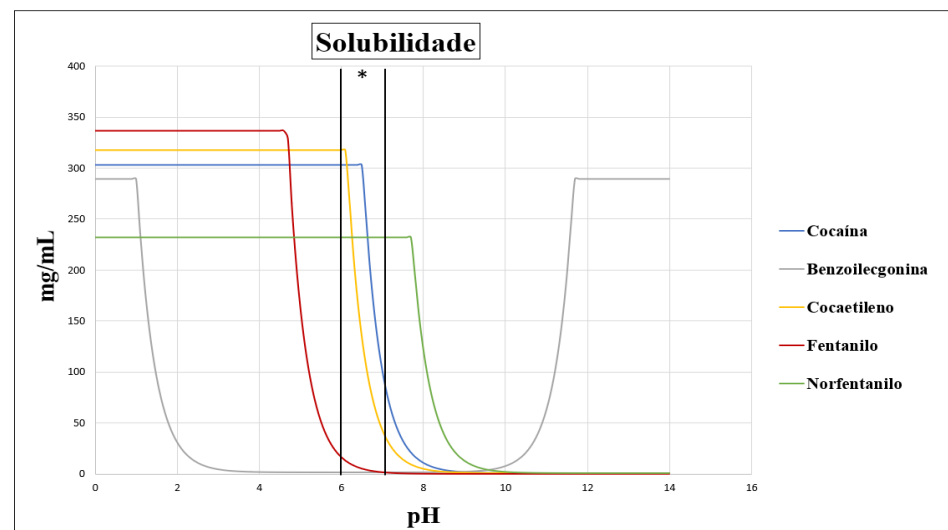


Figura 48 Solubilidade dos compostos com exceção do éster metílico da ecgonina, obtido através da plataforma *Chemicalize*.

As informações obtidas pelos gráficos estão relacionadas. É possível realçar que o máximo de hidrofobicidade e o mínimo de solubilidade é atingido nas gamas de pH em que os compostos se apresentam na sua forma neutra. Os gráficos de hidrofobicidade/solubilidade permitem ter acesso a uma informação mais detalhada sobre o comportamento individual dos analitos.

No intervalo de pH das matrizes biológicas, a hidrofobicidade dos analitos segue a ordem, éster metílico da ecgonina < norfentanilo < benzoilecgonina < cocaína < cocaetileno < fentanilo, o que poderá indiciar uma ordem semelhante para o coeficiente de partição fibra de SPME/matriz e consequentemente idêntica para as eficiências de extração individuais uma vez que maiores solubilidades dificultarão o deslocamento dos analitos da fase da matriz aquosa para a fibra de SPME

O éster metílico da ecgonina, apresenta sempre um caráter hidrofílico (valor de lipofilicidade negativo), mesmo a  $\text{pH} > 9$  indicando que o seu equilíbrio entre a fibra de SPME e a matriz aquosa poderá estar deslocado no sentido da última e consequentemente poderá apresentar uma baixa eficiência de extração. A benzoilecgonina, apresenta uma hidrofobicidade constante ao longo do intervalo de pH das matrizes biológicas, com ligeiro caráter hidrofílico, sendo a sua hidrofobicidade máxima, a pH 4-8. Os restantes compostos (cocaína, cocaetileno e fentanilo), atingem uma maior hidrofobicidade, no valor de pH mais alto do intervalo das matrizes biológicas, apresentando caráter hidrofóbico.

Com exceção do éster metílico da ecgonina, todos os compostos atingem a sua hidrofobicidade máxima a  $\text{pH} > 9$ . O fentanilo apresenta sempre valores de hidrofobicidade positivos, ou seja, caráter hidrofóbico, ao longo de toda a gama de pH o que poderá indiciar que o seu equilíbrio entre a fibra de SPME e a matriz aquosa estará deslocado no sentido da primeira e consequentemente apresentará potencialmente a melhor eficiência de extração por SPME, de entre todos os analitos.

Na gama de pH das matrizes biológicas a solubilidade dos analitos segue a ordem fentanilo < benzoilecgonina < cocaetileno < cocaína < éster metílico da ecgonina, o que poderá indiciar uma diminuição do coeficiente de partição fibra de SPME/matriz dos analitos, da esquerda para a direita da ordem e consequentemente pela mesma ordem para eficiência de extração individual uma vez que maiores solubilidades dos analitos dificultarão o seu deslocamento da fase da matriz aquosa para a fibra de SPME. Os analitos fentanilo e benzoilecgonina apresentam, na gama de pH de trabalho, uma muito baixa solubilidade o que suporta a hipótese levantada pela informação da lipofilicidade,

de que o fentanilo, poderá potencialmente apresentar a melhor eficiência de extração por SPME, de entre todos os analitos.

Em relação à benzoilecgonina, a sua baixa solubilidade no intervalo de pH das matrizes biológicas, poderá indiciar a melhor eficiência de extração por SPME do que a estimada pela informação da lipofilicidade. De realçar a grande variação de solubilidade, nos extremos do intervalo do pH das matrizes biológicas, em relação à cocaína e ao cocaetileno, sugerindo que uma pequena variação de pH, mesmo de um valor, poderá ter impacto nas suas eficiências de extração.

A informação adquirida, com base nos parâmetros descritos, aponta para a hipótese de que o máximo de eficiência de extração, do conjunto de todos os analitos, com exceção da benzoilecgonina, se verificar na gama de pH 8-10. Em relação ao éster metílico da ecgonina, toda a informação indica que a eficiência da sua extração por SPME poderá ser mais baixa para  $\text{pH} < 10$ .

Em suma, é possível afirmar que quanto menos ionizável, menos solúvel e mais lipofílico for o analito, e, em perspectiva, maior poderá ser a eficiência de extração por SPME.

## 5.2. Estudo em GC-TOF/MS

Utilizando o sistema GC-TOF/MS, foram realizadas várias análises aplicadas às diferentes técnicas de preparação de amostra. As técnicas estudadas foram a SPE, utilizando dois cartuchos da OASIS, HLB e MCX, e a SPME, utilizando fibras de configuração clássicas e com as novas configurações OC-PDMS/DVB e LC-tips com diferentes revestimentos C18 e PDMS/DVB.

Foi preparada uma solução contendo os padrões das drogas e metabolitos em estudo. A solução com a mistura dos padrões (MP2-ST1), a 500 ng/mL, foi analisada qualitativamente por forma a obter os espectros de massa dos analitos (Anexo B), verificar a sua presença, localizá-los no cromatograma (tempos de retenção) e aferir a resolução cromatográfica e sensibilidade do sistema (figura 49).

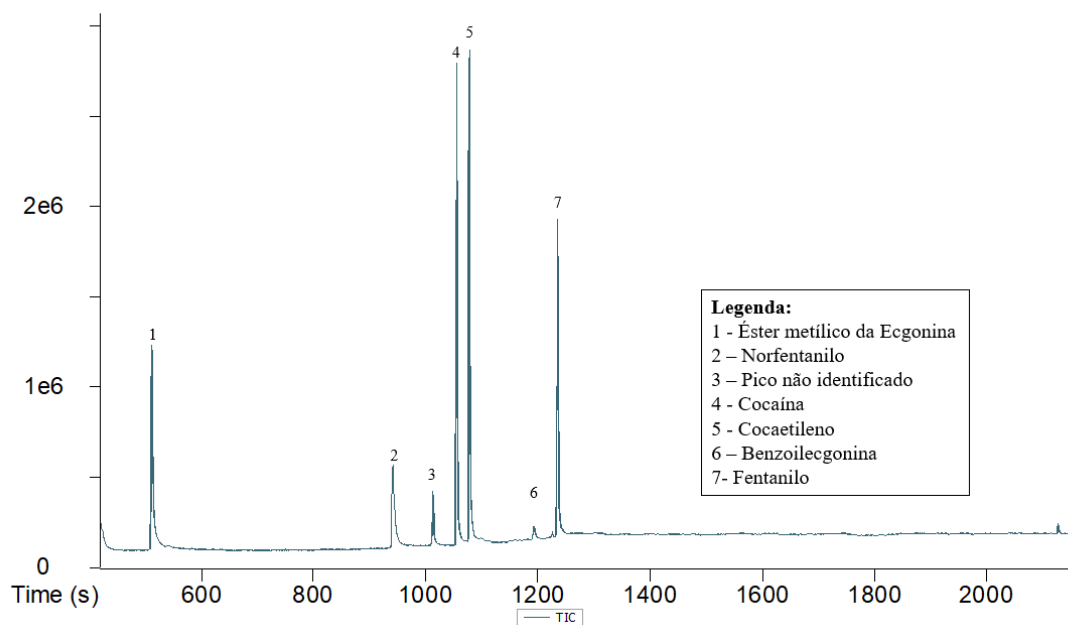


Figura 49 Cromatograma Iônico Total (TIC), em modo *Full Scan* da solução MP2-ST1 (500 ng/mL).

Foi possível obter os espectros de massa, validar a presença dos analitos e verificar que o equipamento possuía a resolução e a sensibilidade adequada para o propósito do estudo.

### 5.2.1. Extração SPE

No estudo da extração por SPE, foram utilizados dois tipos de cartuchos OASIS, HLB e MCX, tendo sido realizados ensaios em amostras brancas (sangue, urina, saliva e plasma) fortificadas (900 ng/mL), para verificação do “ruído de fundo”.

Na figura 50, encontram-se ilustrados os TIC em modo *full scan* amostra branca sangue, sem fortificação, depois de aplicados os protocolos de extração por SPE.

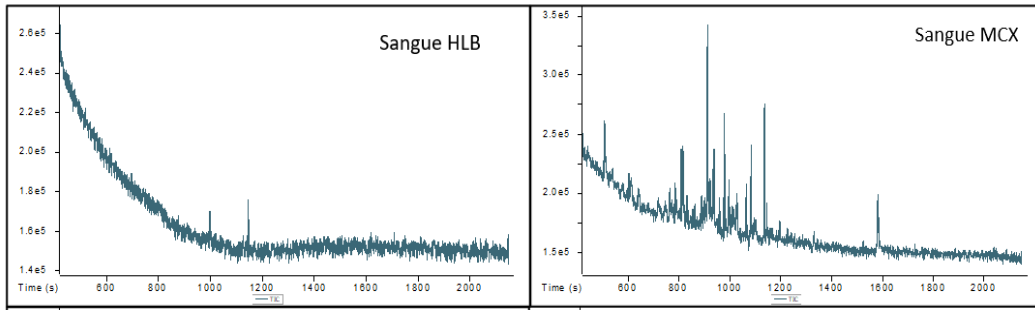


Figura 50 Cromatograma Iônico Total (TIC), em modo *Full scan* da matriz biológica de sangue, sem fortificação, após a aplicação dos protocolos de extração por SPE, com OASIS HLB e MCX, redissolvido em 100 $\mu$ L de ACN.

Tal como esperado, os resultados evidenciam que as amostras possuem potenciais interferentes, mesmo após submissão a um processo de extração e de *clean-up*.

Nas figuras 51 e 52, são apresentados cromatogramas, para a amostra de controlo de sangue (fortificada), extraída com os dois tipos de cartuchos (HLB e MCX), sendo possível observar as diferenças na eficácia da extração dos compostos.

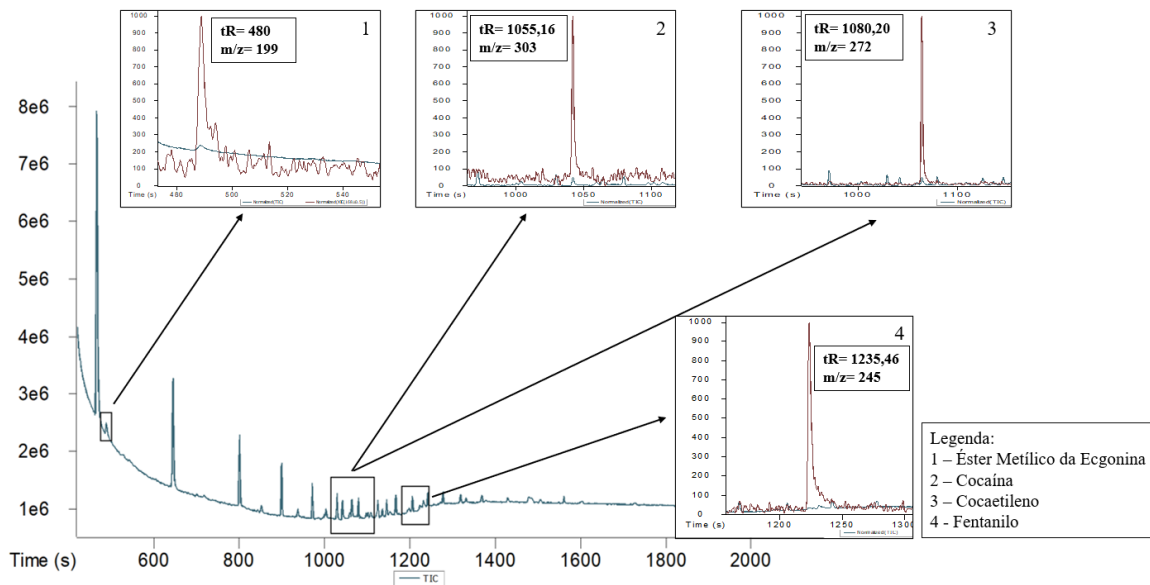


Figura 51 Cromatograma da matriz biológica de sangue fortificada com a solução MP2-ST2 a 900 ng/mL, após a aplicação do protocolo por SPE, com o cartucho OASIS HLB.

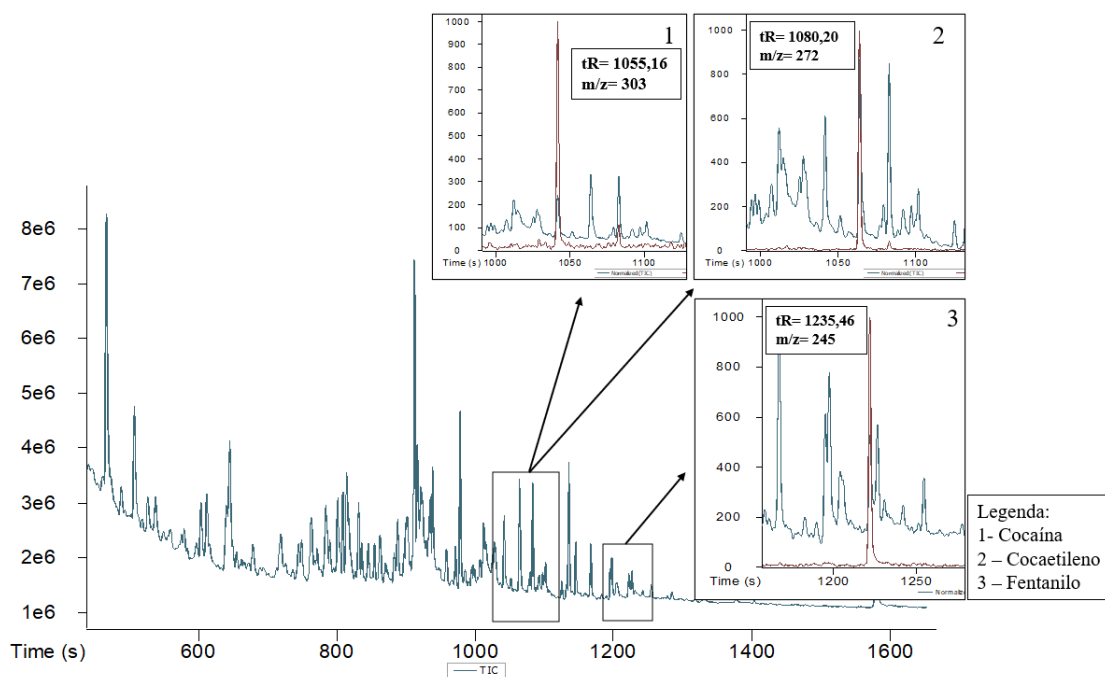


Figura 52 Cromatograma da matriz de sangue fortificada com a solução MP2-ST2 a 900 ng/mL, após a aplicação do protocolo por SPE, com o cartucho OASIS MCX.

É possível observar que o cartucho HLB, consegue realizar um melhor *clean-up* e extração da amostra, comparativamente com o MCX, uma vez que apresenta menos interferentes e uma maior relação sinal/ruído para os analitos alvo, como é o caso do éster metílico da ecgonina que não foi detetado quando usado o cartucho MCX. Contudo, é de notar que os cartuchos apresentam diferentes fases e por isso com diferentes afinidades para os compostos polares ou apolares.

## 5.2.2. Microextração SPME

### 5.2.2.1. SPME com Fibras Clássicas

Nesta etapa, foram estudados os desempenhos de extração de várias fibras de SPME clássicas. Estas possuíam os seguintes revestimentos: PA; PDMS/CAR/DVB; PDMS/DVB; PDMS-30; PDMS-100.

As amostras utilizadas neste estudo, foram soluções preparadas a partir da solução MP1, preparadas no início do projeto, com uma concentração de 100 µg/mL.

Nesta solução MP1, os compostos detetados, por ordem de eluição, foram o norfentanilo, a cocaína e o fentanilo, como ilustrado na figura 53.

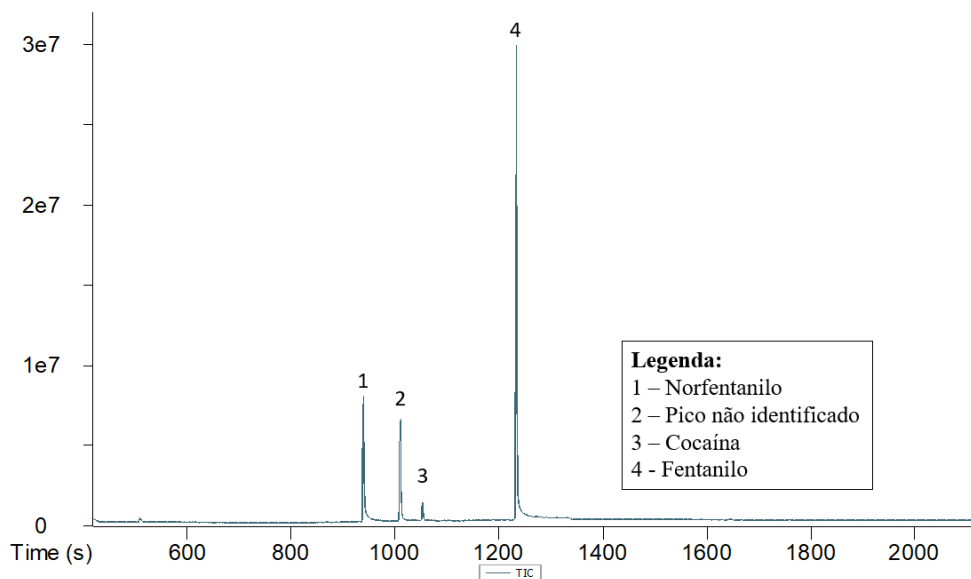


Figura 53 Cromatograma representativo: Solução MP1, contendo uma concentração estimada de 100 µg/mL

A eficiência de extração das diferentes fibras, para os analitos, foi estudada para as mesmas condições operacionais: imersão direta, tempo de extração 45 min, velocidade de agitação 260rpm, volume de amostra de 2 mL.

A figura 54, ilustra os resultados qualitativos de extração para cada tipo de revestimento em relação à quantidade de cada composto detetado na solução mistura (MP1), quando injetada 1 µL. A mistura (1 µL, injeção com solvente), demonstra o perfil dos compostos da mistura original. Para cada fibra a amostra de água foi fortificada com 10 µL da solução mistura, tendo depois sido realizada uma dessorção térmica. Neste sentido, os extratos possuem um fator de enriquecimento de 10 quando comparados com a solução padrão.

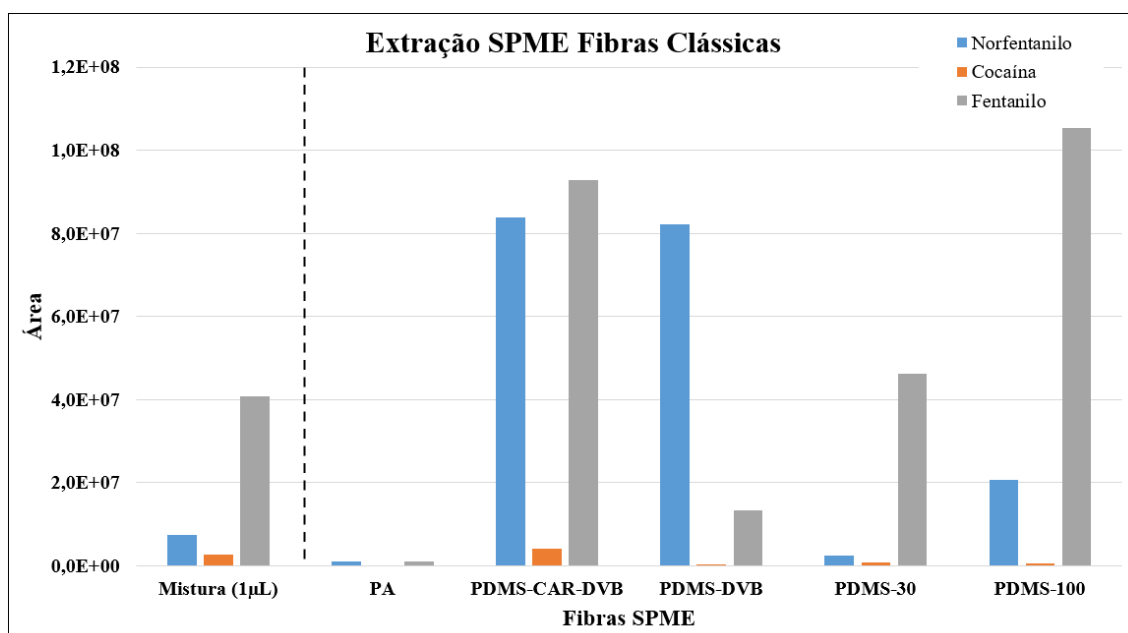


Figura 54 Resultados da capacidade de extração dos diferentes revestimentos das fibras de SPME.

Os resultados indicam que para o norfentanilo e a cocaína, nas condições experimentais utilizadas, as fibras que apresentam maior capacidade de extração, são a PDMS/CAR/DVB e a PDMS/DVB. Para o fentanilo, são as fibras com revestimento PDMS/CAR/DVB e PDMS-100. O fentanilo é o composto que apresenta maior afinidade para estes tipos de revestimento estudados, sendo o composto com maior eficiência de extração, conforme previsto pela avaliação dos descritores da plataforma online *Chemicalize*. A fibra PA apesar de ser polar, é a que apresenta menor eficiência de extração, nas condições experimentais, o que pode ser explicada por uma baixa velocidade de extração (cinética), não obstante a afinidade do analito.

#### 5.2.2.2. SPME com Fibra Clássica OC-PDMS/DVB

Nesta etapa foi estudado o novo revestimento das fibras clássicas, OC-PDMS/DVB. Este revestimento permite um melhor desempenho e durabilidade durante o processo de microextração, uma vez que a camada DVB, encontra-se protegida de contaminações, aumentando desta forma a robustez física da fibra (Michel, Sidisky, & Aldrich, 2015). Neste sentido, foi comparado o desempenho analítico destas novas fibras com as fibras clássicas PDMS/DVB (*non-OC*), tendo em conta a otimização de vários parâmetros metodológicos.

Foram utilizadas as soluções MP2-ST1, com uma concentração de 500 ng/mL e C-ST1, com concentrações de 500; 250; 125; 63; 32; 16 ng/mL, preparadas por diluição consecutiva da solução MP2-ST1.

A primeira variável estudada foi o tempo de extração (45, 30, 15, 10 e 5 min). A figura 55, apresenta a variação da área do pico de cada composto em relação ao tempo de microextração.

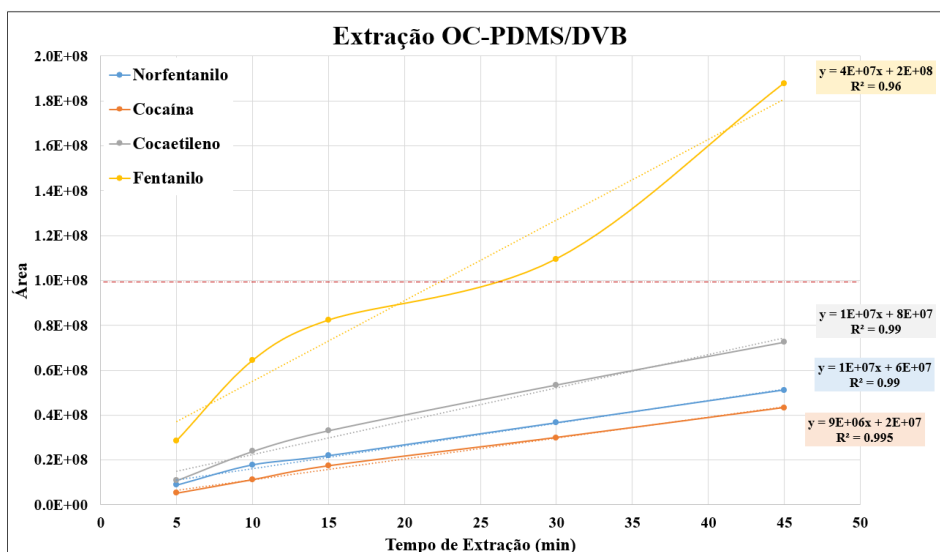


Figura 55 Comportamento dos compostos na fibra OC-PDMS/DVB nos diferentes tempos de extração.

Os dados obtidos indicam que a extração dos analitos apresenta uma resposta linear em função do tempo ( $R^2 \geq 0,99$  para a cocaína, cocaetileno e norfentanilo;  $R^2 = 0,96$  para o fentanilo) e que 45 min de tempo de extração não são suficientes para atingir o equilíbrio de extração. Para o fentanilo, observa-se uma cinética de extração diferente, o que pode estar relacionado com um *outlier* (evento operacional), uma vez que quando normalizadas as áreas em função do tempo de extração o perfil do fentanilo, em relação aos outros analitos, só “desalinha” num determinado valor.

A aplicabilidade da SPME para quantificar um analito requer o estudo da linearidade e o estabelecimento de uma curva de calibração numa gama de concentrações.

A figura 56 ilustra os resultados quantitativos e qualitativos para a curva de calibração nas seguintes condições experimentais: tempo extração 45 min, velocidade de agitação 260rpm, volume de amostra 2mL.

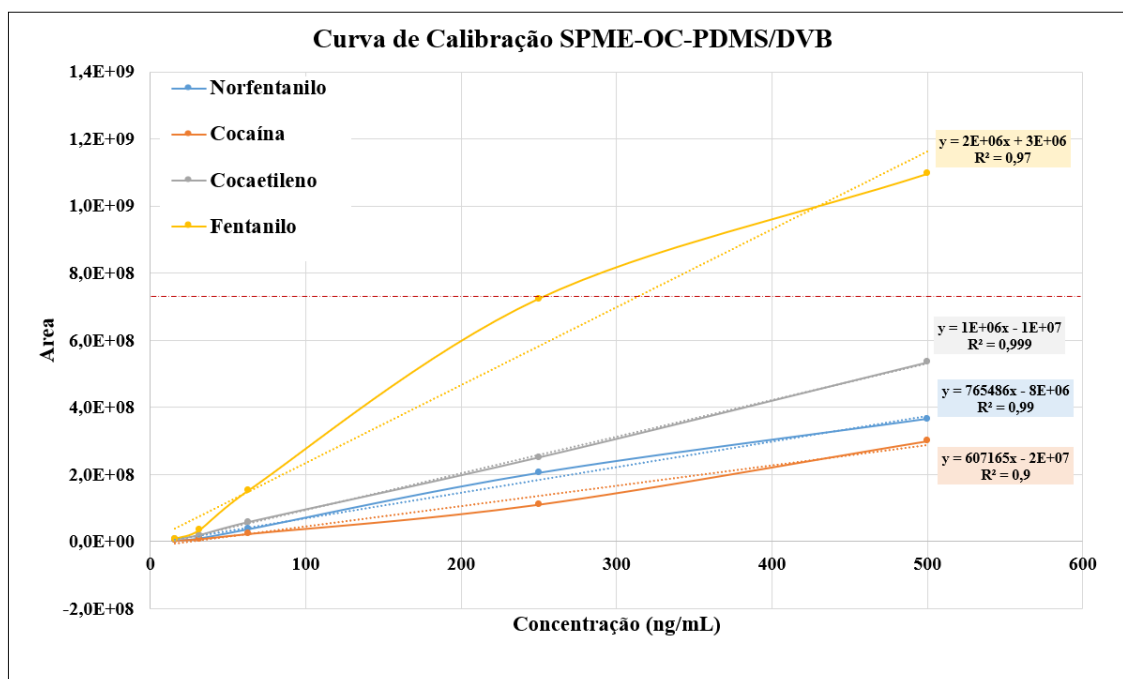


Figura 56 Curva de calibração obtidas para as fibras OC-PDMS/DVB.

As curvas de calibração obtidas, para o estudo da linearidade, não foram realizadas com recurso a replicados. No entanto, os dados experimentais obtidos permitem observar, uma muito boa linearidade para a cocaína, cocaetileno e norfentanilo ( $R^2 \geq 0.99$ ) na gama de concentrações utilizada. O fentanilo ( $R^2 = 0.97$ ) apresenta de novo um desvio observável (aparente a partir dos 2,5  $\mu\text{g/mL}$ ) que pode estar relacionado com um potencial efeito de saturação do sinal do detetor ou da capacidade da fibra, já referido no estudo da cinética de extração.

#### 5.2.2.3. SPME com Fibras *TIPS*

Nesta etapa foram realizados ensaios experimentais com recurso às fibras *TIPS*, revestidas com C18 e DVB. Os parâmetros estudados foram a velocidade de agitação, o tempo de extração e a linearidade.

A solução utilizada para este estudo foi a solução MP2-ST1, como uma concentração de 500 ng/mL.

A primeira variável a ser estudada para ambos os revestimentos foi a velocidade de agitação, utilizando um agitador orbital (*shaking*) a 300, 500, 750, 1000 e 1400 rpm.

Os resultados obtidos relativos à eficiência de extração dos compostos podem ser observados nas figuras 57 e 58.

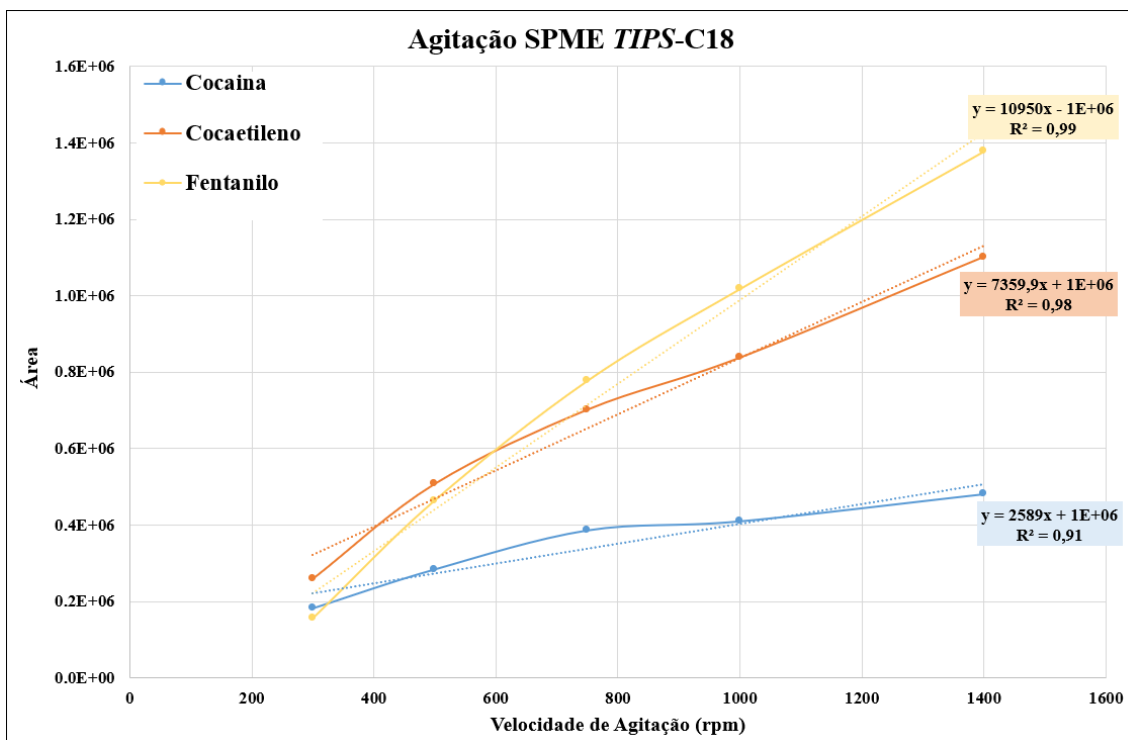


Figura 57 Extração dos compostos com a fibra SPME *tips*, com revestimento C18, em relação à agitação.

Os dados obtidos, indiciam que a extração dos compostos com a LC-*Tip* C18, está diretamente relacionada com a agitação utilizada ( $R^2 \geq 0,91$ ).

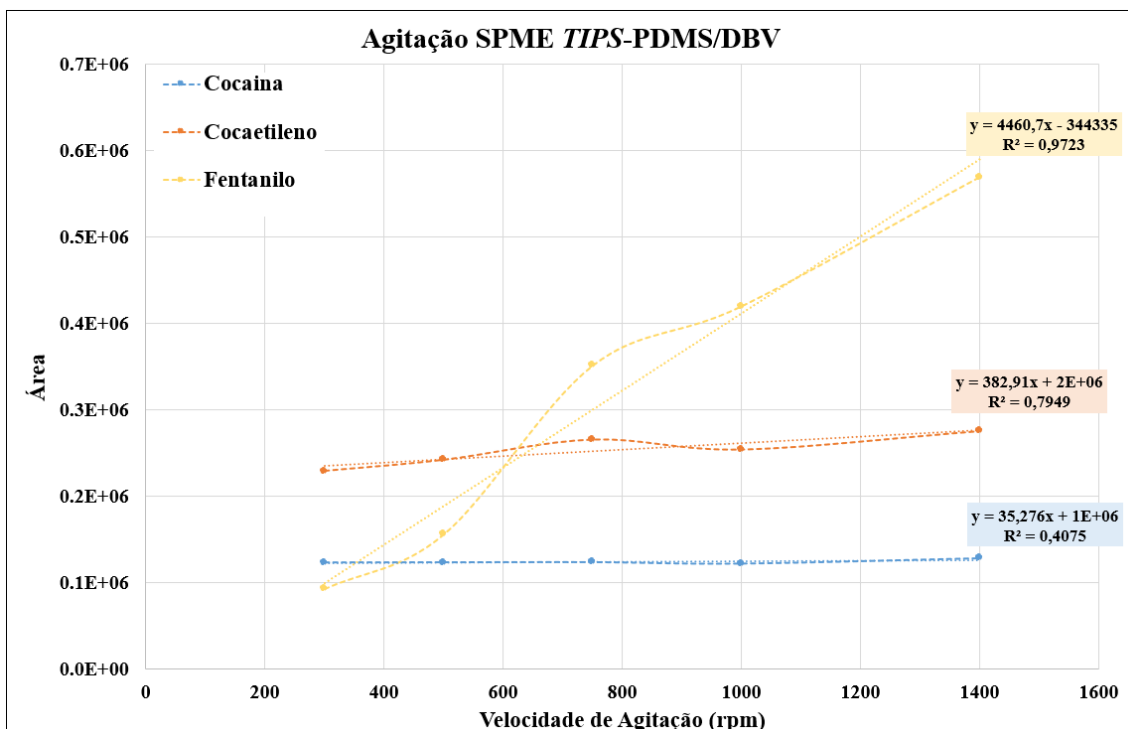


Figura 58 Extração dos compostos com a fibra SPME *tips* com revestimento PDMS/DVB em relação à agitação.

Para a fibra PDMS/DVB, verifica-se que a extração da cocaína pode ser considerada como independente da agitação ( $R^2 = 0,41$ ), para  $t \geq 15$ min, sendo praticamente constante ao longo da gama de velocidades estudadas experimentalmente (o

coeficiente de determinação estimado é muito baixo em relação á escala do eixo das ordenadas). A extração do cocaetileno está moderadamente relacionada com a agitação utilizada operacionalmente ( $R^2 = 0,80$ ). Por outro lado, os dados indiciam que a extração do fentanilo é fortemente dependente da velocidade de agitação ( $R^2 = 0,97$ ).

Relativamente ao estudo da linearidade, para as LC-tips foram realizadas curvas de calibração para os analitos em estudo, utilizando as soluções C-ST1, com concentrações de 50; 250; 125; 63; 32; 16 ng/mL, obtidas a partir de diluições sequenciais, com origem na solução MP2-ST1. As condições experimentais utilizadas foram as seguintes: tempo de extração de 15 min; velocidade de agitação de 1400 rpm; volume de amostra de 2 mL.

Porém, no estudo da linearidade não foi possível realizar os ensaios experimentais com a benzoilecgonina, a norfentanilo e o fentanilo, uma vez que os padrões para estes compostos já se tinham esgotado.

A figura 59, apresenta a curva de calibração realizadas com as fibras tips, com revestimento C18 e PDMS/DVB.

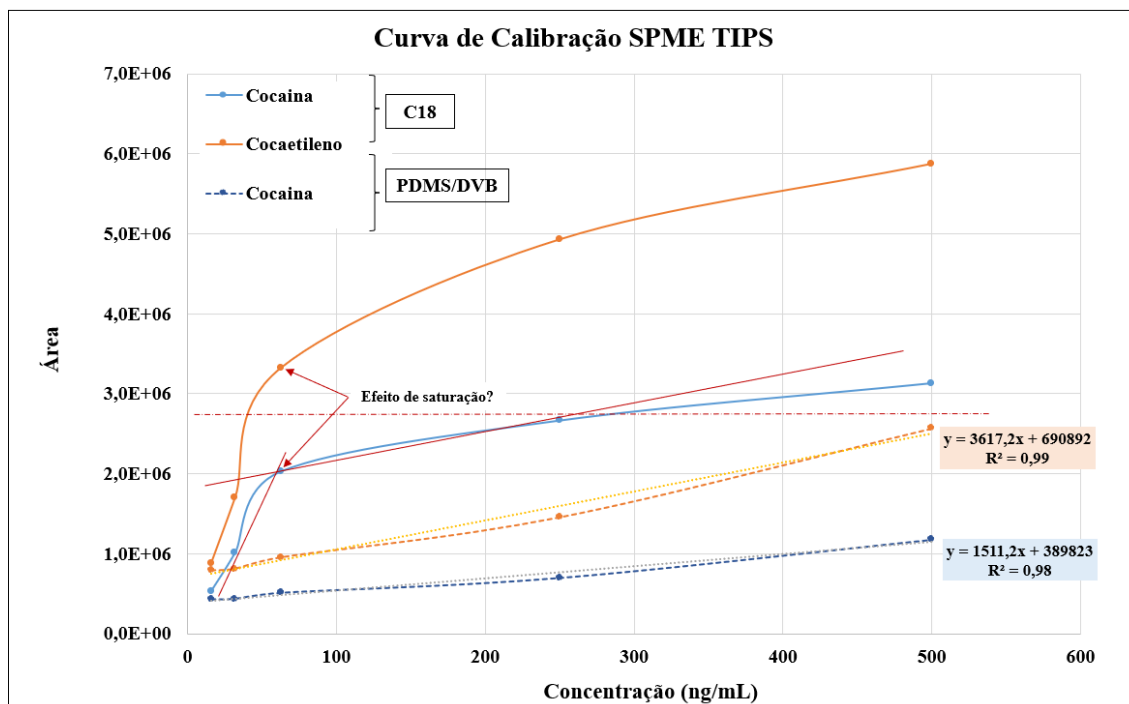


Figura 59 Curva de calibração para os compostos extraídos com fibras tips com revestimentos C18 e PDMS/DVB.

Os dados obtidos, permitem observar uma boa linearidade para a cocaína e para o cocaetileno ( $R^2 \geq 0,98$ ) na gama de concentrações utilizada quando utilizada a LC-tip de PDMS/DVB, suportando a sua aplicabilidade para a análise quantitativa.

Esta relação linear não é observável quando se utiliza a fibra LC-tip C18 (representada com preenchimento), sendo observável uma aparente relação logarítmica.

Esta observação pode estar diretamente relacionada com um efeito de saturação do sinal do detetor ou da capacidade da fibra para realizar a extração para concentrações acima de  $1 \mu\text{g/mL}$ . No entanto, dado que os compostos extraídos pelas *LC-tip*, são desorvidos por retro extração em  $200 \mu\text{L}$  de acetonitrilo esta ausência de linearidade observada pode também estar indiretamente relacionada com um efeito de saturação do solvente. Esta observação indica a necessidade de se estudar a gama de concentrações que permitem uma capacidade efetiva da *LC-tip* C18 e a relação desta com o solvente utilizado para a retroextração (tipo de solvente, volumes a utilizar, tempo de retroextração, cinética de retroextração). Outra hipótese a estudar é a possibilidade de poder haver duas zonas de “linearidade”, por exemplo acima e abaixo de  $1 \mu\text{g/mL}$ . A nível de sensibilidade a fibra *LC-tip* C18 apresenta melhores resultados que a PDMS/DVB, o que apesar da não linearidade na gama de concentrações modelo poderá permitir, utilizando valores limites (*threshold values*) de acordo com o contexto clínico, legal ou outro.

Seguidamente, foi estudado o comportamento das *LC-tips* em função do tempo de extração a 5, 10 e 15 min (figura 60). Os ensaios foram realizados com a velocidade de agitação de 1400 rpm, de modo a maximizar os resultados quantitativos, uma decisão que é suportada pelos dados obtidos anteriormente.

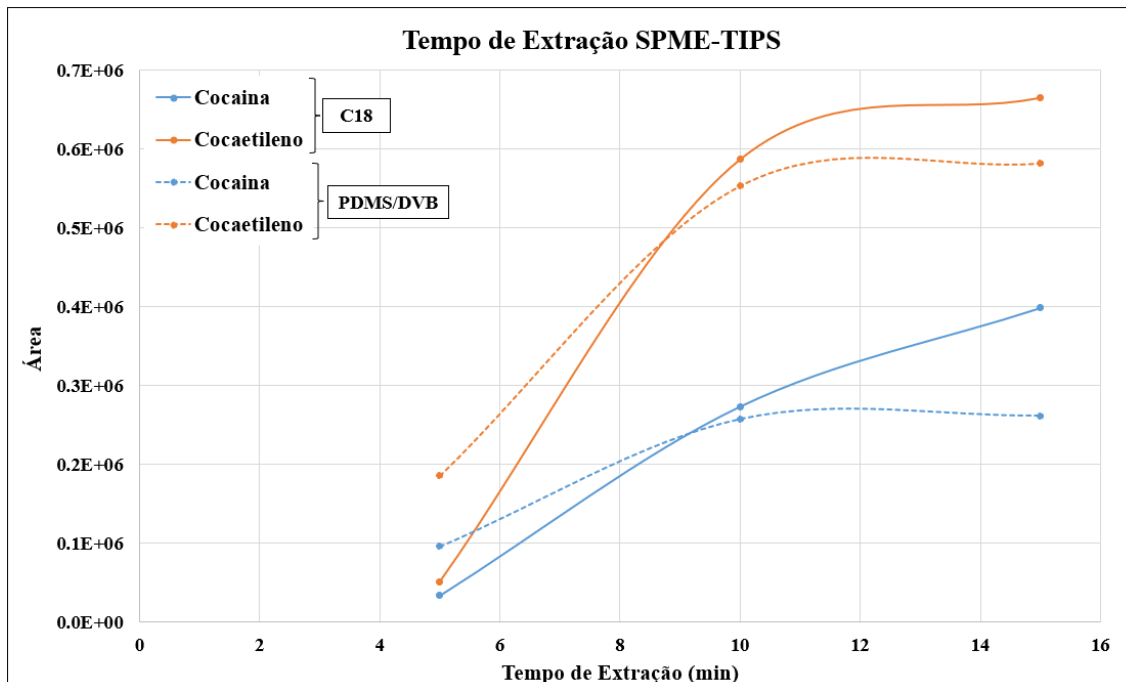


Figura 60 Tempo de extração em ambos os revestimentos das fibras *tips* (C18 e PDMS/DVB).

Como seria esperado, os resultados permitem observar que para ambos os revestimentos desta fibra, a extração quantitativa dos compostos é uma função direta do tempo de extração. Para a *LC-tip* PDMS/DVB o equilíbrio da extração, para as condições experimentais utilizadas, é atingido á volta dos 10 min. Para a *LC-tip* C18 o equilíbrio da

extração para o cocaetileno é atingido para o mesmo tempo, não sendo observado o tempo de equilíbrio para a cocaína na gama temporal experimental. Os dados obtidos suportam a decisão de se aplicar 10 minutos como tempo de extração para amostras reais.

Foram igualmente realizados ensaios com extração passiva (sem agitação), durante 02h30 min e 07h00 min, por forma a determinar as eficiências de extração (figura 61).

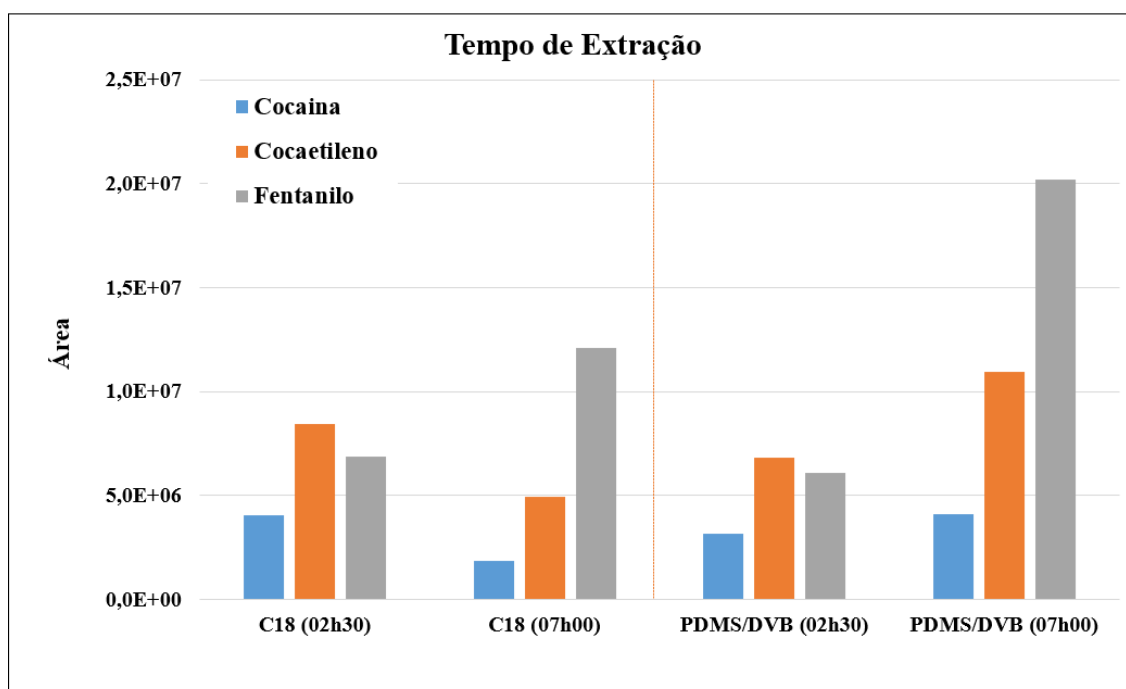


Figura 61 Diferenças da eficiências de extração em função do tempo de contacto, para as fibras *tips* com revestimentos C18 e PDMS/DVB.

No tempo mais baixo a fibra C18, apresenta quantitativamente uma ligeira melhor eficiência de extração, no entanto ao fim 7 horas a fibra PDMS/DVB apresenta melhor eficiência. Na fibra C18, com o passar do tempo, a extração da cocaína e do cocaetileno aparenta diminuir e a extração do fentanilo aumenta.

Os dados obtidos sugerem a existência de processos de extração diferentes para as duas fibras, suportando também a hipótese de uma potencial saturação da capacidade da fibra com revestimento C18.

Para que este estudo tivesse sido mais abrangente teria sido necessário, não só dispor de mais padrões, como também replicar mais testes de extração passiva, a tempos crescentes e com recurso a agitação para obter informação sobre a “estabilização” e a dinâmica da extração.

### 5.3. Estudo em GC/MS/MS

Foram realizados testes para otimização das condições cromatográficas para os compostos em estudo, as quais foram depois aplicadas às amostras biológicas estudadas.

#### 5.3.1. Ensaio Cromatográficos

O primeiro passo correspondeu à injeção de uma solução padrão mistura, a uma concentração de 900 ng/mL, em *full scan* (Figura 61). Através do modo *full scan*, foi possível obter os espectros de massa completos para cada composto, onde todos os iões estão presentes. Destes iões, foram escolhidos os de maior intensidade, como iões precursores para cada composto, como exemplificado na Tabela 15, para a cocaína.

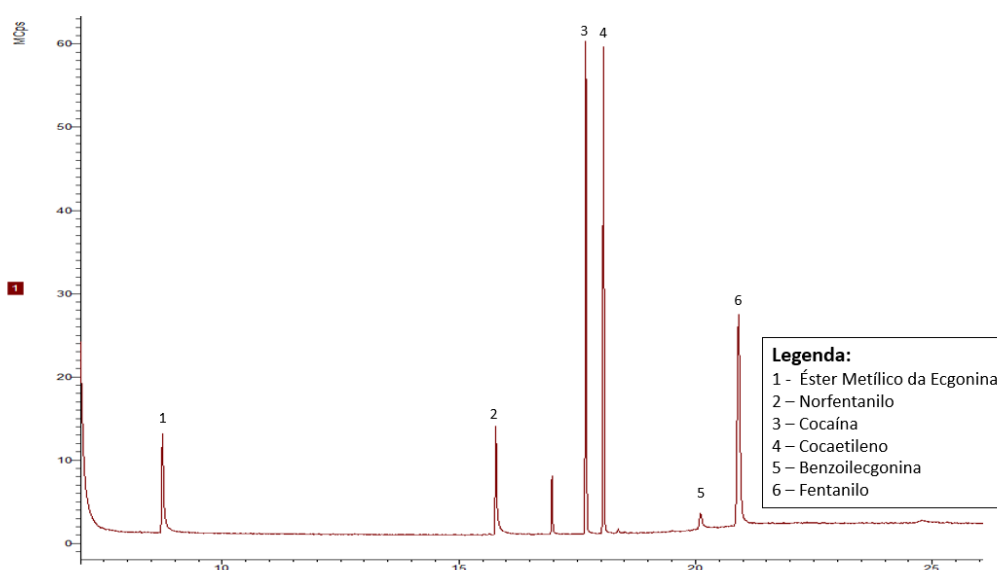


Figura 62 Cromatograma Iônico Total (TIC), em modo *Full Scan* dos compostos, presentes na solução mistura MP2-ST2, com uma concentração de 900 ng/mL.

Após a análise em *full-scan*, o passo seguinte foi injetar de novo a solução em modo SIM. A figura 63, ilustra a diferença entre o *full scan* e o SIM, para a cocaína.

Após termos escolhido os iões precursores, fez-se o estudo dos iões produtos em função de diferentes energias de colisão. A figura 64, mostra o estudo dos iões produtos realizado para a cocaína.

Tabela 15 Resumo do estudo dos iões produto e das energias de ionização para a cocaína.

Percursos	Produto	Energia
198	82	10eV
303	82	10eV
182	82	10eV
272	82	10eV

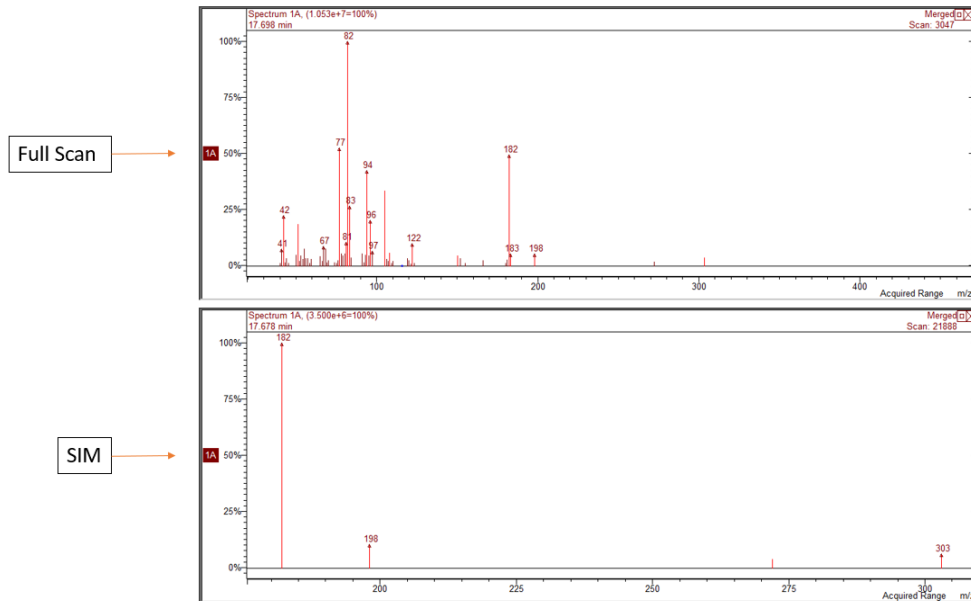


Figura 63 Comparação do espectro de massa, relativamente ao *full scan* e *SIM*, para a cocaína.

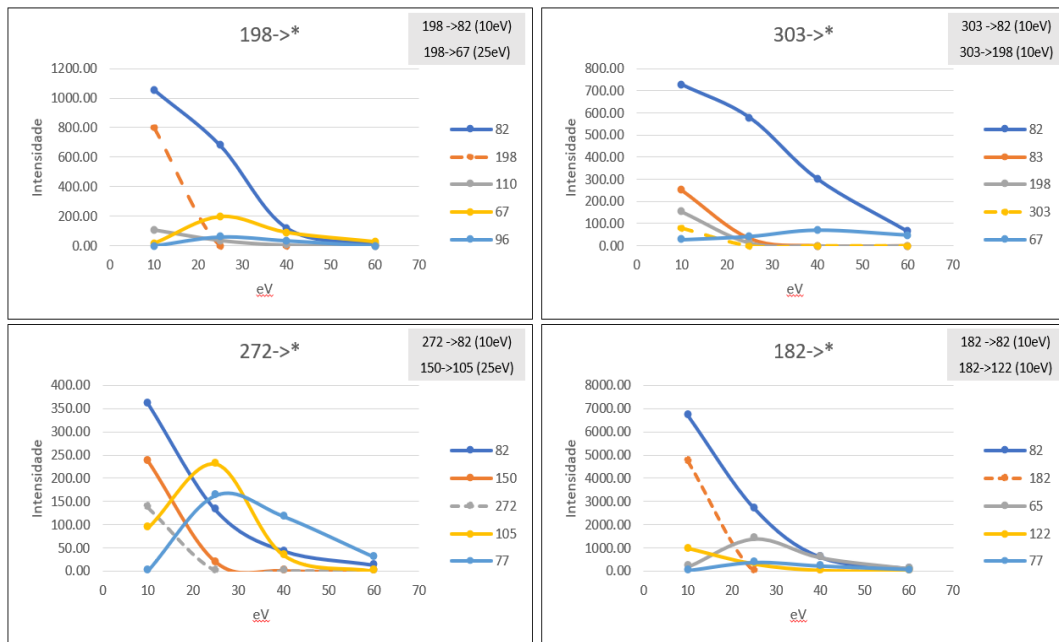


Figura 64 Estudo dos iões produto e das energias de ionização para a cocaína.

Selecionados os iões produto e a energia de ionização, foi realizada a análise em modo *MRM*, onde se colocou a transição escolhida (precursor/produto), com a energia escolhida para cada transição, de modo a ser obtido os iões quantificador e qualificador para cada composto. A presença destes iões no valor de rácio estabelecido com o padrão, permite confirmar a presença do composto na amostra. Estes parâmetros devem ser estabelecidos para as diferentes matrizes e concentrações.

### 5.3.2. Amostras Brancas Fortificadas

Tendo sido realizados ensaios de otimização instrumental, o passo seguinte, passou por aplicar a metodologia em amostras brancas e amostras controle de sangue,

urina, plasma e saliva. Por razões de limitação de espaço, apenas mostro os dados relativos aos ensaios realizados em amostras de sangue.

A análise das amostras brancas, teve como propósito a verificação da existências de compostos interferentes presentes na matriz, bem como interferentes nas transições escolhidas, que pudessem levar ao aumento ou supressão do sinal do composto, por efeito da matriz.

Para esta análise foi realizada uma extração SPE, utilizando os mesmos dois tipos de cartuchos da OASIS, usados em ensaios anteriores, HLB e MCX.

Para demonstração do estudo feito nas matrizes biológicas, foi escolhida a matriz da urina, e o composto cocaína.

A análise foi realizada em modo SIM e em modo MRM, estando representadas na figura 65 as diferenças entre os dois modos de aquisição.

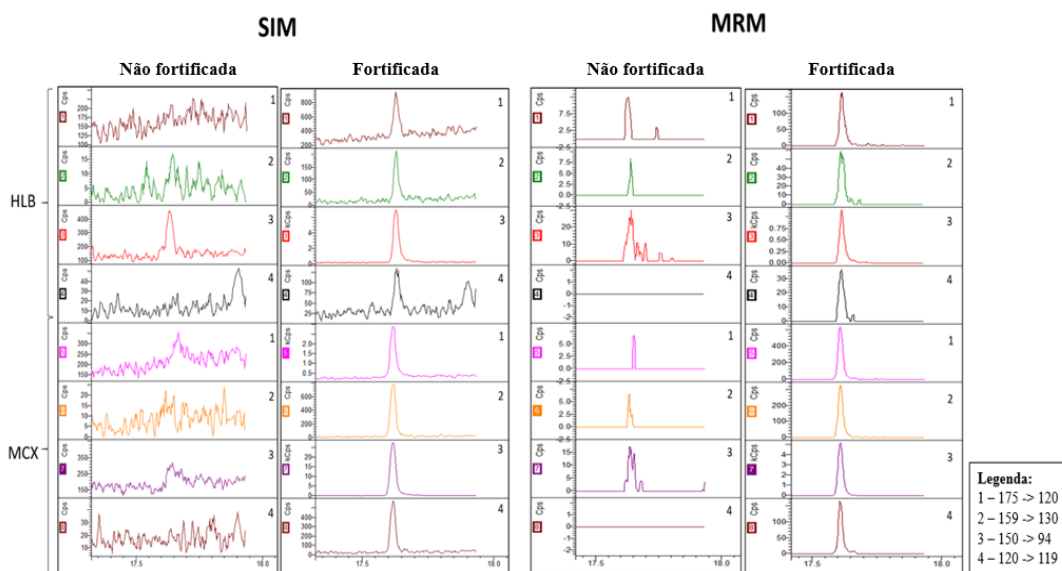


Figura 65 Diferenças entre SIM e MRM e comparação entre matriz de urina fortificada e não fortificada, nos diferentes cartuchos (HLB e MCX), para a cocaína. Tempo de retenção do composto - 17,68 min.

Os resultados permitem observar que algumas transições apresentam interferentes no seu tempo de retenção. No entanto, quando selecionado o pico, este apresenta os iões típicos da cocaína, que permite identificar o mesmo na matriz.

A confirmação da deteção de cada analito, foi realizada pelo tempo de retenção e pela presença dos iões previamente selecionados. Neste caso é possível verificar a presença dos compostos, sendo que a matriz foi fortificada em laboratório, com todos os compostos. A forma mais correta de confirmar a deteção de cada composto, seria não só pela análise acima referida, bem como, pelo rácio entre qualificador e quantificador. Que

permite de modo mais fiável saber que o composto detetado é o que está a ser estudado e não um interferente.

No decorrer deste estudo houve várias limitações e era necessário a repetição de vários parâmetros, no entanto, o fator tempo e falta de padrão para a repetição do estudo, esteve sempre presente como referido no preâmbulo.

#### 5.4. Amostra de Urina Positiva

Foi realizado um estudo comparativo entre o método de extração por SPE, aplicando a metodologia convencional e as técnicas com as diferentes fibras OC-PDMS/DVB e *tips*, com o objetivo de demonstrar a viabilidade da metodologia SPME para estes compostos em matriz de urina.

##### 5.4.1. Extração SPME com Fibra OC\_PDMS/DVB

A aplicabilidade operacional desta fibra foi realizada seguindo o procedimento experimental utilizado na linearidade. As condições experimentais de extração consistiram num tempo de extração de 45 min, velocidade de agitação de 260 rpm e o volume de amostra de 2 mL.

Esta fibra, permitiu a deteção da cocaína e do cocaetileno (figura 66). No entanto, esta fibra co-extraiu também outros compostos presentes nesta amostra.

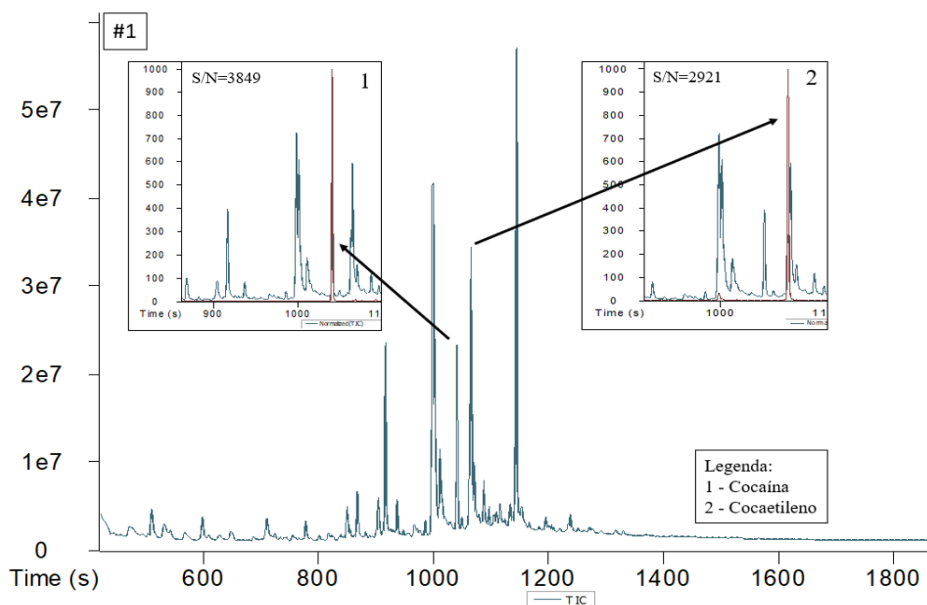


Figura 66 Cromatograma representativo: *Full scan* da amostra de urina positiva, após a sua extração com uma nova fibra de SPME, OC-PDMS/DVB. Deteção dos compostos cocaína e cocaetileno.

Depois de terem sido detetados e identificados (análise qualitativa) a cocaína e o cocaetileno, foi depois realizada uma análise semi-quantitativa, para determinação das

suas concentrações estimadas, na amostra de urina comparando a área obtida no GC/TOFMS com o valor correspondente na curva de calibração estimada. A concentração estimada para a cocaína e cocaetileno foi de 101 e 43 ng/mL, respectivamente.

Foi igualmente realizada uma identificação dos compostos interferentes presentes na amostra de urina positiva, sendo aqui apresentados três exemplos: cafeína (figura 67), triclosan (figura 68) e ibuprofeno (figura 69). A identificação destes compostos, foi feita por comparação com padrão analisado nas mesmas condições.

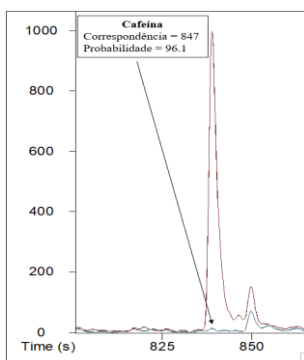


Figura 67 Cafeína extraída pela fibra OC-PDMS/DVB na amostra positiva

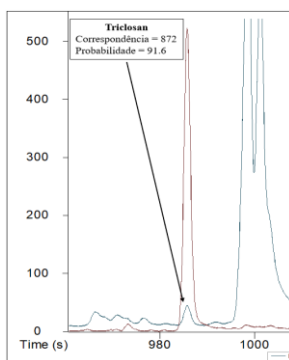


Figura 68 Triclosan extraído pela fibra OC-PDMS/DVB na amostra de urina positiva.

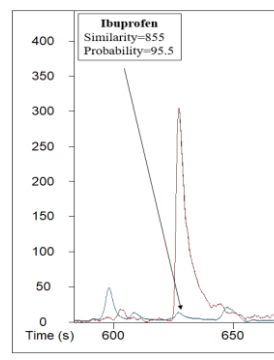


Figura 69 Ibuprofen extraído pela fibra OC-PDMS/DVB na amostra de urina positiva.

#### 5.4.2. Extração SPME com Fibra LC-Tips

As condições experimentais de extração consistiram num tempo de extração de 15 min, velocidade de agitação de 1400 rpm e o volume de amostra de 2 mL.

A aplicação das LC-tips, na amostra de urina positiva, permitiu detetar e identificar a cocaína e o cocaetileno, conforme pode ser observado nas figuras 69 e 70.

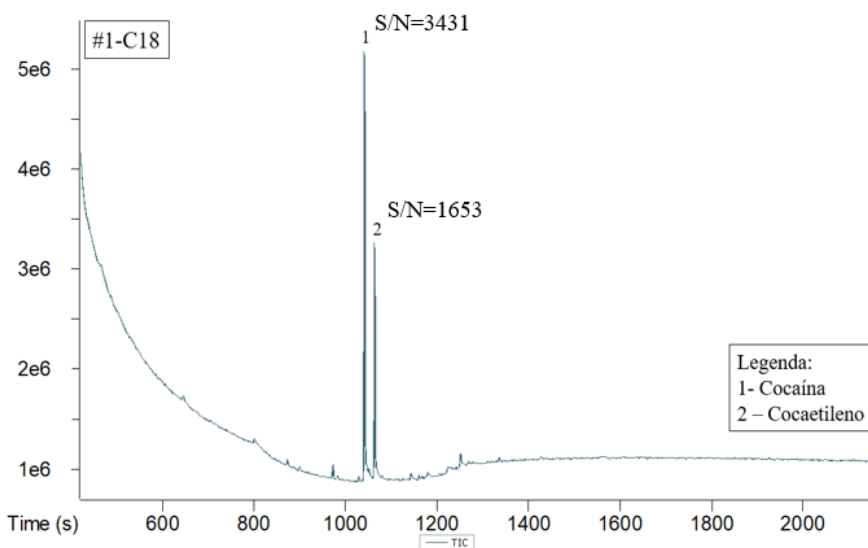


Figura 70 Compostos detetados pela fibra tips, com revestimento C18, na amostra de urina positiva.

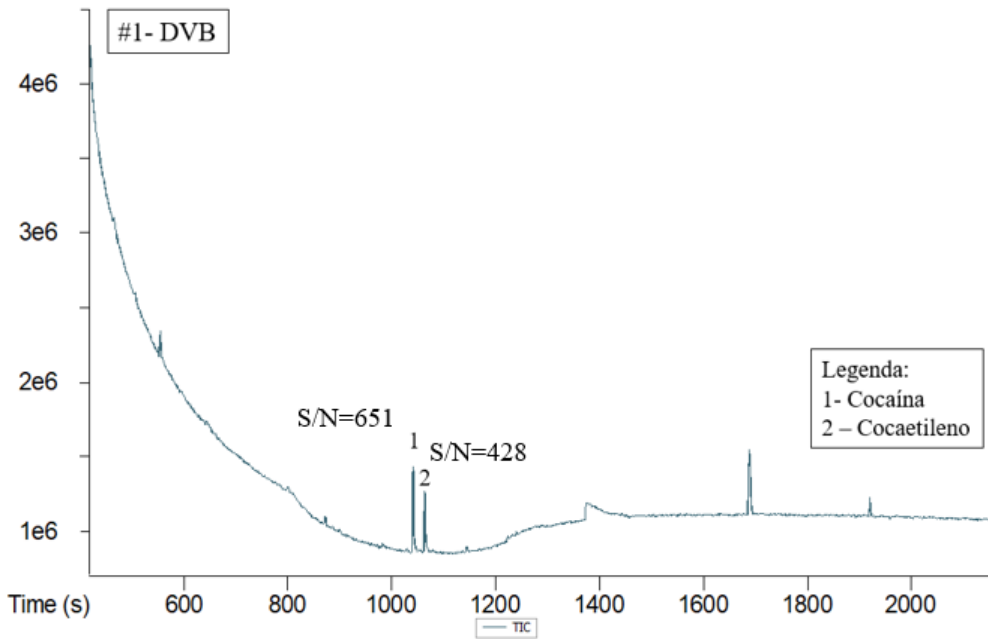


Figura 71 Compostos detetados pela fibra *tips*, com revestimento PDMS/DVB, na amostra de urina positiva.

#### 5.4.3. Extração SPE

A amostra foi submetida a um processo de extração SPE, utilizando os mesmos cartuchos de estudo (HLB e MCX). Foram detetados o éster metílico da ecgonina (apenas com o cartucho MCX), a cocaína e o cocaetileno (em ambos os cartuchos). Na figura 71, encontram-se ilustrados os compostos detetados, nas diferentes transições.

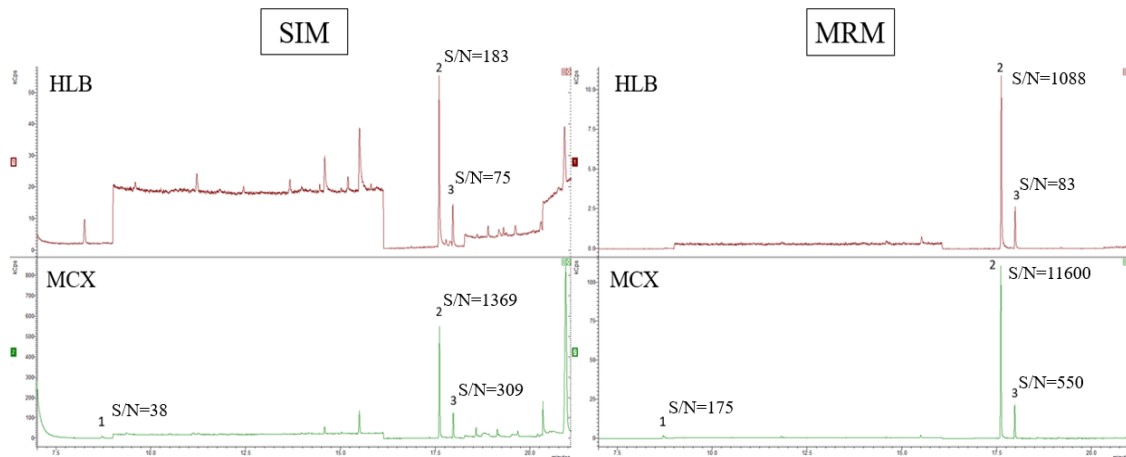


Figura 72 Compostos detetados pelo método SPE, utilizando os dois cartuchos (HLB e MCX), na amostra de urina positiva. Legenda: 1-Éster metílico da ecgonina; 2-cocaína; 3-cocaetileno.

A confirmação dos compostos, foi realizada por intermédio do tempo de retenção e pela presença dos iões selecionados de cada composto no pico.

Os resultados obtidos permitem verificar que a cocaína e o cocaetileno foram extraídos que por ambas as fibras OC-PDMS/DVB e *tips* (C18 e PDMS/DVB), quer por SPE. No

entanto, esta última utilizando as colunas MCX, permitiu extrair também o éster metílico da ecgonina.

#### 5.4.4. Análise da Eficiência de Extração entre Fibras

Por último foi feita uma avaliação da eficiência de extração entre o novo revestimento das fibras clássicas OC-PDMS/DVB e a nova configuração *tips*, com revestimento C18 e PDMS/DVB, através da comparação das áreas dos picos cromatográficos representados na figura 73.

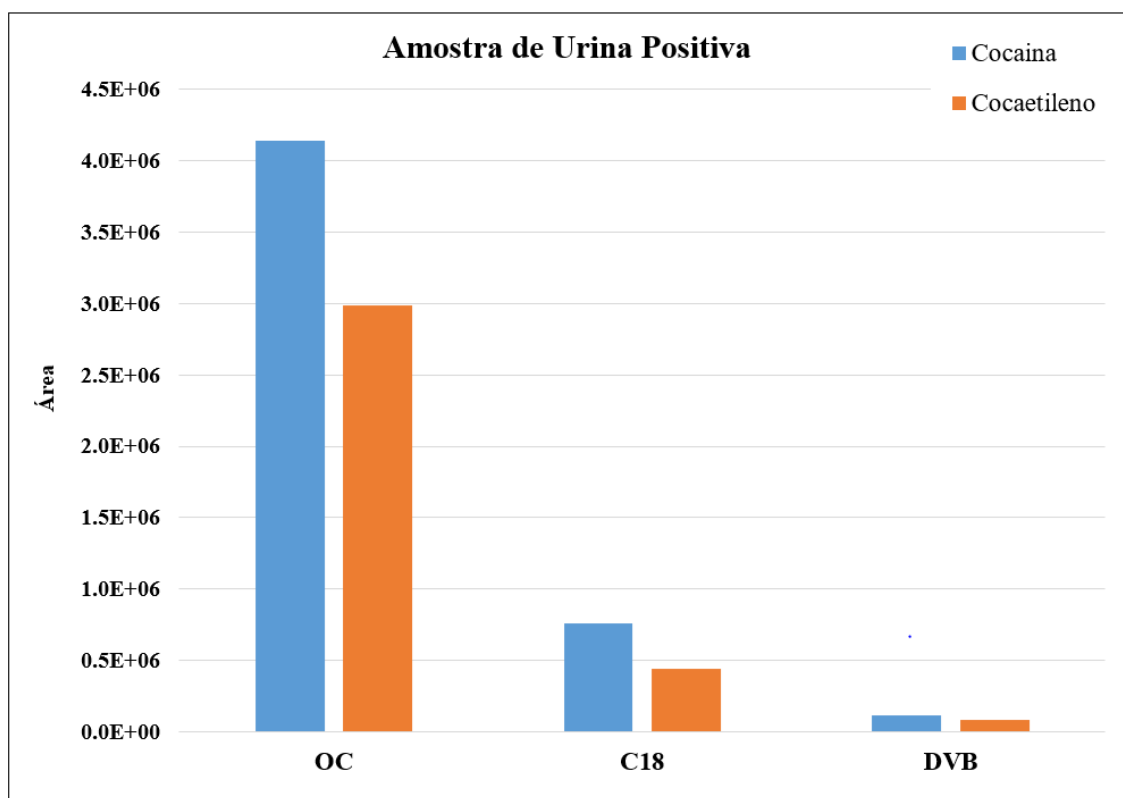


Figura 73 Diferenças na extração da cocaína e cocaetileno, na amostra de urina positiva com dois tipos de fibras, OC (revestimento PDMS-DVB-PDMS) e TIPS (com revestimento C18 e DVB).

Através dos resultados obtidos, verificou-se que nas condições experimentais utilizadas para as fibras SPME-*tips*, a C18 apresenta uma melhor eficiência de extração em relação à PDMS/DVB. Quanto à fibra OC-PDMS/DVB, uma vez que a dessorção é térmica, permite uma maior sensibilidade (S/N) e um limite de detecção mais baixo.

#### 5.4.5. Sensibilidade dos Sistemas Cromatográficos

A sensibilidade de um método em GC/MS, pode ser determinada mediante o sinal/ruído. No entanto, é de notar que o limite de detecção prático é muito difícil de

estimar em geral, porque o mesmo depende do composto e de vários fatores, entre eles o tipo de matrizes analisadas.

A determinação da razão sinal/ruído é realizada por meio da comparação dos sinais medidos da amostra. É também importante aumentar a intensidade do sinal e diminuir o ruído para uma análise de alta sensibilidade. Assim sendo, pode-se assumir que quanto maior o S/N, melhor a sensibilidade (Skoog, *et al*, 2006).

Foi realizado um exercício de comparação da sensibilidade dos sistemas cromatográficos utilizados, a partir do S/N, como uma medida indireta, utilizando a amostra de urina positiva. Para tal, usou-se o S/N obtido para as fibras OC-PDMS/DVB, *tips* C18 e PDMS/DVB, e para SPME em SIM e MRM, como demonstrado na figura 73.

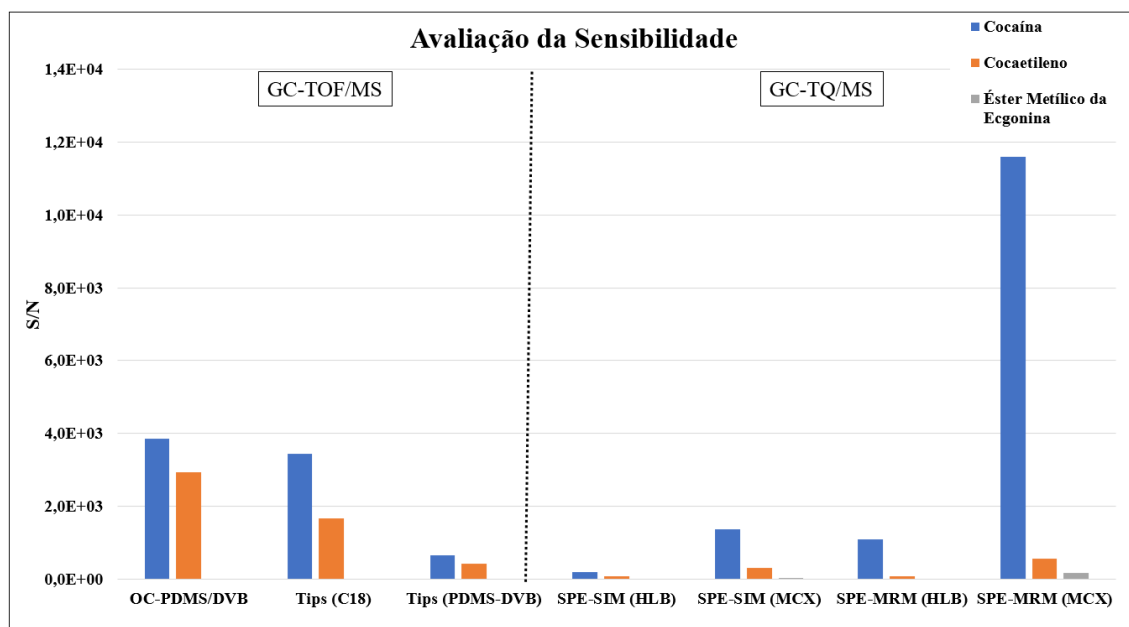


Figura 74 Dados obtidos para a avaliação da sensibilidade, através do S/N para cada compostos nos diferentes métodos, na amostra de urina positiva.

Para o GC-TOF/MS, podemos observar que o método que apresenta um maior S/N verificou-se com as fibras OC-PDMS/DVB, que pode ser explicado pela ausência de solvente (dessorção térmica). Dentro das fibras *tips* o revestimento C18 apresenta um maior S/N em relação ao PDMS/DVB.

No sistema GC-TQ/MS, utilizando o método convencional de SPE para os dois cartuchos (HLB e MCX), em MRM o S/N é maior se explica por diminuição do ruído, facto que aumenta a sensibilidade do método em modo MRM.

É de salientar que pelo sistema cromatográfico GC-TQ/MS, quando aplicado o método convencional SPE em MRM com o cartucho MCX o mesmo tem sensibilidade suficiente para a deteção do éster metílico da ecgonina, um dos analitos em estudo

## 6. Aplicação da Metodologia na Química Analítica Verde

Por forma a determinar a concordância das metodologias desenvolvidas com os princípios da GAC, foi aplicado o programa AGREE: *Analytical GREennEss Calculator*, nas diferentes técnicas de preparação da amostra.

Uma vez que os métodos de microextração, não foram otimizados, esta aplicação do software, é apenas uma informação geral, não concreta sobre os mesmos.

Como referido na introdução, este programa analisa o método nos doze princípios da química analítica verde dando um resultado que é expresso num pictograma, e que indica a pontuação final, desempenho do procedimento analítico em cada critério, e pesos atribuídos pelo utilizador.

Foram efetuados diversos estudos, um para o método de preparação de amostra em extração em fase sólida (SPE), outro em microextração em fase sólida (SPME), utilizando o GC/MSO como sistema cromatográfico; e um para o método de preparação de amostra em microextração em fase sólida (SPME) utilizando o LC/MS como sistema cromatográfico. A escolha do LC/MS para este estudo, deve-se ao facto de existirem diversos estudos feitos para estes compostos neste sistema cromatográfico, no entanto, no que diz respeito à química analítica verde o mesmo é o menos “verde”, uma vez que utiliza diversos solventes e apresenta alguma toxicidade. Assim sendo, não teve interesse para este projeto, por não se enquadrar num dos objetivos do mesmo – introdução como metodologias alternativas verdes.

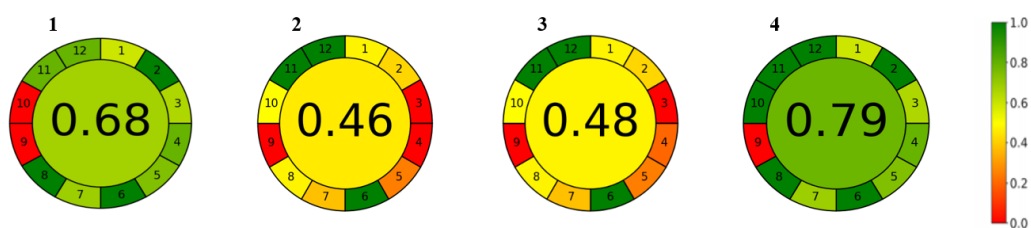


Figura 75 Pictogramas obtidos, através do programa AGREE, para SPME-LC/MS (1), SPE-MCX-GC/MS (2), SPE-HLB-GC/MS (3), SPME-GC/MS (4).

Através dos diferentes pictogramas (figura 73), podemos observar que quando utilizado o sistema cromatográfico LC/MS para uma técnica de microextração, o mesmo é menos “verde”, quando comparado com SPE e SPME utilizando o GC/MS como sistema cromatográfico.

Dentro das técnicas desenvolvidas para este projeto, observamos que método SPME, mesmo não estando otimizado e de ter sido utilizado o método com pior cenário (uso de solventes), é mais verde que o SPE, como seria de esperar, uma vez este último

utiliza ainda mais solventes e necessita de maior volume de amostra. No entanto, em relação ao SPE, a utilização do HLB é um pouco melhor em relação ao MCX.

Os resultados obtidos, após otimização, para os métodos de microextração devem aumentar ainda mais, tornando o método ainda mais verde, o que está em sintonia com o segundo objetivo do trabalho.

De modo a ter uma noção do custo/benefício dos métodos de preparação da amostra, foram pesquisados os preços para cada cartucho de SPE e para cada tipo de fibra, bem como o seu revestimento em SPME (tabela 16).

Tabela 16 Relação custo/benefício para as técnicas de preparação de amostra SPE e SPME.

Método de Extração	Revestimento	Preço €	Preço Unitário €	Quantidade	Número de Extrações
SPE	MCX	264	2,64	100	100
	HLB	165	5,5	30	30
SPME Fibras Clássicas	PA	447	447	1	X*
	PDMS	469	469	1	X*
	PDMS/CAR	447	447	1	X*
	PDMS/DVB	447	447	1	X*
SPME Novo Design	OC-PDMS/DVB	580	193,3	3	X*
SPME Fibras TIPS	C18	282	2,93	96	96**
	DVB	382	3,98	96	96**

\* O número de extrações vai depender do tratamento feito à fibra, no entanto, o seu tempo de durabilidade é elevado, sendo as fibras utilizadas inúmeras vezes. \*\*as fibras podem ser reutilizadas de acordo com a informação fornecida pela marca (<https://www.sigmaaldrich.com/PT/en>).

Apesar do preço dos cartuchos utilizados em SPE, serem inferiores aos preços das fibras utilizadas em SPME, a diferença está no número de extrações (reutilização), sendo que cada cartucho permite apenas uma extração, enquanto uma fibra permite a realização de várias extrações, tornando-as a longo prazo mais vantajosas. Em relação aos métodos de preparação da amostra, a técnica, SPME, com as diversas fibras pode apresentar uma vantagem competitiva em relação à SPE, sendo mais barata a longo prazo e uma técnica mais “verde” e amiga do ambiente, como referido anteriormente. Em relação aos tipos de fibras, a SPME realizada com as fibras *tips*, apresenta-se como mais competitiva em relação às fibras clássicas, sendo mais baratas e permitem um número de extrações maior de uma só vez, sendo que podem fazer até 96 poços em simultâneo ou em série. Em termos da química analítica verde o seu procedimento experimental não difere muito, podendo ser ambas consideradas como mais “verdes”.

## 7. Conclusões

A presente dissertação propõe o desenvolvimento de metodologias inovadoras baseadas em SPME, com recurso a novos revestimentos e configurações de fibras para a determinação de substâncias de abuso emergentes em matrizes biológicas.

Inicialmente, foi feito um estudo pela plataforma *Chemicalize*, que permitiu obter a informação relativa às propriedades físico-químicas de cada analito, por forma a prever o seu comportamento durante o processo de extração e de modo a obter informação que tornasse possível realizar a avaliação e a extrapolação dos seus “comportamentos” individuais nas matrizes biológicas.

O desenvolvimento deste projeto, focou-se no estudo do efeito de extração dos analitos, nos revestimentos de fibras clássicas existentes; no efeito de extração nas fibras com novos revestimentos e configurações, tendo em atenção diversas variáveis como o tempo e agitação; no estudo comparativo de uma abordagem convencional em SPE para estes compostos; e no estudo das diferentes metodologias desenvolvidas numa amostra real de urina fornecida.

Numa primeira fase experimental, ficou demonstrado que todos os compostos são cromatografáveis por GC, permitindo desenvolver uma alternativa analítica para estes compostos em estudo.

No que diz respeito ao estudo realizado com as fibras clássicas, este demonstra os efeitos dos revestimentos na extração destes compostos, onde se observou que a extração dos mesmos depende da sua afinidade com os diferentes revestimentos.

Para as fibras clássicas, com o novo revestimento OC-PDMS/DVB, foram estudados o tempo de extração e a linearidade. Relativamente à extração dos compostos, esta é dependente do tempo de extração, não sendo 45 min de extração suficientes para que se atinja o equilíbrio de extração. Em relação à linearidade, a cocaína e o cocaetilo apresentam uma boa linearidade, não se observando o mesmo para o fentanilo, o que poderá estar relacionado com um potencial efeito de saturação do sinal do detetor ou da capacidade da fibra.

Posteriormente, para as fibras *tips*, com revestimentos C18 e PDMS/DVB, estudaram-se as variáveis velocidades de agitação, o tempo de extração e a linearidade. A extração com o revestimento C18 está diretamente relacionado com a agitação, mas com o PDMS/DVB, apenas o fentanilo é fortemente dependente da agitação, nas condições experimentais ( $t \geq 15$  min). Para ambos os revestimentos, a extração dos

compostos é uma função direta do tempo de extração, atingindo os patamares cinéticos em  $t=10$  min, com exceção da cocaína em C18. Os compostos apresentam uma boa relação linear com PDMS/DVB, não sendo observada a mesma relação linear com C18, podendo estar indiretamente relacionada com um efeito de saturação do solvente. No estudo realizado para estas fibras sem agitação, observou-se que o sistema de extração em função do tempo, pode não precisar de agitação.

O estudo feito em SPE, foi feito a análise destes compostos em GC/MS/MS, onde se realizaram vários testes cromatográficos, e posteriormente, foi aplicado este estudo em amostras biológicas, como sangue, urina, plasma e saliva, e numa amostra de urina positiva.

Por fim, foi feito um estudo entre as técnicas desenvolvidas com as diferentes fibras OC-PDMS/DVB e *tips*, em simultâneo com o método em SPE aplicando a metodologia convencional numa amostra real de urina fornecida, com o objetivo de demonstrar a viabilidade da metodologia para estes compostos nesta matriz real. Quando utilizadas as fibras OC-PDMS/DVB e as *tips* (C18 e PDMS/DVB), os compostos extraídos na amostra real de urina fornecida foram a cocaína e o cocaetileno para ambas. No entanto, em comparação com SPE utilizando um método convencional para a mesma amostra, detetou-se também o éster metílico da ecgonina pelo cartucho MCX (utilizado como método para a extração destes compostos em análise de rotina em laboratório).

O sistema instrumental, é um fator muito importante na deteção e quantificação dos compostos. Inicialmente, o sistema utilizado foi o GC/MS, de quadrupolo simples que, no entanto, não permitiu obter uma sensibilidade para este estudo que suportasse o estudo e desenvolvimento de um método analítico mais verde. Esta observação suporta a importância do sistema de GC/MS a utilizar (ex. GC/MS/MS e GC-TOFMS) ou a que se tem acesso operacional, reforçando o papel da deteção na análise qualitativa e quantitativa e no processo de desenvolvimento e validação do método analítico, independentemente da otimização do importante passo de preparação das amostras.

Posteriormente, utilizaram-se dois sistemas cromatográficos diferentes o GC-TQ/MS e o GC-TOF/MS, para avaliar a diferença e a importância de um detetor que seja favorável ao método em estudo. Uma vez que o TQ/MS apenas monitoriza os iões selecionados, acaba por ser um método mais seletivo e por isso mais sensível para estas análises em amostras biológicas. No TO/FMS, é possível utilizar a resolução espectral para extrair os espectros totais dos compostos presentes na amostra da amostra, ou seja, é possível utilizar algoritmos de desconvolução para detetar "tudo" o que está presente na

amostra. No entanto, em relação ao GC/MS/MS acaba por ser um método menos seletivo para os analitos, o que o torna menos sensível que a técnica MRM e por consequência a apresentar limites de deteção mais elevados.

Os métodos analíticos desenvolvidos, demonstraram ser alternativas analíticas mais verdes na determinação de algumas das substâncias de abuso em estudo. O facto de algumas das substâncias não terem sido detetadas pelos sistemas instrumentais como é o caso da benzoilecgonina e do éster metílico da ecgonina (metabolitos principais da cocaína), deve-se ao facto de as mesmas precisarem de um passo adicional, a derivatização, de modo a tornarem-se mais cromatografáveis e a aumentarem o seu fator de resposta (S/N). No entanto, este contratempo, não inviabiliza o método desenvolvido, requer é um passo adicional. Como um dos objetivos do trabalho é a incrementação como uma metodologia alternativa verde, a derivatização do extrato é um passo não considerado, mas que poderá ser adicionado.

De um modo geral, e tendo como finalidade a aplicação do método como de rotina em laboratórios, no futuro próximo, será necessário haver uma otimização destes parâmetros estudados, bem como outros parâmetros e a posterior validação do método, como descrito no tópico abaixo – Perspetivas Futuras.



## 8. Perspetivas Futuras: Otimização e Validação do Método

A validação de métodos analíticos tem como objetivo demonstrar, através de estudos laboratoriais, que o método é adequado aos requisitos exigidos pela aplicação analítica pretendida, ou seja, que o método é adequado para a quantificação do/os analito/os na matriz, a uma determinada concentração, com veracidade e precisão satisfatórias. A validação de um método analítico confere uma garantia de qualidade operacional e de desempenho analítico (Calçada, 2017).

A exigência da validação varia consoante a natureza do método a ser avaliado. No entanto, existem sempre parâmetros a avaliar, como a seletividade, linearidade, precisão, veracidade, gama de trabalho, limite de deteção e quantificação, entre outros, de acordo sempre com a *guideline* escolhida.

Neste sentido, o primeiro passo será escolher uma *guideline* que seja adequada ao método pretendido. Bons exemplos são a *Standard for identification Criteria in Forensic Toxicology* (OSAC, 2019a), criada com o propósito fornecer requisitos mínimos para a identificação de um analito nos laboratórios de toxicologia forense, a *Standard for Mass Spectral Data Acceptance in Forensic Toxicology* (OSAC, 2019b) , criada com o propósito de fornecer normas mínimas de prática para a aceitação de dados espectrais de massa utilizados em todos os laboratórios de toxicologia forense e a *The Fitness for Purpose of Analytical Methods* (Magnusson, Örnemark, 2014), que consiste num guia laboratorial de validação de métodos.

No entanto, antes da validação da metodologia proposta, é necessário proceder à sua otimização, com o intuito de minimizar o tempo de análise e custo de operação, incrementar a precisão e a veracidade, diminuir os limiares analíticos, entre muitos outros.

No presente projeto de mestrado, este processo não foi realizado, mas é sugerido a otimização de vários parâmetros experimentais para trabalhos futuros, como pro exemplo, a otimização do tempo e temperatura de extração, da velocidade de agitação, do volume de amostra, da manipulação da força iónica da matriz, da concentração da amostra (de modo a que não haja um efeito de saturação do sinal e da fibra), do estudo da dessorção, do tipo de *liner* utilizado, do estudo noutros sistemas cromatográficos que permitam uma melhor deteção e quantificação dos analitos em estudo, entre muitos outros. Por forma a agilizar estes ensaios de otimização e determinar possíveis interações entre os diferentes parâmetros, é sugerido a aplicação de um desenho experimental, como o central *composite design* ou o *Box-Behnken design*.



## 9. Referências

- Ahmad, S. M., Gonçalves, O. C., Oliveira, M. N., Neng, N. R., & Nogueira, J. M. F. (2021). Application of microextraction-based techniques for screening-controlled drugs in forensic context—a review. *Molecules*, 26(8), 1–32. <https://doi.org/10.3390/molecules26082168>
- Ahmad. (2020). *Metodologias Analíticas Inovadoras Baseadas em Microextração Adsorptiva em Barra para a Monitorização de Contaminantes e Substâncias de Abuso Emergentes em Matrizes Ambientais e Biológicas*. Tese de Doutoramento em Química, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Baldo, B. A. (2018). Opioid analgesic drugs and serotonin toxicity (syndrome): mechanisms, animal models, and links to clinical effects. *Archives of Toxicology*, 92(8), 2457–2473. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2244-6>
- Basílio. (2009). *Prevalência Do Consumo De Drogas De Abuso Nos Casos Mortais Autopsiados Na Delegação Do Centro Do Instituto Nacional De Medicina Legal E No Gabinete Médico-Legal Da Figueira*. Tese Mestrado em Medicina Legal, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.
- Billiard, K. M., Dershem, A. R., Gionfriddo, E. (2020). Solid-Phase Microextraction : A Review. *Molecules*, 1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules25225297>
- Calçada, S. (2017). *Validação de métodos físico-químicos*. Tese de Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- Decreto-Lei n.º 15/93 de 22 de janeiro do *Conselho de Ministros*. Diário da República Série I-A de 1993-01-22, n.º 18 (1993). Acedido a 22 de agostos de 2021. Disponível em [www.dre.pt](http://www.dre.pt).
- Drug Enforcement Administration (2019). *Fentanyl*. [https://www.deadiversion.usdoj.gov/drug\\_chem\\_info/fentanyl.pdf](https://www.deadiversion.usdoj.gov/drug_chem_info/fentanyl.pdf)
- Ettre, L. S. (2000). Chromatography: The separation technique of the 20th Century. *Chromatographia*, 51(1–2), 7–17. <https://doi.org/10.1007/BF02490689>
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2020), European Drug Report 2020: Trends and Developments, Publications Office of the European Union, Luxembourg.
- Ferreira, M. (2015). *Estudo da aplicação de método microextração por fase empacotada (MEPS) para determinação de contaminantes emergentes*. Tese de Mestrado em Engenharia do Ambiente, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade

Nova de Lisboa.

- Ferreira, M., Martini, K. (2001). Cocaína: lendas, história e abuso. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 23(2), 96–99. <https://doi.org/10.1590/s1516-44462001000200008>
- Follador, D., Yonamine, M., Moreau, M., Silva, A. (2004). Detection of cocaine and cocaethylene in sweat by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 811, 37–40. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.03.071>
- Fonte, C. (2006). *Comportamentos Aditivos: Conceito de Droga, Classificação de Drogas e Tipos de Consumo*. Revista da Faculdade de Ciências da Saúde. Porto. 3, 104-112.
- Gomes, M. S. (2013). *Contributo da Química Forense na Detecção de Drogas de Abuso*. Tese de Mestrado em Química, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Hübschmann, H.-J. (2015). *Handbook of GC-MS - Fundamentals and Applications*. 3<sup>a</sup> ed, Wiley-VCH, Alemanha.
- Isralowitz, R. E., Myers, P. L. (2011). *Health and Medical Issues Today - Illicit Drugs*. Greenwood, Califórnia, Estados Unidos da América.
- Karch, M. D. (1998). *Drug Abuse Handbook*. CRC Press LLC. California, Estados Unidos da América.
- Lizot, L. D. L. F., Da Silva, A. C. C., Bastiani, M. F., Maurer, T. F., Hahn, R. Z., Perassolo, M. S., Antunes, M. V., Linden, R. (2020). Simultaneous Determination of Cocaine and Metabolites in Human Plasma Using Solid Phase Micro-Extraction Fiber Tips C18 and UPLC-MS/MS. *Journal of Analytical Toxicology*, 44(1), 49–56. <https://doi.org/10.1093/jat/bkz042>
- Luiz, A. L., Maciel, E. V. S., Lanças, F. M. (2015). Uma abordagem conceitual das técnicas miniaturizadas de preparo de amostra e suas aplicações na análise de resíduos e contaminantes em matrizes alimentares. *Scientia Chromatographica*, 7(3), 157–182. <https://doi.org/10.4322/sc.2016.002>
- Magnusson, B., Örnemark, U.g (eds.) *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0. Available from [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org).
- Martins, V. F. M. (2019). *Profiling de Cocaína*. Tese de Mestrado em Química Forense, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

- Merkle, S., Kleeberg, K., Fritsche, J. (2015). Recent Developments and Applications of Solid Phase Microextraction (SPME) in Food and Environmental Analysis—A Review. *Chromatography*, 2(3), 293–381. <https://doi.org/10.3390/chromatography2030293>
- Michel, F., Sidisky, L., Aldrich, S. (2015). *Advantages of PDMS-Overcoated Adsorbent Based SPME Fiber for Extraction in complex Samples*. Apresentado em Internations Symposium on Advances in Extraction Technologies (ExTech), China.
- Mounteney, J., Giraudon, I., Denissov, G., Griffiths, P. (2015). Fentanyl: Are we missing the signs Highly potent and on the rise in Europe. *International Journal of Drug Policy*, 26(7), 626–631. <https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2015.04.003>
- Murtada, K. (2020). Trends in nanomaterial-based solid-phase microextraction with a focus on environmental applications - A review. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 25, e00077. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2019.e00077>
- Oliveira, S. M. de. (2015). *Avaliação do Consumo de Drogas de Abuso por Estudantes Universitários Experiência Profissionalizante na vertente Comunitária, Hospitalar e Investigação*. Tese de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Universidade da Beira Interior.
- Organization of Scientific Area Committees for Forensic Science (OSAC) (2019a). Standard for Identification Criteria in Forensic Toxicology.
- Organization of Scientific Area Committees for Forensic Science (OSAC) (2019b). Standard for Mass Spectral Data Acceptance in Forensic Toxicology.
- Pena-Pereira, F., Wojnowski, W., Tobiszewski, M. (2020). AGREE - Analytical GREEnness Metric Approach and Software. *Analytical Chemistry*, 92(14), 10076–10082. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01887>
- Queiroz, M. E. C. (2009). Microextração em fase sólida para análise de fármacos em fluidos biológicos. *Scientia Chromatographica*, 1(3), 11–19.
- Raikos, N., Theodoridis, G., Alexiadou, E., Gika, H., Argiriadou, H., Parlapani, H., Tsoukali, H. (2009). Analysis of anaesthetics and analgesics in human urine by headspace SPME and GC. *Journal of Separation Science*, 32(7), 1018–1026. <https://doi.org/10.1002/jssc.200800447>
- Rydberg, J., Cox, M., Musikas, C., Chopin, G. R. (2004). Principles and practices of solvent extraction. Wiley. Nova Iorque, Estados Unidos da América.
- Saraji, M., Khalili Boroujeni, M., Hajialiakbari Bidgoli, A. A. (2011). Comparison of dispersive liquid-liquid microextraction and hollow fiber liquid-liquid-liquid

- microextraction for the determination of fentanyl, alfentanil, and sufentanil in water and biological fluids by high-performance liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400(7), 2149–2158. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4874-x>
- Simões, S. M. S. S. (2016). *DBS – “ Dried Blood Spots ”: estudo sobre a sua aplicação na área da Toxicologia Forense*. Tese de Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.
- Skoog, D. A., Crouch, F., Holler. J., West. D. M. (2006). *Fundamentos de Química Analítica*. 8ª ed., Thomson, Brasil.
- Sparkman, O. D., Penton, Z. E., Kitson, F. G. (2011). *Gas Chromatography and Mass Spectrometry - Practical Guide*. 2ª ed, Academic Press, Amsterdam
- Thurman, E. M., Mills, M. S. (2019). *Solid-Phase Extraction: Principles and Practice*. Elsevier Science Publishing Co Inc. Estados Unidos da América.
- Tiscione, N. B., & Wegner, K. (2017). Validation of the Neogen® fentanyl ELISA kit for blood and urine. *Journal of Analytical Toxicology*, 41(4), 313–317. <https://doi.org/10.1093/jat/bkx005>
- Tobiszewski, M., Mechlińska, A., Zygmunt, B., Namieśnik, J. (2009). Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 28(8), 943–951. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.06.001>
- Truta, L. (2012). *Desenvolvimento e procedimentos de validação de uma metodologia analítica por GC/MS/MS para a determinação de antidepressivos em sangue total*. Tese de Mestrado em Engenharia Química, Politécnico do Porto.
- United Nations Offices on Drugs and Crime. (2020). World Drug Report 2020 (United Nations publication, Sales No. E.20.XI.6)
- Valério, A. T. C. (2014). *Anatomia e Farmacologia das “Drogas” de Abuso*. Tese de Mestrado em Farmácia, Faculdade de ciências do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz.

Anexos  
Análise em GC-TOF/MS

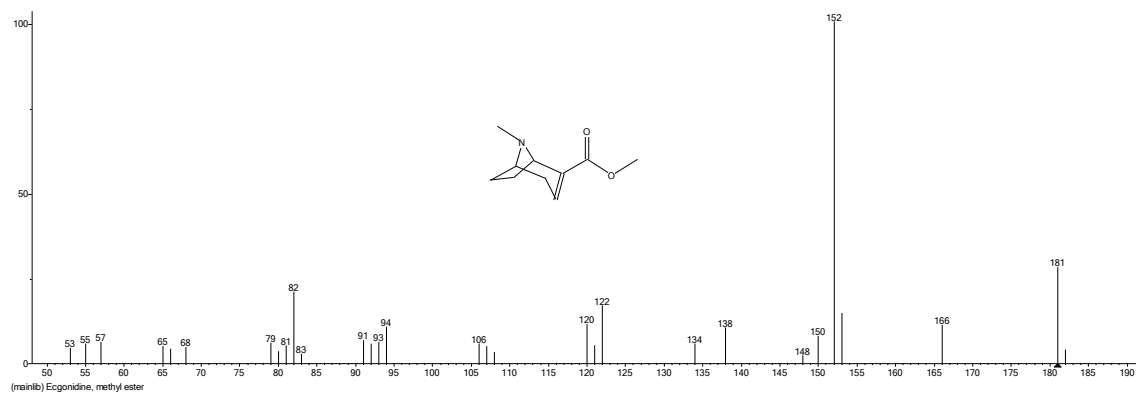


Figura 76 Espectro de massa do éster metílico da ecgonina.

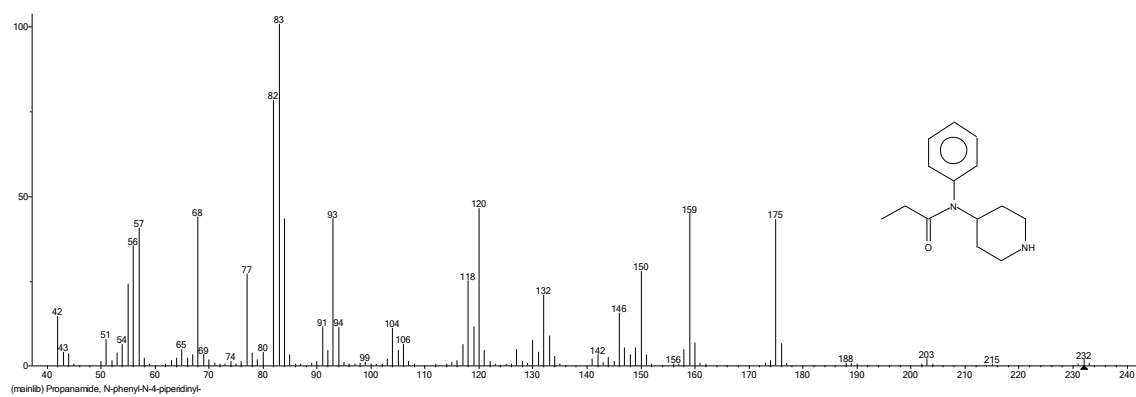


Figura 77 Espectro de massa do norfentanilo

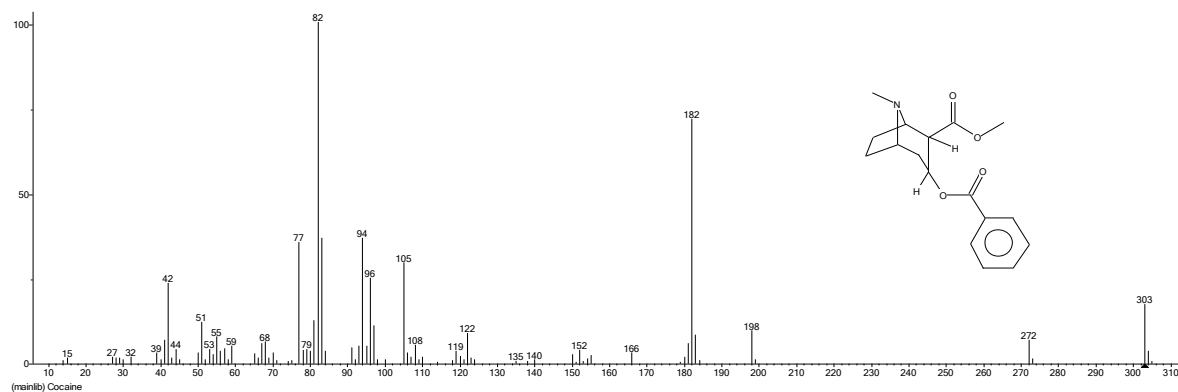


Figura 78 Espectro de massa da cocaína.

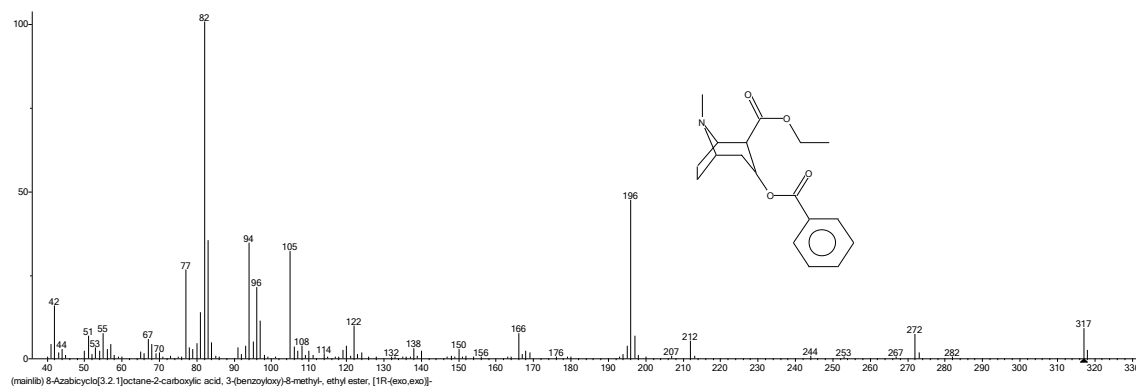


Figura 79 Espectro de massa do cocaetileno.

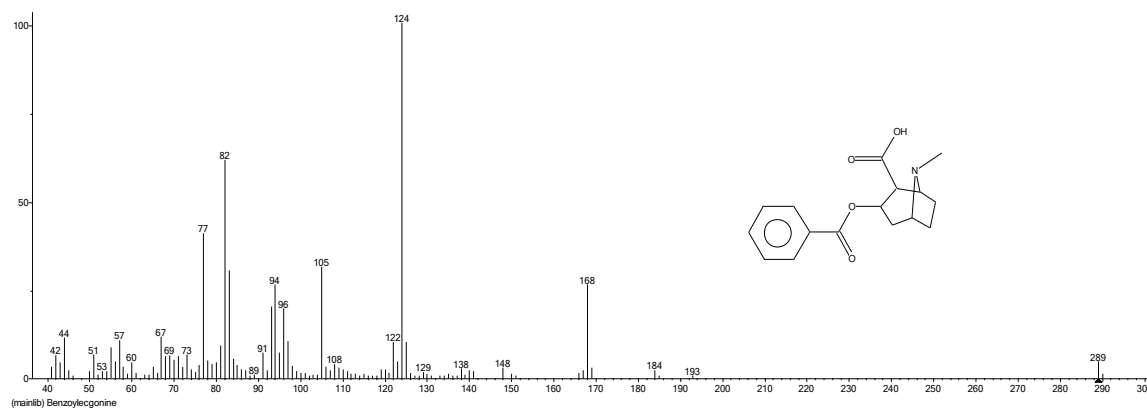


Figura 80 Espectro de massa da benzoilecgonina.

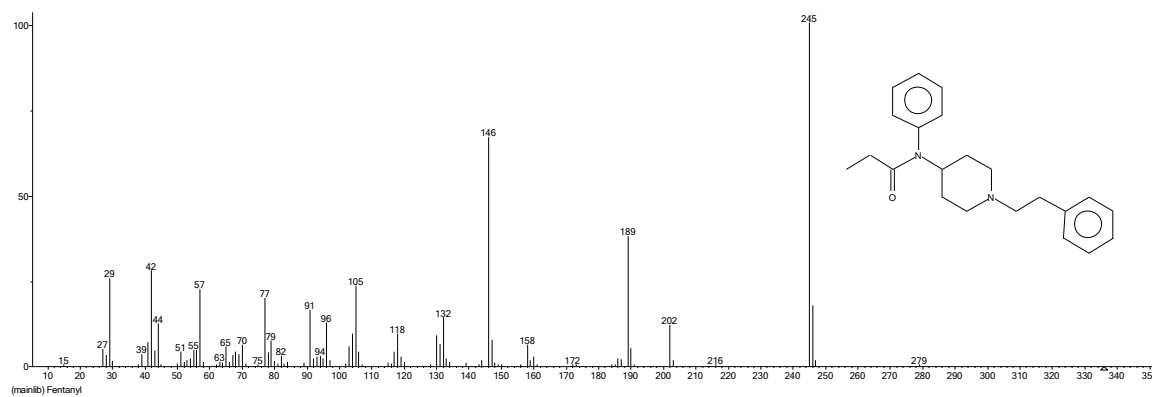


Figura 81 Espectro de massa do fentanilo.

Tabela 17 Tempo de retenção e  $m/z$  para os compostos em estudo por GC-TOF/MS.

Compostos	Tempo de Retenção (min)	$m/z$ (Ião Principal)
Éster Metílico da Ecgonina	480	199
Norfentanilo	1009,9	175
Cocaína	1055,16	303
Cocaetileno	1080,20	272
Benzoilecgonina	1199,8	168
Fentanilo	1235,46	245

## Análise em GC-TQ/MS

Tabela 18 Tabela esquematizada do estudo feito para os analitos em GC-TQ/MS.

Compostos	Tempo de Retenção (min)	Iões Precusores ( $m/z$ )	Iões Produto ( $m/z$ )	Energia de Ionização (eV)
Éster Metílico da Ecgonina	8,74	199	83	10
		182	82	10
		168	100	10
Norfentanilo	15,78	175	120	10
		159	130	10
		150	94	10
		120	119	10
Cocaína	17,68	303	82	10
		272	82	10
		198	82	10
		182	82	10
Cocaetileno	18,07	317	82	10
		272	82	10
		196	82	10
Benzoilecgonina	20,10	289	152	10
		168	91	25
		124	83	10
Fentanilo	20,90	245	146	25
		202	146	10
		189	146	10
		146	131	10