



**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO EM TECNOLOGIAS LABORATORIAIS EM  
CIÊNCIAS FORENSES**

**DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA ANALÍTICA  
PARA A ANÁLISE DE DEXTROMETORFANO E SEUS  
METABOLITOS MAIORITÁRIOS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS**

Trabalho submetido por  
**Carolina Gonçalves Rosa Lopes**  
para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologias Laboratoriais em  
Ciências Forenses

**outubro de 2022**





**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO EM TECNOLOGIAS LABORATORIAIS EM  
CIÊNCIAS FORENSES**

**DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA ANALÍTICA  
PARA A ANÁLISE DE DEXTROMETORFANO E SEUS  
METABOLITOS MAIORITÁRIOS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS**

Trabalho submetido por  
**Carolina Gonçalves Rosa Lopes**  
para a obtenção do grau de **Mestre** em Tecnologias Laboratoriais em  
Ciências Forenses

Trabalho orientado por  
**Doutor Eduardo Manuel Hipólito Pires Mateus**

e coorientado por  
**Mestre João Eduardo Rodrigues Sedas Brinco**  
**Prof. Doutor Samir Marcos Esmail Ahmad**

**outubro de 2022**



## Agradecimentos

A presente dissertação representa a conclusão de um ciclo de enorme aprendizagem, a nível profissional e pessoal e tal não seria possível, sem o contributo de algumas pessoas que, direta ou indiretamente, desempenharam um papel muito importante nesta jornada.

Primordialmente agradecer, ao Mestre João Brinco, co-orientador do meu mestrado, que desempenhou um papel fulcral em todo o processo. Pelo apoio, motivação e conhecimentos transmitidos, por ter sido incansável estando sempre predisposto a ajudar-me nesta caminhada.

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

Ao Laboratório *Resolution Lab*, localizado no CENSE- Center for Environmental and Sustainability Research, da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa (FCT), que me recebeu e me permitiu desenvolver este projeto de dissertação, através de uma parceria com o Laboratório de Patologia Molecular e Bioquímica Forense do Centro de Investigação Interdisciplinar Egas Moniz (CiiEM) da Cooperativa de Ensino Superior Egas Moniz.

Ao Prof. Doutor Eduardo Mateus, pela orientação e disponibilidade.

Ao Prof. Doutor Samir Ahmad, por todo o apoio prestado, não só nesta última fase como ao longo destes anos.

Aos meus pais e irmão, por serem o meu maior suporte, por lutarem diariamente comigo para alcançar tudo aquilo a que me proponho, por todos os sacrifícios feitos em prol de um futuro melhor para mim, o meu maior e mais sincero obrigado!

Ao meu namorado, por me ter acompanhado ao longo dos anos, dando-me sempre o apoio para que nunca desistisse dos meus objetivos.

Aos meus amigos mais antigos, e àqueles que fiz ao longo destes 5 anos, por terem estado presentes e tornado esta caminhada inesquecível.

A todos vós, muito obrigada!



## Certificado de originalidade

Certifico que sou responsável pelo trabalho submetido neste relatório e que o trabalho é original, não sendo copiado ou plagiado de outra fonte, excetuando o especificado nas referências. Adicionalmente, declaro que o trabalho em si contido não foi submetido anteriormente para qualquer outro propósito.

---

(Carolina Lopes)

---

Data



## Resumo

O dextrometorfano (DXM), quimicamente referido como 3-metoxi-17-meilmorfino é a substância ativa de alguns medicamentos não sujeitos a receita médica, indicados no tratamento sintomático da tosse seca. O DXM e o seu principal metabolito, dextrorfano (DXO) apresentam sintomas semelhantes ao de drogas dissociativas quando consumidos para além das doses recomendadas. A dose máxima diária recomendada de DXM é de 120 mg.

Os possíveis problemas relacionados com o abuso de medicamentos que contenham uma substância ativa a possibilidade de apresentar capacidades dissociativas justificam o desenvolvimento de novos métodos analíticos.

Numa fase inicial realizou-se uma pesquisa sobre as propriedades físico-químicas dos compostos. Posteriormente, tentou-se desenvolver um método de extração, utilizando a microextração em fase sólida (SPME), para detetar os analitos em sangue. Foram testadas duas fibras SPME-LC *Tips*, fibras C18 e PDMS/DVB. Construiu-se um desenho experimental, um Plackett Burman, para otimizar o processo de extração. Identificou-se o pH como uma das variáveis com maior influência.

A análise quantitativa e qualificativa realizou-se através cromatografia gasosa com recurso a dois analisadores de massa diferentes: um analisador de voo (GC-TOF/MS) e um espectrómetro de massa em *tandem* (GC/MS/MS), utilizando um triplo quadrupolo.

No decorrer do trabalho, foi necessário a substituição do padrão interno, inicialmente escolhido, assim como o uso de protetores analíticos, numa tentativa de aumentar os picos cromatográficos dos compostos.

Após realizadas diversas injeções e analisados os resultados ao longo do processo experimental, verificou-se que o uso de sangue total apresentava desvantagens como a sujidade no *liner* e das fibras *tips*.

**Palavras-chave:** Dextrometorfano; Dextrorfano; Preparação de amostra; Método de análise; SPME LC-*Tips*; Sangue total;



## Abstract

Dextromethorphan (DXM), chemically referred to as 3-methoxy-17-meylmorphinan, is the active substance in some over-the-counter medicines indicated in the symptomatic treatment of dry cough. DXM and its main metabolite, dextrorphan (DXO) exhibit symptoms similar to dissociative drugs when consumed in excess of recommended doses. The maximum recommended daily dose of DXM is 120 mg.

The possible problems related to the abuse of drugs that contain an active substance, the possibility of presenting dissociative abilities, justify the development of new analytical methods.

In an initial phase, research was carried out on the physicochemical properties of the compounds. Subsequently, an attempt was made to develop an extraction method, using solid phase microextraction (SPME), to detect the analytes in blood. Two SPME-LC Tips fibers, C18 and PDMS/DVB fibers were tested. An experimental design, a Plackett Burman, was built to optimize the extraction process. PH was identified as one of the most influential variables.

The quantitative and qualitative analysis were performed resorting gas chromatography using two different mass analyzers: a flight analyzer (GC-TOF/MS) and a tandem mass spectrometer (GC/MS/MS), using a triple quadrupole.

During the work, it was necessary to replace the internal standard, initially chosen, as well as the use of analytical protectors, in an attempt to increase the chromatographic peaks of the compounds.

After performing several injections and analyzing the results throughout the experimental process, it was found that the use of whole blood had disadvantages such as dirt on the liner and tips fibers.

**Key words:** Dextromethorphan; Dextrorphan; Sample preparation; Analysis method; SPME LC-Tips; Whole blood;



## Índice

|   |    |
|---|----|
| Agradecimentos .....  | 5  |
| Certificado de originalidade .....                            | 7  |
| Resumo .....  | 1  |
| Abstract .....  | 3  |
| Índice de Figuras.....  | 7  |
| Índice de Tabelas .....                                       | 9  |
| Lista de abreviaturas .....                                   | 11 |
| 1. Introdução.....  | 13 |
| 1.1 Dextrometorfano .....                                     | 13 |
| 1.1.2 História, Consumo Abusivo e Comercialização .....       | 14 |
| 1.1.2.1 Introdução Histórica .....                            | 14 |
| 1.1.2.3 Consumo Abusivo .....                                 | 16 |
| 1.1.3 Farmacocinética e Farmacodinâmica .....                 | 17 |
| 1.2. Objetivos do trabalho .....                              | 20 |
| 2.1 Preparação da Amostra.....                                | 21 |
| 2.1.1 Microextração em Fase Sólida .....                      | 22 |
| 2.2 Métodos Cromatográficos .....                             | 25 |
| 2.2.1 Cromatografia gasosa (GC) .....                         | 26 |
| 2.2.2 Espectrometria de massa .....                           | 28 |
| 2.2.2.1 Quadrupolo.....                                       | 28 |
| 2.2.2.2 Triplo Quadrupolo .....                               | 29 |
| 2.3 Revisão Bibliográfica.....                                | 31 |
| 2.4 <i>Desenho Experimental</i> (DoE).....                    | 31 |
| 2.5 <i>Analyte protectants</i> (protetores de analitos) ..... | 32 |
| 3. Materiais e Métodos.....                                   | 35 |
| 3.1 Produtos Químicos e padrões.....                          | 35 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 3.2   | Preparação das soluções .....   | 35 |
| 3.3   | Extração por SPME .....   | 36 |
| 3.3.1 | Procedimento Experimental por Fibras <i>Tips</i> , C18 e PDMS/BVB .....       | 36 |
| 3.4   | Condições Cromatográficas .....   | 37 |
| 3.4.1 | GC-TOF/MS .....   | 37 |
| 3.4.2 | GC/MS/MS .....  | 37 |
| 4.    | Resultados e Discussão .....  | 39 |
| 4.1   | Considerações sobre os analitos.....  | 39 |
| 4.2   | Estudo em GC-TOF/MS.....  | 42 |
| 4.3   | Estudo em GC/MS/MS.....   | 46 |
| 4.4   | Estudo SPME com Fibras <i>Tips</i> .....                                      | 48 |
| 4.4.1 | Desenho Experimental (DoE) .....  | 48 |
| 4.4.2 | Resultados DoE.....   | 51 |
| 4.4.3 | Estudo da adição de <i>analyte protectants</i> (protetores de analitos) ..... | 59 |
| 5.    | Conclusão .....   | 65 |
| 6.    | Perspetivas Futuras .....   | 69 |
| 7.    | Referências bibliográficas .....  | 71 |
| 8.    | Anexos  |    |

## Índice de Figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Fórmula química do composto dextrometorfano. Adaptado da plataforma ( <a href="https://chemicalize.com/">https://chemicalize.com/</a> ).....   | 13 |
| Figura 2. Bissoltussin em pastilhas moles. Adaptado de <a href="https://farmacianovadamaia.pt/pt/tosse/13244-bisoltussin-105mg-pastilhas-moles-20-unidades.html">https://farmacianovadamaia.pt/pt/tosse/13244-bisoltussin-105mg-pastilhas-moles-20-unidades.html</a> ..... | 15 |
| Figura 3. Tussoral em xarope, 200 mL. Adaptado de <a href="https://farmacianovadamaia.pt/pt/tosse/15457-tussoral-133mgml-xarope-200ml.html">https://farmacianovadamaia.pt/pt/tosse/15457-tussoral-133mgml-xarope-200ml.html</a> .  | 15 |
| Figura 4. Ampola de separação Líquido-Líquido. Adaptado de ( <a href="https://qmc.ufsc.br/organica/exp7/liquido.html">https://qmc.ufsc.br/organica/exp7/liquido.html</a> ).....  | 22 |
| Figura 5. Esquema de um processo de extração em fase sólida. (Adaptado de (Vettorello et al., 2017) ).   | 22 |
| Figura 6. SPME-LC Tips (imagem da direita adaptado de <a href="https://www.sigmaaldrich.com/PT/en">https://www.sigmaaldrich.com/PT/en</a> ) .....  | 23 |
| Figura 7. Representação 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).  | 26 |
| Figura 8. Constituintes de um GC convencional. Adaptado de ( <a href="https://www.dctech.com.br/entendendo-um-sistema-de-cromatografia-gasosa-cg/">https://www.dctech.com.br/entendendo-um-sistema-de-cromatografia-gasosa-cg/</a> )....                                   | 26 |
| Figura 9. Sistema de GC/MS de quadrupolo simples. Adaptado de ( <a href="https://www.quimicasuprema.com/2019/07/espectrometria-de-massas.html">https://www.quimicasuprema.com/2019/07/espectrometria-de-massas.html</a> ) .....  | 29 |
| Figura 10. Sistema de GC/MS/MS de triplo quadrupolo. Adaptado de ( <a href="https://www.quimicasuprema.com/2019/07/espectrometria-de-massas.html">https://www.quimicasuprema.com/2019/07/espectrometria-de-massas.html</a> ) .....   | 30 |
| Figura 11. Aparelho de agitação, e dispositivo de suporte.....   | 37 |
| Figura 12. Fibras LC-Tips colocadas nos frascos das amostras para o processo de extração. ....   | 37 |
| Figura 13. Gráfico da hidrofobicidade dos analitos, obtido da plataforma Chemicalize. ....   | 42 |
| Figura 14. Detecção do composto DXM, na solução de concentração 0,02 $\mu\text{g/mL}$ . ....   | 45 |
| Figura 15. Detecção do composto DXO, na solução de concentração 0,02 $\mu\text{g/mL}$ .....  | 45 |
| Figura 16. Cromatograma Iónico Total (TIC) dos compostos, mais padrão interno, em modo full scan, presentes na solução a concentração de 50 $\text{ng/mL}$ . ....  | 46 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 17. Estudo das energias de ionização para o DXM e DXO, em que a variável dependente corresponde às de energias de ionização, e a variável independente às áreas dos picos cromatográficos. .... | 47 |
| Figura 18. Picos cromatográficos dos compostos, após retirada do qualifier: Em [A] análise com qualifier; [B] análise sem qualifier; .....   | 51 |
| Figura 19. Cromatograma dos compostos DXM, DXO e lidocaína. Extrato a Ph 10,5. 54  |    |
| Figura 20. Imagem do liner, após as injeções do DoE.....   | 54 |
| Figura 21. Gráficos com as razões das áreas dos picos do DXO/Lidocaína e do DXM/Lidocaína, respetivamente. ....  | 55 |
| Figura 22. Cromatograma do padrão interno lidocaína em interação com outro composto. ....  | 56 |
| Figura 23. Cromatograma contendo os três pesticidas e os analitos, DXM e DXO.....  | 57 |
| Figura 24. Gráfico das áreas dos picos do composto DXM, e duplicados.....  | 58 |
| Figura 25. Gráfico das áreas dos picos do composto DXO, e duplicados. ....   | 58 |
| Figura 26. O cromatograma [A] é referente às áreas dos picos antes da adição dos protetores analíticos, enquanto o [B] representa o cromatograma após a sua adição.....                                | 60 |
| Figura 27. Solução amostra precipitada devido ao excesso de sal [A]; Solução amostra sem precipitado, após reduzida a quantidade de sal [B]. ....  | 61 |
| Figura 28. Processo de extração final. ....  | 64 |

## Índice de Tabelas

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1. Relação dose-efeito relativamente ao consumo excessivo do composto dextrometorfano, tendo como referência uma pessoa “média” (United Nations Office on Drugs and Crime, 2017).....                | 19 |
| Tabela 2. Limites, gamas lineares e concentrações obtidas para os compostos (DXM e DXO) em estudos prévios. ....  | 31 |
| Tabela 3. Propriedades químicas do DXM e DXO, obtidas através da plataforma digital Chemicalize ( <a href="https://chemicalize.com">https://chemicalize.com</a> ). ....                                     | 35 |
| Tabela 4. Estrutura química, pka, e respetivo gráfico, do composto DXM obtido pela plataforma Chemicalize.....  | 40 |
| Tabela 5. Estrutura química, pka, e respetivo gráfico, do composto DXO, obtido pela plataforma Chemicalize.....   | 41 |
| Tabela 6. Tabela com as diferentes variáveis cromatográficas a otimizar, e respetivas possibilidades; .....   | 43 |
| Tabela 7. As seguintes tabelas resumem os resultados das médias e desvios padrões das áreas dos picos para cada variável em estudo, na análise do DXM e o DXO, nas matrizes biológicas sangue e urina. .... | 43 |
| Tabela 8. Resumo do estudo dos iões produto e das energias de ionização para o DXM e DXO, respetivamente.....   | 47 |
| Tabela 9. DoE desenvolvido para otimizar o processo de extração. ....   | 48 |
| Tabela 10. Tabela com os resultados da extração, que compara duas hipóteses.....  | 62 |
| Tabela 11. Representa o cálculo do desvio padrão e do RSD (%) para cada hipótese, e respetivo composto. ....  | 62 |
| Tabela 12. Cálculo do desvio padrão e RSD (%) de cada um dos pesticidas. ....   | 63 |



## Lista de abreviaturas

ACN- Acetonitrilo

C18- Octadecilo

DI-SPME- Microextração em fase sólida por imersão direta (do inglês *Direct Immersion Solid-Phase Microextraction*)

DXM- Dextrometorfano

DXO- Dextrorfano

GC/MS/MS- Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa em Tandem (do inglês *Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*)

GC-TOF/MS- Cromatografia gasosa hifenada à espectrometria de massa utilizando um analisador de tempo de voo (do inglês *Gas Chromatography-Time-Of-Flight/Mass Spectrometry*)

HS-SPME- Microextração em fase sólida por headspace (do inglês *Headspace Solid-Phase Microextraction*)

INFARMED- Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P.

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

MeOH- Metanol

MDMA- 3,4-metilenodioximetanfetamina (*ecstasy*)

MRM- Monitorização de Reações Múltiplas (do inglês *Multiple Reaction Monitoring*)

NMDA- *N*-metil-D-aspartato

PDMS- Polidimetilsiloxano

PDMS/DVB- Polidimetilsiloxano-divinilbenzeno

PTV- Vaporização com temperatura programada (do inglês *Programmed Temperature Vaporization*)

SIM- Monitorização de iões selecionados (do inglês *Selected Ion Monitoring*)

SNC- Sistema nervoso central

SPE- Extração em fase sólida (do inglês *Solid-Phase Extraction*)

SPME- Microextração em fase sólida (do inglês *Solid Phase Microextraction*)



## 1. Introdução

### 1.1 Dextrometorfano

O dextrometorfano (DXM) é um derivado morfínico sintético, quimicamente referido como 3-metoxi-17-meilmorfinano (**Figura 1**) (Ebeshi et al., 2014), e é a substância ativa de alguns medicamentos em Portugal, não sujeitos a receita médica, indicados no tratamento sintomático da tosse seca e irritativa (Infarmed, 2015). Este composto é ainda um análogo dextrorrotatório metilado do levorfanol e da codeína, sendo que o DXM não apresenta dependência física, e em doses baixas é considerado um fármaco seguro que não produz reações adversas (Amaratunga et al., 2016; Ebeshi et al., 2014).

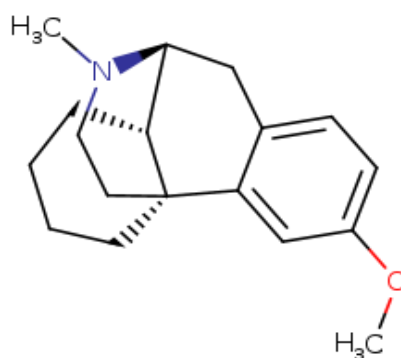


Figura 1. Fórmula química do composto dextrometorfano. Adaptado da plataforma (<https://chemicalize.com/>).

Para além do seu principal propósito, o DXM e o levorfanol, foram inicialmente ponderados como analgésicos alternativos à morfina na gestão de dor (Siu & Drachtman, 2007).

Também conhecido por “Triple C”, “Dex”, “Orange Crush” ou “Red Devils”, na sua forma de base livre, o DXM, apresenta-se como um pó inodoro cristalino de cor branca. Comercialmente é frequentemente encontrado como um sal hidrobromado (PUBCHEM, 2017; United Nations Office on Drugs and Crime, 2017).

Consentido pela *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) e presente no mercado há mais de 60 anos, quando tomado de acordo com as doses terapêuticas definidas é capaz de reduzir severamente a tosse seca e apresenta efeitos adversos mínimos. O problema associado a este composto surge quando a dosagem máxima estabelecida no rótulo é ultrapassada, pois o DXM passa a agir como uma droga alucinogénia dissociativa, produzindo efeitos semelhantes aos da cetamina, fenciclidina (PCP), entre outros (Bendriss et al., 2001; Brown et al., 2018).

Embora apresente semelhanças estruturais com os restantes agentes opióides, tais como a morfina e a heroína, o DXM não age nos recetores opióides. O seu mecanismo de ação, que lhe confere capacidade de antitússico e de controlo das condições do Sistema Nervoso Central (SNC), provém da ação antagonista não competitiva nos recetores *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA) e da sua ação agonista em recetores sigma-1 (Nguyen et al., 2016).

O composto DXM é convertido no seu principal metabolito ativo, o dextrorfano (DXO), através de uma *O*-desmetilação via CY2D6, e apresenta um tempo de semi-vida de 3,2 - 3,6 h (Cochems et al., 2007). Para além deste, o DXO também sofre um *N*-desmetilação, via CYP3A4, formando o metabolito inativo 3-metoxi-morfinano (3-MM) (Yu & Haining, 2001).

Estudos realizados em ratos apontam para um valor de LD<sub>50</sub> por via oral de 210 mg/kg (PUBCHEM, 2017).

## 1.1.2 História, Consumo Abusivo e Comercialização

### 1.1.2.1 Introdução Histórica

Tendo surgido pela primeira vez nos anos 50, o DXM tornou-se numa droga de abuso significativa que acabou por ser retirada do mercado. Numa tentativa de reduzir o consumo abusivo da mesma, os fabricantes começaram a redistribuir a substância numa formulação diferente que apresentava um gosto detestável para o consumidor. A diminuição nas vendas fez com que houvesse necessidade de melhorar o sabor da mesma, fazendo com que a substância voltasse a ser uma droga significativamente consumida, principalmente pelos mais jovens (Babu et al., 2005; Centers, 2022).

Embora seja utilizado como droga não sujeita a prescrição médica desde 1958, apenas recentemente foi considerada como uma substância de abuso em ascensão. O uso recreativo acabou por se tornar mais recorrente nos anos 90 (Spangler et al., 2016), provavelmente associado à rápida divulgação de informação através da *Internet*.

Apesar disto, estudos realizados pela *Consumer Healthcare Products Association*, referem que uma tentativa de atenuação do abuso é mais eficiente do que a programação controlada de substâncias ou mesmo a necessidade de receita médica para a sua utilização, uma vez que essa decisão apenas iria reduzir o uso lícito deste medicamento que apresenta benefícios no tratamento da tosse seca, que ultrapassam os seus riscos (Spangler et al., 2016).

### 1.1.2.2 Comercialização

De acordo com o *site* do [Infomed](http://Infomed), atualmente existem no mercado 16 medicamentos nos quais o DXM é a sua substância ativa. Estes medicamentos encontram-se todos direcionados para o tratamento sintomático da tosse seca e irritativa. Podem ser encontrado sob a forma de solução oral, pastilha mole ou xarope (Infarmed, 2015).

Na forma de pastilha mole existe o Bisoltussin (**Figura 2**), cuja dose máxima diária é de 12 pastilhas (126 mg de bromidrato de dextrometorfano). Em caso de automedicação, a administração deverá ser de 3-5 dias, e mesmo com aconselhamento médico, o tratamento não deverá ser superior a 2-3 semanas. O mesmo apontamento é recomendado para a solução oral de Bisoltussin (Infarmed, n.d.-b).

Na forma de xarope, a concentração de DXM varia entre 1 e 2 mg/mL, num máximo de 200 mL por frasco (Infarmed, n.d.-a), mas o facto de ser um medicamento não sujeito a receita permite ao consumidor comprar tanto quanto pretender. Um exemplo de medicamento em xarope é o Tussoral (**Figura 3**). No resumo das características do medicamento (RCM), é referido que a sua dose máxima é de 120 mg de bromidrato de dextrometorfano, equivalente a 8 copos medida. O consumo recomendado é de um copo medida por toma (corresponde a 15 mg de bromidrato de dextrometorfano), podendo ser repetido após 4 horas, em caso de necessidade. Este é um medicamento que apenas deve ser administrado em adultos ou adolescentes com idade igual ou superior a 15 anos (Infarmed, n.d.-c).

Em ambos os casos, é recomendada a precaução na toma destes medicamentos em adolescentes e jovens adultos, assim como doentes com historial de abuso de drogas ou substâncias psicoativas, devido a casos relatos de abuso e dependência de dextrometorfano.



Figura 2. Bissoltussin em pastilhas moles. Adaptado de <https://farmacianovadamaia.pt/pt/tosse/13244-bisoltussin-105mg-pastilhas-moles-20-unidades.html>.



Figura 3. Tussoral em xarope, 200 mL. Adaptado de <https://farmacianovadamaia.pt/pt/tosse/15457-tussoral-133mgml-xarope-200ml.html>.

O DXM não é tipicamente produzido em laboratórios clandestinos, exceto nos casos em que é adicionado ao MDMA ou até mesmo vendido como MDMA falso. No entanto, os utilizadores abusivos de DXM desenvolveram uma técnica de extração simples à base de ácido capaz de libertar a base, ou extrair o DXM da guaifenesina indesejada, agentes corantes, edulcorantes e álcool, geralmente incluídos nas preparações para a constipação (Hendrickson & Cloutier, 2007).

### 1.1.2.3 Consumo Abusivo

O abuso de doses elevadas de DXM está relacionado com uma procura de sentimentos de euforia, alucinações visuais e auditivas por parte dos seus utilizadores, que consomem quantidades que dependem do peso corporal e do efeito que pretendem alcançar. Os consumidores habituais desta substância ingerem normalmente 250 a 1,500 mg numa única dose, valores que excedem as recomendações dos rótulos das formulações farmacêuticas (United Nations Office on Drugs and Crime, 2017). O seu uso ilícito é conhecido popularmente como “Robo-tripping” ou “Skittling” (Amaratunga et al., 2016).

O DXM é psicoativo em doses superiores às encontradas nas preparações de supressão de tosse de venda livre. Apesar de apresentar um perfil de efeito subjetivo semelhante ao dos opiáceos agonistas-antagonistas (por exemplo, nalorfina e a pentazocina), os consumidores de opiáceos descrevem os efeitos de DXM como semelhantes ao dos barbitúricos, potenciando sintomas de embriaguez e nervosismo. Contrariamente aos opióides agonistas-antagonistas, o DXM não produz efeitos subjetivos semelhantes aos da morfina, independentemente da dose (Karch, 1997).

O consumo de comprimidos de cápsulas e de gel tem vindo a aumentar, visto serem produtos com altas doses de DXM, fáceis de obter, que não requer o consumo de grandes volumes de xarope com sabor desagradável, e práticos para o utilizador consumir em qualquer lugar e ao longo do dia (DEA, 2020; United Nations Office on Drugs and Crime, 2017). O DXM também está disponível sob a forma de pó, e o mesmo pode ser adquirido através da *Internet*, sendo que este apresenta riscos adicionais para o utilizador devido à dúvida em relação à sua composição e dosagem (United Nations Office on Drugs and Crime, 2017).

Os sintomas do abuso de DXM estão diretamente relacionados com as doses e podem diferir, desde perturbações do funcionamento motor, cognitivo e perceptivo até alucinações, similares a sonhos ou delírios com alucinações visuais e estados dissociativos que podem levar o utilizador a ter comportamentos agressivos (Stanciu et

al., 2016). Taquicardia, hipertensão, midríase, agitação, ataxia ou tontura, vômitos, confusão, temperatura elevada, boca seca, foram também alguns dos sintomas descritos (Banerji & Anderson, 2001).

O abuso de DXM ocorre em indivíduos de todas as faixas etárias, mas é mais recorrente em adolescentes e jovens adultos (Levy & Siqueira, 2014). O seu consumo como droga recreativa pode estar relacionado com a disponibilidade deste no mercado e pela imensa informação sobre “como” abusar desta substância, disponível na Internet (DEA, 2020).

### 1.1.3 Farmacocinética e Farmacodinâmica

A farmacocinética concentra-se no estudo de um determinado medicamento e da sua cinética metabólica no corpo (Ruiz-Garcia et al., 2008).

Após ingerido, o DXM é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal, atingindo concentrações plásticas máximas após 2,5 horas (Barnhart & Massad, 1979; Siu & Drachtman, 2007). Em seguida, o composto sofre um metabolismo de primeira passagem no fígado, pelo complexo enzimático citocromo P-450 CYP2D6 (CYP9) (Siu & Drachtman, 2007). Proveniente da metabolização, resulta o principal metabolito ativo responsável por toda a atividade biológica, o dextrofanano (DXO). O DXO é o resultado de uma O-desmetilação do DXM, catalisada pelo citocromo polimórfico P-450 CYP2D6. Atinge concentrações plasmáticas máximas em 1,6 a 1,7 horas após a ingestão. Para além deste, o DXO sofre também uma N-desmetilação, catalisada principalmente pelo citocromo P450 CYP3A4, formando o metabolito inativo 3-metoximorfinano (3MM) e 3-hidroximorfinano (Bendriss et al., 2001).

O DXM é um fármaco utilizado na avaliação da função do CYP2D6 devido ao facto de ser um medicamento de fácil acesso com efeitos adversos baixos. A sua atividade é calculada através da razão metabólica (MR) da concentração molar de DXM/DXO (Ebeshi et al., 2014; Streetman et al., 2000).

Vários polimorfismos podem ser encontrados no gene CYP2D6, sendo que a frequência dos alelos difere com a população específica examinada (Vuppalanchi, 2011). Existem quatro subpopulações que definem a taxa de metabolismo de droga pelo CYP2D6: metabolizadores extensivos (EM), imediatos/ultrarrápidos (UM), intermediários (IM) e os metabolizadores pobres (PM). Para além destas subpopulações, pode também ocorrer o gene estar ausente, tal como acontece em 5% a 10% da população caucasiana (Capon et al., 1996).

A principal via de eliminação do DXM é a O-desmetilação a DXO no fígado (Amaratunga et al., 2016), representando cerca de 50-60% do total da depuração plasmática do DXM. Dessa mesma percentagem, cerca de 20% de DXO é excretado sobre a forma de conjugado metabolito glucurónico (Logan et al., 2009).

A farmacodinâmica refere-se e estuda a parte do fármaco que é ingerida e que teve ação no recetor apropriado. Este processo engloba a ligação ao recetor, o efeito pós-recetor e as interações químicas que ocorrem. Posteriormente, a resposta farmacológica vai depender da ligação criada entre o fármaco e o seu alvo, sendo que a concentração do fármaco neste local vai influenciar o seu efeito. Fatores como o envelhecimento, outros fármacos ou até alterações fisiológicas associadas a alguma doença podem influenciar a farmacodinâmica de um fármaco (Hughes, 2016).

O mecanismo de ação do DXM e DXO deve-se ao facto de serem agonistas do N-metil-D-aspartato, dando origem a alucinações, euforia, dissociação, agitação ou até mesmo coma. Estes efeitos psicológicos são semelhantes aos da cetamina e da fenciclidina (PCP) em doses elevadas (Bendriss et al., 2001).

Subsequentemente, as propriedades antitússicas do dextrometorfano proveem da ação agonista nos recetores opióides sigma-1 e antagonista não competitiva nos recetores N-metil-D-aspartato (NMDA), que anestesia a garganta, e ainda confere efeitos psicoativos idênticos aos de outras drogas como o ácido lisérgico dietilaminda (LSD), cetamina ou psilocibina (Brown et al., 2018; Nguyen et al., 2016).

Com base em diversos estudos feitos relativamente ao aumento do consumo de DXO em doses elevadas, sabe-se que este composto apresenta uma janela terapêutica relativamente ampla e que os efeitos adversos ligeiros se resumem a febre, tonturas, vômitos/náuseas, diaforese e midríase. No entanto, quando ingerido em doses supra-terapêuticas os efeitos vividos incluem paranoia, desorientação, agressão, alucinações, delírios ou até mesmo insensibilidade à dor. Sintomas fisiológicos de diaforese, hipertermia ou taquicardia são também expectáveis (Stanciu et al., 2016; Wolfe & Caravati, 1995).

Os efeitos psicoativos do DXM são da inteira responsabilidade do DXO. Como já referido anteriormente, estes compostos são antagonistas dos recetores NMDA, apresentando semelhanças em relação à cetamina e ao PCP. Para além disso, e tal como a cetamina, o dextrometorfano também tem impacto nos transportadores de serotonina e nos recetores sigma-1, que podem ser responsáveis pelas propriedades antidepressivas comunicadas (Stanciu et al., 2016).

#### 1.1.4. Concentração Terapêutica e Concentração Abusiva

A dose terapêutica para o DXM, reportada na literatura, encontra-se compreendida entre 0,005 e 0,006 mg/L no sangue, enquanto a dose letal varia entre 3,3 mg/L e 9,5 mg/L, no sangue também (Shafi et al., 2016). Quando consumido dentro dos regimes terapêuticos de dosagem as concentrações de DXM no sangue encontram-se abaixo das 50 ng/mL. A gama de concentração plasmática para metabolizadores extensivos é de 0,5-5,9 ng/mL (média de 2,4) e de 182-231 ng/mL (média de 207) para metabolizadores pobres (Cochems et al., 2007).

A dose máxima diária recomendada de DXM é de 120 mg (Mayberry et al., 2020), sendo que a ingestão de quantidades superiores pode resultar em sintomas de intoxicação e efeitos secundários perigosos não desejados. A **tabela 1** enumera diferentes níveis dose-dependentes, experienciados por pessoas que abusam deste composto.

*Tabela 1. Relação dose-efeito relativamente ao consumo excessivo do composto dextrometorfano, tendo como referência uma pessoa “média” (United Nations Office on Drugs and Crime, 2017).*

| Dosagens de dextrometorfano (mg) | Sintomas  |
|----------------------------------|---|
| 100-200                          | Leve estimulação e euforia                          |
| 200-400                          | Sensação de euforia e alucinações mais fortes       |
| 300-600                          | Ausência de coordenação motora e distorções visuais |
| 500-1500                         | Sensações fora-do-corpo                             |

A intoxicação de qualquer dose acima da recomendada tem início num espaço de 15 a 30 minutos após a sua ingestão, à medida que o estômago vai digerindo a droga, e os seus efeitos podem se prolongar de 3-6 horas. Para doses de 1500 mg ou superiores, é esperado que o consumidor sofra uma *overdose* de dextrometorfano (Centers, 2022).

A duração de ação do DXM tomado por via oral é de 2 a 4 horas e a sua meia-vida de 6 a 29 (em caso de dose única) (Karch, 1997).

As concentrações sanguíneas são referidas como tóxicas a 0,1-2,8 mg/L e letais a 1,8-18 mg/mL (Logan et al., 2009).

A evolução do abuso do dextrometorfano na sociedade, o desconhecimento da sua capacidade toxicológica e de dependência psicológica por parte dos profissionais de saúde, e o fácil acesso ao mesmo, levam a que este composto seja uma substância de interesse de estudo, levando à valorização de processos de deteção do mesmo em

diferentes matrizes (Miller, 2005). Neste contexto, sentiu-se necessidade de desenvolver metodologias analíticas que possibilitem a sua monitorização em matrizes biológicas.

Uma vez que a concentração destas substâncias de abuso é vestigial em matrizes muito complexas, é usualmente necessário um passo de preparação da amostra antes do processo de análise instrumental. Isto permite extrair e concentrar os analitos alvo, de preferência procurando reduzir ou eliminar a coextração de potenciais interferentes da matriz, cuja análise instrumental deve ser minimizada ou evitada.

São várias as técnicas existentes que permitem a preparação da amostra, como é o caso das técnicas de extração líquido-líquido (LLE) e extração em fase sólida (SPE). Ambas apresentam como princípio a partição de solutos em duas fases, sendo que na técnica de LLE ocorre de uma fase líquida para outra, e na técnica de SPE existe interação de uma fase líquida com uma fase sólida. Contudo, as abordagens contemporâneas são maioritariamente baseadas na miniaturização dos processos e dispositivos analíticos, uma vez que permitem ter em conta os princípios da Química Analítica Verde (Pena-Pereira et al., 2020). Destas, destaca-se a microextração em fase sólida (SPME), em particular as novas configurações que têm surgido no mercado como as fibras SPME-LC *Tips*.

## 1.2. Objetivos do trabalho

São vários os problemas associados ao consumo de substâncias ilícitas e não ilícitas, mas apesar disso a sua procura não apresenta qualquer tipo de retrocesso. Por vezes, medicamentos disponíveis para venda, que não necessitam de receita médica, são utilizados como substitutos de substâncias de abuso, visto que a ingestão de doses acima das recomendadas leva ao aparecimento de sintomas semelhantes ao de drogas ilegais. Os riscos que o uso de medicamentos não sujeitos a prescrição médica acarretam, tornam essencial o desenvolvimento de métodos analíticos capazes de analisar e detetar estes “novos compostos de abuso”.

Na presente dissertação pretende-se numa primeira fase perceber mais sobre o consumo de uma substância ativa, o dextrometorfano, presente em medicamentos direcionados para o tratamento da tosse seca, e quais os sintomas apresentados pelos indivíduos que o ingerem de forma excessiva. Posteriormente, pretende-se estudar e desenvolver uma nova metodologia analítica, capaz de detetar esse mesmo composto, assim como, o seu metabolito maioritário, o dextrorfano, em sangue humano.

## 2. Metodologias Analíticas

### 2.1 Preparação da Amostra

A preparação de amostras biológicas antes da análise instrumental abrange etapas como a eliminação de compostos endógenos, a extração e a pré-concentração dos analitos (Silva, 2007). Este é um procedimento necessário devido à complexidade das matrizes das diversas amostras biológicas existentes, não sendo possível, na maior parte dos casos, a sua injeção direta nos sistemas analíticos. A preparação da amostra leva a que ocorra uma separação seletiva entre os compostos e a própria matriz. Esta etapa permite que a concentração dos compostos aumente, com o propósito de atestar os limiares analíticos de deteção e quantificação, e assim tornar-se exequível a sua identificação e quantificação (Ahmad, 2019; Smith, 2003).

O processo de extração deve procurar alcançar elevados níveis de reprodutibilidade, uma boa recuperação dos analitos e incluir o menor número de passos possíveis, preferencialmente passíveis de automatização, de forma também a reduzir a presença de contaminantes (Ferreira, 2015; Simões et al., 2014).

Atualmente, os métodos empregues na preparação de amostras biológicas para análise do DXM e DXO baseiam-se na técnica de extração líquido-líquido (LLE) e extração em fase sólida (SPE). A LLE (**Figura 4**), em inglês *Liquid-Liquid Extraction*, uma das primeiras na preparação de amostras para matrizes aquosas, baseia-se num processo de separação onde existe translação de um soluto de uma fase para outra, sendo ambas imiscíveis ou parcialmente imiscíveis entre si. Apresenta como desvantagem o enorme gasto de volumes de solventes orgânicos, alguns deles tóxicos, sendo a sua eliminação um problema para o ambiente, e o facto de ser uma prática demorada, visto ser geralmente realizada manualmente. (Ahmad, 2019)

Introduzida pela primeira vez na década de 70, a SPE (do inglês *Solid-Phase Extraction*) é hoje uma técnica de preparação de amostras muito utilizada (Mallet, 1998). Baseada nos princípios da cromatografia líquida, a SPE (**Figura 5**) envolve a partição de solutos entre duas fases, requerendo interatividade entre um líquido (solvente com analitos) e uma fase sólida (sorvente) (Biziuk, 2015). A SPE apresenta baixos tempos operativos, reprodutível e passível de automação, visto necessitar de menos manuseamento. Permite ainda uma diminuição do consumo de solventes orgânicos (Ferreira, 2015).

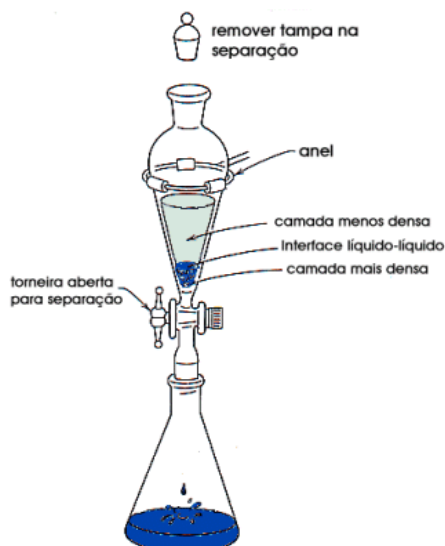


Figura 4. Ampola de separação Líquido-Líquido. Adaptado de (<https://qmc.ufsc.br/organica/exp7/liquido.html>).

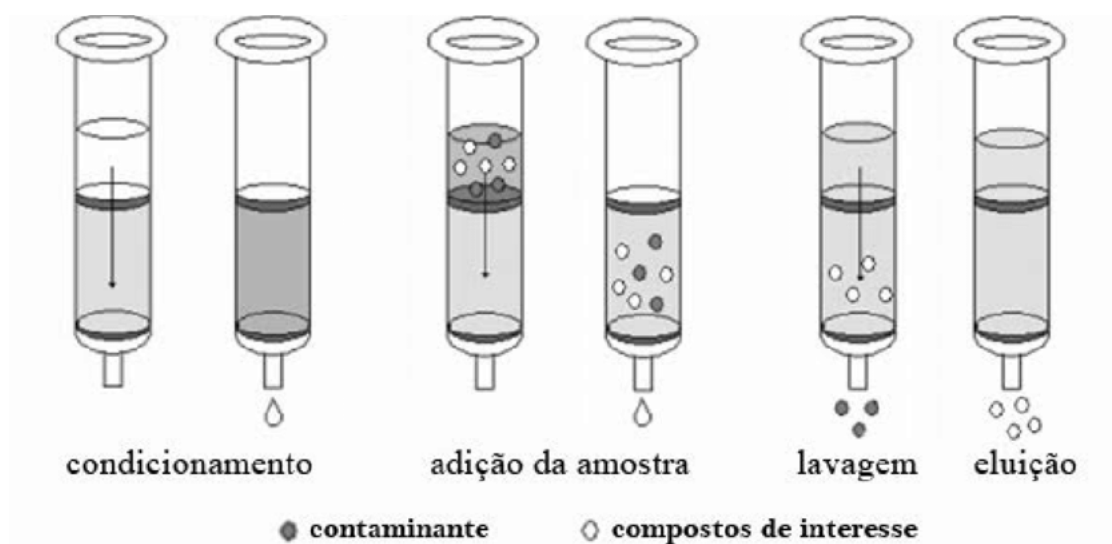


Figura 5. Esquema de um processo de extração em fase sólida. (Adaptado de (Vettorello et al., 2017)).

As técnicas de microextração têm vindo a ganhar relevo nas últimas décadas, uma vez serem mais fáceis de usar, requerem menor manuseamento, terem melhor custo-benefício e serem mais amigas do ambiente. Destas destaca-se a SPME.

### 2.1.1 Microextração em Fase Sólida

Introduzida pela primeira vez em 1990, por Pawlizyn juntamente com a sua equipa (Arthur & Pawlizyn, 1990; Merkle et al., 2015), a SPME (do inglês *Solid Phase Microextraction*) tornou-se operacionalmente numa técnica bastante atrativa, com diferentes aplicações, relatada na extração e análise de analitos em inúmeras áreas de estudo devido à sua simplicidade, à redução da quantidade de amostra analiticamente

necessária e ao facto de ser possível a reutilização de fibras de SPME (Ahmad, 2019; Ferreira, 2015; Ouyang & Pawliszyn, 2008).

O tradicional dispositivo de microextração consiste num suporte similar a uma seringa que contem uma fibra de sílica fundida revestida com um polímero ou um sólido adsorvente (Silva, 2007).

Esta é uma técnica de extração baseada no equilíbrio e na cinética de transferência que ocorre entre a fibra de sílica fundida revestida com uma fase “extratora” e os analitos presentes na matriz em estudo. Fatores como a agitação, o pH do meio, o *salting-out* (adição de sal), a temperatura e o tempo de extração são variáveis que podem influenciar a eficácia da extração (Ahmad, 2019; Ferreira, 2015).

A técnica de SPME encontra-se dividida em dois momentos: o primeiro momento diz respeito à extração do analito e o segundo à etapa em que os analitos podem ser desorvidos da fibra termicamente (dessorção térmica) ou mediante solvente num processo também conhecido por “retroextração”. A “retroextração” pode ser feita recorrendo a solventes compatíveis com as fibras, variando consoante os compostos alvo e o sistema instrumental usado na separação e quantificação dos analitos extraídos. A transferência dos analitos da matriz para fibra pode ser feita através de imersão direta da fibra em matrizes aquosas que contêm os analitos (DI-SPME) ou então indiretamente através da exposição da fibra à fase gasosa (*headspace*) de matrizes sólidas ou aquosas (HS-SPME) (Merkle et al., 2015).

Atualmente existem quatro *desenhos* de fibras disponíveis no mercado: SPME *Classic*, SPME-LC *Probe*, a SPME-LC *Tips* e a SPME-*Arrow*.

As SPME-LC *Tips* (**Figura 6**) fazem parte de uma configuração mais atual, correspondente a uma microfibras revestida, posicionada no lugar de uma ponta de micropipeta. Neste campo, até então, há dois tipos de revestimento para estas fibras, a C18 (octadecilo) a PDMS/DVB (Polidimetilsiloxano/divinilbenzeno).



Figura 6. SPME-LC *Tips* (imagem da direita adaptado de <https://www.sigmaaldrich.com/PT/en>).

As *tips* C18 são as mais recentes e têm na sua constituição partículas de sílica incorporadas num polímero patenteado, não-inflamável e biocompatível. As PDMS/DVB demonstram-se propícias na extração de analitos semi-voláteis ou voláteis relativamente polares.

Este tipo de pontas podem ser manipuladas de forma manual ou automática, podendo ser utilizadas em sistemas de 96 poços, em formato de bandeja, permitindo “extrações em escala” (Tips et al., 2015).

A SPME fundamenta-se no equilíbrio de partição do analito entre duas fases, como tal, a eficiência da mesma pode ser calculada teoricamente (Koziel et al., 2004). Quando o equilíbrio é estabelecido, e tendo em consideração que o volume de amostra é consideravelmente superior ao volume do material sorvente, a quantidade de massa dos analitos extraído pode ser calculada com base na equação (Ahmad, 2019):

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

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

A quantidade de analito absorvido ou adsorvido pela fibra relaciona-se linearmente com a concentração inicial do analito na amostra, permitindo assim, a análise quantitativa (Silva, 2007).

As SPME-LC *tips* para a análise de compostos orgânicos, apresentam como vantagens: não necessitar de usar grandes quantidades de solventes orgânicos; pequenas quantidades de amostra; rápido processo operacional; permite automatização possibilitando análises de elevado rendimento; permite a extração e pré-concentração direta e indireta dos analitos em matrizes sólidas, líquidas e gasosas; permite a execução de análises no local de amostragem ou *in vivo* (J. Pawliszyn, 2000; Janusz Pawliszyn, 2007).

Tanto o SPME clássico como a SPME-LC *tips* são métodos de extração por equilíbrio, pelo que não será possível a recuperação total dos analitos.

O desenvolvimento de qualquer processo de SPME requer uma otimização de variáveis, tais como: fase da fibra extratora, temperatura e tempo de extração e retroextração, pH da matriz e *salting-out*, tal como será apresentado mais à frente.

## 2.2 Métodos Cromatográficos

Em 1906 surgiu pela primeira vez o termo “cromatografia” utilizado pelo botânico russo Mikhail S. Tswett (Ettre, 2000). As duas técnicas cromatográficas mais utilizadas na análise qualitativa e quantitativa em amostras complexas são a cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O seu aparecimento simbolizou um enorme avanço tecnológico e são atualmente imprescindíveis em inúmeras áreas.

No processo cromatográfico a separação de compostos presentes numa mistura é feita entre duas fases: a fase estacionária e a fase móvel. A fase estacionária encontra-se situada numa coluna ou numa superfície sólida, e pode ser sólida ou líquida. Por outro lado, a fase móvel tanto pode ser líquida como gasosa ou até mesmo um fluido supercrítico.

Na cromatografia de partição, o fenómeno da separação de compostos ocorre de velocidades a que os compostos são arrastados na fase móvel, ocasionadas pelas diferentes interações com a fase estacionária, levando a que ocorram diferentes distribuições no equilíbrio das duas fases. As concentrações relativas de um composto para com a fase estacionária ( $C_S$ ) e fase móvel ( $C_M$ ) relacionam-se através do coeficiente de distribuição ( $K$ ), formando a seguinte equação:

$$K = \frac{C_S}{C_M}$$

A diferença de velocidades explicasse com base na afinidade dos analitos para com a fase estacionária (presente na coluna) e a fase móvel. Uma menor afinidade à fase estacionária resulta numa eluição mais rápida dos compostos, saindo em primeiro lugar. O contrário ocorre quando os compostos apresentam uma afinidade para com a fase estacionária, agarram-se à fase, eluem de forma lenta, logo o tempo de saída da coluna é maior. Ou seja, um analito que não fique retido na coluna é eluído no tempo morto ( $t_M$ ), enquanto o composto que fica retido eluirá mais tarde, apresentando um tempo de retenção ( $t_R$ ) superior. O tempo que o composto despense na fase estacionária é conhecido como o tempo de retenção ajustado ( $t_E$ ) (**Figura 7**).

Desta forma, não é possível realizar uma separação sem que existam diferenças de distribuição entre os componentes. (Ahmad, 2019)

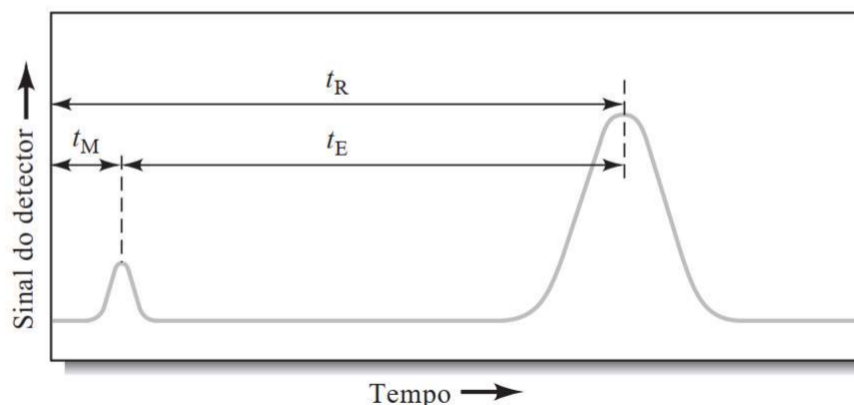


Figura 7. Representação do tempo morto ( $t_M$ ), do tempo de retenção ajustado ( $t_E$ ) e do tempo de retenção ( $t_R$ ) num cromatograma. Adaptado de (Skoog et al, 2006).

### 2.2.1 Cromatografia gasosa (GC)

Em cromatografia gasosa (GC), existe um gás inerte, a fase móvel, responsável por transportar a amostra ao longo da coluna contendo a fase estacionária sem que exista interação deste com a mesma. O hélio, o azoto e o hidrogénio são os gases geralmente utilizados. O sistema GC apresenta na sua constituição um injetor, uma coluna cromatográfica, que se encontra inserida num forno, e um detetor. Atualmente, todos os constituintes são controlados através de um *software* adequado (Ahmad, 2019). Na **figura 8** encontra-se representado um esquema dos componentes de um sistema GC.

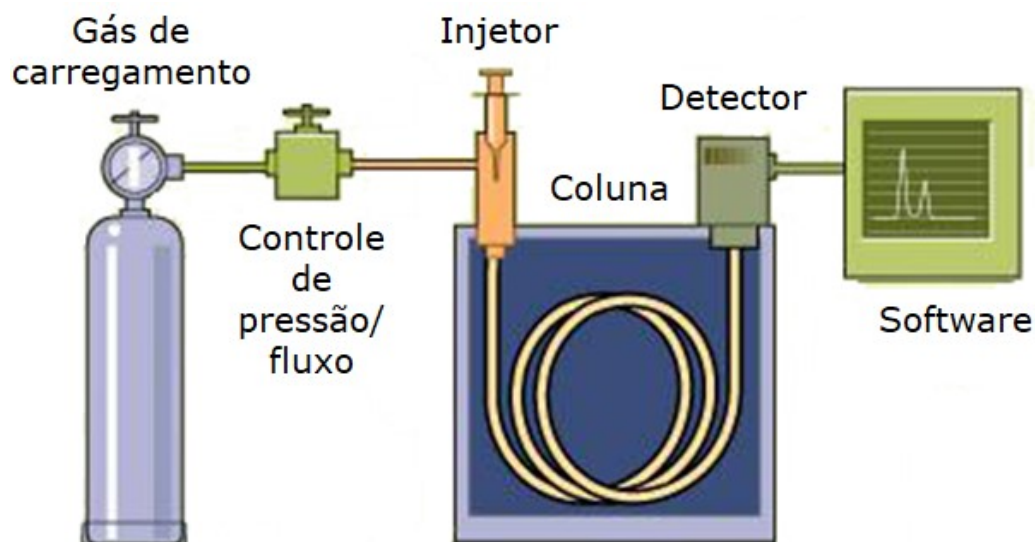


Figura 8. Constituintes de um GC convencional. Adaptado de (<https://www.dctech.com.br/entendendo-um-sistema-de-cromatografia-gasosa-cg/>).

Numa típica injeção em GC, a amostra líquida, é inserida no injetor, sendo os seus componentes e o seu solvente vaporizados, misturados com o gás de arraste, e introduzidos na coluna.

São vários os modos de injeção existentes em GC, sendo que os mais utilizados são os sistemas por temperatura constante (isotérmica), que podem ser com (*split*) ou sem (*splitless*) repartição da amostra e o modo de vaporização com temperatura programada (em inglês *Programmed Temperature Vaporization*, PTV). Em modo *split*, através de um sistema de válvulas, apenas parte da amostra entra na coluna, sendo que a divisão da amostra é determinada por meio da relação entre a quantidade de gás de arraste que abandona o injetor pela válvula de *split* e o fluxo na coluna (razão de *split*). No modo *splitless* grande parte da amostra injetada é arrastada para a coluna. Por fim, o modo PTV possibilita a injeção de grandes volumes (normalmente até 100  $\mu\text{L}$ ), permitindo assim maior sensibilidade analítica. Com esta configuração, após a injeção e evaporação do solvente a uma temperatura comparativamente baixa, a câmara do injetor é aquecida balisticamente a temperaturas elevadas e os analitos são transferidos para a coluna, onde se sucede a separação dos componentes. (Ahmad, 2019; Ettre, 2000)

A coluna cromatográfica situa-se dentro de um forno, e pode ser de dois tipos: de empacotamento ou capilar. A coluna de empacotamento contém uma fase estacionária totalmente compactada composta por partículas finas. Já as colunas capilares apresentam na sua constituição um tubo de sílica fundida, com um revestimento exterior em poliimida e a fase estacionária a revestir a parede interna. Com o passar dos anos as colunas de empacotamento têm vindo a ser substituídas pelas colunas capilares, devido ao seu elevado poder de eficiência e resolução. (Ahmad, 2019; Ettre, 2000)

As fases estacionárias líquidas mais usadas são as que contêm polissiloxano, sendo que o tipo e a percentagem de grupos substituintes permitem diferenciar cada fase em termos de seletividade e ditar as características de polaridade. A fase mais comum é o polidimetilsiloxano (PDMS) apresentando características apolares.

Desta forma, e visto que a coluna se encontra dentro do forno com temperatura programável, pode-se optar por operar em modo isotérmico ou em gradiente de temperatura. Este último é o mais usado, através de rampas de temperatura, onde podem ser feitos aumentos térmicos progressivos constantes ou a diferentes velocidades e tempos diferenciados com a hipótese de etapas isotérmicas no princípio, no decorrer ou no fim da corrida cromatográfica. (Ahmad, 2019; Ettre, 2000)

Por fim, o último componente do GC é o detetor. Incumbindo de emitir o sinal, o detetor traduz a modificação da resposta em função da composição e/ou propriedades dos componentes eluídos.

No presente encontram-se disponíveis diversos detetores consoante as aplicações pretendidas, tais como, os detetores de ionização de chama, de condutividade térmica, de captura eletrónica, de azoto-fósforo e ainda MS. (Ahmad, 2019; Ettre, 2000)

### 2.2.2 Espectrometria de massa

A junção de um cromatógrafo gasoso (GC) ao espectrómetro de massa (MS) permite a combinação dos prós inerentes das técnicas cromatográficas com as vantagens da espectrometria de massa. Desta junção resulta uma alta seletividade e eficiência de separação (Cromatografia), assim como, a aquisição de informação estrutural e um aumento adicional de seletividade (MS).

Primeiramente, a amostra é inserida no injetor de GC, que separa os seus componentes na coluna, que depois entram na câmara de ionização, onde são intercetados por um feixe de eletrões, ocorrendo a sua ionização e consecutivamente fragmentação. Os iões formados são desviados e acelerados em direção ao analisador de massa, por meio de um campo elétrico, que os separa conforme a razão massa/carga ( $m/z$ ). Os analisadores mais comuns são o quadrupolo e o tempo de voo (TOF, time-of-flight).

O acoplamento do MS a um cromatógrafo apresenta como vantagem a capacidade de este reagir a todos os compostos orgânicos, voláteis e semi-voláteis. (Ahmad, 2019)

#### 2.2.2.1 Quadrupolo

Um espectrómetro de massa de quadrupolo é um instrumento de relativamente baixo custo, tolerante a elevadas pressões, que se encontra ligado, em paralelo, a um gerador de radiofrequência e a uma potencial de corrente contínua. Num campo de radiofrequência específico, os iões com diferentes massas, que entrem em conjunto no analisador, são expelidos de acordo com as suas massas de modo a se obter o espectro (Hoffmann & Stroobant, 2007).

Atualmente, a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS) é uma das técnicas mais promissoras capazes de fornecer um método de deteção ultra seletivo de compostos-alvo em matrizes complexas a níveis residuais (amostras biológicas, metabolitos, vestígios de drogas e outros vestígios em amostras

forenses). Apresenta como vantagens o incremento da detetabilidade, uma diminuição da interferência espectral dos compostos existentes na matriz e ainda um aumento da quantidade de informação estrutural possível de ser obtida (Hübschmann, 2015; Skoog, D. A., Crouch, F., Holler, J., 2006; Truta, 2012).

Na imagem a baixo encontra-se representado uma imagem do analisador de massa (**Figura 9**).

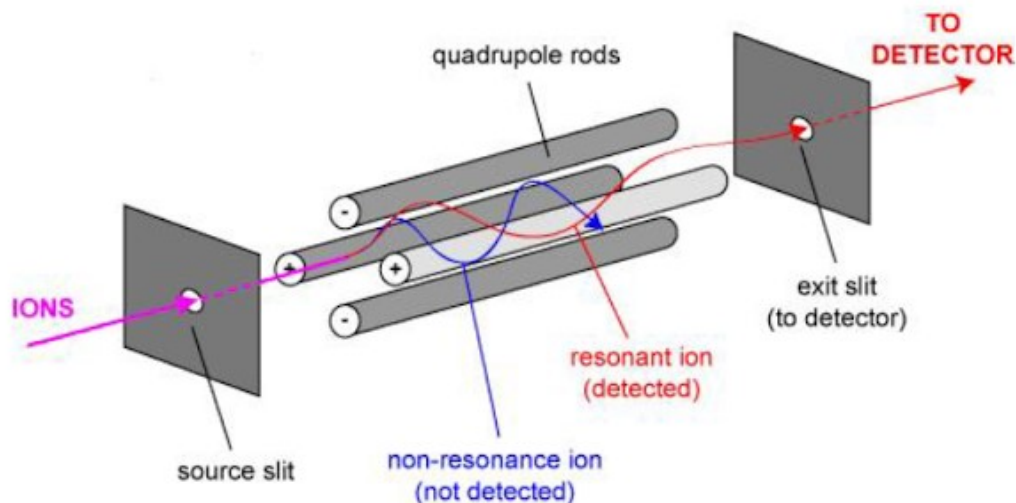


Figura 9. Sistema de GC/MS de quadrupolo simples. Adaptado de (<https://www.quimicasuprema.com/2019/07/espectrometria-de-massas.html>)

#### 2.2.2.2 Triplo Quadrupolo

A espectrometria de massa MS/MS é uma técnica espectrométrica que utiliza dois estágios de espectrometria de massa, MS<sub>1</sub> e MS<sub>2</sub>. Um dos estágios tem como propósito o isolamento do íon de interesse (íon precursor) e o outro é usado para instituir uma relação entre o íon obtido e os íons gerados através da sua decomposição induzida (íons produto) (Truta, 2012).

O analisador triplo quadrupolo (**Figura 10**) é um instrumento que possui na sua constituição três quadrupolos em série. Quando utilizado em modo *tandem*, o primeiro quadrupolo (Q<sub>1</sub>) e o terceiro quadrupolo (Q<sub>3</sub>) são utilizados como analisadores de massa, enquanto o segundo quadrupolo (Q<sub>2</sub>) é utilizado como célula de colisão (CC). Ou seja, o Q<sub>2</sub> em vez de separar íons com base na razão m/z, é responsável por fragmentar os íons selecionados, no Q<sub>1</sub>, através de um processo de dissociação induzida por colisão (do inglês, *Collision Induced Dissociation*) com um gás inerte (como por exemplo argon, hélio ou azoto). Após fragmentados, os íons produzidos são encaminhados para o Q<sub>3</sub> (Sparkman, O. D., Penton, Z. E., Kitson, 2011; Truta, 2012).

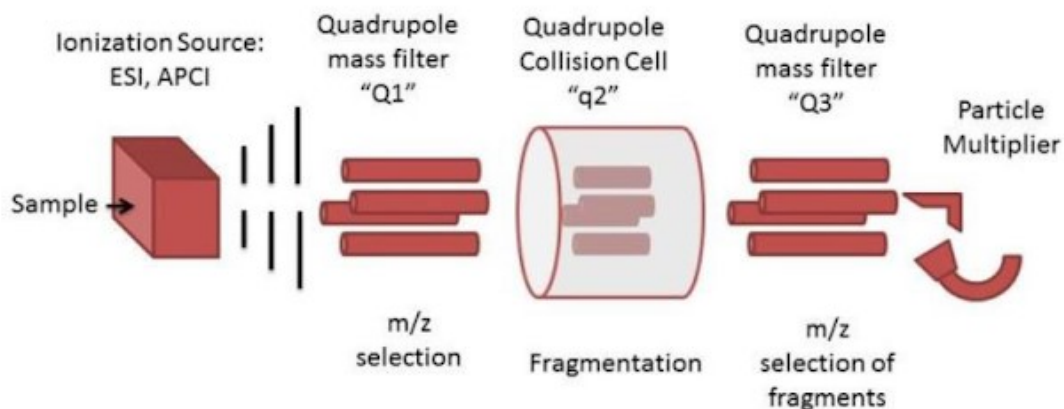


Figura 10. Sistema de GC/MS/MS de triplo quadrupolo. Adaptado de (<https://www.quimicasuprema.com/2019/07/espectrometria-de-massas.html>)

O modo *scan* do íon produto utiliza Q<sub>1</sub> como um filtro de massa, permitindo a passagem de uma única razão *m/z* pretendida. O Q<sub>3</sub> opera em modo *full scan*, obtendo-se um espectro dos produtos de dissociação do íon precursor. O modo *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) permite a monitorização de duas ou mais transições em simultâneo.

Em MRM, os dois analisadores funcionam de forma análoga ao modo SIM (*Selected Ion Monitoring*). No Q<sub>1</sub> passa o íon precursor (de *m/z* específico), que prossegue para o Q<sub>2</sub>, onde sofre uma dissociação por colisão. Após a fragmentação, chega ao Q<sub>3</sub> o íon produto com a massa molecular pretendida, seguindo depois para o detetor. (Truta, 2012)

### 2.3.2.3 Tempo de Voo

Este tipo de analisador de massa separa os íões com base no tempo que estes levam a percorrer o analisador. Quanto menor a massa molecular do íão, maior é a rapidez com que estes percorrem o analisador.

Numa fase inicial, os íões recebem todos a mesma energia cinética ( $E_c$ ), possibilitando assim analisar a rapidez com que os íões viajam pelo detetor. Íões que apresentam um *m/z* mais baixo, viajam mais depressa, chegando ao detetor primeiro. Presentemente, os instrumentos GC-TOFMS encontram-se equipados com um refletor que concentra a distribuição de  $E_c$ , proveniente de pequenas diferenças na velocidade inicial. (Hübschmann, 2015)

## 2.3 Revisão Bibliográfica

Antes de se proceder ao desenvolvimento do método, fez-se um estudo da literatura existe acerca de técnicas de microextração usadas anteriormente no rastreio dos analitos alvo. Na **tabela 2**, encontra-se um resumo de alguns trabalhos realizados, sendo que de cada um deles foram retiradas as seguintes informações: técnica de microextração usada para DXM e DXO, a matriz biológica, o instrumento de deteção utilizado e o limite de deteção (LOD) obtido.

Tabela 2. Limites, gamas lineares e concentrações obtidas para os compostos (DXM e DXO) em estudos prévios.

| Referência Bibliográfica | Matriz Biológica | Composto | LOD (ng/ml) | LOQ (ng/ml) | LLOQ (ng/ml) | Gama linear (ng/ml) | Concentrações obtidas (ng/ml) |
|--------------------------|------------------|----------|-------------|-------------|--------------|---------------------|-------------------------------|
| Amaratunga et al., 2016  | Saliva           | DXM      | 0,016       | -           | 5            | 2-100               | 5,9-2713,4                    |
|                          |                  | DXO      | 0,037       |             |              |                     | 2,1-308,4                     |
| Antunes et al., 2014     | Plasma           | DXM      | -           | -           | 1            | 1-250               | -                             |
|                          |                  | DXO      |             |             | 10           | 10-2500             |                               |
| Bagheri et al., 2005     | Plasma           | DXM      | 0,01        | -           | -            | 0,03-2000           | -                             |
|                          |                  | DXO      | 0,015       |             |              | 0,05-2000           |                               |
| Ebeshi et al., 2014      | Urina            | DXM      | 20          | -           | 50           | 200-5000            | 190-1780                      |
|                          |                  | DXO      |             |             |              |                     | 180-2110                      |
| Kim et al., 2006         | Urina            | DXM      | 50          | 100         | -            | 100-2000            | 160-5,263×10 <sup>4</sup>     |
|                          |                  | DXO      |             |             | -            |                     | 410-2,375×10 <sup>4</sup>     |
| Lutz et al., 2004        | Urina            | DXM      | 0,52*       | 1,3*        | -            | 1,3-520*            | -                             |
|                          |                  | DXO      |             |             | -            |                     |                               |
|                          | Saliva           | DXM      | 0,104*      | 0,26*       | -            | 0,26-104*           | 0,286-228,8                   |
|                          |                  | DXO      |             |             | -            |                     | 0,078-39                      |
| Rodrigues et al., 2008   | Urina            | DXM      | 1           | 10          | -            | 10-100              | 2,2-803                       |
|                          |                  | DXO      |             |             | -            |                     | 3,8-2918                      |
|                          | Saliva           | DXM      |             |             | -            |                     | 0,9-76,6                      |
|                          |                  | DXO      |             |             | -            |                     | 1,4-11,3                      |

\* Conversão feita com base no pressuposto de que 5 pmol/ml corresponde aproximadamente a 1,3 ng/mol;

\*\* No processo de extração realizou-se hidrólise;

\*\*\* Utilizou-se um detetor de fluorescência

Tendo em conta a pesquisa realizada é possível observar que até então o tipo de matriz utilizada para detetar os compostos, variou entre urina, plasma e sangue, para ambos os analitos. Os níveis de deteção obtidos encontravam-se todos na gama na ng/mL.

Relativamente ao que se tentou realizar neste projeto, ou seja, estudar a deteção dos compostos DXM e DXO, utilizando como matriz biológica o sangue total, não se encontraram artigos que tivessem realizado testes nestas mesmas condições, de modo a poderem ser utilizados como meio de comparação.

## 2.4 Desenho Experimental (DoE)

A capacidade que um método tem de separar, identificar e quantificar uma espécie com sucesso, depende de inúmeros fatores, que muitas vezes só são detetados em

momentos experimentais, após diversas repetições, num processo de busca pelas condições favoráveis para um determinado composto.

A necessidade de tornar este processo mais eficiente, não só ao nível do tempo como também de desperdício e custo, originou uma procura por formas mais inteligentes e eficientes de otimizar um método, que envolvessem um menor número de experiências. Surgiu então o *desenho experimental* (DoE).

O DoE é baseado numa abordagem estatística para a otimização de um método, que permite avaliar diversos parâmetros em simultâneo num número reduzido de experiências, com o objetivo de encontrar os valores ideais para as variáveis em estudo.

Cada um dos métodos que podem ser considerados como *desenho experimental* apresentam uma abordagem em que os dados multivariados podem ser ajustados a uma função empírica, usualmente linear ou quadrática, com termos de interação, que podem ser utilizados para fornecer informações sobre o sistema, (máximos e mínimos, tendências à medida que se vão alterando os parâmetros, etc.). Esta abordagem estatística é então utilizada para escolher os valores de cada fator, com o propósito de gerar os dados de modo a maximizar a informação sobre os parâmetros da função.

Uma das vantagens de o DoE é o facto de ser possível determinar o número de experiências que vão ser necessárias antes de qualquer trabalho prático ser realizado.

No decorrer deste trabalho foram desenvolvidos dois desenhos experimentais: um utilizado no processo de otimização das condições cromatográficas do GC-TOF/MS; e o segundo para otimizar as condições de extração dos analitos da matriz biológica. Em ambos os desenhos experimentais utilizou-se um *Plackett Burman*. Este tipo de desenho requer  $4n$  experiências, para se investigar um máximo de  $4n-1$  fatores com dois níveis. O símbolo  $n$  diz respeito ao número de variáveis que se pretende otimizar.

(Hibbert, 2012)

## 2.5 *Analyte protectants* (protetores de analitos)

O termo protetor analítico refere-se a um conjunto de compostos com capacidade de interagir com os centros ativos presentes na coluna do sistema cromatográfico. Ao se “mascarar” os centros ativos, está-se a facilitar a passagem de composto de interesse pela coluna. Para além disso, ajudam na redução substancial da acumulação de componentes da matriz não voláteis em GC.

Num estudo realizado acerca do tema, foram avaliadas diferentes combinações de possíveis protetores analíticos, e identificou a combinação de sorbitol, gluconolactona e glicetol etílico como a mais eficiente na minimização de perdas de analito e na melhoria do formato de picos cromatográficos, devido à redução de *tailing* (Maštovská et al., 2005).

Nesta dissertação a utilização de protetores analíticos relacionou-se com a tentativa de aumentar os picos cromatográficos que se encontravam abaixo do expectável.



### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Produtos Químicos e padrões

Para o desenvolvimento deste projeto adquiriram-se as soluções padrão de dextrometorfano (DXM) e dexrorfano (DXO), da Sigma- Aldrich (Steinheim, Alemanha) e da Cerrillant (Round Rock, Texas, EUA), respetivamente. A solução padrão de lidocaína também era da marca Sigma- Aldrich (Steinheim, Alemanha). A **tabela 3** resume as propriedades dos dois compostos em estudo. Os três pesticidas, o diflufenican, tebuconazole e o terbuthylazine) assim como, os protetores analíticos (ethylglycerol, gluconolactona e o sorbitol) foram obtidos da Sigma-aldrich (Steinheim, Alemanha) e são de grau analítico.

*Tabela 3. Propriedades químicas do DXM e DXO, obtidas através da plataforma digital Chemicalize (<https://chemicalize.com>).*

| <b>Composto</b> | <b>Fórmula Química</b>             | <b>Massa Molar (g/mol)</b> |
|-----------------|------------------------------------|----------------------------|
| Dextrometorfano | C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO | 271.404                    |
| Dexrorfano      | C <sub>17</sub> H <sub>23</sub> NO | 257.377                    |

As amostras de sangue utilizadas foram fornecidas por dois voluntários, que consentiram a sua utilização e garantiram a não ingestão do composto principal. A referenciação destas duas amostras fez-se utilizando a expressão “amostra branca de sangue 1” e “amostra branca de sangue 2”. A amostra de urina seguiu as mesmas condições, e é referida no como “amostra branca de urina”.

Os solventes, os pesticidas e os protetores químicos foram adquiridos através Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) e são de grau analítico. Tanto o acetonitrilo (ACN) como o metanol (MeOH) foram HPLC *gradient grade*. A água utilizada no processo de extração dos analitos desionizada e purificada com um sistema Mili-Q *plus* da Millipore (Massachusetts, EUA). As micropipetas usadas com volumes compreendidos entre 2 e 1000 µL são da marca Labnet, e as pontas de plástico das micropipetas da marca DELTALAB.

#### 3.2 Preparação das soluções

Os padrões de lidocaína e DXM encontravam-se sob a forma de pó em frascos de vidro. Pesou-se 5 mg de cada um dos compostos e diluiu-se em 5 mL de metanol,

atingindo-se uma concentração final de 1 mg/mL. O padrão de DXO encontrava-se sob a forma líquida numa ampola de vidro, a concentração de 1 mg/mL. Esta solução foi diluída em 5 mL de metanol, ficando a concentração final de 0,2 mg/mL. As soluções foram conservadas no congelador. A escolha do metanol para solvente baseou-se no facto de este ser um solvente comum e com preço acessível. Em contrapartida, é o tipo de solvente que pode apresentar alguns problemas na fase estacionária, em análises em GC.

De forma a terem concentrações iguais, as três soluções foram diluídas primeiramente de 1/10, e de seguida, as soluções de DXM e lidocaína foram diluídas novamente de 1/5, para no fim se obter uma concentração de 0,02 mg/mL para os três compostos.

### 3.3 Extração por SPME

#### 3.3.1 Procedimento Experimental por Fibras *Tips*, C18 e PDMS/BVB

As fibras de SPME LC-*tips* com os revestimentos PDMS/DVB e C18 foram fornecidas pela Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha).

Antes de cada utilização, as LC-*tips* foram lavadas em metanol ou acetonitrilo durante 10 minutos, e posteriormente reequilibradas em água ultrapura durante 10 minutos, sempre em constante agitação.

Os ensaios de extração por SPME, com as fibras-*tips*, realizaram-se recorrendo a um dispositivo de suporte (*holder*) onde se colocaram os *vials* de 2 mL da marca ABDOS LABTECH (Uttrakhand, Índia). O suporte era depois colocado em cima do aparelho de agitação (**figura 11**) da marca Bunsen (Madrid, Espanha). Numa fase inicial, os *vials* foram preenchidos com 0,2 mL de amostra branca de sangue mais 1,3 mL de solução tampão bicarbonato de potássio com hidróxido de sódio. Com recurso a um *desenho* experimental, realizaram-se diversos ensaios testando diferentes hipóteses para várias variáveis.

A fixação das LC-*tips* nos *vials* para realizar extração foi feita com recurso a pontas de micropipetas de plástico, tal como se encontra demonstrado na **figura 12**. Para garantir o contacto entre a fibra e o extrato foi necessário selar os frascos com tampas de orifício com septos de silicone revestidos com PTFE (Supelco, PA, EUA) mas já cortados, sendo assim possível inserir as fibras sem que as mesmas se partissem. A retroextração foi realizada por dessorção líquida, as fibras foram submersas em metanol ou acetonitrilo, a temperatura controlada ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ).



Figura 11. Aparelho de agitação, e dispositivo de suporte.

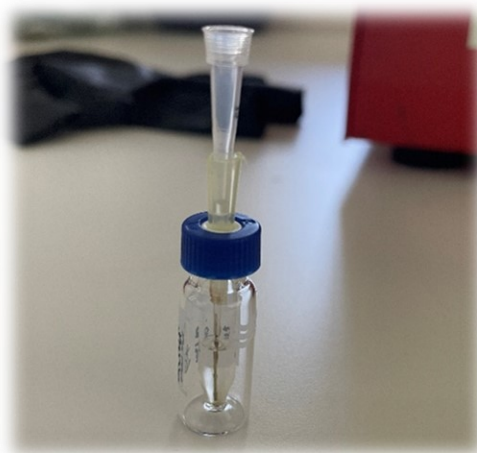


Figura 12. Fibras LC-Tips colocadas nos frascos das amostras para o processo de extração.

### 3.4 Condições Cromatográficas

#### 3.4.1 GC-TOF/MS

O aparelho de análise foi um Leco Pegasus® BT GC-TOFMS (LECO Corp., Saint Joseph, MI, USA). O injetor automático utilizado foi um PAL3 (CTC Analytics AG, Zwingen, Suíça). Os dados adquiridos foram processados pelo *software* ChromaTof (LECO Corp., Saint Joseph, MI, EUA). As injeções foram feitas, num injetor MMI (Multi-Mode Inlet), operado em modo PTV, com um volume de injeção de 5  $\mu$ L, sendo que a temperatura inicial estava a 90°C durante 0,5 minutos, com fluxo de *split* de 60 mL/min, de seguida a válvula de *split* era fechada por 90 segundos seguido de um aumento de temperatura até aos 290°C a 700°C/min. Por fim, o fluxo de *split* foi aberto a 15 mL/min até ao fim da corrida. O solvente de lavagem foi o acetonitrilo. O fluxo da purga do septo foi configurado em 3 mL/min, e a coluna a um fluxo constante de 1,2 mL/min durante toda a corrida. O gás de arraste escolhido foi o hélio, da marca Alphagaz a 99,9999%. Para o forno o programa estabelecido foi: 60°C durante 1 minuto seguido de um aumento de temperatura de 20°C/min até aos 180°C; de seguida 5°C/min até aos 240°C; e por fim, um aumento de temperatura de 20°C/min até aos 300°C. A temperatura do MS *Transfer Line* foi programada para os 300°C. A temperatura do quadrupolo encontrava-se a 40°C e a da fonte 250 °C. A energia de ionização foi de 70 eV.

#### 3.4.2 GC/MS/MS

A análise foi realizada num sistema GC/MS constituído por um Bruker GC 456 acoplado a um detetor Bruker Scion TQ (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). O injetor automático utilizado foi o CTC Analysis Autosampler CombiPAL. Os dados foram

adquiridos através do *software* MSWS 8.2 Bruker e analisados no Bruker MS Data Review 8.0 (Bruker Daltonics). Fornecido pela Phenomenex, (Torrance, CA, USA), utilizou-se a coluna capilar ZB-5MS (30 m × 0,25m i.d., 0,25 µm). As injeções foram feitas, num injetor PTV (1079 Temperature Programmable Split/Splitless Capillary Injector), operado em modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), com um volume de injeção de 5µL. A programação da temperatura do forno realizou-se da seguinte forma: 60°C durante 3,50 minutos, seguido de um aumento de temperatura de 20°C/min até aos 180°C; de seguida 5°C/min até aos 240°C; e por fim, um aumento de temperatura de 20°C/min até aos 300°C durante 1,5 minuto. Fazendo assim um total de corrida de 26 minutos. O hélio foi o gás de arraste utilizado com um fluxo constante de 1,2 mL/min. A temperatura do MS *Transfer Line* foi programa para os 300°C. A temperatura do quadrupolo encontrava-se a 40 °C e a da fonte a 270°C. A energia de ionização foi de 70 eV.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Considerações sobre os analitos

Inicialmente foram analisadas as propriedades físico-químicas do DXM e DXO, utilizando a plataforma *online* *Chemicalize* (<https://chemicalize.com>). Critérios como o *pKa* (**Tabelas 4 e 5**), a hidrofobicidade (**Figura 13**), entre outros, permitem estimar as eficiências de extração para cada uma das fibras de SPME na matriz biológica.

A constante de dissociação, o *pKa*, indica qual o grau de dissociação de um composto e permite prever, de forma indireta, a sua solubilidade. Assim sendo, a constante diz respeito ao pH no qual o analito se encontra 50% na sua forma ionizada e 50% na sua forma neutra, não ionizada. O ponto isoelétrico de um composto é o valor de pH ao qual este apresenta carga elétrica média zero. Para o estudo da hidrofobicidade, o *Chemicalize* utiliza duas constantes, o log P que corresponde ao coeficiente de partição dos compostos entre duas soluções (água e o octanol) e o log D, que diz respeito à variação do log P em função pH da matriz e do *pKa* dos analitos. Por fim, a solubilidade é a quantidade máxima de uma substância que pode ser dissolvida num líquido.

Tabela 4. Estrutura química, pka, e respetivo gráfico, do composto DXM obtido pela plataforma Chemicalize.

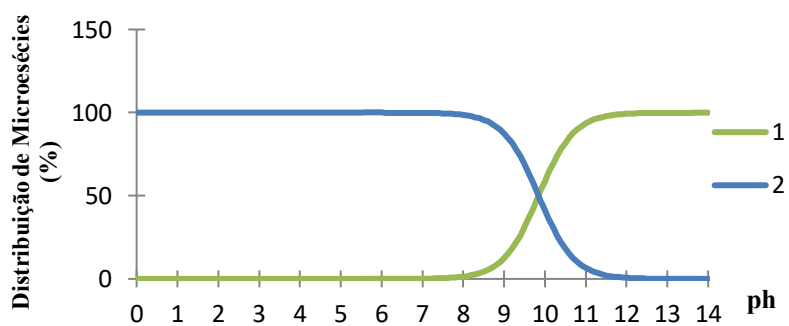
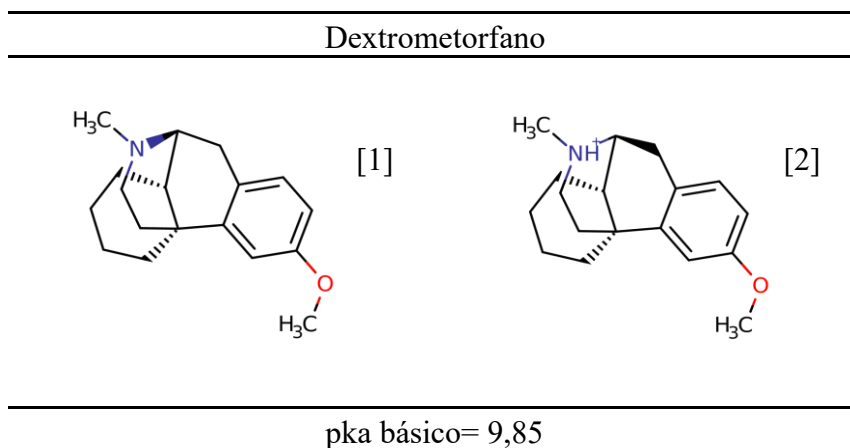
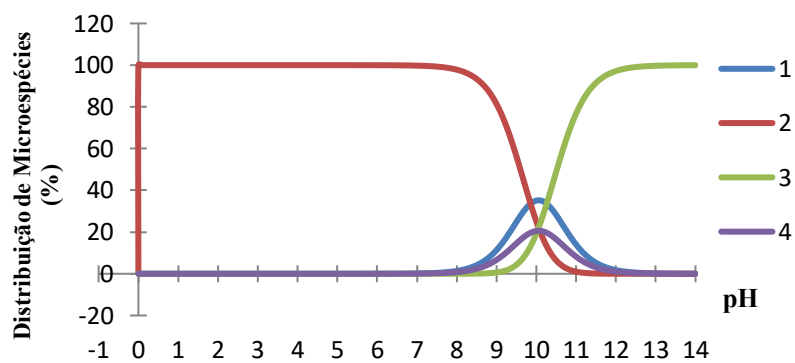
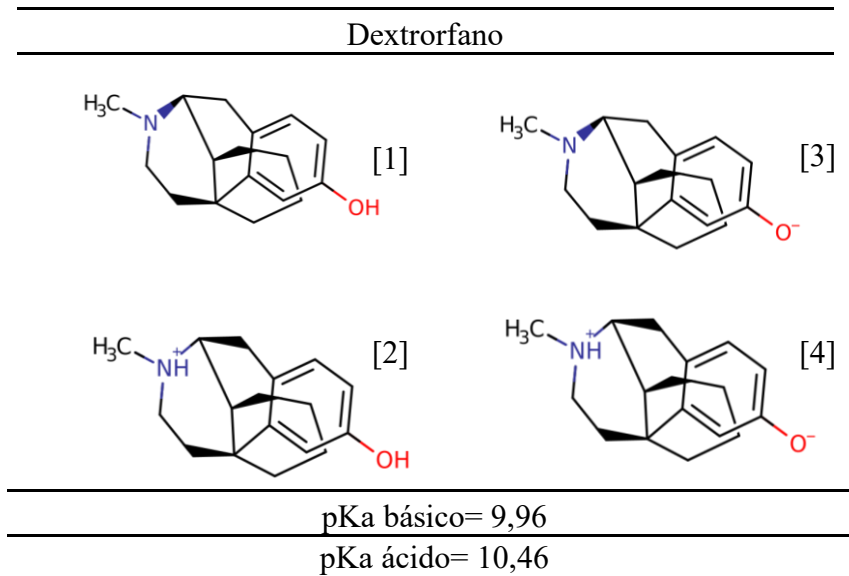


Tabela 5. Estrutura química, *pKa*, e respetivo gráfico, do composto DXO, obtido pela plataforma Chemicalize.

Com base nos gráficos de *pKa* do DXM e do DXO é perceptível que o primeiro comporta-se como uma base fraca. Já o DXO apresenta diferentes espécies, tornando mais complexo definir qual o pH ideal para promover a sua extração.

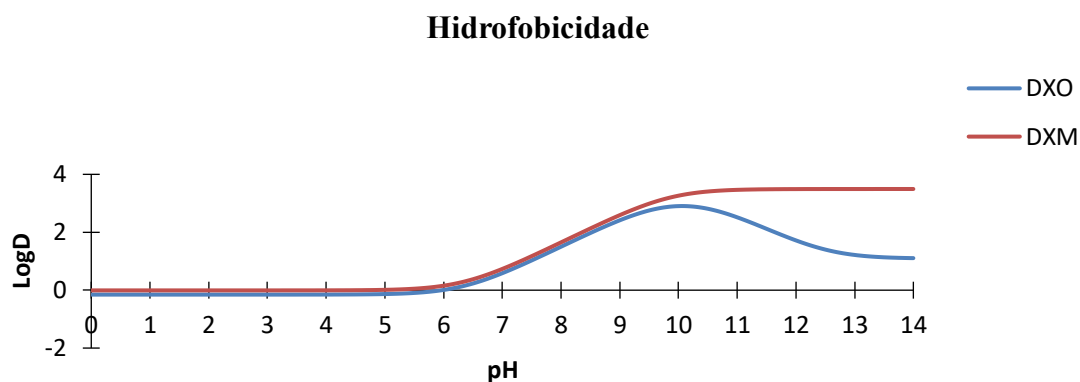


Figura 13. Gráfico da hidrofobicidade dos analitos, obtido da plataforma Chemicalize.

Analisando o gráfico da hidrofobicidade de ambos os compostos, é perceptível que o valor de log D começa a subir à medida que o pH se aproxima de pH 7. Sabe-se que quando o valor de log D é positivo, o que significa que o analito apresenta um carácter mais hidrofóbico, podendo favorecer a sua extração. Neste caso, quando o pH se aproxima de 7 e vai aumentando os compostos vão ficando mais hidrofóbicos. De notar que a partir de pH 10 o DXM continua a apresentar a mesma hidrofobicidade, enquanto o DXO volta a ser mais hidrofílico.

#### 4.2 Estudo em GC-TOF/MS

Com o propósito de otimizar as condições cromatográficas do instrumento para promover a melhor separação dos analitos alvo recorreu-se a um desenho experimental (**Tabela 6**). Para cada experiência realizaram-se triplicados.

Tabela 6. Tabela com as diferentes variáveis cromatográficas a otimizar, e respectivas possibilidades;

|   | T. Vent (s) | Pressão Vent (psi) | T. Splitless (s) | Temp. Fonte (°C) | Temp. Inicial Injetor (°C) |
|---|-------------|--------------------|------------------|------------------|----------------------------|
| 1 | 30          | 1                  | 120              | 250              | 90                         |
| 2 | 90          | 1                  | 60               | 250              | 60                         |
| 3 | 30          | 5                  | 60               | 250              | 90                         |
| 4 | 90          | 5                  | 120              | 250              | 60                         |
| 5 | 30          | 1                  | 120              | 280              | 60                         |
| 6 | 90          | 1                  | 60               | 280              | 90                         |
| 7 | 30          | 5                  | 60               | 280              | 60                         |
| 8 | 90          | 5                  | 120              | 280              | 90                         |

Após injetados os extratos de plasma e urina, retiraram-se os valores das áreas dos picos com o propósito de perceber quais as variáveis mais importantes e quais os valores a definir para cada variável. Na seguinte tabela é possível observar a conclusão do desenho experimental (**Tabela 7**).

Tabela 7. As seguintes tabelas resumem os resultados das médias e desvios padrões das áreas dos picos para cada variável em estudo, na análise do DXM e o DXO, nas matrizes biológicas sangue e urina.

| <b>Média</b> |               |        |                     |        |                    |        |             |        |               |        |
|--------------|---------------|--------|---------------------|--------|--------------------|--------|-------------|--------|---------------|--------|
|              | Vent time (s) |        | Vent pressure (psi) |        | Splitless time (s) |        | Tfonte (°C) |        | Ti inlet (°C) |        |
|              | Urina         | Plasma | Urina               | Plasma | Urina              | Plasma | Urina       | Plasma | Urina         | Plasma |
| DXO          | -             | -      | -                   | +      | +                  | +      | +           | +      | +             | -      |
| DXM          | -             | -      | -                   | +      | +                  | +      | +           | +      | +             | -      |

| <b>Desvio Padrão</b> |           |        |                     |        |                    |        |             |        |               |        |
|----------------------|-----------|--------|---------------------|--------|--------------------|--------|-------------|--------|---------------|--------|
|                      | Vent time |        | Vent pressure (psi) |        | Splitless time (s) |        | Tfonte (°C) |        | Ti inlet (°C) |        |
|                      | Urina     | Plasma | Urina               | Plasma | Urina              | Plasma | Urina       | Plasma | Urina         | Plasma |
| DXO                  | -         | +      | -                   | -      | +                  | +      | -           | +      | +             | +      |
| DXM                  | -         | -      | -                   | -      | +                  | -      | -           | +      | +             | +      |

A tabela acima apresentada corresponde a um resumo dos resultados obtidos do *desenho* experimental. Para se obter estes resultados, começou-se por calcular a média dos picos cromatográficos dos triplicados de cada experiência. De seguida, o valor da média é multiplicado pelo sinal que é suposto para aquela variável, naquela experiência.

Para cada variável existem dois níveis, um mais alto, representado pelo sinal +, e um mais baixo, onde é visível o sinal -. O símbolo - ou + corresponde ao valor -1 ou

+1. Por exemplo, na experiência número 1 para a variável *vent time*, o valor do sinal é negativo (-1). Logo, ao se multiplicar o valor da média das áreas dos picos, irá se obter um valor com sinal negativo. Após multiplicadas as médias das áreas dos picos, de cada experiência, pelo respetivo sinal, relativamente à variável escolhida, somou-se todos os valores, e o sinal obtido correspondeu ao nível deve ser usado.

As variáveis *vent time* e a temperatura da fonte aparecem como as mais importantes, visto que o somatório final, seja ele positivo ou negativo, apresentou os valores mais altos. Os restantes valores foram fixados com base nas conclusões retiradas da tabela. Assim sendo, as seguintes características foram seleccionadas para o método cromatográfico foram: *vent time* será de 30 segundos; *vent pressure* de 1 psi; o tempo de *splitless* de 120 segundos; a temperatura da fonte a 280°C; e por fim, a temperatura do *inlet* estará a 90°C.

Após otimizado o método cromatográfico, e numa tentativa de calcular o limite de detecção instrumental do aparelho, foram injetadas três soluções dos compostos em solvente puro com as seguintes concentrações: 0,2 µg/mL, 0,02 µg/mL e 0,005 µg/mL. Analisados os cromatogramas, chegou-se à conclusão que a solução de concentração 0,02 µg/mL, corresponde ao limite de detecção instrumental do DXO, visto que apresenta o valor de relação sinal/ruído mais próximo do que está estabelecido na literatura, referindo que o valor do sinal do pico em consideração deve ser três vezes o do ruído. Na solução de menor concentração, apesar de se detetar o composto DXO este já se encontrava muito próximo da altura do ruído. Nas **Figuras 14 e 15** é visível o pico dos compostos na solução de concentração 0,02 µg/mL.

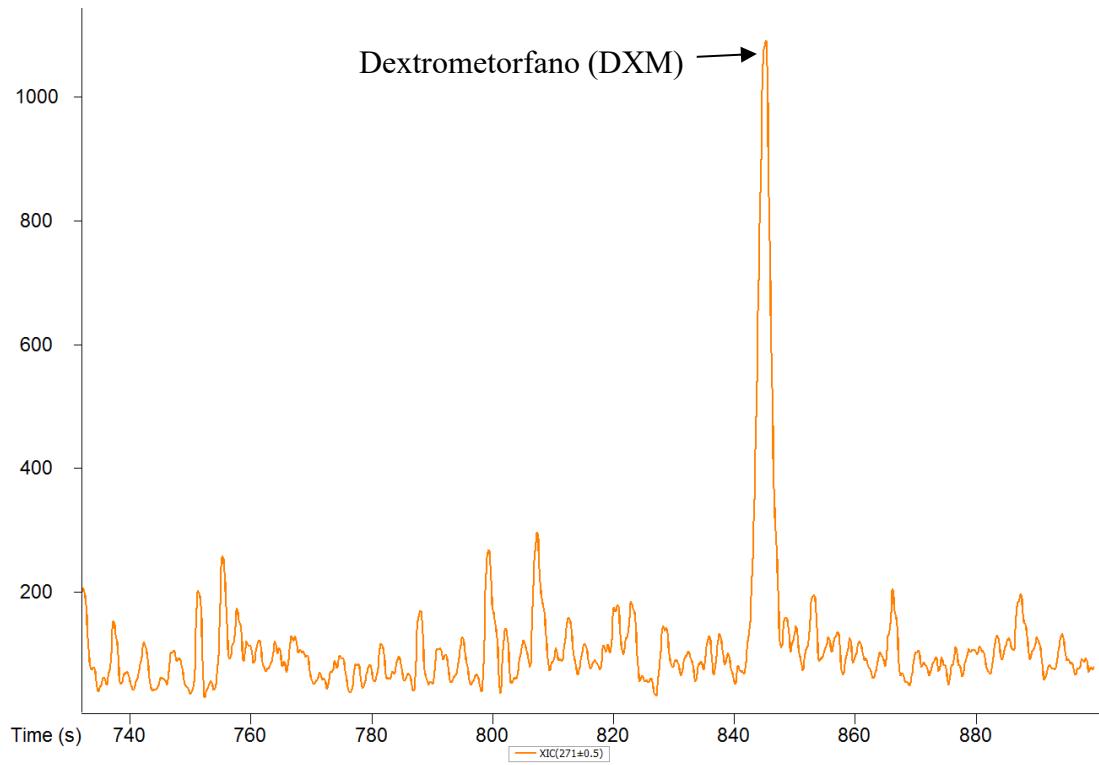


Figura 14. Detecção do composto DXM, na solução de concentração 0,02 µg/mL.

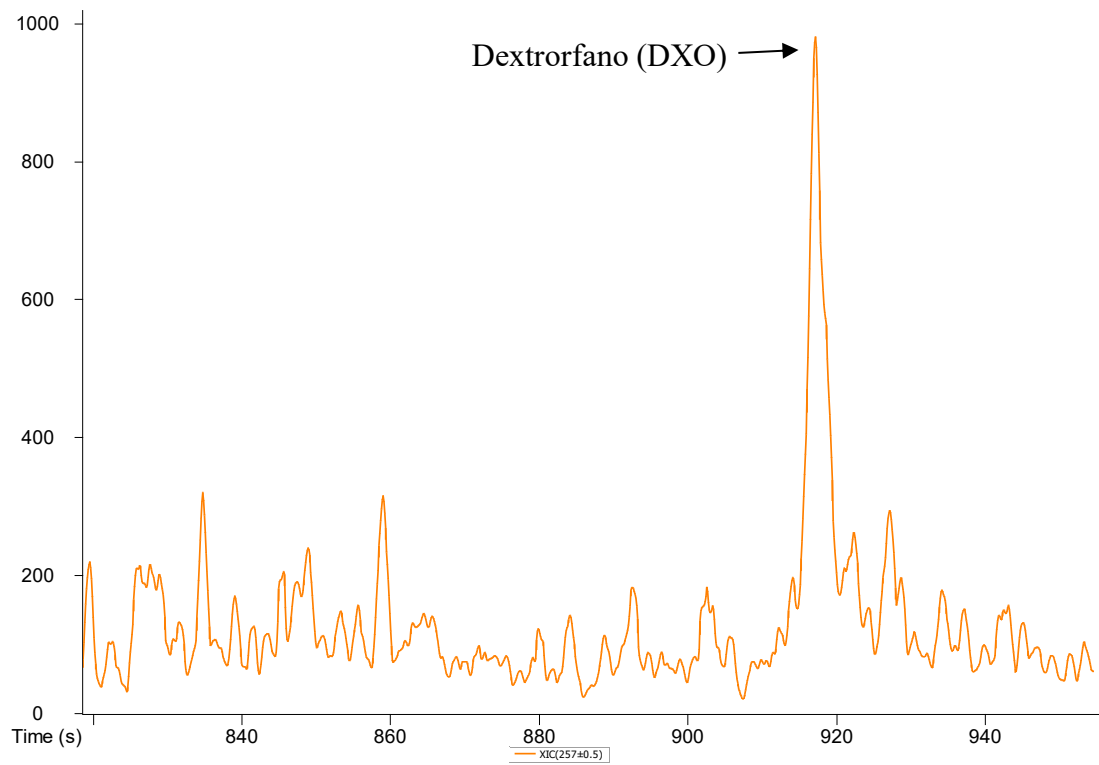


Figura 15. Detecção do composto DXO, na solução de concentração 0,02 µg/mL.

Observados os resultados, e visto que o limite instrumental era demasiado alto considerando os valores expectáveis no sangue, decidiu-se avançar para uma técnica mais seletiva (MS/MS).

#### 4.3 Estudo em GC/MS/MS

Para dar início à análise dos compostos no aparelho de GC/MS/MS, injetou-se no aparelho 1  $\mu\text{L}$  da solução a concentração 50  $\mu\text{g/mL}$  de DXM e DXO, e lidocaína como padrão interno a uma concentração de 12  $\mu\text{L/mL}$  em *full scan* (**Figura 16**).

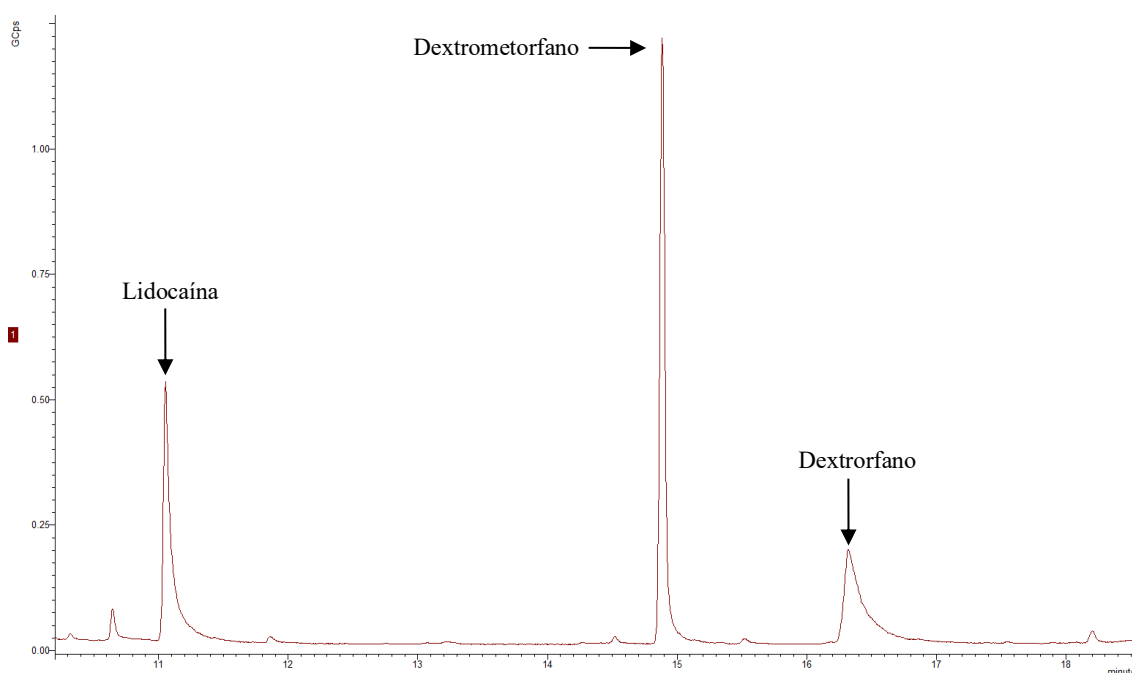


Figura 16. Cromatograma Iônico Total (TIC) dos compostos, mais padrão interno, em modo *full scan*, presentes na solução a concentração de 50 ng/mL.

Na **figura 16** é visível a diferença de simetria e de sinal entre os picos cromatográficos do DXM e do DXO. A diferença de alturas está diretamente relacionada com a fórmula química dos compostos. O DXO apresenta pior performance cromatográfica por ter grupos mais polares, podendo interagir com pontos ativos na coluna ou no *liner*, e assim apresentar *tailing*.

O sistema foi inicialmente operado no modo *full scan* de modo a obter os espectros de massa completos de cada um dos compostos em análise, onde todos os iões se encontram presentes. A análise dos espectros de massa completos possibilita a escolha dos iões de maior intensidade para cada composto, como potenciais iões precursores. Selecionados os iões precursores, realizou-se uma análise dos seus produtos.

Selecionados os iões produto e a energia de ionização, realizou-se uma análise em modo MRM. De modo a conhecer os iões quantificadores e qualificadores de cada composto, foram testadas diferentes energias de ionização para cada uma das transições (precursor/produto). Este teste tem o propósito de perceber a que energia é que os iões apresentam maiores áreas. Na **figura 17** é possível observar os gráficos do estudo das energias de ionização, para cada um dos compostos. A **tabela 8** identifica os iões precursores e produtos escolhidos para cada composto e a energias de ionização escolhida para cada um deles.

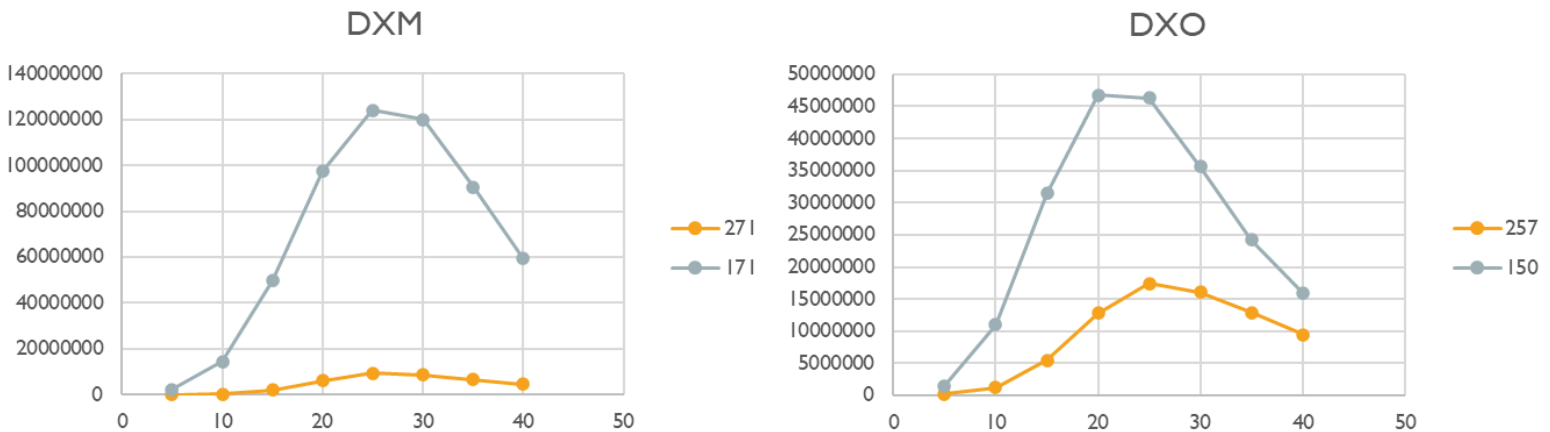


Figura 17. Estudo das energias de ionização para o DXM e DXO, em que a variável dependente corresponde às de energias de ionização, e a variável independente às áreas dos picos cromatográficos.

Tabela 8. Resumo do estudo dos iões produto e das energias de ionização para o DXM e DXO, respetivamente.

| <b>Dextrometorfano</b> |          |              |
|------------------------|----------|--------------|
| Precursores            | Produtos | Energia (Ev) |
| 271                    | 172      | 25           |
| 171                    | 128      | 25           |

| <b>Dextrorfano</b> |          |              |
|--------------------|----------|--------------|
| Precursores        | Produtos | Energia (Ev) |
| 257                | 158      | 25           |
| 150                | 91       | 20           |

A confirmação da detecção dos analitos pode ser feita através de 3 fatores: pelo tempo de retenção e através do rácio entre o qualificador e o quantificador. Este último método de confirmação é visto como o mais adequado, pois permite-nos, com probabilidade elevada garantir que o composto detetado é aquele que se pretende estudar e não um possível contaminante.

#### 4.4 Estudo SPME com Fibras *Tips*

##### 4.4.1 Desenho Experimental (DoE)

Para a realização do processo de extração dos compostos da amostra de sangue branca, construiu-se um desenho experimental *Plackett Burman* com dez variáveis, ou seja, 11 experiências, cada uma realizada em duplicado. Cada uma das experiências apresenta condições diferentes entre si de forma a testar o máximo de possibilidades e combinações possíveis. Na **Tabela 9** observa-se os dois níveis em estudo para cada variável.

Tabela 9. DoE desenvolvido para otimizar o processo de extração.

|    | Modificador orgânico | Ph da Matriz | Salting-Out | Tipo de Matriz | Solvente | Tempo de Extração (min) | Tempo de Retroextração (min) | Tipo de material | Tipo de Fibra | Velocidade da Agitação |
|----|----------------------|--------------|-------------|----------------|----------|-------------------------|------------------------------|------------------|---------------|------------------------|
| 0  | Não                  | 11           | Sim         | Sangue         | MeOH     | 60                      | 15                           | Vidro            | PDMS          | Alto                   |
| 1  | Sim                  | 11           | Sim         | Plasma         | MeOH     | 60                      | 15                           | Eppendorf        | C18           | Baixo                  |
| 2  | Não                  | 10           | Nao         | Plasma         | MeOH     | 60                      | 15                           | Eppendorf        | PDMS          | Alto                   |
| 3  | Sim                  | 11           | Nao         | Sangue         | AcN      | 20                      | 15                           | Eppendorf        | PDMS          | Alto                   |
| 4  | Sim                  | 11           | Nao         | Sangue         | MeOH     | 60                      | 5                            | Vidro            | PDMS          | Baixo                  |
| 5  | Sim                  | 10           | Sim         | Sangue         | MeOH     | 20                      | 15                           | Vidro            | C18           | Alto                   |
| 6  | Não                  | 11           | Sim         | Plasma         | AcN      | 20                      | 15                           | Vidro            | PDMS          | Baixo                  |
| 7  | Não                  | 10           | Sim         | Sangue         | MeOH     | 20                      | 5                            | Eppendorf        | PDMS          | Baixo                  |
| 8  | Não                  | 10           | Nao         | Sangue         | AcN      | 60                      | 15                           | Vidro            | C18           | Baixo                  |
| 9  | Sim                  | 10           | Sim         | Plasma         | AcN      | 60                      | 5                            | Vidro            | PDMS          | Alto                   |
| 10 | Não                  | 11           | Sim         | Sangue         | AcN      | 60                      | 5                            | Eppendorf        | C18           | Alto                   |
| 11 | Não                  | 11           | Nao         | Plasma         | MeOH     | 20                      | 5                            | Vidro            | C18           | Alto                   |

- 1. Modificador orgânico:** Pretendeu-se perceber se a presença de um modificador orgânico beneficiaria ou não os resultados. Nas experiências em que o solvente a testar foi o metanol, utilizou-se o acetonitrilo como modificador orgânico, e vice-versa. Para um volume final de 1,5 ml colocou-se 10% deste volume em cada extrato;

2. **pH da matriz:** Sabendo que os *pka*'s dos compostos eram elevados, preparou-se uma solução de bicarbonato de sódio a 0,2 mol/L e adicionou-se gotas de hidróxido de sódio, até se atingir os valores de pH a 10 e 11;
3. **Salting-out:** Estudou-se se a presença de sal nas soluções. Em cada frasco de extração colocou-se 0,1 g de cloreto de sódio (sal);
4. **Sangue ou Plasma:** O sangue é uma matriz biológica muito complexa, com muitos constituintes, o que pode dificultar a detecção dos compostos. O plasma é obtido através da centrifugação do sangue total. O propósito deste estudo foi perceber em qual dos dois níveis é mais fácil a detecção da presença do DXM e DXO;
5. **Solvente:** Os dois solventes escolhidos para testar foram o metanol e o acetonitrilo;
6. **Tempo de extração:** Refere-se ao período em que a fibra *tip* se encontra a absorver compostos do extrato, até atingir o equilíbrio. Pretende-se perceber se um maior tempo de imersão no extrato é diretamente proporcional a uma maior absorção de composto;
7. **Tempo de retroextração:** Corresponde ao momento em que a fibra transfere os compostos recolhidos para uma quantidade de solvente bastante inferior à do extrato original. O tempo de retroextração testado foi de 5 ou de 15 minutos;
8. **Tipo de material:** O uso de *eppendorfs* ou de frascos de vidro está dependente do tipo de agitador que se usou. Neste caso está diretamente relacionado com a variável velocidade de agitação;
9. **Tipo de fibra:** As duas fibras em análise são ambas fibras *tip* de SPME, e pretende-se perceber qual das duas, a fibra C18 ou a PDMS/DVB, apresentada maior afinada para o DXM e para o DXO;
10. **Velocidade de agitação:** Para esta variável testaram-se dois tipos de aparelhos, sendo que os limites (máximo e mínimo) de velocidades estavam dependente do tipo de aparelho utilizado. Utilizou-se um agitador, que apresentava uma velocidade máxima de 400 rpm e utilizou-se também um *Eppendorf Thermomixer Comfort* que atingia uma velocidade máxima de 1500 rpm. A escolha de um ou outro esteve diretamente relacionada com o material em que foram colocadas as amostras, visto só se poder usar o aparelho *Eppendorf Thermomixer Comfort* quando se fez as experiências em *eppendorfs*, assim como o aparelho da marca

Bunsen, referido anteriormente, só pode ser usado quando os frascos eram de vidro;

Para pôr em prática o *desenho* experimental, utilizou-se a solução de 0,2 mg/mL de DXO e a solução de 1 mg/mL de DXM. A solução de DXM foi diluída num fator de 1:5, para ficar com uma concentração final igual à do DXO. De seguida, colocou-se num *vial*, 1 mL, de cada uma das soluções, e obteve-se uma concentração final de 0,1 mg/mL. Utilizou-se 12,5 mL da “amostra branca de sangue 2” e fez-se um *spike* de 315 µL da solução de 0,1 mg/mL de DXM e DXO, tendo sido obtida uma concentração final no sangue de 2520 ng/mL. Dos 12,5 mL de amostra de sangue, apenas 6,5 mL foram distribuídos por diversos *eppendorfs* e levados à centrífuga durante 15 minutos a 15000 g. Concluído o tempo de centrífuga, retirou-se o plasma (sobrenadante) de cada um dos frascos para um frasco de vidro.

Após preparada a amostra de sangue contendo um *spike* dos compostos, deu-se início à preparação dos *vials*, cada um deles correspondente a uma experiência do desenho experimental. Para cada *vial* (2 mL) fez-se um volume final de 1,5 mL, 0,4 mL de amostra branca de sangue e os restantes 1,1 mL de solução tampão de 0,2 mol/L bicarbonato de potássio com hidróxido de sódio. Nas experiências em que foi necessária a presença de sal, este foi colocado previamente à adição da amostra e da solução tampão, numa quantidade de 15% em relação ao volume final. A quantidade de modificador orgânico foi igual à do sal, sendo que este composto apenas foi colocado no fim de todos os constituintes. A escolha entre o metanol ou o acetonitrilo como modificador orgânico, dependeu do solvente que estava a ser testado, sendo que o modificador e o solvente eram sempre distintos um do outro.

Após preparadas as soluções, os *vials* foram transportados para o agitador. Antes de qualquer processo de extração, foi necessária a realização de um tratamento de acondicionamento para as fibras *Tips*. Num *vial* contendo solvente, a fibra ficou submersa no solvente durante 10 minutos. De seguida, e sem deixar que a mesma secasse transportou-se a fibra para um novo *vial*, desta vez contendo 1,2 ml de água Mili-Q, e deixou-se durante 10 minutos com agitação constante. Após terminado o processo de acondicionamento da fibra, esta foi inserida num *vial* que continha a amostra de sangue, e procedeu-se à extração durante 20/60 minutos com agitação. Terminado o tempo, a fibra é novamente transportada para outro *vial*, contendo apenas 200 µL de solvente, e deu-se início ao processo de retroextração durante 5/15 minutos. Por fim, dos 200 µL do *vial* de

retroextração, retirou-se 180  $\mu\text{L}$  para um novo *vial*. Este passo tem como propósito assegurar o volume que realmente se encontra no *vial*, isto porque no decorrer no processo de retroextração pode haver variação do mesmo. Aos 180  $\mu\text{L}$  de extrato, adicionou-se 15  $\mu\text{L}$  de lidocaína a concentração 120 ng/mL (concentração final na solução foi de 9,23 ng/mL). Finalizado o processo de extração, as soluções foram injetadas no aparelho, 8  $\mu\text{L}$  em PTV. O processo de extração referido anteriormente, foi sendo adaptado tendo em conta qual das experiências estava a ser realizada.

#### 4.4.2 Resultados DoE

Os resultados mostram que os picos cromatográficos obtidos estavam muito próximos do ruído, não sendo possível quantificá-los. Numa tentativa de corrigir a situação, e aumentar o tamanho dos picos, retirou-se o *qualifier*. Este aumento ocorre, porque o detetor passa a ter só o *quantifier* para analisar, não tendo que dividir o seu tempo de análise entre os dois. Mais tarde, e após otimizado o método no seu todo, o *qualifier* voltou a ser adicionado, visto ser um componente importante, permitindo confirmar o composto em estudo. Na **figura 18** é feita a comparação destes dois momentos, o resultado dos picos quando existe *qualifier* e sem *qualifier*.

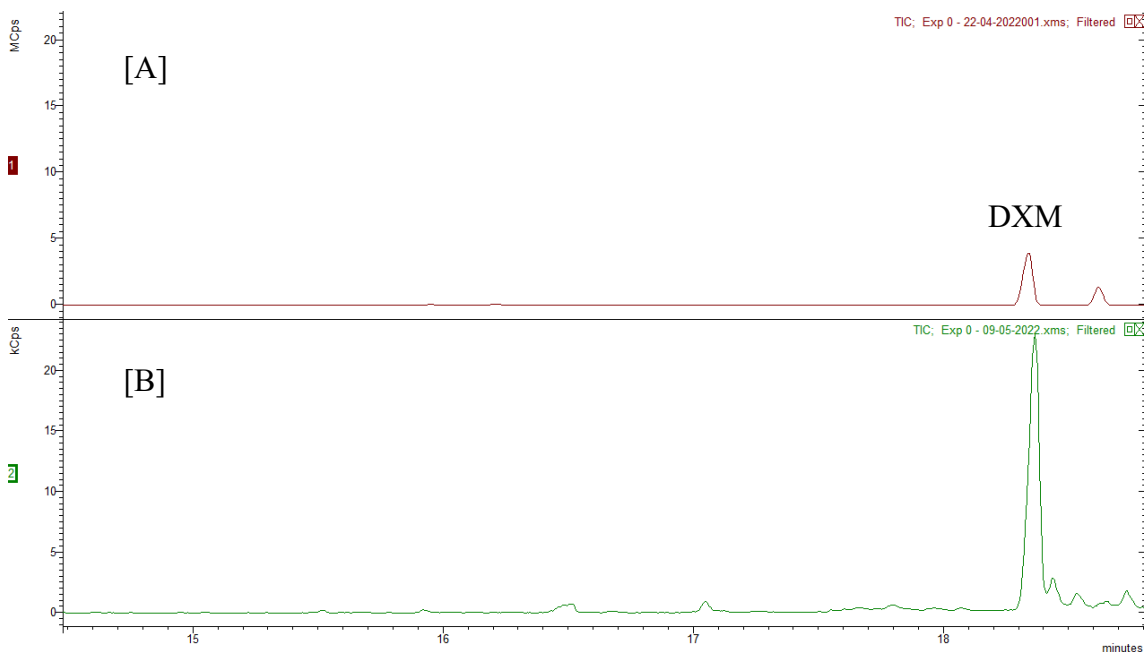


Figura 18. Picos cromatográficos dos compostos, após retirada do *qualifier*: Em [A] análise com *qualifier*; [B] análise sem *qualifier*;

A retirada do *qualifier* permitiu um ligeiro aumento dos picos, suficiente para retirar a área de cada pico e interpretar os resultados do DoE.

Os resultados do DoE identificam como variáveis de maior relevância, 5 das 10 variáveis estudadas: o modificador orgânico, o pH da matriz, o tempo de extração, o tempo de retroextração e o *salting-out*. Estas são as variáveis que devem ser otimizadas de forma individual, e que maior influência tem no processo de extração dos compostos. Às restantes variáveis fixou-se a hipótese que apresentou ser a mais favorável. O metanol apresenta-se como o melhor solvente para ambos os compostos, assim como a velocidade de agitação deve ser a mais alta, tanto para o DXM como para o DXO. Para as variáveis tipo de fibra a usar, o uso de sangue ou plasma e o tipo de agitação, as conclusões retiradas divergiram entre compostos. A escolha foi feita com base nas condições mais favoráveis ao composto DXO visto que apresenta um pior limite de deteção. Logo, para o processo de extração a *tip* escolhida foi a PDMS/DVB, em frascos de vidro. E a matriz biológica o sangue.

#### 4.4.2.1 Otimização da variável pH

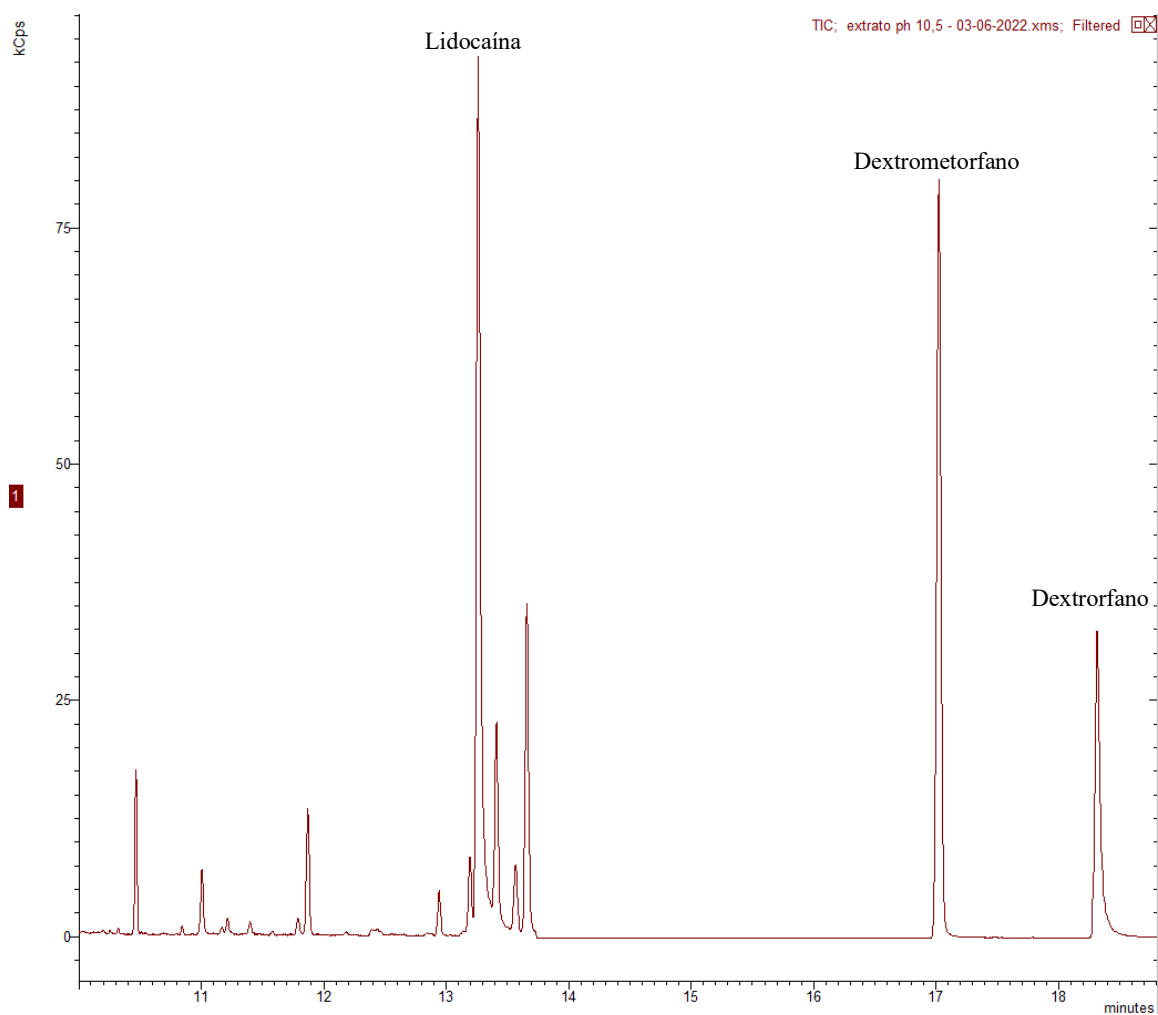
A primeira variável a ser otimizada de forma individual foi o pH. Esta é um das variáveis que se acreditava vir a ser fulcral para os compostos, principalmente para o DXO devido às suas propriedades físico-químicas.

Preparou-se uma solução tampão de carbonato de potássio a pH 9,5, 10, 10,5, 11 e 11,5. Num balão volumétrico de 50 mL, preparou-se 1M de carbonato de potássio, e foi medido o pH, que se encontrava a 12,24. A solução tampão de carbonato de potássio foi distribuída de forma equitativa por 5 frascos de vidro, para de seguida ser acertado o pH através da adição de ácido clorídrico (37%) até serem atingidos os valores de pH pretendidos. Ao contrário do que tinha sido feito nas experiências de desenho experimental, substituiu-se o bicarbonato de sódio pelo carbonato de potássio, porque este é uma base mais forte que apresenta um *pKa* superior ao do bicarbonato de sódio

Após preparadas as soluções tampão a pH's distintos, adicionou-se 192 µL da solução de 0,1 mg/mL de DXM e DXO a 6 mL de amostra branca de sangue, obtendo-se uma concentração final de 3200 ng/mL no sangue. Tal como realizado anteriormente, cada *vial* continha 0,4 mL de sangue e 1,1 mL de solução tampão, perfazendo um volume final de 1,5 mL, colocados por essa mesma ordem. Adicionou-se também 150 µL modificador orgânico e 0,1 g de sal. De seguida, as soluções a diferentes pH's passaram pelo processo de extração utilizando o agitador, a uma velocidade de 400 rpm em cada

etapa. As fibras PDMS/DVB foram submersas durante 10 minutos em metanol; posteriormente, transferidas para um vial contendo água, também durante 10 minutos; sem secar, transferiu-se a fibra para o *vial* contendo a amostra e assim ficou durante 60 minutos; terminada a extração, a fibra foi movida para um vial contendo 200  $\mu\text{L}$  de metanol, onde ocorre o processo de retroextração, durante 15 minutos. Dos 200  $\mu\text{L}$ , 180  $\mu\text{L}$  são transferidos para um novo vial cônico contendo já 15  $\mu\text{L}$  do padrão interno (lidocaína). Neste procedimento, utilizaram-se fibras diferentes para as soluções e para os duplicados. Preparados todos os frascos, as soluções foram injetadas no aparelho.

Um dos resultados mais interessantes prendeu-se com a elevada intensidade dos picos cromatográficos obtidos quando comparados com os ensaios de DoE (**Figura 19**). Os picos eram bastante intensos, fazendo jus à concentração de composto colocada no sangue e à quantidade injetada no aparelho. Esta grande diferença pode estar relacionada com diversos fatores, sendo que o motivo principal está relacionado com a substituição do *liner* do injetor. Após a injeção das 24 experiências do DOE, e tendo sido injetados 8  $\mu\text{L}$  em PTV em cada experiência, o *liner* encontrava-se bastante sujo, tal como visível na **figura 20**, o que pode ter prejudicado a entrada dos compostos no aparelho. Para além disso, a substituição da solução tampão anterior pelo carbonato de potássio, pode também ter levado ao aumento dos picos.



*Figura 19. Cromatograma dos compostos DXM, DXO e lidocaína. Extrato a Ph 10,5.*



*Figura 20. Imagem do liner, após as injeções do DoE.*

Após retiradas as áreas dos picos e comparando com os pH's em estudo, os resultados obtidos não foram conclusivos, tal como é possível verificar nos seguintes gráficos (**Figura 21**):

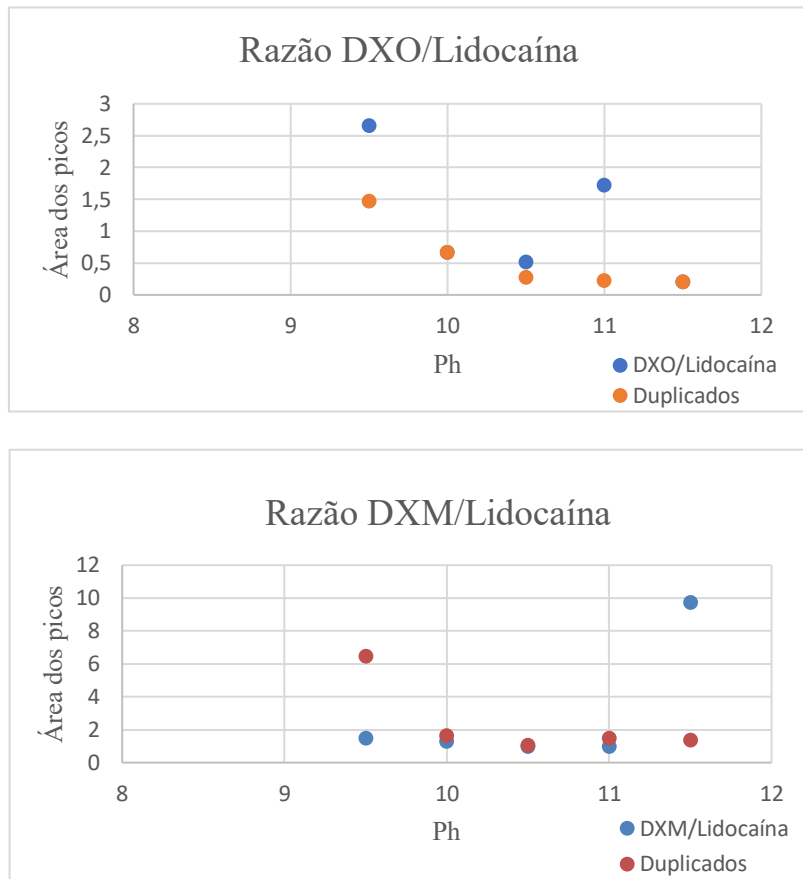


Figura 21. Gráficos com as razões das áreas dos picos do DXO/Lidocaína e do DXM/Lidocaína, respetivamente.

Os pontos observados nos gráficos provêm da razão entre as áreas dos picos do DXM com a lidocaína, e da razão das áreas dos picos do DXO com a lidocaína, para cada um dos pH's. Ao contrário do expectável: que um pH de valor mais elevado melhorasse a saída do composto DXO, e consecutivamente a apresentar um pico mais alto, os pontos revelam uma área de pico menor à medida que o valor de pH aumenta.

A lidocaína no cromatograma apresenta vários co-eluentes. Este fenómeno pode ser explicado pelo facto de este ser um composto pouco seletivo, que apresenta poucos iões disponíveis para análise, e único ião precursor disponível, o 120, é pequeno e comum a muitos outros compostos. Tal como se observa na **figura 22**, a lidocaína e o outro composto que aparece no cromatograma não estão resolvidos à linha de base, ou seja, co-eluem parcialmente, devido ao facto de estar a sair próximo dela.

A falta de informação concreta, que permita fixar um valor de pH mais adequado aos compostos, levou a que fosse necessário alterar o padrão interno, numa tentativa de melhorar os resultados.

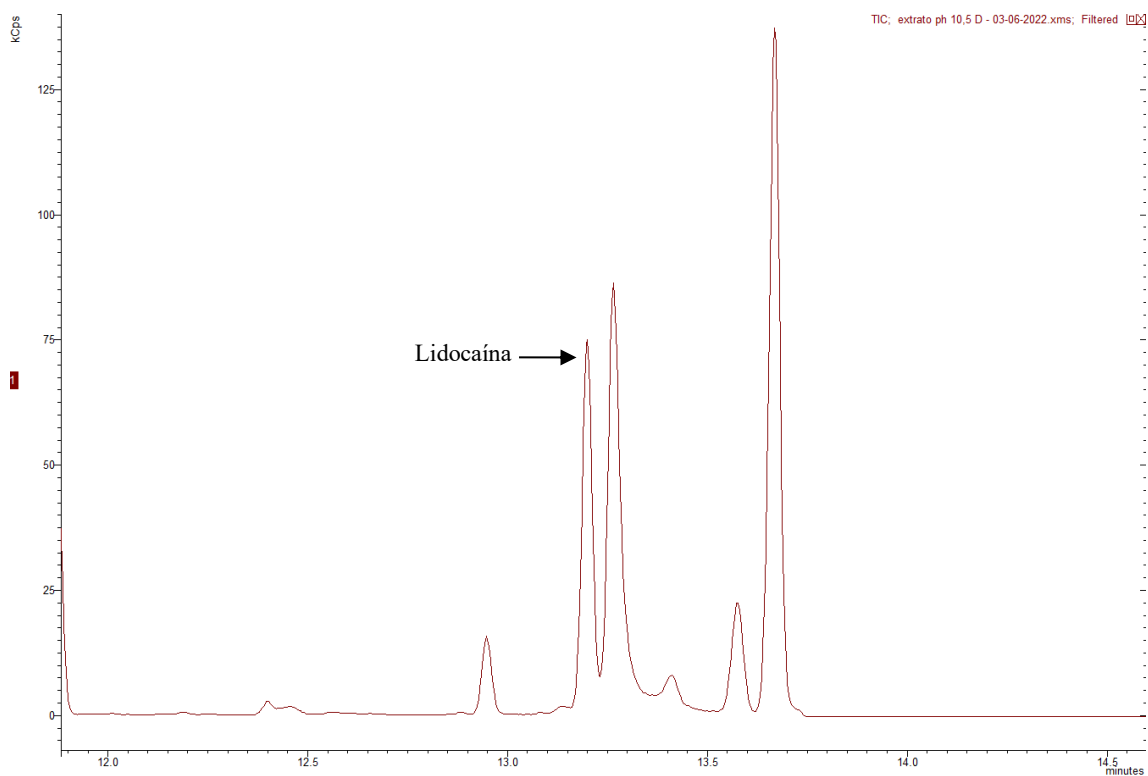


Figura 22. Cromatograma do padrão interno lidocaína em interação com outro composto.

#### 4.4.2.1.1 Alteração do Padrão Interno

Com o proposto de substituir a lidocaína como padrão interno devido à dificuldade de interpretar ou retirar qualquer conclusão dos resultados, escolheram-se três compostos como possíveis padrões internos. Neste caso três pesticidas: *tebuconazole*, *terbuthylazine* e *diflufenican*. A escolha de pesticidas relaciona-se com o facto de estas serem substâncias não expectáveis, com muito baixa probabilidade, de serem encontradas no sangue, assegurado o papel de padrão interno, como corretores de possíveis erros associados à injeção. Na **figura 23** encontra-se o cromatograma com os três pesticidas e os analitos em análise.

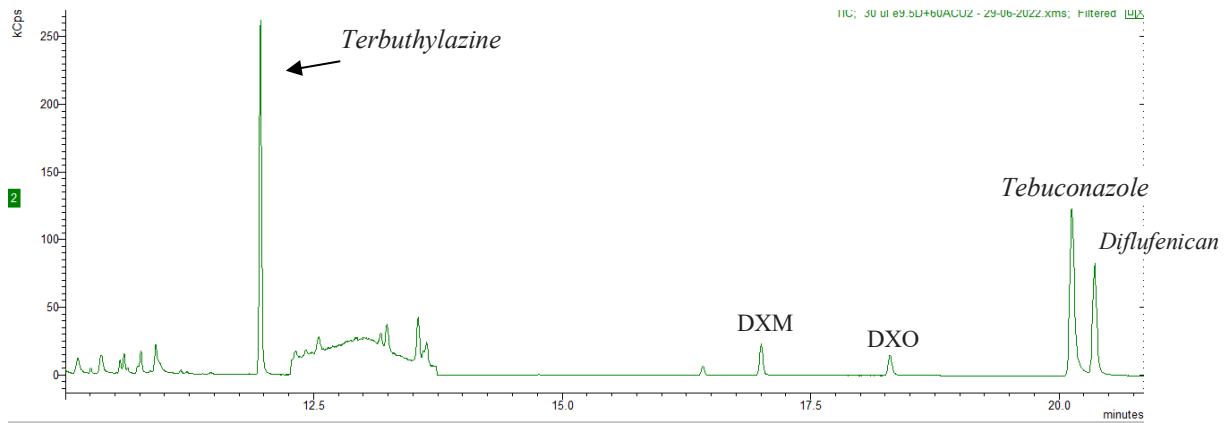


Figura 23. Cromatograma contendo os três pesticidas e os analitos, DXM e DXO.

Num *vial* vidro colocou-se 1 mL de cada um dos três pesticidas em estudo, com uma concentração inicial de 250  $\mu\text{g/mL}$ . Após misturados, injetou-se 2  $\mu\text{L}$  no instrumento em modo *full scan* para obter tempos de retenção de cada um deles. Retirados os tempos recorreu-se a uma biblioteca de MRM disponibilizada pelo *software* do Scion TQ para se obter a informação sobre os iões produtos e precursores dos três pesticidas. Usando os extratos anteriores relativamente ao pH colocou-se 1  $\mu\text{L}$  da mistura dos três pesticidas em 100  $\mu\text{l}$  de cada uma das soluções dos extratos e injetou-se em PTV 2  $\mu\text{L}$  no aparelho. Para além desta injeção realizou-se outra dos mesmos extratos, mas modificou-se o volume injetado para 5  $\mu\text{L}$ , também em PTV.

Tal como previsto os picos dos compostos baixaram significativamente, este acontecimento explica-se pela diminuição da quantidade injetada no aparelho. Apesar de suficientes para retirar as áreas dos picos, a concentração de composto colocado em sangue *vs* o tamanho dos picos não permite atingir limites próximos dos encontrados na literatura. Para além disso, variação aparente entre os extratos e os extratos duplicados pode querer demonstrar que este método de extração com as fibras *tip* não é o mais preciso para a análise destes compostos quando a matriz em causa é o sangue.

Quantificando as áreas dos picos obtidas, percebe-se que a alteração de padrão interno não trouxe melhorias aos resultados. As áreas dos picos dos extratos correspondentes aos diferentes pH's apresentam valores discrepantes e não existe uma interpretação lógica para os mesmos. Era expectável que à medida que fosse aumentado o pH os valores das áreas dos picos fossem aumentando ou diminuindo de forma continua. Mesmo tentando utilizar as áreas dos picos dos três padrões internos, numa tentativa de correção de erros, os resultados permanecem praticamente os mesmos. Na figura abaixo encontram-se representados os resultados das injeções de 2  $\mu\text{L}$  em PTV, para o DXM e

DXO, **figuras 24 e 25**, respetivamente. Os resultados referentes à injeção feita de 5  $\mu$ L não se encontram representados, visto serem exatamente iguais, apenas apresentam uma área de pico superior, tal como era expectável, tendo em conta que foi injetada mais quantidade de solução no aparelho. Os gráficos foram produzidos apenas com os valores das áreas dos picos dos compostos, DXM e DXO, e duplicados.

2  $\mu$ L

|             | DXM               |        |
|-------------|-------------------|--------|
|             | Integrated Area   |        |
| <b>9,5</b>  | 6359              | 7857   |
| <b>10</b>   | 9763              | 3266   |
| <b>10,5</b> | 7850              | 3253   |
| <b>11</b>   | 1225              | 7157   |
| <b>11,5</b> | 2,77E+03          | 107856 |
|             | <u>Duplicados</u> |        |

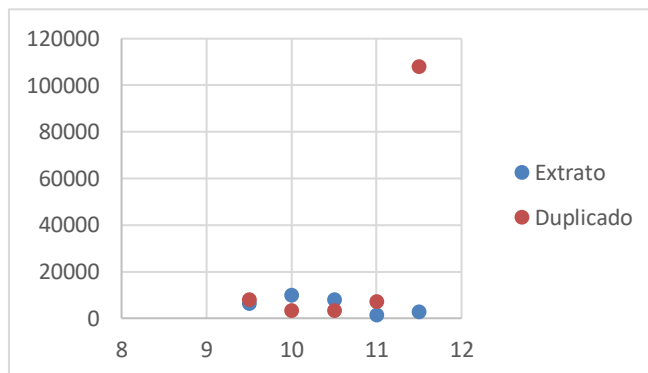


Figura 24. Gráfico das áreas dos picos do composto DXM, e duplicados.

2  $\mu$ L

|             | DXO               |       |
|-------------|-------------------|-------|
|             | Integrated Area   |       |
| <b>9,5</b>  | 4402              | 6436  |
| <b>10</b>   | 4528              | 19576 |
| <b>10,5</b> | 5896              | 5377  |
| <b>11</b>   | 82901             | 55407 |
| <b>11,5</b> | 4785              | 35826 |
|             | <u>Duplicados</u> |       |

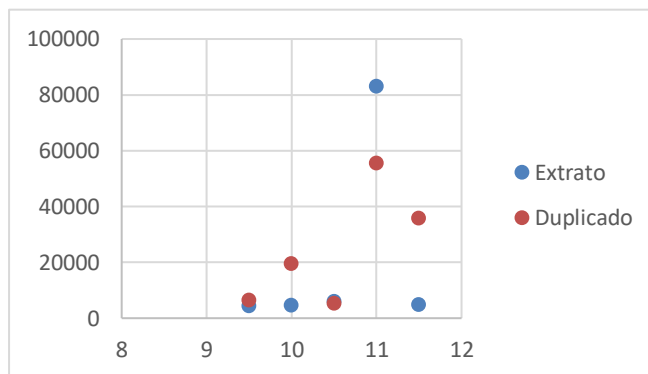


Figura 25. Gráfico das áreas dos picos do composto DXO, e duplicados.

O processo de otimização da variável pH apresentou resultados não conclusivos, e como tal não foi possível selecionar um valor de pH que fosse mais adequado para ambos os compostos. Mas tendo que se escolher, o pH selecionado seria o 11, visto que dentro dos demais é o que apresenta valores ligeiramente melhores que os restantes para o DXO.

As diferentes oscilações podem também querer significar que a escolha do sangue enquanto matriz, talvez não tenha sido a opção certa, apesar dos resultados de

DoE apontarem como certa. Esta é uma matriz muito complexa, constituída por proteínas, açúcares, entre outros, e este tipo de fibras pode não ter a capacidade de extrair apenas os compostos alvos.

A tentativa não conseguida de otimização de pH, pode querer então significar que a matriz sangue para este tipo de metodologias não é a melhor opção.

#### 4.4.3 Estudo da adição de *analyte protectants* (protetores de analitos)

Apesar de não ter sido possível a otimização total do processo de extração, os valores das áreas dos picos dos compostos e respetivos padrões encontravam-se baixos, apesar da concentração de composto na amostra branca de sangue se encontrar bem acima da dose terapêutica. Como tal, e numa tentativa de aumentar a área dos picos, sem aumentar o *spike* no sangue nem a quantidade de solução injetada no aparelho, procurou-se possíveis hipóteses capazes de concretizar esse aumento. A solução encontrada baseou-se num estudo realizado acerca dos benefícios dos protetores analítico (Maštovská et al., 2005). O artigo refere que a combinação dos três protetores analíticos, o sorbitol, o gluconolactona e glicetol etílico, permite “mascarar” os centros ativos da coluna, consentindo que os compostos a atravessem mais facilmente. No momento em que se realizou esta experiência, apenas dois dos açúcares se encontravam disponíveis para utilização.

Assim sendo, ambos os açúcares foram diluídos em metanol. O sorbitol ficou com a concentração de 1,65 mg/mL. Já a gluconolactona foi diluída em metanol até à sua saturação, e posteriormente foi filtrada.

Para testar e comparar se a presença dos açúcares trazia alguma alteração nas áreas dos picos, utilizou-se o duplicado do extrato a pH 9,5, preparado anteriormente. O extrato foi distribuído em dois *vials* cónicos, 30 µL para cada um dos frascos. De seguida, num dos *vials* acrescentou-se 60 µL da solução de sorbitol com gluconolactona. Ao segundo *vial* adicionou-se 60 µL de metanol. As soluções foram injetadas no aparelho nas condições anteriormente usadas. **A figura 26** compara a dimensão dos picos para a solução com e sem protetores de analitos.

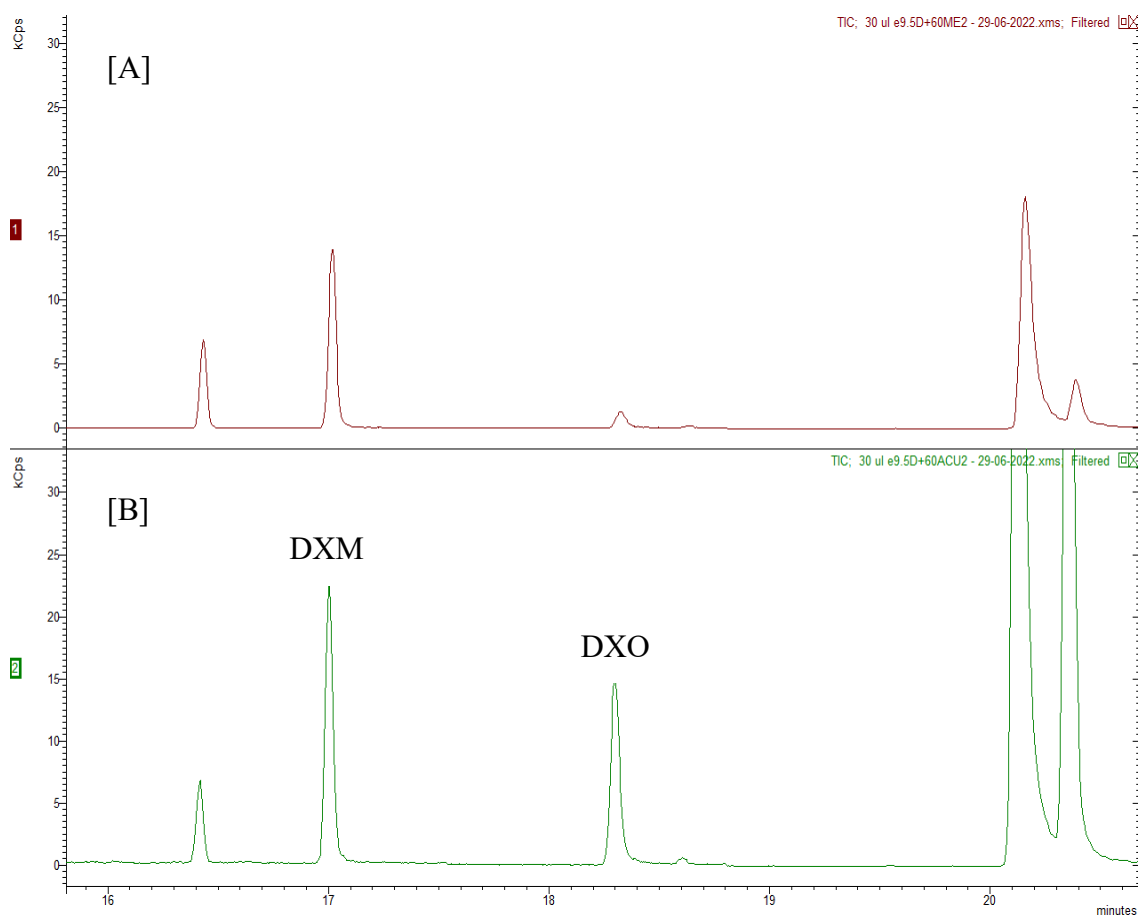


Figura 26. O cromatograma [A] é referente às áreas dos picos antes da adição dos protetores analíticos, enquanto o [B] representa o cromatograma após a sua adição.

Após injetadas ambas as soluções, tal como visível no cromatograma [A], na solução que continha apenas metanol não foi possível integrar o pico de DXO, visto que o mesmo encontrava-se abaixo do limite de deteção. Já no cromatograma [B] é possível visualizar os picos cromatográficos de ambos os compostos. Com base nos resultados obtidos, é possível afirmar que a presença destes dois açúcares levou ao aumento dos picos dos compostos sem que fosse necessário aumentar a quantidade de composto no sangue.

Confirmado o efeito benéfico, como “protetores de analitos”, dos açúcares, decidiu-se redefinir e alterar alguns valores anteriormente fixados para as diferentes variáveis do processo de extração, e as quantidades de matriz e solução tampão. Como tal, a solução de 0,1mg/mL que continha os compostos DXM e DXO em metanol, utilizada ao longo de todo o trabalho foi diluída em metanol num fator de 1:10, obtendo-se uma concentração final de 0,01 mg/mL. Para além desta alteração, alterou-se a quantidade de sangue utilizado, que passou de 0,4 mL para 0,2 mL. Esta alteração

consistiu numa tentativa de comprometer menos as fibras de extração e o próprio *liner*. O *spike* da solução de 0,01mg/mL de DXM e DXO no sangue manteve-se o mesmo, de 10  $\mu$ L, visto já ter sido reduzida a concentração da solução padrão. Resumindo, a quantidade de sangue passou para 0,2 mL, assim como a quantidade de solução tampão passou a ser de 1,3 mL para perfazer o volume final de 1,5 mL. O aumento da solução tampão faz com que o sangue fique mais diluído podendo melhorar o processo de extração dos compostos.

Os picos cromatográficos dos três pesticidas a concentração 83  $\mu$ g/ml encontravam-se bastante altos, distinguindo-se da altura a que se encontravam os picos dos compostos. Esta diferença de altura dos picos não permite que o padrão interno corrija os erros associados à injeção. Desta forma foi necessário diluir a solução cinquenta vezes (cf= 1,66  $\mu$ g/mL). Para isso, transferiu-se 80  $\mu$ L da solução dos três pesticidas para o *vial* que continha o sorbitol em pó, mais 3920  $\mu$ l de metanol, para perfazer um volume de 4 mL. Posteriormente, foi se adicionando gluconolactona à até a mesma ficar saturada.

Preparada a solução de padrão interno com os protetores analíticos necessárias, seguiu-se a preparação das amostras. A 0,2 mL de sangue adicionou-se 10  $\mu$ L de *spike* (solução padrão 0,01 mg/mL de DXM/DXO), ficando-se com uma concentração final no sangue de 250 ng/mL. Adicionou-se 1,3 mL de solução tampão a pH 11. O modificador orgânico e o sal foram também acrescentados à solução amostra. No momento que se adicionou o sal, a solução originou precipitado. Esta ocorrência pode ser explicada pelo facto de se ter aumentado a quantidade de solução tampão, rica em sal, na amostra. Como tal, foi necessário reduzir a quantidade de sal de 0,1g para 0,02 g. Na **figura 27**, é visível o precipitado antes da redução da quantidade de sal, e o depois, após ajustada a dose de sal.



Figura 27. Solução amostra precipitada devido ao excesso de sal [A]; Solução amostra sem precipitado, após reduzida a quantidade de sal [B].

Prosseguiu-se com o processo de extração, realizado tal como descrito anteriormente. A única alteração feita foi na parte final. Os 200  $\mu\text{L}$  de retroextração foram divididos em dois *vials*: o primeiro *vial* contendo 90  $\mu\text{L}$  de extrato mais 10  $\mu\text{L}$  da solução dos pesticidas com os açúcares; e o segundo *vial* contendo 75  $\mu\text{L}$  do extrato mais 25  $\mu\text{L}$  da solução pesticidas/açúcares. Com esta alteração pretende-se comparar se a presença de maior quantidade de açúcar muda o resultado. A **tabela 10 e 11** mostram os resultados obtidos para este novo teste.

*Tabela 10. Tabela com os resultados da extração, que compara duas hipóteses.*

|  | Terbutilazina | DXM   | DXO   | Tebuconazole | Diflufenican |
|--|---------------|-------|-------|--------------|--------------|
| 70 $\mu\text{L}$ de extrato+25 $\mu\text{L}$ de padrão (Injeção 1) | 289704        | 8599  | 9924  | 443719       | 141706       |
| 70 $\mu\text{L}$ de extrato+25 $\mu\text{L}$ de padrão (Injeção 2) | 171458        | 9861  | 9902  | 459064       | 108705       |
| 70 $\mu\text{L}$ de extrato+25 $\mu\text{L}$ de padrão (Injeção 3) | 190100        | 10889 | 12946 | 474889       | 104282       |

|   | Terbutilazina | DXM   | DXO   | Tebuconazole | Diflufenican |
|---|---------------|-------|-------|--------------|--------------|
| 90 $\mu\text{L}$ de extrato +10 $\mu\text{L}$ de padrão (Injeção 1) | 13861         | 7520  | 7051  | 35938        | 1347         |
| 90 $\mu\text{L}$ de extrato +10 $\mu\text{L}$ de padrão (Injeção 2) | 55695         | 11059 | 11257 | 81954        | 1519         |
| 90 $\mu\text{L}$ de extrato +10 $\mu\text{L}$ de padrão (Injeção 3) | 9715          | 10915 | 23122 | 95089        | 1668         |

*Tabela 11. Representa o cálculo do desvio padrão e do RSD (%) para cada hipótese, e respetivo composto.*

|  |     | Desvio Padrão | RSD (%) |
|--|-----|---------------|---------|
| 70 $\mu\text{L}$ de extrato + 25 $\mu\text{L}$ de padrão | DXM | 1146,99       | 11,6316 |
|  | DXO | 1751,14       | 17,6455 |
| 90 $\mu\text{L}$ de extrato + 10 $\mu\text{L}$ de padrão | DXM | 2002,97       | 18,3506 |
|  | DXO | 8334,12       | 74,035  |

Observando ambas as tabelas, é perceptível que a melhor hipótese seria a de 70  $\mu\text{L}$  de extrato + 25  $\mu\text{L}$  de padrão, isto com base no seu valor de RSD, que é inferior ao da outra possibilidade, para ambos os compostos. A presença dos protetores analíticos

influencia o resultado de forma positiva e ajuda na diminuição de dispersão de valores entre as injeções.

Para além desta conclusão é possível retirar outra, referente a qual dos três pesticidas se apresenta como melhor padrão interno para os compostos em estudo. Calculando o valor de RSD (%) para cada um dos pesticidas, o terbutilazina é o que apresenta um valor mais baixo comparativamente aos restantes. Sendo por isso, a escolha mais indicada como padrão interno para os analitos DXM e DXO, tal como se encontra demonstrado na **tabela 12**.

*Tabela 12. Cálculo do desvio padrão e RSD (%) de cada um dos pesticidas.*

|               | Desvio<br>Padrão | RSD (%) |
|---------------|------------------|---------|
| Terbutilazina | 63574,89         | 33,4    |
| Tebuconazole  | 15585,62         | 3,4     |
| Diflufenican  | 20449,88         | 18,8    |

A adição dos protetores de analitos ao extrato teve como propósito o aumento dos picos dos compostos, sem que fosse necessário adicionar mais quantidade de composto ao sangue. A presença destes protetores permite que os analitos não sofram fenómenos de alargamento de banda, ao não interagirem com os centros ativos da coluna.

Apesar de não ter sido possível otimizar as variáveis mais influentes do processo de extração, as alterações feitas à medida que se foram detetando problemas durante as análises feitas, foi possível em parte desenvolver um protocolo de extração para os compostos DXM e DXO. A **figura 28** constitui uma representação do processo de extração desenvolvido, e as características de cada uma das variáveis.



Figura 28. Processo de extração final.

## 5. Conclusão

O dextrometorfano é a substância ativa de 16 medicamentos utilizados no tratamento da tosse seca e encontra-se disponível à venda sem que seja necessária prescrição médica. Quando ingerido em quantidades acima das recomendadas, os seus utilizadores experienciam efeitos semelhantes ao de drogas alucinogénias.

Esta dissertação foi desenvolvida com o propósito de desenvolver uma metodologia analítica capaz de analisar o composto dextrometorfano, e o seu metabolito maioritário, o dextrorfano, em matrizes biológicas. A técnica de extração escolhida foi a de microextração em fase sólida, utilizando fibras *Tips* C18 e PDMS/DVB. No decorrer do processo experimental selecionou-se o sangue total como a matriz a ser estudada.

Inicialmente, e de forma a conhecer os compostos em estudo, através da plataforma *Chemicalize*, recolheram-se informações acerca das características físico-químicas de cada analito, numa tentativa de compreender o seu comportamento quando exposto à matriz e no decorrer do processo de extração.

O passo seguinte consistiu em injetar os dois analitos em solvente orgânico, primeiramente em GC-TOF/MS, para retirar dados como o tempo de retenção, identificar potenciais iões precursores e os seus produtos, e ainda, calcular o limite de deteção instrumental do aparelho. Desenvolveu-se um desenho experimental para otimizar as condições cromatográficas do aparelho.

De seguida, e tendo em conta que o limite instrumental do GC-TOF/MS era demasiado alto considerando os valores expectáveis no sangue, avançou-se para uma técnica de espectrometria de massa mais seletiva (MS/MS). Inicialmente, injetou-se uma solução de DXM mais DXO a que foi acrescentada lidocaína, e foi possível identificar os dois analitos em estudo e o respetivo padrão interno. Realizou-se a análise de produtos e de seguida em modo MRM. Selecionados os iões precursores, iões produtos e respetivas energias para cada um destes, seguiu-se para a otimização da extração.

Para otimizar o processo de extração aplicou-se um desenho experimental, que permitiu determinar diferentes interações entre variáveis. Preparadas as soluções para o DoE não foi possível retirar as áreas dos picos visto que a altura dos mesmo se encontrava muito próxima à do ruído, como tal, decidiu-se retirar o *qualifier*, numa tentativa, que viria a ser bem-sucedida, pois analisando qualitativamente possibilitou o aumento dos

picos cromatográficas. Repetidas as experiências do DoE, e analisados os resultados, permitiram identificar a variável pH como uma das mais importantes a otimizar. Os restantes parâmetros em que os resultados apresentaram ser divergentes para os dois compostos, optou-se por dar preferência à condição mais favorável para o composto DXO, ou seja, àquelas que com base nos resultados de DoE faziam com que a área do pico do composto fosse maior. Isto porque, o DXO apresentou ter um limite de deteção pior que o do DXM. Desta forma, as fibras escolhidas para utilização foram as PDMS/DVB e a matriz de análise o sangue total. A opção de sangue total viria a tornar-se uma escolha complicada que acabou por dificultar não só todo o processo de extração como a deteção dos compostos.

Sabe-se, com base na bibliografia, que é rara a análise da matriz sangue no seu todo, visto que o sangue total é muito complexo, e apresenta na sua composição muitos compostos, com grande potencial de interferência analítica, desde lípidos, proteínas, entre outros. Já a utilização de plasma, obtido através da centrifugação do sangue, permite retirar os constituintes mais densos do sangue e utilizar apenas o sobrenadante aquoso. A utilização do sangue fez com que recuperação dos analitos, assim como a eficiência da extração, fossem mais baixos que o pretendido.

Tal como demonstrado anteriormente, a escolha desta matriz fez com que a cada injeção a inatividade (*inertness*) do *liner* ficasse mais degradada. Para além disso, no decorrer do processo de extração a própria fibra *tip*, acabava por ficar sempre bastante suja após cada extração. Este fenómeno sucede porque os constituintes mais pesados do sangue se “agarram” à fibra, acabando por competir com os analitos. Ao se agarrarem à fibra criam uma espécie de “barreira” que não permite que os analitos cheguem à fibra, não permitindo que a recuperação seja eficiente. Essa eficiência terá sempre tendência a diminuir ao longo das utilizações.

No decorrer experimental, e na procura por melhores os resultados alterou-se a quantidade de sangue de 0,4 mL para 0,2 mL. Com esta alteração tentou-se obter-se um extrato mais limpo, visto que se usou menos sangue e uma menor degradação do *liner* e das fibras.

Para além destas mudanças, sentiu-se necessidade de alterar o padrão interno, visto que a certa altura a lidocaína se encontrava a co-eluir com outro composto, nas condições operacionais utilizadas. Esta foi substituída por um conjunto de pesticidas, visto haver uma elevada probabilidade de que esses tipos de compostos não seriam

encontrados na amostra de sangue. E por fim, tentou-se a eficiências de protetores analíticos. Neste caso, conclui-se que a sua presença beneficiou positivamente os picos cromatográficos.

Após realizado todo o processo descrito, chegou-se á conclusão que o seguimento do desenvolvimento do método com esta matriz e nestas condições operacionais não iria ser viável. O que necessitaria de ser feito seria reavaliar algumas opções feitas de forma a implementar medidas corretivas que permitam desenvolver um método menos dispendioso e com resultados mais próximos dos pretendidos. Apesar de haver essa hipótese, não foi possível avançar dada a proximidade da data limite do trabalho.



## 6. Perspetivas Futuras

Num futuro, e de forma a prosseguir e atingir o propósito idealizado inicialmente para esta dissertação, seria necessário realizar algumas alterações às escolhas feitas anteriormente. A primeira modificação seria no tipo de matriz escolhida, a tentativa de análise de DXM e DXO em sangue total não foi totalmente bem-sucedida, devido à complexidade da matriz. Como tal, e de acordo com os dados obtidos, será mais vantajoso utilizar o plasma como matriz biológica.

De seguida, seria necessário voltar a tentar otimizar a variável pH, visto que foi considerada fundamental para o sucesso experimental. Para além do pH, parâmetros como o tempo de extração, tempo de retroextração, a quantidade de modificador orgânico e de sal, também deveriam ser otimizados, visto que o desenho experimental permitiu identificar estas variáveis influentes. O processo de otimização de parâmetros tem como objetivo minimizar o tempo de análise, os custos de operação, aumentar a precisão, diminuir limites analíticos, entre outros. Concluída a otimização do processo de extração, seria importante perceber qual o limite de deteção do DXM em GC/MS/MS e se este se aproxima do limite detetável no sangue para este composto.

A validação de métodos analíticos é feita através de vários testes laboratoriais, e permite comprovar que o método criado cumpre com certos requisitos exigidos, ou seja, que o mesmo é apropriado para quantificar analitos numa determinada matriz, a uma determinada concentração, que apresenta valores adequados e aceitáveis em parâmetros como a seletividade, linearidade, precisão, limite de deteção e quantificação, entre muitos outros. É a validação que garante a qualidade e desempenho analítico de um método analítico.

Para se validar o método será então necessário escolher uma *guideline* adequada ao método criado e ao propósito do mesmo.



## 7. Referências bibliográficas

- Ahmad, S. M. E. A. (2019). *Metodologias Analíticas Inovadoras Baseadas em Microextração Adsorptiva em Barra (BAμE) para a Monitorização de Contaminantes e Substâncias de Abuso Emergentes em Matrizes Ambientais e Biológicas*. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Amaratunga, P., Clothier, M., Lemberg, B. L., & Lemberg, D. (2016). Determination of dextromethorphan in oral fluid by LC-MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology*, 40(5), 360–366. <https://doi.org/10.1093/jat/bkw033>
- Arthur, C. L., & Pawliszyn, J. (1990). Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, 62(19), 2145–2148. <https://doi.org/10.1021/ac00218a019>
- Babu, K., Boyer, E. W., Hernon, C., & Brush, D. E. (2005). Emerging Drugs of Abuse. *Clinical Pediatric Emergency Medicine*, 6(2), 81–84. <https://doi.org/10.1016/j.cpem.2005.04.002>
- Banerji, S., & Anderson, I. B. (2001). Abuse of Coricidin HBP Cough & Cold tablets: Episodes recorded by a poison center. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 58(19), 1811–1814. <https://doi.org/10.1093/ajhp/58.19.1811>
- Barnhart, J. W., & Massad, E. N. (1979). Determination of dextromethorphan in serum by gas chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 163(4), 390–395. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)81642-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)81642-4)
- Bendriss, E. khalil, Markoglou, N., & Wainer, I. W. (2001). High-performance liquid chromatography assay for simultaneous determination of dextromethorphan and its main metabolites in urine and in microsomal preparations. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 754(1), 209–215. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00609-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00609-5)
- Biziuk, M. (2015). *Solid Phase Extraction Technique – Trends , Opportunities and Applications*.
- Brown, G. R., McLaughlin, K., & Vaughn, K. (2018). Identifying and treating patients with synthetic psychoactive drug intoxication. *Journal of the American Academy of Physician Assistants*, 31(8). <https://doi.org/10.1097/01.JAA.0000541487.41149.71>
- Capon, D. A., Bochner, F., Kerry, N., Mikus, G., Danz, C., & Somogyi, A. A. (1996). The influence of CYP2D6 polymorphism and quinidine on the disposition and antitussive effect of dextromethorphan in humans\*. *Clinical Pharmacology &*

- Therapeutics*, 60(3), 295–307. [https://doi.org/10.1016/S0009-9236\(96\)90056-9](https://doi.org/10.1016/S0009-9236(96)90056-9)
- Centers, A. A. (2022). *Dextromethorphan/DXM Overdose: Dangers of Abusing Cough Medicine*. <https://americanaddictioncenters.org/dextromethorphan-dxm>
- Cochems, A., Harding, P., & Liddicoat, L. (2007). Dextromethorphan in Wisconsin Drivers. *Journal of Analytical Toxicology*, 31(4), 227–232. <https://doi.org/10.1093/jat/31.4.227>
- DEA. (2020). *Drug Fact Sheet-DXM. Dxm*.
- Ebeshi, B. U., Obodozie, O. O., & Bolaji, O. O. (2014). Sensitive and selective reversed-phase high performance liquid chromatographic-UV spectrophotometric determination of dextromethorphan and its CYP2D6 mediated metabolite, dextrophan in human urine. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(2), 281–286. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v13i2.18>
- Ettre, L. S. (2000). Chromatography: The separation technique of the 20th century. *Chromatographia*, 51(1–2), 7–17. <https://doi.org/10.1007/BF02490689>
- Ferreira, M. (2015). *Estudo da aplicação de método microextração por fase empacotada (MEPS) para determinação de contaminantes emergentes*. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.
- Hendrickson, R. G., & Cloutier, R. L. (2007). “Crystal Dex:” Free-Base Dextromethorphan. *The Journal of Emergency Medicine*, 32(4), 393–396. <https://doi.org/10.1016/j.jemermed.2007.03.010>
- Hibbert, D. B. (2012). Experimental design in chromatography: A tutorial review. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 910, 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.01.020>
- Hoffmann, E., & Stroobant, V. (2007). *Mass Spectrometry: Principles and Applications* (3rd (ed.)).
- Hübschmann, H.-J. (2015). *Handbook of GC-MS - Fundamentals and Applications* (3<sup>a</sup> ed). Wiley-VCH, Alemanha.
- Hughes, G. (2016). Friendly pharmacodynamics: A simple introduction. *Nurse Prescribing*, 14(1), 34–43. <https://doi.org/10.12968/npre.2016.14.1.34>
- Infarmed. (n.d.-a). *Pesquisa do medicamento dextrometorfano- INFARMED, I.P.* Retrieved August 10, 2022, from <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/servicos-on-line/pesquisa-do-medicamento>
- Infarmed. (n.d.-b). *Resumo das características do medicamento- Bisoltussin 10,5 mg.* Retrieved August 15, 2022, from <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED->

- fo/detalhes-medimento.xhtml
- Infarmed. (n.d.-c). *Resumo das características do medicamento- Tussoral*. Retrieved August 15, 2022, from <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medimento.xhtml>
- Infarmed. (2015). *Infomed - Base de Dados de Medicamentos de Uso humano: Doxepina*. <https://www.infarmed.pt/infomed/lista.php>
- Karch, S. B. (1997). *Drug Abuse Handbook*.
- Koziel, J. A., Martos, P. A., & Pawliszyn, J. (2004). *System for the generation of standard gas mixtures of volatile and semi-volatile organic compounds for calibrations of solid-phase microextraction and other sampling devices*. *1025*, 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.10.079>
- Levy, S., & Siqueira, L. M. (2014). Testing for Drugs of Abuse in Children and Adolescents. *Pediatrics*, *133*(6). <https://doi.org/10.1542/peds.2014-0865>
- Logan, B. K., Goldfogel, G., Hamilton, R., & Kuhlman, J. (2009). Five Deaths Resulting from Abuse of Dextromethorphan Sold Over the Internet. *Journal of Analytical Toxicology*, *33*(2), 99–103. <https://doi.org/10.1093/jat/33.2.99>
- Mallet, A. I. (1998). Solid-phase extraction: principles and practice E. M THURMAN and M. S MILLS: vol 147 in series chemical analysis, ed. J. D. Winefordner, John Wiley and Sons, New York, 1998 ISBN 0471 61422X Price £50. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *12*(14), 988–988. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(19980731\)12:14<988::AID-RCM265>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(19980731)12:14<988::AID-RCM265>3.0.CO;2-1)
- Maštovská, K., Lehotay, S. J., & Anastassiades, M. (2005). Combination of Analyte Protectants To Overcome Matrix Effects in Routine GC Analysis of Pesticide Residues in Food Matrixes. *Analytical Chemistry*, *77*(24), 8129–8137. <https://doi.org/10.1021/ac0515576>
- Mayberry, K. M., Bloemer, J., & Ray, S. D. (2020). Drugs of abuse. *Side Effects of Drugs Annual*, *42*, 33–53. <https://doi.org/10.1016/bs.seda.2020.09.004>
- 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>
- Miller, S. C. (2005). *Dextromethorphan psychosis , dependence and physical withdrawal*. *December*, 325–327. <https://doi.org/10.1080/13556210500352410>

- Nguyen, L., Thomas, K. L., Lucke-Wold, B. P., Cavendish, J. Z., Crowe, M. S., & Matsumoto, R. R. (2016). Dextromethorphan: An update on its utility for neurological and neuropsychiatric disorders. *Pharmacology & Therapeutics*, 159, 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.01.016>
- Ouyang, G., & Pawliszyn, J. (2008). A critical review in calibration methods for solid-phase microextraction. *Analytica Chimica Acta*, 627(2), 184–197. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.08.015>
- Pawliszyn, J. (2000). Theory of Solid-Phase Microextraction. *Journal of Chromatographic Science*, 38(7), 270–278. <https://doi.org/10.1093/chromsci/38.7.270>
- Pawliszyn, Janusz. (2007). *Applications of Solid Phase Microextraction* (Janusz Pawliszyn (ed.)). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781847550149>
- 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>
- PUBCHEM. (2017). *Open chemistry database*. US National Library of Medicine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5360696#section=Top>
- Ruiz-Garcia, A., Bermejo, M., Moss, A., & Casabo, V. G. (2008). Pharmacokinetics in Drug Discovery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(2), 654–690. <https://doi.org/10.1002/jps.21009>
- Shafi, H., Imran, M., Usman, H. F., Sarwar, M., Tahir, M. A., Naveed, R., Ashiq, M. Z., & Tahir, A. M. (2016). Deaths due to abuse of dextromethorphan sold over-the-counter in Pakistan. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 6(3), 280–283. <https://doi.org/10.1016/j.ejfs.2015.07.002>
- Silva, B. J. G. da. (2007). Avaliação da técnica SPME/LC na análise de antidepressivos em amostra de plasma para fins de monitorização terapêutica. *Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto*.
- Simões, M., Martins, N., Cabrita, M. J., Burke, A. J., & Garcia, R. (2014). Tailor-made molecularly imprinted polymers for dimethoate and deltamethrin recognition: synthesis, characterization and chromatographic evaluation. *Journal of Polymer Research*, 21(3), 368. <https://doi.org/10.1007/s10965-014-0368-9>
- Siu, A., & Drachtman, R. (2007). Dextromethorphan: A Review of N-methyl-d-aspartate Receptor Antagonist in the Management of Pain. *CNS Drug Reviews*,

- 13(1), 96–106. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.2007.00006.x>
- Skoog, D. A., Crouch, F., Holler, J., W. D. M. (2006). *Fundamentos da Química Analítica* (8ª ed). Thomson, Brasil.
- Smith, R. M. (2003). Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of Chromatography A*, 1000(1–2), 3–27. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00511-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00511-9)
- Spangler, D. C., Loyd, C. M., & Skor, E. E. (2016). Dextromethorphan: a case study on addressing abuse of a safe and effective drug. *Substance Abuse Treatment, Prevention, and Policy*, 11(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s13011-016-0067-0>
- Sparkman, O. D., Penton, Z. E., Kitson, F. G. (2011). *Gas Chromatography and Mass Spectrometry- Practical Guide* (2ª ed). Academic Press, Amsterdam.
- Stanciu, C. N., Penders, T. M., & Rouse, E. M. (2016). Recreational use of dextromethorphan, “Robotripping”—A brief review. *The American Journal on Addictions*, 25(5), 374–377. <https://doi.org/10.1111/ajad.12389>
- Streetman, D. S., Bertino, J. S., & Nafziger, A. N. (2000). Phenotyping of drug-metabolizing enzymes in adults: a review of in-vivo cytochrome P450 phenotyping probes. *Pharmacogenetics*, 10(3), 187–216. <https://doi.org/10.1097/00008571-200004000-00001>
- Tips, S. L. C., Figure, W., Tips, S. L. C., Tips, S. L. C., Lc, T. S., Tips, S. L. C., & Tips, L. C. (2015). *SPME Tips*.
- Truta, L. (2012). *Desenvolvimento e procedimentos de validação de uma metodologia analítica por GC/MS/MS para a determinação de antidepressivos em sangue total*.
- United Nations Office on Drugs and Crime. (2017). Drugs of Abuse 2017 Edition: A DEA Resource Guide. *Forensic Toxicology*, 37(2), 2352–2362. <http://dx.doi.org/10.1039/C8AY00041G>[https://www.dea.gov/pr/multimedia-library/publications/drug\\_of\\_abuse.pdf](https://www.dea.gov/pr/multimedia-library/publications/drug_of_abuse.pdf)<http://www.emcdda.europa.eu/publications/implementation-reports/2010><http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/2373/TD0216072EN>
- Vettorello, G., Brandt, V. V., Dallazen, M. C., Kuhn, D., Etgeton, H. P., Spellmeyer, J. G., Carlesso, W. M., & Hoehne, L. (2017). MICROPOLUENTES EM ÁGUA – O NOVO DESAFIO EMERGENTE. *Revista Caderno Pedagógico*, 14(1). <https://doi.org/10.22410/issn.1983-0882.v14i1a2017.1410>
- Vuppalanchi, R. (2011). Metabolism of Drugs and Xenobiotics. In *Practical Hepatic*

*Pathology: A Diagnostic Approach* (pp. 45–52). Elsevier.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-443-06803-4.00004-6>

Wolfe, T. R., & Caravati, E. M. (1995). Massive dextromethorphan ingestion and abuse.

*The American Journal of Emergency Medicine*, 13(2), 174–176.

[https://doi.org/10.1016/0735-6757\(95\)90088-8](https://doi.org/10.1016/0735-6757(95)90088-8)

Yu, A., & Haining, R. L. (2001). Comparative contribution to dextromethorphan metabolism by cytochrome P450 isoforms in vitro: can dextromethorphan be used as a dual probe for both CYP2D6 and CYP3A activities? *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 29(11), 1514–1520.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11602530>

## 8. Anexos

**Anexo 1:** Tabela com as variáveis cromatográficas a otimizar, e respetivo nível a testar.  
Continuação da Tabela 6;

|          | T. <i>Vent</i> (s) | Pressão <i>Vent</i> (psi) | T. <i>Splitless</i> (s) | Temp. Fonte (°C) | Temp. Inicial Injetor (°C) |
|----------|--------------------|---------------------------|-------------------------|------------------|----------------------------|
| <b>1</b> | -                  | -                         | +                       | -                | +                          |
| <b>2</b> | +                  | -                         | -                       | -                | -                          |
| <b>3</b> | -                  | +                         | -                       | -                | +                          |
| <b>4</b> | +                  | +                         | +                       | -                | -                          |
| <b>5</b> | -                  | -                         | +                       | +                | -                          |
| <b>6</b> | +                  | -                         | -                       | +                | +                          |
| <b>7</b> | -                  | +                         | -                       | +                | -                          |
| <b>8</b> | +                  | +                         | +                       | +                | +                          |

**Anexo 2:** Tabela com as variáveis cromatográficas a otimizar para o processo de extração, e respetivo nível a testar. Continuação da Tabela 9;

|    | Modificador orgânico | Ph da Matriz | Salting-Out | Tipo de Matriz | Solvente | Tempo de Extração (min) | Tempo de Retroextração (min) | Tipo de material | Tipo de Fibra | Velocidade da Agitação |
|----|----------------------|--------------|-------------|----------------|----------|-------------------------|------------------------------|------------------|---------------|------------------------|
| 0  | -1                   | 1            | 1           | 1              | 1        | 1                       | 1                            | 1                | 1             | 1                      |
| 1  | 1                    | 1            | 1           | -1             | 1        | 1                       | 1                            | -1               | -1            | -1                     |
| 2  | -1                   | -1           | -1          | 1              | 1        | 1                       | 1                            | -1               | 1             | 1                      |
| 3  | 1                    | 1            | -1          | 1              | -1       | -1                      | 1                            | -1               | 1             | 1                      |
| 4  | 1                    | 1            | -1          | 1              | 1        | 1                       | -1                           | 1                | 1             | -1                     |
| 5  | 1                    | -1           | 1           | -1             | 1        | -1                      | 1                            | 1                | -1            | 1                      |
| 6  | -1                   | 1            | 1           | 1              | -1       | -1                      | 1                            | 1                | 1             | -1                     |
| 7  | -1                   | -1           | 1           | 1              | 1        | -1                      | -1                           | -1               | 1             | -1                     |
| 8  | -1                   | -1           | -1          | -1             | -1       | 1                       | 1                            | 1                | -1            | -1                     |
| 9  | 1                    | -1           | 1           | 1              | -1       | 1                       | -1                           | 1                | 1             | 1                      |
| 10 | -1                   | 1            | 1           | -1             | -1       | 1                       | -1                           | -1               | -1            | 1                      |
| 11 | -1                   | 1            | -1          | -1             | 1        | -1                      | -1                           | 1                | -1            | 1                      |