



Impacto da Derivatização Química na Detecção de Metabolitos de Cocaína na presença de Benzodiazepinas

Suzel Costa^{1*}; Luana M. Rosendo^{1,2,3}; Mário Barroso^{1,4}; Eugenia Gallardo^{2,3}

¹ Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, Delegação do Sul, Serviço de Química e Toxicologia Forenses, Lisboa, Portugal

² Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior (CICS-UBI), Covilhã, Portugal

³ Laboratório de Fármaco-Toxicologia-UBIMedical, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal

⁴ AlphaBiolabs, 14 Webster Court, Carina Park, Warrington, United Kingdom

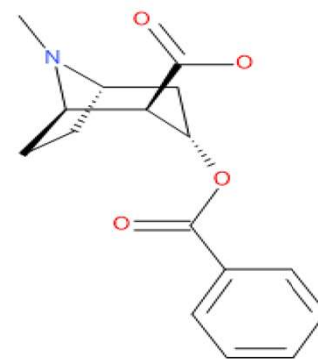
Introdução

Materiais e Métodos

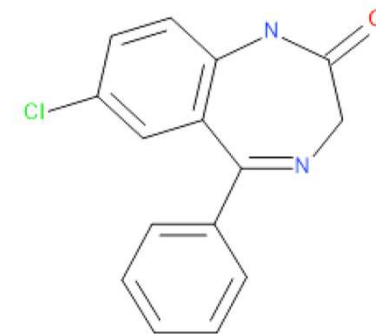
Resultados e Discussão

Conclusão

- A derivatização química é essencial na toxicologia forense, particularmente na cromatografia gasosa, para garantir a detecção de drogas e seus metabolitos.
- O nordiazepam, um dos principais metabolitos de algumas benzodiazepinas, pode interferir na detecção de benzoilecgonina, o principal metabolito da cocaína, quando se utiliza cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS) e a derivatização N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA).
- Este estudo tem como **objetivo** avaliar se a derivatização com N-metil-N-(tert-butildimetilsilil)-trifluoroacetamida (MBDSTFA) pode reduzir a interferência do nordiazepam, possibilitando a confirmação qualitativa e quantitativa da benzoilecgonina em amostras de sangue *postmortem*.



Benzoilecgonina



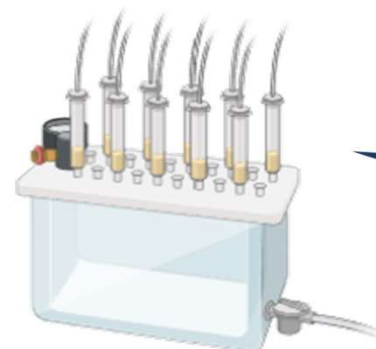
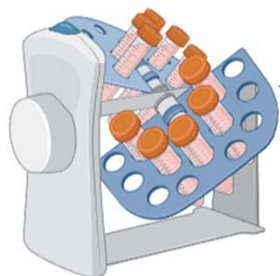
Nordiazepam

Introdução

Materiais e Métodos

Resultados e Discussão

Conclusão

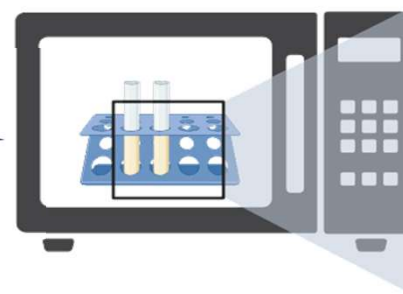


0,5 mL de sangue + 8 mL de tampão KH_2PO_4 ; fortificação com 25 μL de PI (BEG-d3 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

Após homogeneização através de movimentos de rotação/inversão durante 10 minutos, as amostras foram submetidas a centrifugação a 3500 rpm durante 15 minutos.

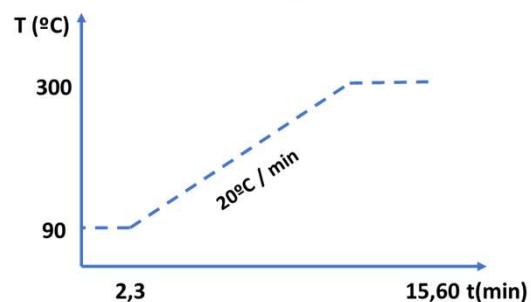
Colunas Oasis® MCX (60 mg, 3 mL)
Acondicionamento: 2 mL de MeOH e 2 mL de H_2O ;
Passagem completa das amostras;
Lavagem: 2 mL de H_2O ; 2 mL de HCl a 0,1 M, 3 mL de diclorometano: metanol (70:30, v/v) e 3 mL de n-hexano.
Eluição: 2 mL de diclorometano: isopropanol: amónia (78:20:2, v/v/v).

Os extractos resultantes foram evaporados até à secura sob fluxo de azoto a 45°C.



2 μL foram injectados no GC-MS para análise

- 1) Derivatização assistida por micro-ondas a 600 W durante 2 minutos com 65 μL de MSTFA contendo 5% de trimetilclorossilano (TMCS);
- 2) Derivatização assistida por micro-ondas a 600 W durante 2 minutos com 65 μL de MBDSTFA



GC-MS Agilent Technologies 6890 N/5973
 Razão do split 5:1
 Fluxo do hélio: 0,8 mL/min
 Coluna: HP-5MS (30m x 250µm x 0,25 µm)
 Modo de detecção: SIM
 EI: 70 eV

Tabela 1. Tempos de retenção (T_R) e fragmento iônicos selecionados.

Compostos	T_R (min)	Fragmentos iônicos (m/z)
BEG TMS	11,88	82, <u>240</u> , 361
BEG-d3 TMS	11,88	<u>243</u>
BEG TBDMS	12,94	<u>282</u> , 346, 403
BEG-d3 TBDMS	12,93	<u>285</u>
NOR TMS	11,90	227,269, <u>341</u>
NOR TBDMS	12,84	327, 384, 329

BEG: benzoilecgonina; NOR: nordiazepam; TMS: MSTFA (N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida); TBDMS: MBDSTFA (N-metil-N-(terc-butildimetilsilil)-trifluoroacetamida).

Introdução

Materiais e Métodos

Resultados e Discussão

Conclusão

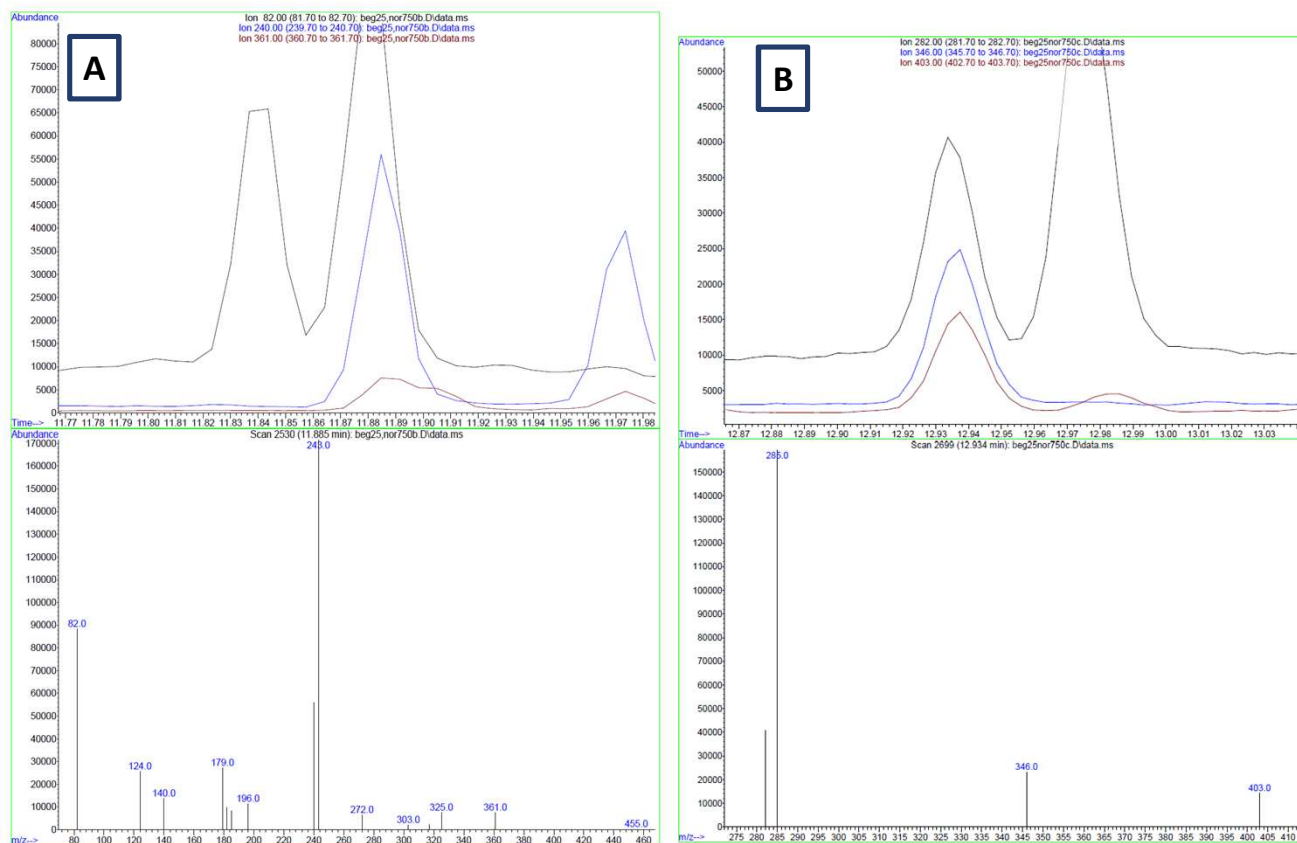


Figura 1. Cromatograma e respectivos espectros de massa da benzoilecgonina TMS (A) e TBDMS (B), respectivamente. Concentração de 25 ng/mL de benzoilecgonina e 750 ng/mL de nordiazepam.

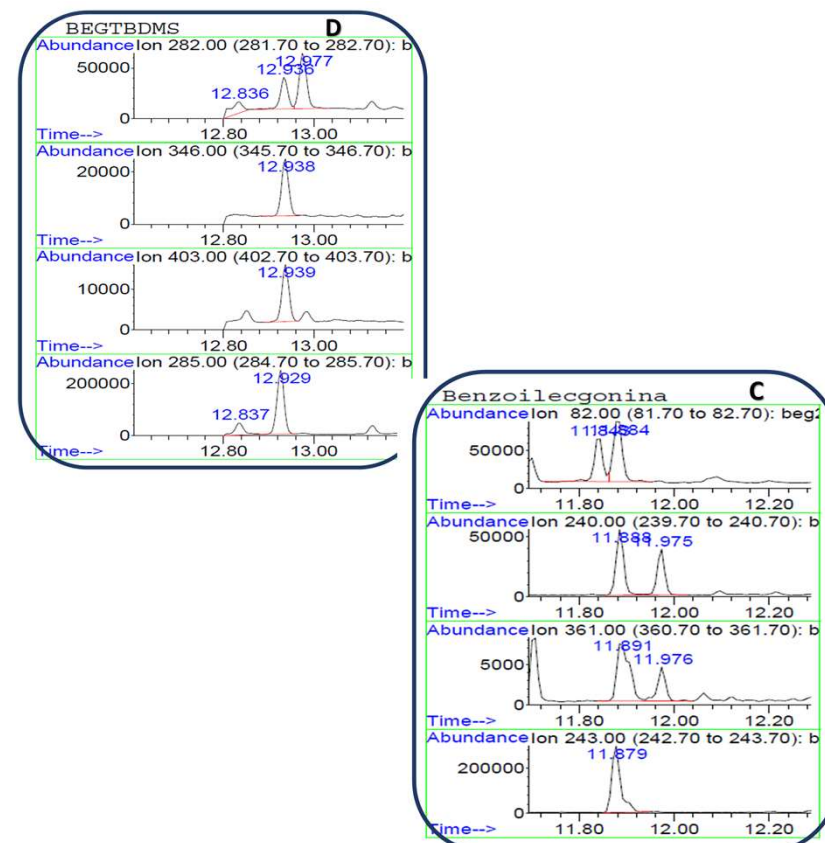


Figura 2. Extract ion da benzoilecgonina TMS (C) e TBDMS (D), respectivamente. Concentração de 25 ng/mL de benzoilecgonina e 750 ng/mL de nordiazepam.

Tabela 2. Contribuição cruzada do nordiazepam nos íões m/z 82 e 240 da benzoilecgonina derivatizada com MSTFA.

Concentração NOR (ng/mL)	Fragmentos iônicos m/z		Resultado	BEG (ng/mL)
	82 (%)	240 (%)		
50	100	41.9	Positivo	10
100	100	48.0	Positivo	
250	100	47.7	Positivo	
500	100	57.8	Falso negativo	
750	100	81.1	Falso negativo	
1000	100	90.6	Falso negativo	
50	100	49.3	Positivo	25
100	100	51.8	Positivo	
250	100	54.2	Positivo	
500	100	47.4	Positivo	
750	100	56.6	Falso negativo	
1000	100	68.7	Falso negativo	

Introdução

Materiais e Métodos

Resultados e Discussão

Conclusão

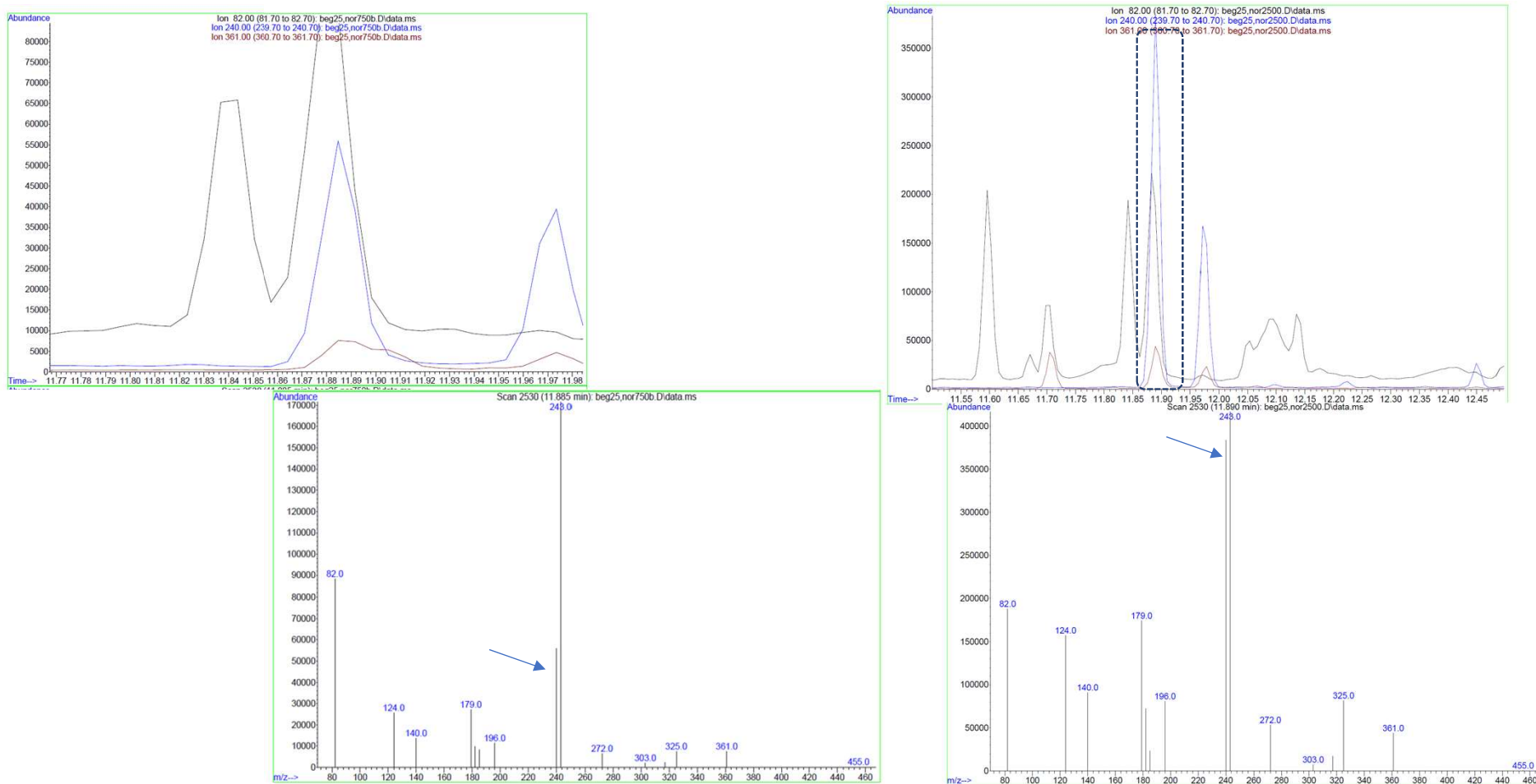


Figura 3. Demonstração da inversão completa de fragmentos iônicos. Cromatograma e respectivos espectros de iões da benzoilecgonina TMS. (A) Concentração de 25 ng/mL de benzoilecgonina e 750 ng/mL de nordiazepam, (B) Concentração de 25 ng/mL de benzoilecgonina e 2500 ng/mL de nordiazepam.

Introdução

Materiais e Métodos

Resultados e Discussão

Conclusão

A

Controlo: BEG 10	lão	Área	Área relativa	Tolerância	limite inferior	limite superior
1º ião	82	212410	100,0%			
2º ião	240	93398	44,0%	20% rel.	35,2%	52,8%
3º ião	361	45111	21,2%	5 abs.	16,2%	26,2%
4º ião						
Benzoilecgonina (t.r.) =	11,89			0,1 abs.	11,789	11,989
beg-d3 (t.r.) =	11,88	t.r.r. =	1,001	1% rel.	0,991	1,011

Amostra: NOR 0,5 TMS	lão	Área	Área relativa	Conformidade
1º ião	82	427154	100,0%	conforme
2º ião	240	254447	59,6%	não conforme
3º ião	361	105206	24,6%	conforme
4º ião				
Benzoilecgonina (t.r.) =	11,89			conforme
beg-d3 (t.r.) =	11,88	t.r.r. =	1,001	conforme

Cest.: 15 ng/mL

B

Controlo: Beg 10 ng/mL	lão	Área	Área relativa	Tolerância	limite inferior	limite superior
1º ião	282	58772	100,0%			
2º ião	236	52125	88,7%	10 abs.	78,7%	98,7%
3º ião	403	30919	52,6%	10 abs.	42,6%	62,6%
4º ião						
Benzoilecgonina (t.r.) =	12,94			0,1 abs.	12,840	13,040
beg-d3 (t.r.) =	12,93	t.r.r. =	1,001	1% rel.	0,991	1,011

Amostra: NOR 0,5 ng/mL TBDMs	lão	Área	Área relativa	Conformidade
1º ião	282	78789	100,0%	conforme
2º ião	236	62561	79,4%	conforme
3º ião	403	35595	45,2%	conforme
4º ião				
Benzoilecgonina (t.r.) =	12,94			conforme
beg-d3 (t.r.) =	12,93	t.r.r. =	1,001	conforme

Cest.: 11 ng/mL

Figura 4. Amostras de sangue com benzoilecgonina a 10 ng/mL e nordiazepam a 500 ng/mL. Derivatização de MSTFA **(A)** e MBDSTFA **(B)**.



Introdução

Materiais e
Métodos

Resultados
e Discussão

Conclusão

- Este estudo realça a importância crucial da seleção de técnicas de derivatização adequadas em toxicologia forense para garantir a deteção fiável de drogas de abuso e os seus metabolitos. Ao utilizar a derivatização com MSTFA, embora comumente utilizada, esta é propensa à interferência do nordiazepam, particularmente em concentrações mais elevadas, o que conduz a falsos negativos na deteção da benzoilecgonina.
- Em contrapartida, a derivatização com MBDSTFA oferece um método fiável, permitindo a confirmação inequívoca e a quantificação exacta da benzoilecgonina sem a interferência do nordiazepam.
- Estes resultados sublinham a necessidade de uma validação e seleção meticolosas dos métodos analíticos nas investigações toxicológicas forenses para manter a qualidade dos resultados e, desta forma, o esclarecimento de questões judiciais relacionadas com o consumo de drogas de abuso.



Obrigada pela atenção!

