

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO EM TECNOLOGIAS LABORATORIAIS EM CIÊNCIAS FORENSES

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UMA METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE ROTINA DE NOVOS OPIOIDES SINTÉTICOS E ALUCINOGENÍOS EM SANGUE TOTAL POR CROMATOGRAPHIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA EM TANDEM

Trabalho submetido por
Joana Rita Pinela Pereira
para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologias Laboratoriais em
Ciências Forenses

setembro de 2024

[Esta página foi propositadamente deixada em branco]

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO EM TECNOLOGIAS LABORATORIAIS EM CIÊNCIAS FORENSES

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UMA METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE ROTINA DE NOVOS OPIOIDES SINTÉTICOS E ALUCINOGENÍOS EM SANGUE TOTAL POR CROMATOGRAPHIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA EM TANDEM

Trabalho submetido por
Joana Rita Pinela Pereira
para a obtenção do grau de **Mestre** em Tecnologias Laboratoriais em
Ciências Forenses

Trabalho orientado por
Professora Mestre Suzana de Moraes Valente Martins da Fonseca

e coorientado por
Professor Doutor Nuno da Rosa Neng

setembro de 2024

[Esta página foi propositadamente deixada em branco]

“Quando tens um sonho, tens de agarrá-lo e
nunca o largar”

Carol Burnett

Este trabalho é só mais uma prova disso.

[Esta página foi propositadamente deixada em branco]

Agradecimentos

Quero começar por agradecer a todos os docentes que lecionam no Mestrado em Tecnologias Laboratoriais em Ciências Forenses, por todo o conhecimento que transmitiram ao longo do primeiro ano do Mestrado, e que pôde ser utilizado no decorrer deste trabalho. Agradeço também à Coordenação do respetivo Ciclo de Estudos, na pessoa do Coordenador Professor Doutor Alexandre Quintas e do vice-Coordenador Professor Doutor Carlos Família, por proporcionarem a oportunidade de realizar os projetos de mestrado em instituições de renome no âmbito das ciências forenses, e por todo o acompanhamento que deram durante a realização do projeto de dissertação.

Tenho de fazer um enorme e sentido agradecimento ao Serviço de Química e Toxicologia Forenses da Delegação Sul do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P., na pessoa do Sr. Diretor João Miguel Franco, por terem aceite a realização deste trabalho e por me terem proporcionado (mais) uma experiência incrível que em muito contribuiu e contribuirá para o meu desenvolvimento académico e pessoal. Obrigada à Ema Vasconcelos, à Elsa Rodrigues, à Beatriz, ao António Castañera, ao Francisco Vale, ao Mário Barroso, ao Nuno Gonçalves, à Susana Simões, à Suzel Costa e em especial à professora Suzana Fonseca por me terem recebido tão bem, por terem sido tão atenciosos e por todo o conhecimento e experiência que partilharam comigo.

Em relação a esta dissertação, quero agradecer profundamente à Professora Mestre Suzana Fonseca e ao Professor Doutor Nuno Neng por terem sido orientadores extraordinários e muito melhores do que poderia ter pedido. O vosso apoio, a vossa cooperação/colaboração e as vossas sugestões foram pilares fundamentais na realização deste trabalho com sucesso.

Não posso deixar de agradecer à Luana Rosendo e à Mónica Antunes, as minhas colegas de laboratório e companhia diária de almoço. Obrigada por todos os momentos que partilhámos.

Por fim, quero também agradecer a todos aqueles que sempre me motivaram e apoiaram durante esta jornada.

Sem vocês este trajeto teria sido muito mais complicado!

A todos vós, um enorme OBRIGADA!

[Esta página foi propositadamente deixada em branco]

Declaração de Honra

Código | IMP-EM-EI-112_00

Declaro, por minha honra, que o presente trabalho académico é original e foi elaborado por mim própria, não se tendo recorrido a quaisquer outras fontes, para além das indicadas, usadas, adotadas literalmente ou adaptados a partir dos seus originais (em fontes impressas, não impressas ou na internet) e encontram-se adequados, identificados e citados, com observância das convenções do trabalho académico em vigor.

Mais declaro que esta Dissertação/Tese (Desenvolvimento e Validação de uma Metodologia para Análise de Rotina de Novos Opioides Sintéticos e Alucinogénios em Sangue Total por Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massa em Tandem) não foi apresentada, para efeitos de avaliação, a qualquer outra entidade ou instituição, para além das diretamente envolvidas na sua elaboração, e que os conteúdos das versões impressa e eletrónica são inteiramente coincidentes.

Declaro, igualmente, encontrar-me ciente de que a inclusão, neste texto, de qualquer falsa declaração terá consequências legais.

Joana Rita Pimela Pereira

Data: 26 / 09 / 2024

[Esta página foi propositadamente deixada em branco]

Declaração Conflito de Interesses (DCI)

Código | IMP-EM-EI-110_00

Eu Joana Rita Pinela Pereira, referente a Dissertação/Tese (Desenvolvimento e Validação de uma Metodologia para Análise de Rotina de Novos Opioides Sintéticos e Alucinogénios em Sangue Total por Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massa em Tandem) declaro que não possuo conflitos de interesse de ordem pessoal, comercial, académica, político ou financeiro.

Joana Rita Pinela Pereira

Data: 26/01/2024

[Esta página foi propositadamente deixada em branco]

Declaração de Financiamento

Código | IMP-EM-EI-114_00

Eu Joana Rita Pinela Pereira, referente a Dissertação/Tese (Desenvolvimento e Validação de uma Metodologia para Análise de Rotina de Novos Opioides Sintéticos e Alucinogénios em Sangue Total por Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massa em Tandem) declaro que o meu trabalho não se encontra financiado.

Joana Rita Pinela Pereira

Data: 26/09/2024

[Esta página foi propositadamente deixada em branco]

Declaração de Ética e Registo

Código | IMP-EM-EI-113_00

Eu Joana Rita Pinela Pereira, referente a Dissertação/Tese (Desenvolvimento e Validação de uma Metodologia para Análise de Rotina de Novos Opioides Sintéticos e Alucinogénios em Sangue Total por Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massa em Tandem) declaro que o meu trabalho se encontra aprovado pela Comissão de Ética do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. sob o número ou identificação de registo CE-42/2023.

Joana Rita Pinela Pereira

Data: 26/09/2024

[Esta página foi propositadamente deixada em branco]

Divulgação Científica

Comunicações Orais

- Pereira, Joana R. P.; Neng, Nuno R.; Fonseca, Suzana. “*Desenvolvimento e Validação de um Método Analítico para Determinação de Novos Opioides Sintéticos em Sangue Total por Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massa em Tandem (LC-MS/MS)*”. Trabalho apresentado a 9 de outubro de 2023 no Labmeeting em Ciências Forenses, Monte da Caparica, Portugal.
- Pereira, Joana R. P.; Neng, Nuno R.; Fonseca, Suzana. “*Desenvolvimento de Método Analítico para Determinação de Novos Opioides Sintéticos em Sangue*”. Trabalho apresentado a 28 de novembro de 2023 nas Egas Moniz Scientific Journeys - IV Jornadas Científicas Universitárias e Politécnicas Egas Moniz, Monte da Caparica, Portugal.
 - Premiada como Melhor Comunicação Oral de Ciências Forenses e Criminais.
- Pereira, Joana R. P.; Neng, Nuno R.; Fonseca, Suzana. “*Desenvolvimento e Validação de uma Metodologia para Análise de Rotina de Novos Opioides Sintéticos e Alucinogénios em Sangue Total por Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massa em Tandem*”. Trabalho apresentado a 22 de julho de 2024 no Labmeeting em Ciências Forenses, Monte da Caparica, Portugal.
- Pereira, Joana R. P.; Antunes, Mónica C.; Neng, Nuno R.; Mostra, Carla; Franco, João; Fonseca, Suzana. “*Determinação de Novos Opioides Sintéticos e Alucinogénios em Sangue Total com recurso a UHPLC-QTRAP-MS*”. Trabalho apresentado a 27 de setembro de 2024 nas IV Jornadas Ibéricas de Toxicologia, Covilhã, Portugal.
- Pereira, Joana R. P.; Antunes, Mónica C.; Neng, Nuno R.; Mostra, Carla; Franco, João; Fonseca, Suzana. “*Desenvolvimento e Validação de um Método de Quantificação de Novos Opioides Sintéticos e Alucinogénios em Sangue Total Postmortem e in Vivo*”. Trabalho a ser apresentado no 22.º Congresso Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (17 a 19 de outubro de 2024), Estoril, Portugal.

Posters Científicos

- Pereira, Joana R. P.; Antunes, Mónica C.; Neng, Nuno R.; Mustra, Carla; Franco, João; Fonseca, Suzana. “Analysis of New Synthetic Opioids and Hallucinogens in Whole Blood by UHPLC-MS/MS”. Póster apresentado nos CQE Days 2024, 18 e 19 de junho de 2024, Lisboa, Portugal.
- Pereira, Joana R. P.; Antunes, Mónica C.; Neng, Nuno R.; Mustra, Carla; Franco, João; Fonseca, Suzana. “UHPLC-MS/MS Methodology for Analysis of New Synthetic Opioids and Hallucinogens in Whole Blood”. Póster apresentado no Congresso Anual 2024 da Associação Internacional de Toxicologistas Forenses (TIAFT), 2 a 6 de setembro de 2024, St. Gallen, Suíça.

Resumo

As Novas Substâncias Psicoativas (NPS) são uma ameaça real e contemporânea, frequentemente consumidas em dosagens desconhecidas, por vezes letais. Os opioides sintéticos são o grupo de NPS que mais cresceu nos últimos anos. Não obstante, é importante continuar a monitorizar outras drogas mais “tradicionais”, como os alucinogénios, uma vez que têm sido associados a intoxicações e o seu potencial terapêutico está atualmente em estudo.

O objetivo desta dissertação foi desenvolver, otimizar e validar uma metodologia simples, rápida e sensível, para a análise de rotina em laboratórios de toxicologia forense de 6 novos opioides sintéticos (carfentanilo, fentanilo, isotonitazeno, metonitazeno, norfentanilo e sufentanilo) e 4 alucinogénios (lisergida, 2-oxo-3-hidroxi-lisergida, mescalina e psilocina) em sangue total. Tendo em vista o futuro alargamento do método a outras NPS, a mefedrona (catinona sintética) também foi incluída nos analitos-alvo.

A preparação de amostra foi otimizada por desenho experimental fatorial total e consistiu na precipitação proteica de 50 µL de sangue com recurso a 100 µL de acetonitrilo contendo 0,1 % de ácido fórmico. Após centrifugação, o sobrenadante foi analisado diretamente por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem, numa corrida de 5 minutos no modo de monitorização de reação múltipla com 2 transições para cada analito.

A linearidade foi verificada entre 0,1 e 20 ng/mL para todos os analitos à exceção da mescalina, não tendo sido observados arrastamentos ou efeitos de matriz significativos. A precisão foi inferior a 20 % e a justeza ficou compreendida entre ± 20 %. O limite de deteção foi estimado entre 0,05 e 1 ng/mL. A seletividade foi assegurada através da análise de amostras fortificadas com mais de 200 medicamentos, pesticidas e outras drogas de abuso. Foram também analisadas amostras forenses autênticas, tendo sido identificadas amostras positivas para fentanilo, norfentanilo, sufentanilo e mefedrona.

A metodologia proposta permite a identificação, confirmação e quantificação simultâneas de compostos de diferentes famílias de substâncias psicoativas, em amostras *postmortem* e *in vivo*. A rapidez, simplicidade e eficácia demonstradas tornam-na particularmente vantajosa para implementação em rotina em laboratórios de toxicologia.

Palavras-Chave: Novos Opioides Sintéticos; Alucinogénios; Sangue Total; Toxicologia; Precipitação Proteica; UHPLC-QTRAP-MS

[Esta página foi propositadamente deixada em branco]

Abstract

New Psychoactive Substances (NPS) are a real contemporary threat, typically consumed in unknown doses, some of which are lethal. Synthetic opioids represent the fastest growing NPS group in recent years. Nevertheless, it is important to continue monitoring other more “traditional” drugs, such as hallucinogens, as they have been linked to intoxications and their therapeutic potential is currently under study.

The objective of this dissertation was to develop, optimize and validate a simple, fast and sensitive methodology for the routine analysis in forensic toxicology laboratories of 6 new synthetic opioids (carfentanil, fentanyl, isotonitazene, metonitazene, norfentanyl, and sufentanil) and 4 hallucinogens (lysergide, 2-oxo-3-hydroxy-lysergide, mescaline, and psilocin) in whole blood. In view of the future expansion of the method to other NPS, mephedrone (a synthetic cathinone) was also included in the target analytes.

Sample preparation was optimized by full factorial design of experiments and consisted of protein precipitation of 50 μ L of blood using 100 μ L of acetonitrile containing 0.1 % of formic acid. After centrifugation, the supernatant was directly analyzed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry in a 5-minute run in multiple reaction monitoring mode with 2 transitions for each compound.

Linearity was verified between 0.1 and 20 ng/mL for all analytes except mescaline, and no significant carryover or matrix effects were observed. The precision values were < 20 % and trueness values were between $\pm$ 20 %. The limit of detection was estimated between 0.05 and 1 ng/mL. Selectivity was ensured through the analysis of samples fortified with more than 200 medicines, pesticides and other drugs of abuse. Authentic forensic samples were also analyzed, and positive samples for fentanyl, norfentanyl, sufentanil and mephedrone were identified.

The proposed methodology allows the simultaneous identification, confirmation and quantification of compounds from different families of psychoactive substances, in both postmortem and in vivo samples. The demonstrated speed, simplicity, and effectiveness make it particularly advantageous for routine implementation in toxicology laboratories.

Keywords: New Synthetic Opioids; Hallucinogens; Whole Blood; Toxicology; Protein Precipitation; UHPLC-QTRAP-MS

[Esta página foi propositadamente deixada em branco]

Índice Geral

Resumo	1
Abstract	3
Índice Geral.....	5
Índice de Figuras	7
Índice de Tabelas	9
Lista de Abreviaturas.....	11
1. Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses	15
1.1. Enquadramento Histórico, Organização e Funcionamento	15
1.2. Serviço de Química e Toxicologia Forenses	16
2. Introdução	19
2.1. Substâncias Psicoativas: Perspetiva Histórica e Tendências Atuais.....	19
2.1.1. Novas Substâncias Psicoativas.....	20
2.1.2. Drogas Clássicas - Alucinogénios	26
2.2. Metodologias de Análise.....	30
2.2.1. Amostras em Toxicologia Forense	30
2.2.2. Precipitação Proteica.....	32
2.2.3. Cromatografia.....	33
2.2.3.1. Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência (UHPLC).....	36
2.2.4. Espectrometria de Massa em Tandem.....	38
2.3. Química Analítica Verde/Sustentabilidade da Metodologia	40
2.4. Objetivo do Trabalho	41
3. Materiais e Métodos	43
3.1. Solventes e Padrões Analíticos.....	43
3.2. Amostras.....	43
3.3. Parte Experimental.....	44
3.3.1. Preparação de Soluções.....	44

3.3.2.	Instrumentação	44
3.3.3.	Desenvolvimento e Otimização da Metodologia	45
3.3.4.	Condições Finais da Metodologia.....	47
3.3.5.	Validação da Metodologia	49
3.3.6.	Aplicação a Amostras Reais.....	53
4.	Resultados e Discussão	55
4.1.	Desenvolvimento e Otimização da Metodologia	55
4.1.1.	Ensaio de Otimização por DoE	58
4.2.	Validação da Metodologia.....	59
4.2.1.	Seletividade/Estudos de Interferências	60
4.2.2.	Efeito de Matriz	60
4.2.3.	LOD	62
4.2.4.	LLOQ.....	63
4.2.5.	Linearidade/Modelo de Calibração e Arrastamento.....	63
4.2.6.	Justeza e Precisão	65
4.2.7.	Integridade de Diluição	66
4.2.8.	Estabilidade de Amostra Processada.....	68
4.3.	Comparação com Outras Metodologias	71
4.4.	Análise de Amostras Reais.....	72
4.5.	Sustentabilidade da Metodologia	73
5.	Conclusões e Perspetivas Futuras	77
6.	Referências Bibliográficas	79
Anexos.....		89

Índice de Figuras

Figura 1: Estrutura química central do fentanilo. Os diversos análogos diferem entre si na constituição das cadeias R^1 a R^5	24
Figura 2: Cartaz afixado, em março de 2024, na Baixa de Lisboa, publicitando terapia com recurso a psilocibina.	29
Figura 3: Representação das formas em que o sangue se pode apresentar, consoante o seu modo de colheita: sangue total, plasma e soro (da esquerda para a direita).	31
Figura 4: Diferenças na separação de picos cromatográficos consoante o valor de resolução (R). Adaptado de [45].	35
Figura 5: Curvas de van Deemter: efeito da velocidade da fase móvel e do tamanho de partícula de fase estacionária na altura equivalente a um prato teórico. Adaptado de [44].	38
Figura 6: Representação esquemática do processo de ionização electrospray. Adaptado de [49].	39
Figura 7: Representação esquemática do detetor QTRAP-MS utilizado neste trabalho. Adaptado de [51].	40
Figura 8: Representação esquemática do procedimento experimental desenvolvido e otimizado.	49
Figura 9: Cromatogramas de iões extraídos (XIC) das 5 transições de LSD-OH otimizadas pelo equipamento, de um controlo negativo (a) e de uma amostra fortificada (b). As transições estão numeradas de 1 a 5, da esquerda para a direita.	55
Figura 10: Cromatograma obtido para uma amostra fortificada, após análise com o método cromatográfico desenvolvido.	56
Figura 11: Gráfico de barras representativo da área relativa média da transição de quantificação do LSD obtida em cada um dos testes de solvente de precipitação e respetivas barras de erro (desvio padrão) ($n = 9$).	57
Figura 12: Cromatogramas iónicos extraídos da transição $205.1 > 160.2$ da psilocina, quando amostras preparadas nas mesmas condições são injetadas em diferentes volumes: 10 μL (a); 5 μL (b); e 2 μL (c). Em (a) e (b) é visível um interferente, assinalado com uma seta.	57

Figura 13: Cromatogramas iônicos extraídos referentes ao sufentanilo (a) e ao isotonitazeno (b) no sangue a uma concentração correspondente ao respectivo LOD estimado (0,05 ng/mL).	62
Figura 14: Gráficos de área relativa do metonitazeno em função do tempo de armazenamento no amostrador (em horas) (a) e no congelador a -20 °C (em dias) (b), bem como os limites de estabilidade aceites em cada um dos casos (linhas horizontais cor-de-laranja e verdes).	69
Figura 15: Cromatogramas MRM de fentanilo para uma amostra considerada positiva no rastreio (a) e outra considerada negativa (b).	72
Figura 16: Resultados obtidos pela metodologia desenvolvida quando submetida a análise através dos softwares AGREE (a) [52] e AgreePrep (b) [53].	74

Índice de Tabelas

Tabela 1: Critérios para detecção e identificação de picos cromatográficos, em comparação com uma amostra controle, de acordo com a norma da WADA [60].....	47
Tabela 2: Parâmetros de funcionamento do equipamento UHPLC para a metodologia desenvolvida no presente trabalho.....	47
Tabela 3: Transições MRM selecionadas, respectivos parâmetros MS otimizados e tempo de retenção de cada um dos analitos-alvo deste trabalho. As transições de quantificação estão apresentadas a negrito.	48
Tabela 4: Sequência dos ensaios de otimização do procedimento de precipitação proteica por DoE fatorial total realizados neste trabalho e respectiva resposta desejável obtida. As três respostas mais elevadas estão destacadas a negrito.	58
Tabela 5: Valores de supressão e/ou incremento iônico determinados para cada transição dos analitos-alvo deste trabalho. Os valores que não cumprem os critérios de aceitação estão destacados a vermelho.....	61
Tabela 6: Valores de LOD, LLOQ e principais parâmetros de linearidade obtidos no processo de validação dos analitos em estudo neste trabalho.	65
Tabela 7: Valores de precisão e justeza intra e inter-dias obtidos para as substâncias em estudo, a três níveis de concentração.....	66
Tabela 8: Valores de Precisão (CV %) e Justeza (Bias %) obtidos para cada analito quando as amostras foram diluídas 2, 5 ou 10 vezes. Os valores que não cumprem os critérios de aceitação estão apresentados a vermelho.....	67
Tabela 9: Limites temporais em que foi verificada a estabilidade dos analitos-alvo em extratos fortificados a concentração baixa ou alta e armazenados no amostrador ou no congelador.	69
Tabela 10: Registos de confirmação da presença de 4-MMC em amostras consideradas positivas no rastreio. Em (a), verificou-se total conformidade dos critérios de aceitação, pelo que a confirmação foi positiva. Em (b), a abundância relativa das áreas não estava conforme, pelo que corresponde a uma confirmação negativa.	73

[Esta página foi propositadamente deixada em branco]

Lista de Abreviaturas

α - Fator de Seletividade

u - Velocidade Linear Média da Fase Móvel

Σ – Símbolo matemático representativo de somatório

2-MMC – 2-metilmetcatinona (do inglês *2-Methylmethcathinone*)

3-MMC - 3-metilmetcatinona (do inglês *3-Methylmethcathinone*)

4-MMC - Mefedrona ou 4-metilmetcatinona (do inglês *4-Methylmethcathinone*)

ACN - Acetonitrilo

AFM - Ácido Fórmico

AGREE – Software de avaliação da pegada ecológica de uma metodologia (do inglês *Analytical GREENness Metric Approach*)

C_{Calc} - Concentração Calculada a partir da Curva de Calibração

CE - Energia de Colisão (do inglês *Collision Energy*)

CID - dissociação induzida por colisão (do inglês *Collision Induced Dissociation*)

C_{Teor} - Concentração Teórica do Calibrador

CV % - Coeficiente de Variação

CXP - Potencial de Saída da Célula de Colisão (do inglês *Collision Cell Exit Potential*)

DoE - Desenho Experimental (do inglês *Design of Experiments*)

DP - Potencial de Desagrupamento (do inglês *Declustering Potential*)

EMCDDA - Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência (do inglês *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*)

EP - Potencial de Entrada (do inglês *Entrance Potential*)

ER % - erro relativo percentual

ESI - ionização *electrospray* (do inglês *Electrospray Ionization*)

EUA - Estados Unidos da América

EUDA - Agência da União Europeia sobre Drogas (do inglês *European Union Drugs Agency*)

Fentanilo-D₅ – fentanilo deuterado (molécula de fentanilo em que 5 átomos de hidrogénio foram substituídos por deutérios)

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

GC - Cromatografia Gasosa (do inglês *Gas Chromatography*)

H - Altura Equivalente a Um Prato Teórico

H₂O – Água

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*)

HS - Espaço de Cabeça (do inglês *Headspace*)

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

INMLCF - Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, Instituto Público

k' - Fator de capacidade

K_D – Coeficiente de Distribuição

L - Comprimento de Coluna

LC - Cromatografia Líquida (do inglês *Liquid Chromatography*)

LLOQ - Limite Inferior de Quantificação (do inglês *Lower Limit of Quantification*)

LOD - Limite de Deteção (do inglês *Limit of Detection*)

LSD - Dietilamida do Ácido Lisérgico (do alemão *LysergsäureDiethylamid*) ou Lisérgida

LSD-OH - 2-oxo-3-hidroxi-LSD ou 2-oxo-3-hidroxi-lisérgida

m/z - Razão Massa/Carga

MeOH - Metanol

min. – Minutos

MQ_{DG} - Média dos Quadrados Dentro dos Grupos

MQ_{EG} - Média dos Quadrados Entre Grupos

MRM - Monitorização de Reação Múltipla (do inglês *Multiple Reaction Monitoring*)

MS - Espectrometria de Massa (do inglês *Mass Spectrometry*)

MS/MS - Espectrometria de Massa em Tandem

n - Número de Replicados

N - Número de Pratos Teóricos

NPS - Novas Substâncias Psicoativas

OVAT - Uma Variável de Cada Vez (do inglês *One Variable At a Time*)

PI – Padrão Interno

QQQ – Triplo Quadrupolo

QTRAP – Analisador híbrido de Triplo Quadrupolo e de Armadilha Linear de Iões (do inglês *Triple Quadrupole Linear Ion Trap*)

r - Coeficiente de Correlação Linear

R - Resolução

r² - Coeficiente de Determinação

rpm – Rotações Por Minuto

S/N - Razão Sinal/Ruído (do inglês *Signal to Noise*)

SCAN - Modo de Varrimento Completo de Iões

seg. – Segundos

SIM – Monitorização de Iões Seleccionados (do inglês *Selected Ion Monitoring*)

SQTF - Serviço de Química e Toxicologia Forenses

t'_R – Tempo de Retenção Ajustado

t_M – Tempo Morto

t_R – Tempo de Retenção

t_{RR} – Tempo de Retenção Relativo

UHPLC-QTRAP-MS - Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massa em Tandem com um analisador híbrido de Triplo Quadrupolo e de Armadilha Linear de Iões (do inglês *Ultra-High Performance Liquid Chromatography coupled with Hybrid Triple Quadrupole Linear Ion Trap Mass Spectrometer*)

UNODC - Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (do inglês *United Nations on Drugs and Crime*)

W - Extensão do Alargamento do Pico

WADA - World Anti-Doping Agency

XIC - Cromatogramas de iões extraídos

1. Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses

O trabalho experimental descrito neste documento, desenvolvido com vista à obtenção do grau de Mestre em Tecnologias Laboratoriais em Ciências Forenses, foi realizado no Serviço de Química e Toxicologia Forenses (SQTF) da Delegação Sul do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, Instituto Público (INMLCF), em Lisboa. Assim, é pertinente fazer uma breve contextualização acerca desta instituição.

1.1. Enquadramento Histórico, Organização e Funcionamento

O primeiro diploma referente à realização de perícias médico-legais em Portugal foi a Carta de Lei de 17 de agosto de 1899, que dividiu o país em três circunscrições médico-legais (Lisboa, Porto e Coimbra). Mais tarde, em 1918, foram criados os Institutos de Medicina Legal (de Lisboa, Porto e Coimbra), “responsáveis pelo serviço pericial das respetivas comarcas e pelos exames de laboratório solicitados pelas restantes comarcas” [1]. Para garantir a implementação de metodologias/procedimentos uniformes em todo o país, foi determinado, através do Decreto-Lei n.º 96/2001, de 26 de março, que os três institutos de medicina legal se fundissem num só, o Instituto Nacional de Medicina Legal, com o propósito de alcançar “melhores níveis de eficácia, eficiência, racionalização e participação da peritagem médico-legal” [2].

Esta instituição adquiriu a designação atual (Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, Instituto Público) com a publicação do Decreto-Lei n.º 166/2012, de 31 de julho [3], estando a sua organização interna e os seus Estatutos estabelecidos na Portaria n.º 19/2013, de 21 de janeiro [4]. De acordo com estes mesmos diploma legais, o INMLCF é uma instituição nacional de referência na área da medicina legal e de outras ciências forenses, sendo um Laboratório do Estado que coopera com os Tribunais e demais entidades que intervêm no sistema de administração da justiça, tendo como parte da sua missão “assegurar a prestação de serviços periciais médico-legais e forenses [...], bem como a promoção da formação e da investigação neste domínio” [3]. Esta instituição está sediada em Coimbra, mas atua sobre todo o território nacional, sendo composta por quatro órgãos, designadamente: Conselho Diretivo; Conselho Médico-Legal; Comissão de Ética; e Fiscal Único; e dispendo de Serviços Centrais e de três Delegações, no Porto, Coimbra e Lisboa (Delegações do Norte, Centro e Sul, respetivamente), que englobam Serviços de Clínica e Patologia Forense na dependência dos quais funcionam os diversos Gabinetes Médico-Legais e Forenses, distribuídos ao longo do país. Para além disso, os

Serviços Centrais de Genética e Biologia Forenses e de Química e Toxicologia Forenses funcionam através de Unidades Operativas (Laboratórios) em cada uma das Delegações. O Conselho Diretivo é atualmente presidido pelo Doutor Francisco Corte Real, tendo como vice-presidente o Doutor Agostinho Santos e como vogais as Doutoras Laura Cainé e Eugénia Cunha, que são, simultaneamente, o Presidente do INMLCF e os Diretores das Delegações do Norte, Centro e Sul, respetivamente.

1.2. Serviço de Química e Toxicologia Forenses

De acordo com o artigo 6.º da Portaria n.º 19/2013, de 21 de janeiro [4], compete ao SQTF “assegurar, a nível nacional, a realização de perícias e exames laboratoriais químicos e toxicológicos, no âmbito das atividades das Delegações e dos Gabinetes Médico-Legais, bem como a solicitação das autoridades e entidades para o efeito competentes”.

A Toxicologia tem evoluído ao longo dos séculos, podendo ser definida como o estudo dos efeitos adversos provocados por drogas, venenos e/ou produtos químicos nos organismos biológicos [5]. Por sua vez, a Toxicologia Forense é uma subárea da Toxicologia, altamente multidisciplinar e especializada, que tem como objetivo auxiliar a Justiça, contribuindo para o esclarecimento de questões que surjam durante investigações criminais ou em processos judiciais, e que estejam eventualmente relacionadas com intoxicações e efeitos tóxicos de drogas e outras substâncias em humanos e animais [6].

O SQTF realiza perícias no âmbito médico-legal e forense, respeitantes quer a patologia quer a clínica forense, mas também perícias no âmbito da fiscalização da condução sob influência do álcool ou de substâncias psicotrópicas. Nesse sentido, tem implementadas metodologias para a determinação, confirmação e/ou quantificação de substâncias com interesse forense, nomeadamente: drogas de abuso; medicamentos; pesticidas; substâncias voláteis (p.e. etanol, solventes orgânicos); monóxido de carbono; nitritos; entre outros, em diversas matrizes biológicas, destacando-se sangue, urina, cabelo e conteúdo gástrico.

Em termos organizacionais, o SQTF tem atualmente como Diretor o Doutor João Miguel Gouveia Franco e encontra-se dividido em três setores: Serviços Administrativos; Receção e Armazenamento de Amostras; e Análises Químicas e Toxicológicas.

Os Serviços Administrativos realizam variadas tarefas necessárias ao funcionamento diário do serviço, tais como: introdução na base de dados das análises solicitadas para cada amostra para posterior encaminhamento para o setor de Análises Químicas e Toxicológicas; elaboração de Autos de Ocorrência nas situações de ausência ou incongruência de dados e/ou documentos, que impossibilitem a realização dos exames toxicológicos; faturação das perícias; atendimento ao cliente; entre outras.

Por sua vez, o setor de Receção e Armazenamento de Amostras marca o início dos processos, uma vez que lhe compete proceder à receção e verificação de documentos e amostras, assim como a atribuição de número de processo, registo, rotulagem, armazenamento de amostras e registo de ocorrências. Neste setor são também preparadas as bolsas contendo os recipientes a usar na colheita e transporte das amostras biológicas a sujeitar a perícia toxicológica, que são depois disponibilizadas às respetivas entidades.

Relativamente ao setor de Análises Químicas e Toxicológicas, este é o responsável pela execução laboratorial dos diversos exames toxicológicos que são solicitados. Em termos organizacionais, este setor engloba quatro equipas distintas, encarregues de técnicas analíticas diferentes: a Equipa I realiza Ensaios Imunoenzimáticos; a Equipa II realiza perícias envolvendo GC-MS (Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa); a Equipa III executa LC-MS/MS (Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa em Tandem); e a Equipa IV está encarregue da técnica de GC-FID (Cromatografia Gasosa com Detetor de Ionização de Chama) com extração por *Headspace* (HS).

Por último, uma vez que este serviço se encontra Acreditado pelo Instituto Português de Acreditação de acordo com a norma internacional NP EN ISO/IEC 17025:2018 (norma de referência para laboratórios de toxicologia forense), possui também um Responsável da Qualidade.

[Esta página foi propositadamente deixada em branco]

2. Introdução

2.1. Substâncias Psicoativas: Perspetiva Histórica e Tendências Atuais

O termo “Substâncias Psicoativas” é utilizado para designar os compostos que atuam ao nível do Sistema Nervoso Central, provocando alterações na percepção, humor, estado de consciência e comportamento [7].

O consumo intencional destas substâncias não é, contudo, um fenómeno recente, mas sim algo que se tem verificado ao longo de todo processo evolutivo, em que substâncias psicoativas têm sido utilizadas para fins religiosos, medicinais e recreativos [8]. Desde há milénios que os líderes religiosos ingerem plantas e fungos com o objetivo de induzir estados de transe dissociativo. Um exemplo são os cogumelos *Amanita muscaria*, que eram ingrediente fundamental de uma bebida sagrada na Índia Antiga e que têm estado no centro de rituais religiosos na Ásia Central há pelo menos 4000 anos. Na América Central, os cogumelos do género *Psilocybe* eram utilizados com o mesmo propósito, enquanto que o cato peiote (*Lophophora williamsi*) era consumido para provocar estados de introspeção/reflexão espiritual pelos povos indígenas no México pré-Colombiano e pelo povo Navajo no sudoeste dos Estados Unidos da América (EUA). Outros compostos, por sua vez, têm sido utilizados como medicamentos ao longo de toda a História. O ópio, proveniente da papoila *Papaver somniferum*, é um desses compostos, estando o seu uso medicinal documentado em registos históricos como a Odisseia de Homero (século XIX a.C.) ou como o papiro de Ebers (≈1500 a.C.), onde é descrito um remédio contendo grãos de papoila do ópio para evitar o choro excessivo das crianças. Na América do Sul, nas zonas de produção, as folhas de coca são mastigadas, nomeadamente pelos mineiros, como forma de diminuir a fadiga. Para além das finalidades religiosa e medicinal, algumas substâncias, como o álcool, a nicotina e a cafeína, têm sido utilizadas com fins recreativos, nomeadamente como facilitadores de interação social. O seu consumo regular e relativamente generalizado levou a que fossem considerados compostos socialmente aceites. Similarmente, nas culturas Islâmicas, o haxixe é amplamente consumido com fins recreativos [8].

Ao longo das épocas e consoante as localizações geográficas, a evolução do conhecimento e as Regulamentações implementadas, os padrões de consumo têm vindo a alterar-se. De acordo com o Relatório Mundial sobre Drogas 2024 do Escritório das

Nações Unidas sobre Drogas e Crime (UNODC), 292 milhões de pessoas eram consumidoras de drogas em 2022, o que representa um aumento de 20 % em dez anos. Destas, 64 milhões apresentavam mesmo perturbações/adições decorrentes desse consumo. A canábis continua a ser, destacadamente, a droga mais consumida a nível mundial, seguida dos opioides, das anfetaminas, da cocaína e do *ecstasy*. Por conseguinte, a maioria dos problemas decorrentes do consumo de droga estão, logicamente, associados à canábis e aos opioides. No entanto, o consumo de opioides tem consequências muito mais graves para a saúde, sendo responsável pela maior percentagem global de intoxicações fatais. A nível Europeu, os opioides eram a principal droga consumida (51 %) pelos toxicodependentes que se encontravam em tratamento [9].

Não obstante, a quantidade e diversidade de drogas disponíveis nos mercados mundiais tem vindo a aumentar, o que resulta em padrões de consumo cada vez mais complexos e situações de policonsumo muito mais comuns. Este aumento de substâncias disponíveis deve-se essencialmente às drogas sintéticas, que apresentam características que as tornam uma alternativa às drogas tradicionais/naturais, nomeadamente: tempo de produção mais curto; não têm uma geografia fixa, pois não exigem grandes áreas de solo; e apenas necessitam de produtos químicos baratos e facilmente acessíveis, o que lhes confere também um preço de venda mais baixo. Contudo, os riscos associados ao consumo de drogas sintéticas são muito elevados, devido ao desconhecimento da sua farmacologia e perigosidade e às misturas de drogas em que são vendidas [9].

2.1.1. Novas Substâncias Psicoativas

De acordo com o UNODC, no século XXI tem-se observado um aumento no número de Novas Substâncias Psicoativas (NPS). Estas substâncias, também denominadas “*legal highs*” ou “*designer drugs*”, são compostos que “não estão controlados ao abrigo da Convenção Única sobre Estupefacientes de 1961 nem da Convenção de 1971, mas que representam uma ameaça para a saúde pública, não sendo necessariamente novas invenções, mas sim substâncias que ficaram recentemente disponíveis” [9]. O fenómeno das NPS funciona como uma forma do mercado ilícito responder às proibições e limitações legais aplicadas às drogas clássicas, fornecendo substâncias (legais) capazes de mimetizar os efeitos psicoativos dessas mesmas drogas controladas. Contudo, muitas dessas substâncias acabam por ser mais potentes ou com efeito mais prolongado do que as disponíveis até então, podendo ser mais perigosas e mortais. Muitas vezes, inclusive, os utilizadores nem sabem que estão a comprar e

consumir estas substâncias, pois os traficantes misturam-nas com outras drogas ou usam-nas mesmo em sua substituição [9–11].

Segundo o Relatório Mundial sobre Drogas 2024, o número de NPS disponíveis no mercado global tem-se mantido estável desde 2018 (à exceção de 2021), correspondendo, em 2022, a um total de 566 NPS, 44 das quais identificadas nesse mesmo ano. No entanto, desde 1995 já foram identificadas mais de 1200 novas substâncias psicoativas [9]. O Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência (EMCDDA, atualmente Agência da União Europeia sobre Drogas (EUDA)) estava a monitorizar, no final de 2023, mais de 950 NPS, 26 das quais notificadas pela primeira vez na Europa nesse ano [10]. A maioria destas novas substâncias pertence ao grupo dos estimulantes (nomeadamente catinonas) (35 %) e dos canabinoides sintéticos (22 %). No entanto, os opioides sintéticos são o grupo que mais cresceu nos últimos anos, aumentando a sua percentagem global de 3 % (em 2015) para 15 % (em 2022), sendo que, no mercado europeu da droga, foram identificados 81 novos opioides desde 2009, 7 deles em 2023 [9,10].

Os opioides são conhecidos pelo seu potencial de analgesia, mas contribuem também para uma melhoria do humor, através da ativação da via da recompensa da dopamina. Os opioides sintéticos são compostos lipofílicos, pelo que conseguem atravessar facilmente a barreira hematoencefálica e entrar no sistema nervoso central. Os seus efeitos adversos são semelhantes aos causados pela heroína e outros opioides e incluem: dor de cabeça, tonturas, sonolência, náuseas, bradicardia, inconsciência, entre outros. O efeito adverso mais grave é a depressão respiratória, que, em casos extremos, pode desencadear hipoxia cerebral aguda, coma e até morte [12]. Para provocar os efeitos descritos, estes compostos sintéticos interagem com os mesmos recetores que os opioides endógenos (endorfinas, encefalinas, endomorfina, dinorfina e nocicetina/orfantina), ou seja, ligam-se aos recetores opioide, amplamente distribuídos no sistema nervoso, mas também em órgãos periféricos como coração, pulmões, fígado e nos sistemas gastrointestinal e reprodutivos, sendo essenciais na modulação da dor, no humor/estado de espírito, na locomoção, na termorregulação, na diurese e no stress. Atualmente, existem quatro tipos de recetores opioide, nomeadamente μ (*mu*), δ (*delta*), κ (*kappa*) e recetor opioide de nociceção. Os diferentes opioides sintéticos podem ligar-se aos vários tipos de recetor, no entanto, os recetores opioide μ são os principais responsáveis pelos efeitos descritos anteriormente e pelo potencial aditivo [12].

Existem diversos opioides sintéticos, contudo o maior e mais popular grupo de novos opioides sintéticos corresponde ao fentanilo e aos seus análogos.

O consumo destes opioides é particularmente relevante nos Estados Unidos da América que, desde 1990, está perante uma crise de opioides, responsável por milhares de intoxicações fatais todos os anos. Esta crise de opioides iniciou-se como resultado do aumento generalizado de overdoses decorrentes do consumo de opioides prescritos para o tratamento de dor; mais tarde, quando a prescrição destes compostos foi restringida, os utilizadores, muitos deles já dependentes, começaram a consumir heroína em alternativa. A partir de 2013, fentanilo ilícito, análogos de fentanilo e outros opioides sintéticos começaram a aparecer em larga escala no mercado da droga. Como consequência, passaram a verificar-se números cada vez mais elevados de mortes por intoxicação com estes opioides sintéticos [12,13]. De acordo com o *CDC's National Center for Health Statistics*, em 2023, verificaram-se cerca de 81 000 intoxicações fatais envolvendo opioides nos EUA, das quais cerca de 74 700 associadas a fentanil [14].

O fentanilo é um agonista sintético de ação rápida dos recetores opioides μ , cerca de 50 a 100 vezes mais potente que a morfina, e que, apesar de ser uma substância controlada desde 1964, está atualmente aprovado para ser utilizado como analgésico e anestésico. Contudo, o seu abuso/consumo não prescrito/controlado representa a maior fonte de perigo e preocupação. Quando utilizado como analgésico, a sua concentração sérica deve estar entre 1 e 2 ng/mL. Em casos de anestesia, a concentração deverá ser 10 – 20 ng/mL. A dose letal estimada de fentanilo em humanos é de 2 mg, sendo que concentrações sanguíneas iguais ou superiores a 7 ng/mL já foram associadas a mortes com policonsumo. Uma vez no organismo, a sua metabolização é essencialmente hepática, sendo o norfentanilo, um composto farmacologicamente inativo, o seu principal metabolito [12,15].

Os primeiros análogos do fentanilo, isto é, moléculas estruturalmente relacionadas com o mesmo, começaram a ser sintetizados na década de 60. Contudo, a partir de 2013 verificou-se um aumento no número destes compostos no mercado, que emergiram como forma de contornar as leis que visavam controlar o consumo de fentanilo. Atualmente, já foram identificados mais de 1400 análogos de fentanilo (alguns mais potentes que o próprio fentanilo, extremamente tóxicos e com propriedades desconhecidas), sendo que a maioria deles são produzidos na China. Devido à sua elevada potência, estes compostos são frequentemente misturados com heroína ou vendidos em seu lugar e vendidos sob a

forma de comprimidos, supostamente contendo alprazolam, oxicodona ou outros medicamentos prescritos [12].

Dois exemplos de análogos de fentanilo são o sufentanilo e o carfentanilo. O sufentanilo, à semelhança do fentanilo, também está aprovado para uso terapêutico em humanos, sendo, desde 1976, utilizado como anestésico em procedimentos cirúrgicos com pacientes submetidos a intubação traqueal e ventilação mecânica. Para além disso, é usado como analgésico em situações pós-operatório e obstétricas. Este composto é 10 a 15 vezes mais forte que o fentanilo e 500 a 1000 vezes mais forte que a morfina [16]. O carfentanilo, por sua vez, tem uma potência cerca de 10 000 vezes superior à da morfina e 30 a 100 vezes superior à do fentanilo, sendo o opioide mais potente aprovado para uso terapêutico em medicina veterinária, como anestésico, analgésico e imobilizador de animais de grande porte, como elefantes ou ursos [12]. Apesar de não estar aprovado para uso em humanos, o carfentanilo é consumido ilicitamente ou de forma desconhecida, sendo responsável por diversas intoxicações e mortes. Esta substância já foi utilizada como arma química contra um ataque terrorista num teatro em Moscovo em 2002 e tem estado envolvido em casos forenses desde 2015 [17]. As concentrações de carfentanilo encontradas no sangue variam bastante de pessoa para pessoa, pelo que há registos de casos com concentrações bastante diversas. Num estudo de Noble *et al.* (2021) [17], as concentrações de carfentanilo determinadas em 1136 amostras de sangue *postmortem*, recebidas entre 2017 e 2020, variaram de 0,05 a 32 ng/mL. Segundo Zawilska e colaboradores (2021) [18], as concentrações identificadas no sangue *postmortem* estão geralmente compreendidas entre 0,01 ng/mL e 92,0 ng/mL, enquanto em casos *in vivo* as gamas de concentração reportadas são compreendidas entre 0,01 e 32,4 ng/mL.

Este fenómeno não se verifica apenas nos Estados Unidos, sendo um problema mundial. Na Europa, apesar de ainda não existir uma crise de opioides e de a heroína continuar a ser o opioide mais consumido, nos últimos anos o mercado de novos opioides sintéticos tem sido igualmente dominado pelo fentanilo e seus análogos, sendo que, em 2022, os Estados Membros da União Europeia comunicaram cerca de 163 mortes associadas aos fentanils, não só de origem ilegal, mas também resultantes de desvios de compostos de origem médica [10].

Devido à grande disponibilidade destes compostos e ao número elevado de overdoses, tornou-se um problema de saúde pública. Para tentar resolver esta questão, foram implementadas diversas normas a nível internacional. Em 2018, a US Drug

Enforcement Administration impôs uma proibição sobre as substâncias relacionadas com o fentanilo, ou seja, substâncias que apresentassem a sua estrutura central (Figura 1), mas que tivessem sofrido alterações químicas, o que permitiu abranger uma elevada quantidade de análogos de fentanilo. Em 2019, a China implementou uma ação semelhante, banindo os precursores de fentanil N-fenetil-4-piperidona e 4-anilino-N-fenetilpiperidina. Estas leis levaram a uma redução do número de análogos de fentanilo disponíveis no mercado. No entanto, como resposta a esta situação, rapidamente foram introduzidos no mercado novos opioides sintéticos, pertencentes a outras famílias [19]. Estes novos opioides incluem membros das famílias difeniletilpiperazina (MT-45), ciclohexilbenzamida (Utopioides, p.e. U-47700), benzimidazolona (p.e. brorfina) e cinamilpiperazina (AP-238), mas a família que mais se destaca atualmente são os opioides benzimidazóis (também designados por nitazenos), já responsáveis por centenas de overdoses fatais, tendência que também se verifica na Europa [11].

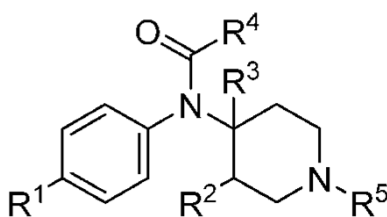


Figura 1: Estrutura química central do fentanilo. Os diversos análogos diferem entre si na constituição das cadeias R¹ a R⁵.

Os nitazenos foram inicialmente desenvolvidos pela empresa farmacêutica Suíça CIBA nos anos 50 devido às suas propriedades analgésicas, mas, devido aos seus efeitos adversos, nunca avançaram para ensaios clínicos e, por isso, nunca foram aprovados para uso terapêutico em humanos. Estes compostos são agonistas dos recetores opioides μ com propriedades antinociceptivas e efeitos psicoativos comparáveis à morfina ou à heroína. Contudo, podem ser centenas a milhares de vezes mais potentes que a morfina e dez vezes mais potentes que o fentanilo [13]. O primeiro nitazeno desenvolvido foi o etonitazeno, tendo sido controlado internacionalmente devido à sua elevada potência em comparação com o fentanilo. Até 2019, apenas o etonitazeno foi raras vezes encontrado no mercado ilícito da droga, tendo a sua presença sob a forma de "pó de aparência acastanhada" sido somente relatada em Itália no final da década de 1960, na Alemanha em 1987, na Rússia em 1998 e nos EUA em 2003 [11,19].

O “verdadeiro” aparecimento dos nitazenos deu-se em 2019, quando o isotonitazeno, que havia sido desenvolvido pela primeira vez ao mesmo tempo que o

etonitazeno, surgiu no mercado das drogas recreacionais nos EUA e na Europa, sendo o nitazeno mais prevalente nesse ano. Em outubro de 2020, o isotonitazeno já havia sido identificado em mais de 200 casos *postmortem* nos EUA, no Canadá e na Europa [11,19,20], o que levou à sua inclusão na lista de drogas controladas. Como consequência, emergiu a seguir, em 2020, o metonitazeno, sendo o nitazeno mais prevalente no início de 2021, também associado a dezenas de mortes [19].

Em matrizes biológicas, as concentrações de nitazenos são baixas, tipicamente inferiores a 10 ng/mL no sangue, sendo quase sempre detetadas juntamente com benzodiazepinas e outros opioides (heroína ou fentanil), mas também com estimulantes (cocaína, anfetaminas, metanfetaminas) e até canabinóides [11,13]. Num trabalho realizado por Papsun e colaboradores, a presença de nitazenos e buprenorfina foi analisada em 384 amostras de sangue colhidas entre janeiro de 2020 e dezembro de 2021 nos EUA, sendo que as concentrações de isotonitazeno variaram de 0,11 a 99 ng/mL e as de metonitazeno de 0,5 a 50 ng/mL. Noutro trabalho, a presença de metonitazeno foi confirmada em 20 casos *postmortem* com uma concentração no sangue entre 0,5 e 33 ng/mL [11].

Tal como aconteceu com os análogos de fentanilo, à medida que estes compostos foram sendo introduzidos na lista de substâncias controladas, outros nitazenos foram surgindo no mercado. A nível europeu, os nitazenos também são uma ameaça real e contemporânea, até porque, desde 2019, 21 países da União Europeia já comunicaram a presença de pelo menos um nitazeno, quer em apreensões ou amostras biológicas. Dos 7 novos opioides sintéticos identificados pela primeira vez em 2023, 6 deles correspondem a nitazenos. Até 4 de julho de 2024, já foi notificado o aparecimento de mais três novos nitazenos na Europa, o que faz com que atualmente existam 19 nitazenos sob monitorização, o que corresponde a cerca de 20 % do total de opioides controlados. De entre esses nitazenos, os mais comuns na Europa são o protonitazeno, o metonitazeno e o isotonitazeno [10,21].

Em 2022, foram registadas quase 750 apreensões de novos opioides sintéticos, o que totalizou aproximadamente 16,6 kg de produto. No total, 40 % das apreensões (302) e 49 % do material apreendido (8,2 kg) corresponderam a carfentanil e 34 % das apreensões (253) e 18 % de produto (3,5 kg) eram nitazenos. A maioria das apreensões ocorreu no norte da Europa, nomeadamente na Letónia, Lituânia, Estónia, Polónia e Suécia. No mesmo ano, a polícia estónia informou ter apreendido pó contendo

metonitazeno misturado com bromazolam (uma nova benzodiazepina) e outras misturas contendo protonitazeno, metonitazeno e xilazina (sedativo e analgésico animal). O número de medicamentos falsificados contendo nitazenos também tem aumentado, tendo sido notificada a apreensão de 430 comprimidos e/ou cápsulas em 2022. Em 2023, a Polícia Judiciária Portuguesa apreendeu 5752 comprimidos falsos de oxicodona contendo N-desetil isotonitazeno (primeira vez que a substância foi identificada na Europa), enquanto na Suécia foram apreendidos 3100 comprimidos falsos de oxicodona que continham metonitazeno. Mais recentemente, em 2024, a polícia finlandesa comunicou uma apreensão de 1000 comprimidos falsos de buprenorfina contendo metonitazeno [10,22].

Um aspeto ainda mais grave é o facto de os nitazenos também estarem envolvidos em mais de 150 mortes na Europa, apenas em 2023, tendo sido identificadas 76 mortes na Letónia, 56 na Estónia, 13 na Noruega, 8 na Finlândia, uma na Suécia e uma em França. Na Irlanda e em França foram relatados surtos de intoxicações provocados por nitazenos vendidos como se fossem heroína. O surto em França foi limitado, envolvendo um pequeno número de intoxicações não fatais e uma morte. Os surtos na Irlanda foram mais extensos, suspeitando-se que tenham resultado em 65 intoxicações não fatais, não se sabendo, contudo, se houve mortes associadas. O nitazeno identificado nas amostras apreendidas neste surto foi protonitazepina. Em 2024, nitazenos vendidos indevidamente como heroína foram associados a overdoses em duas prisões irlandesas. No Reino Unido, foram confirmadas pelo menos 65 mortes decorrentes do consumo de opioides, sendo que estes surtos envolveram heroína adulterada com nitazenos e medicamentos falsificados (oxicodona e benzodiazepinas) contendo nitazenos [10,22].

2.1.2. Drogas Clássicas - Alucinogénios

O fenómeno das NPS está bastante presente na atualidade e é motivo de grande preocupação. Não obstante, é igualmente importante continuar atento às substâncias psicoativas mais “tradicionais”, como por exemplo, os alucinogénios clássicos. Estes incluem substâncias como a dietilamida do ácido lisérgico (LSD), também designada de lisérgida, a psilocibina ou a mescalina, sendo também designadas por alucinogénios ou psicadélicos serotoninérgicos, uma vez que exercem os seus efeitos ao nível dos recetores de serotonina, embora o seu mecanismo de ação ainda não seja totalmente conhecido [23–25].

O consumo de alucinogénios afeta a mente, desencadeando alterações profundas na percepção, cognição, emoção, humor e consciência, sendo que a profundidade e natureza destas alterações é influenciada pela dose consumida, pela personalidade e perspectivas do consumidor ou até pelo ambiente aquando do consumo, podendo resultar em experiências positivas de desinibição, melhoria do estado de espírito e prazer, mas também podendo originar estados psicóticos associados a sentimentos de medo e pânico e ideias paranoicas [25]. Além disso, os psicadélicos aumentam a neuroplasticidade, isto é, a capacidade do cérebro se adaptar e formar novas conexões neuronais [23].

Devido a estes efeitos e à sua ocorrência natural, estes compostos têm sido usados desde há milénios pelos Humanos com finalidades espirituais, religiosas e medicinais. Apesar deste consumo histórico, a “verdadeira” investigação científica dos alucinogénios apenas começou em 1897, quando Arthur Heffter isolou a mescalina e confirmou os seus efeitos psicoativos. No entanto, nas décadas seguintes pouca pesquisa foi feita e os psicadélicos permaneceram “desconhecidos/adormecidos”. Este cenário alterou-se com a síntese de LSD, em 1938, por Albert Hofmann, que, poucos anos mais tarde, identificou também a estrutura da psilocibina.

A mescalina é um alcaloide natural presente nos catos peiote (*Lophophora williamsii*), San Pedro (*Echinopsis pachanoi*), tocha peruana (*Echinopsis peruviana*) e tocha boliviana (*Echinopsis lageniformis*), sendo também encontrada nas plantas *Pereskia aculeata* e *Acacia berlandieri*. Apesar da sua ocorrência natural, em 1919, Ernst Späth conseguiu sintetizar este composto em laboratório. Segundo Vamvakopoulou (2023), apenas foi relatada uma morte decorrente do consumo de mescalina, com uma concentração no sangue de 9700 ng/mL [26]. Num ensaio envolvendo administração oral de 300 e 500 mg de mescalina, as concentrações plasmáticas máximas foram de 600 a 1284 ng/mL e 721 a 1822 ng/mL, respetivamente [27].

No que concerne à LSD, esta é um composto semissintético obtido a partir do ácido lisérgico, que, por sua vez, é produzido pelo fungo da cravagem do centeio (*Claviceps purpurea*). Esta droga surge geralmente sob a forma de selos e é extensivamente metabolizada em 2-oxo-3-hidroxi-LSD (LSD-OH) e N-desmetil-LSD, com apenas 1% da forma não metabolizada a ser excretada na urina. O LSD-OH é considerado um marcador de consumo de LSD devido às suas concentrações 16 a 43 vezes mais elevadas e à sua janela de deteção mais prolongada [28]. A LSD é uma das drogas mais potentes, sendo necessárias doses bastante reduzidas para produzir efeitos, o

que faz com que esteja presente nas matrizes biológicas também em concentrações muito baixas. Existem registos de mortes por intoxicação por LSD, onde foram encontradas concentrações de 4,8 ng/mL e 0,47 ng/mL no sangue e, nos casos de intoxicações agudas não fatais, as concentrações de LSD no sangue variaram entre < 5 e 60 ng/mL. Num estudo retrospectivo australiano, foram identificados 26 casos *postmortem* positivos para LSD entre 2000 e 2023, com concentrações no sangue entre 0,1 e 3 ng/mL [29].

Por sua vez, a psilocibina é um composto presente nos cogumelos dos géneros *Psilocybe*, *Panaeolina*, *Pluteus*, *Panaeolus*, *Stropharia*, *Conocybe*, and *Gymnopilus*, designados geralmente de “cogumelos mágicos”. À semelhança do que ocorreu com a mescalina, esta substância também foi sintetizada em laboratório em 1957. Após a administração oral, a psilocibina é rapidamente convertida em psilocina. A psilocibina (e consequentemente a psilocina) apresentam toxicidade reduzida. No entanto, já foram reportados alguns casos fatais resultantes do seu consumo. Em 1996, foi descrito um caso em que a causa de morte foi consumo bastante excessivo de um cogumelo, apresentando uma concentração de psilocina no plasma de 4 $\mu\text{g/mL}$ [30]. Noutros casos, com mortes atribuídas à toxicidade da psilocibina, as concentrações no sangue foram de 4000 e 30 ng/mL. Na Austrália, entre 2000 e 2023 foram identificados 5 casos *postmortem* positivos para psilocina, com concentrações no sangue entre 6 e 83 ng/mL [29].

Nos anos 50 e 60, centenas de trabalhos clínicos estudaram e exploraram os potenciais usos terapêuticos e efeitos dos alucinogénios no tratamento de neuroses, transtornos obsessivos-compulsivos, abuso de substâncias, ansiedade e depressão, alguns deles com resultados promissores. Contudo, a maioria destes estudos apresentava falhas metodológicas graves, pelo que não pôde ser dada total credibilidade aos seus resultados. Simultaneamente, a partir dos anos 60, aumentou o interesse público pelos alucinogénios e o uso recreativo de LSD, psilocibina e mescalina expandiu-se bastante, sendo largamente associado ao movimento *Hippie* dessa época. Tudo isto levou a que, nos anos 70, se procedesse ao controlo internacional destas substâncias, o que resultou igualmente numa redução do seu estudo científico [23,25]. Nas últimas décadas, devido ao aumento global dos problemas de saúde mental, tem-se verificado um interesse renovado no uso terapêutico dos alucinogénios no tratamento de transtornos mentais/psicológicos, até porque os medicamentos existentes, nomeadamente antipsicóticos e antidepressivos, apesar de atuarem também ao nível dos recetores de serotonina, são ineficazes em muitos pacientes, acarretam efeitos adversos significativos, e necessitam de semanas de ingestão

diária até que os efeitos terapêuticos surjam. Assim, os psicadélicos poderão ser uma nova alternativa, pois aparentam ter baixa toxicidade e efeitos secundários menores, baixo risco de dependência e produzem efeitos terapêuticos mais rapidamente (após doses únicas) e mais duradouros, mantendo-se durante algum tempo [23,24].

Apesar de os alucinogénios apresentarem toxicidade baixa e demonstrarem potencial terapêutico, isto não significa que estas substâncias são isentas de risco, pois ainda existe um elevado potencial de abuso, especialmente em ambientes recreativos, e há registos de situações graves resultantes do seu consumo. A maioria das mortes decorrentes do consumo de alucinogénios está associada a lesões traumáticas acidentais ou autoinfligidas (p.e. saltar de uma janela ou automutilações) que ocorrem como consequência de estados psicóticos ou alucinações. No entanto, também existem registos de mortes ou quase mortes atribuídas diretamente à toxicidade destes compostos, pois, quando existe um consumo em doses bastante elevadas, podem ser desencadeados efeitos adversos como enfarte do miocárdio, taquicardia, bradicardia, hipertensão, hipertermia, vômitos e convulsões [29]. Para além disso, também existem atualmente outros cenários envolvendo psicadélicos que vão além dos ensaios clínicos e que são distintos dos usos tradicionais indígenas, nomeadamente comunidades de microdosagem, conferências sobre psicadélicos e festivais/retiros. Todos estes cenários tendem a propiciar o consumo não terapêutico e não controlado de psicadélicos, o que pode ter consequências imprevisíveis e bastante perigosas [9]. Curiosamente, estes cenários já se verificam em Portugal, existindo (em março de 2024) “cartazes publicitários” na Baixa de Lisboa referentes a terapia com psilocibina (Figura 2).

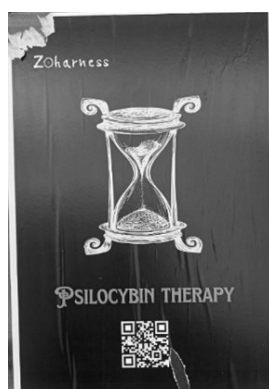


Figura 2: Cartaz afixado, em março de 2024, na Baixa de Lisboa, publicitando terapia com recurso a psilocibina.

2.2. Metodologias de Análise

2.2.1. Amostras em Toxicologia Forense

No âmbito da Toxicologia Forense, podem ser analisadas diversas matrizes biológicas, tanto no contexto *antemortem* como *postmortem*. Devido às limitações de colheita, as amostras *antemortem* utilizadas são geralmente sangue, urina, fluido oral e cabelo. No contexto *postmortem*, as mais comumente utilizadas são o sangue, a urina e o humor vítreo. Quando estas amostras não estão disponíveis (p.e. em situações de cadáveres em avançado estado de putrefação) ou quando são necessárias análises mais específicas, podem também ser utilizadas matrizes alternativas, como conteúdo gástrico, fígado, cérebro, bÍlis, entre outras [31].

O sangue é a amostra de eleição para detetar, quantificar e interpretar a presença de substâncias tóxicas, pois é a matriz que melhor reflete o estado de influência e a dimensão/gravidade dos efeitos produzidos pelos analitos no organismo no momento da colheita ou aquando da morte, sendo, por isso, considerada a amostra mais importante em toxicologia forense. No entanto, devido à distribuição, metabolização e excreção dos compostos, estes permanecem relativamente pouco tempo no sangue, pelo que a janela de deteção é menor do que noutras matrizes. Para além disso, o sangue é uma matriz complexa, pelo que requer uma etapa de preparação de amostra mais exigente do que, por exemplo, a urina [31]. Outro aspeto que deve ser tido em conta na utilização de amostras de sangue *postmortem* é o fenómeno de redistribuição *postmortem*, que consiste na difusão dos compostos presentes nos órgãos de armazenamento em concentrações elevadas para outros fluidos ou órgãos, após a morte. A redistribuição *postmortem* no sangue é de grande importância, especialmente em ensaios de quantificação, pois a concentração dos analitos será superior àquela que realmente se verificava antes da morte, podendo levar a interpretações incorretas. Uma vez que o sangue periférico está menos sujeito a redistribuição *postmortem*, estas amostras refletem melhor as concentrações *antemortem*, pelo que devem ser aquelas preferencialmente utilizadas [32].

O sangue é um fluido constituído por uma fração celular (correspondente a cerca de 45% do volume) e uma fração líquida. A fração celular do sangue apresenta três tipos de células: glóbulos vermelhos (também designados por eritrócitos ou hemácias), responsáveis pelo transporte e distribuição de oxigénio para os tecidos e órgãos; glóbulos brancos (ou leucócitos), que têm como função combater infeções, fazendo parte do

sistema imunitário; e plaquetas (trombócitos), que participam no processo de coagulação, auxiliando no controlo de hemorragias. A fração líquida do sangue designa-se de “plasma” e é constituída maioritariamente por água, contendo também outras substâncias como proteínas plasmáticas, fatores de coagulação e sais minerais [31,33,34].

Consoante a forma como é colhido, o sangue pode encontrar-se em três formas diferentes: sangue total; plasma; e soro (Figura 3). Quando o sangue é colhido na sua forma original, sem separação dos seus componentes (com ou sem adição de anticoagulante), designa-se de “sangue total”; o “plasma” é obtido ao centrifugar sangue com anticoagulante, pois este separa-se em três camadas: uma camada inferior (cerca de 45% do volume) constituída pelas hemácias, uma fina camada intermédia com os glóbulos brancos e as plaquetas e uma camada superior aquosa correspondente ao “plasma” (cerca de 50% do volume); por fim, caso não seja adicionado nenhum anticoagulante ao sangue, ele irá coagular e, após centrifugação, poderá obter-se o fluido remanescente que se designa de “soro”. O soro tem uma composição semelhante à do plasma, mas sem a presença dos fatores de coagulação. Quando uma pessoa está viva, o seu conteúdo celular está intacto, pelo que é possível isolar o plasma após centrifugação do sangue e obter os três tipos de matriz. Contudo, imediatamente após a morte, começa a ocorrer lise celular (rotura/dissolução das células) e o seu conteúdo mistura-se com o plasma, impedindo a sua separação. Para além disso, pode também ocorrer a formação de coágulos, que dificultam a posterior análise [33,34]. Assim, em situações *postmortem*, a amostra que se utiliza geralmente é sangue total.

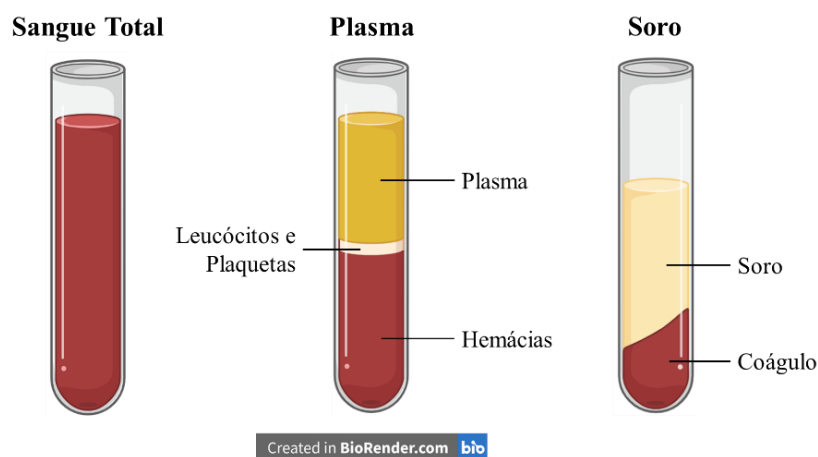


Figura 3: Representação das formas em que o sangue se pode apresentar, consoante o seu modo de colheita: sangue total, plasma e soro (da esquerda para a direita).

Em contexto laboratorial, as amostras começam por ser sujeitas a análises de triagem/rastreio, cujo objetivo é apenas determinar a presença ou não das substâncias em análise. Contudo, os resultados obtidos no rastreio são meramente presuntivos, isto é, apenas indicam a ausência ou a possível presença de uma substância ou grupo de substâncias, e, por esse motivo, é necessário sujeitar as amostras positivas a uma segunda análise mais específica e rigorosa, para confirmar a presença da substância e proceder à sua identificação. Uma amostra é considerada positiva apenas se os resultados do rastreio e confirmação forem ambos positivos. Após identificada e confirmada a presença de determinada substância, pode ser necessário proceder à sua quantificação e/ou dos seus metabolitos, a fim de verificar qual a concentração presente na amostra em causa.

A metodologia descrita neste trabalho foi desenvolvida para a triagem, confirmação e quantificação das amostras, consistindo em precipitação proteica de sangue total seguida de análise por cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada a espectrometria de massa em tandem com um analisador híbrido de triplo quadrupolo e de armadilha linear de iões (UHPLC-QTRAP-MS). Os fundamentos teóricos subjacentes a esta metodologia são apresentados de seguida.

2.2.2. Precipitação Proteica

A primeira fase de uma metodologia em toxicologia forense é geralmente a preparação da amostra, sendo uma etapa fundamental para o sucesso da análise. De um modo genérico, a preparação da amostra consiste essencialmente na extração dos analitos-alvo de uma matriz complexa e tem como principais objetivos: remover os analitos da matriz, isolando-os dos compostos endógenos que podem interferir com a análise; aumentar a concentração dos analitos, o que facilita a sua deteção; e dissolver os compostos num solvente adequado para a análise subsequente [35].

As técnicas clássicas e mais utilizadas de preparação de amostra são a extração líquido-líquido e a extração em fase sólida. Contudo, estas técnicas utilizam elevados volumes de solvente, o que é atualmente uma desvantagem. A precipitação proteica é também uma alternativa bastante usada, principalmente em amostras de sangue [36–39]. Técnicas mais recentes como microextração em fase sólida, microextração líquido-líquido, microextração líquido-líquido/em fase sólida dispersiva, manchas de sangue seco, entre outras, já foram aplicadas na análise de alucinogénios e/ou de novos opioides sintéticos [38–42].

As matrizes biológicas apresentam teores proteicos variáveis, que vão desde cerca de 6 % no soro ou plasma até mais de 50 % nos rins, fígado ou coração. Devido a estas concentrações relevantes de proteínas, a realização de precipitação proteica é bastante útil para remover estes interferentes endógenos. Esta técnica é bastante simples e rápida e baseia-se na adição de um solvente orgânico, ácido ou sal à amostra em questão. Nas matrizes biológicas, as proteínas apresentam uma camada de solvatação com moléculas de água à sua volta, o que evita que se agreguem entre si, contribuindo para a sua solubilidade. A adição do solvente orgânico (geralmente acetonitrilo, metanol ou acetona) provoca um deslocamento da água da região hidrofóbica da superfície da proteína que, por sua vez, leva à interrupção das interações hidrofóbicas entre as proteínas na amostra, fazendo com que as proteínas se precipitem para fora da solução. Por sua vez, a adição de um reagente ácido origina um sal insolúvel, a partir da reação com os grupos amina positivamente carregados das proteínas. Quando se adiciona sal em excesso ou a altas concentrações, a água desloca-se das superfícies das proteínas, devido à maior interação que exerce com o sal, levando a uma agregação e precipitação das proteínas. A precipitação proteica pode ser potenciada quando realizada sob agitação (p.e. no vórtex), devido à maior interação do solvente com as proteínas e aos choques entre estas. A utilização de solventes refrigerados também melhora a eficiência do processo. Após a precipitação, induz-se a separação através de centrifugação ou filtração, originando-se, idealmente, um extrato límpido à superfície e um *pellet* com as proteínas precipitadas na parte inferior do tubo. Por vezes, após a centrifugação, os extratos podem ser levados à secura e posteriormente redissolvidos, para limpar e concentrar ainda mais os analitos da amostra [35,43]. As suas principais vantagens são a simplicidade e rapidez de execução, bem como a necessidade de pequenos volumes de amostra e solventes.

2.2.3. Cromatografia

Em qualquer amostra, para se identificar e quantificar determinado analito, é necessário separá-lo dos restantes compostos presentes simultaneamente. A técnica analítica de separação mais poderosa, eficaz e versátil é a cromatografia, sendo a técnica mais utilizada em toxicologia forense. A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa tem sido a técnica instrumental de eleição em toxicologia forense, particularmente útil devido à disponibilidade e atualidade das bibliotecas espectrais, que auxiliam na identificação de compostos desconhecidos, tendo já sido aplicada à análise de fentanilo e de alguns análogos e também de alguns alucinogénios [28,38]. Contudo,

alguns compostos mais potentes, presentes em concentrações mais reduzidas, não são detetados com esta técnica, necessitando de alternativas mais sensíveis. Para além disso, esta técnica está dependente da volatilidade e termoestabilidade dos compostos e necessita muitas vezes de derivatização. Por estes motivos, emergiu a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem, sendo atualmente a dominante na literatura relativamente aos novos opioides sintéticos e o método de eleição para análise de alucinogénios em matrizes biológicas [28,36–38].

Na cromatografia, após a injeção das amostras no equipamento, por ação de um fluxo contínuo de fase móvel (gasosa, líquida ou fluído supercrítico), estas atravessam uma coluna cromatográfica que contém uma fase estacionária líquida ou sólida. Depois de percorrerem a coluna, os compostos alcançam o detetor, que produz um sinal proporcional à quantidade de substância (um pico cromatográfico com área definida), sinal esse que é registado digitalmente sob a forma de um gráfico da resposta do detetor em função do tempo de corrida, denominado cromatograma.

É no interior da coluna que se dá a separação dos compostos das amostras, consoante o seu coeficiente de distribuição (K_D), isto é, de acordo com a afinidade dos mesmos pelas fases estacionária e móvel: as moléculas que têm maior afinidade pela fase estacionária do que pela fase móvel ficam mais retidas na coluna, levando mais tempo a percorrer a coluna e a chegar ao detetor e vice-versa. Quanto maior o valor de K_D , maior a afinidade pela fase estacionária.

O tempo mínimo necessário para a eluição de um composto não retido na coluna designa-se de tempo morto (t_M). No caso dos compostos com afinidade pela fase estacionária, o tempo que decorre entre a injeção dos compostos, estes percorrerem a coluna cromatográfica e alcançarem o detetor designa-se tempo de retenção (t_R). O tempo de retenção ajustado (t'_R) representa o tempo despendido na fase estacionária e corresponde à diferença entre o tempo de retenção e o tempo morto.

A taxa de migração e retenção de um analito na coluna pode ser calculada através do fator de capacidade (k') (Equação 1 do Anexo I), que, idealmente, deve estar compreendido entre 2 e 5. Se k' for inferior a 1, a determinação precisa do t_R pode ser difícil, e o pico do analito pode ser perdido na chamada "frente de solvente". Valores de k' superiores a 20 estão geralmente associados a longos tempos de retenção e picos largos.

Assim, a separação ocorre quando cada composto tem K_D e, consequentemente, t_R e k' diferentes e característicos, que, nas mesmas condições, se mantêm constantes e reprodutíveis. Esta separação pode ser avaliada através do fator de seletividade (α) da coluna (Equação 2 do Anexo I). Ao calcular α , o composto A elui sempre antes do B, pelo que α é sempre maior que 1. Quanto maior o valor de α , melhor a separação dos compostos.

Um pico cromatográfico ideal é agudo e simétrico, com um perfil Gaussiano perfeito. Os analitos que se movem mais rapidamente ao longo da coluna tendem a apresentar picos mais agudos/afiados e bem definidos do que aqueles que eluem mais tarde, porque há menos interação com a coluna e, respetivamente, menos tempo para alargamento de banda.

A extensão do alargamento do pico (W) determina a eficiência do processo cromatográfico, que pode ser expressa pelo número de pratos teóricos (N) ou pela altura equivalente a um prato teórico (H) (Equações 3 e 4 do Anexo I). O modelo dos pratos teóricos postula que uma coluna cromatográfica contém várias camadas, os “pratos teóricos”, onde ocorrem os equilíbrios fase móvel – fase estacionária durante a separação. Quanto mais “pratos teóricos” existirem, mais equilíbrios ocorrem, e, consequentemente, mais eficiente será a separação. Por outro lado, quanto menor for a altura equivalente a um prato teórico, melhor a separação, pois, para um mesmo comprimento de coluna (L), quanto maior o número de “pratos teóricos”, menor a sua altura.

Outra forma de avaliar a separação dos compostos é através da resolução (R), que se relaciona com N , α e k' (Equação 5 do Anexo I). Dois picos são considerados totalmente separados quando $R \geq 1,5$ (Figura 4). Quando R é inferior a esse valor, ocorre coeluição dos compostos [44,45].

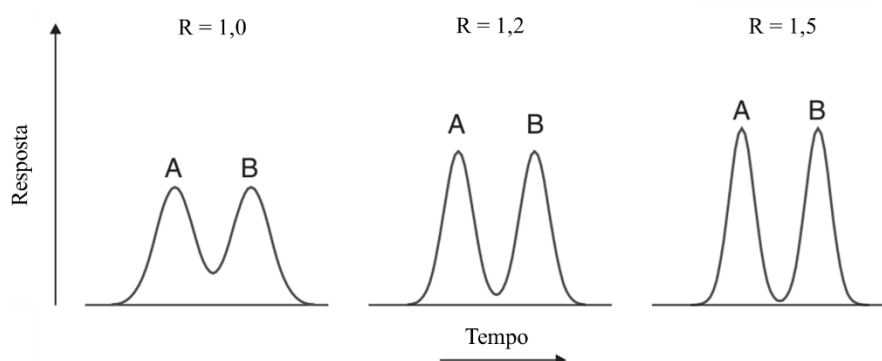


Figura 4: Diferenças na separação de picos cromatográficos consoante o valor de resolução (R).
Adaptado de [45].

2.2.3.1. Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência (UHPLC)

As principais formas de cromatografia são a cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida (LC), que se distinguem, essencialmente, na natureza da fase móvel (que é um gás inerte no primeiro caso e um solvente ou mistura de solventes no último caso) e no tipo de coluna cromatográfica utilizada. Nas últimas décadas a GC tem sido o “*golden standard*” em toxicologia forense. No entanto, devido aos avanços técnicos e tecnológicos que têm ocorrido, a LC tem tido grandes melhorias na velocidade de análise, poder de resolução e capacidade de deteção (sensibilidade) que, associadas ao facto de permitir a análise de uma maior variedade de compostos, incluindo analitos não voláteis e/ou termolábeis, e de possibilitar a utilização de métodos de preparação de amostra mais simples, sem necessidade de derivatização, têm-na tornado o método de eleição em muitos laboratórios [46,47].

Um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), vulgarmente designada apenas por LC, consiste em: reservatórios de eluentes; uma ou mais bombas de alta pressão; um sistema de injeção de amostras; uma coluna cromatográfica (acompanhada ou não por uma pré-coluna); um detetor; e um software informático para aquisição e processamento de dados.

As fases estacionárias de LC são constituídas por partículas de tamanho bastante reduzido. Isto garante maior resolução e análises mais rápidas, contudo exige a presença de bombas de alta pressão para transportar a fase móvel desde os seus recipientes até ao final da coluna.

Para evitar que ar dissolvido presente nos solventes da fase móvel leve à formação de bolhas de ar na bomba ou no detetor, condicionando toda a análise, estes solventes são bombeados para um desgaseificador, onde existe uma câmara de vácuo que assegura a remoção do ar eventualmente presente. Quando a composição da fase móvel é constante ao longo de toda a corrida, designa-se de eluição isocrática, sendo o modo mais simples em LC. A mistura de fase móvel pode ser preparada antes da análise e bombeada através de um único reservatório ou pode ser feita diretamente no equipamento, com bombas a “puxar” os solventes de cada reservatório e a misturá-los numa câmara de mistura. Esta última hipótese é fundamental no outro modo de eluição existente, ou seja, na eluição por gradiente, em que a composição da fase móvel vai variando ao longo da corrida. A eluição

por gradiente é o modo mais utilizado, sendo particularmente útil na separação de compostos com retenção bastante diferente.

Os equipamentos atuais dispõem de amostradores automáticos, onde apenas é necessário colocar os *vials* das amostras, sendo todo o processo de injeção realizado pelo equipamento. Estes amostradores contêm uma seringa que suga o volume pretendido de amostra e o transfere para o sistema de injeção, que é geralmente uma válvula de seis portas na qual a amostra preenche um *loop* de aço inoxidável. Ao rodar a válvula, a fase móvel entra no *loop* da amostra, misturando-se com esta, e arrastando-a até à coluna.

As colunas de LC são geralmente de aço inoxidável e com comprimentos entre 3 e 25 cm, sendo preenchidas/empacotadas com partículas de tamanho micrométrico. A sílica-gel é a substância mais utilizada como suporte/base das partículas de empacotamento, uma vez que é barata, estável, inerte e resistente. Esta consiste numa estrutura tridimensional de ligações de grupos siloxano (Si-O-Si) com poros interligados, que lhe confere um carácter polar. Contudo, a sílica pode ser modificada, ligando cadeias de hidrocarbonetos aos grupos siloxano, adquirindo um carácter apolar. A fase estacionária mais comum é a sílica octadecil, em que a modificação é feita com cadeias C₁₈. Por vezes, pode ser colocada uma pré-coluna antes da coluna analítica para a proteger de impurezas da amostra ou do próprio equipamento. A pré-coluna deve ter cerca de 5% do tamanho da coluna analítica e conter a mesma fase estacionária. Consoante as fases móvel e estacionária, podemos estar perante uma cromatografia de fase normal ou de fase reversa. No primeiro caso, a fase estacionária é polar e a fase móvel é apolar. A cromatografia de fase reversa é a mais comum, consistindo numa fase estacionária apolar (geralmente sílica modificada com hidrocarbonetos) e uma fase móvel polar (normalmente metanol e/ou acetonitrilo com água) [47,48].

Para avaliar a influência do tamanho de partículas de empacotamento na eficiência da cromatografia, podem ser utilizadas as curvas de van Deemter (Figura 5), concluindo-se que, quanto menor o tamanho das partículas, menor a altura equivalente a um prato teórico (H) e consequentemente, melhor resolução, devido à maior área de superfície disponível para interação. Este fenómeno levou ao desenvolvimento de fases estacionárias de HPLC com partículas ainda mais reduzidas (< 2 µm), resultando no surgimento da cromatografia líquida de ultra-alta eficiência [44].

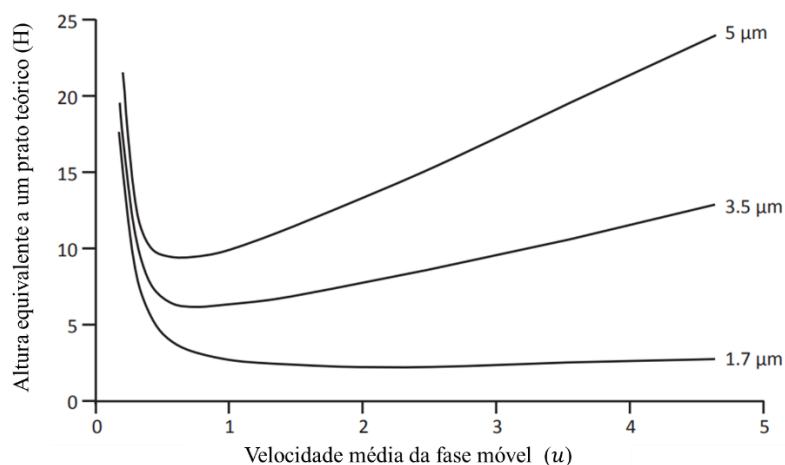


Figura 5: Curvas de van Deemter: efeito da velocidade da fase móvel e do tamanho de partícula de fase estacionária na altura equivalente a um prato teórico. Adaptado de [44].

2.2.4. Espectrometria de Massa em Tandem

Existem diversos tipos de detetores que podem ser acoplados aos sistemas cromatográficos e que têm como objetivo identificar os compostos separados anteriormente. Atualmente, o detetor mais utilizado em toxicologia forense é o detetor de massas. Na espectrometria de massa (MS), as moléculas entram numa fonte de ionização, onde são convertidas em iões que, de seguida, são direcionados até ao analisador de massas e, através da manipulação de campos magnéticos e eletrostáticos, são seletivamente filtrados/isolados de acordo com a sua razão massa/carga (m/z). Após esta seleção, os iões chegam ao detetor, onde são convertidos num sinal eletrónico. O acoplamento LC-MS requer que os analitos transitem de um grande volume de solvente a pressão atmosférica para um estado gasoso sob vácuo no espectrómetro de massa. Isto tornou-se possível com o desenvolvimento de técnicas de ionização à pressão atmosférica, que conseguem fazer a interface entre LC e MS. De entre as formas de ionização mais comuns em LC, vão ser destacadas a ionização *electrospray* (ESI) e a dissociação induzida por colisão (CID), por terem sido as utilizadas neste trabalho.

Na ESI, devido a uma diferença de potencial eletrostático, os iões são direcionados para um capilar metálico, onde azoto aquecido e altamente pressurizado nebuliza a fase móvel que vai entrando, criando um aerossol de gotículas carregadas. À medida que o solvente evapora, vai aumentando a densidade de iões no interior das gotículas até que se atinge o ponto de rotura, designado de limite de Rayleigh. Nesta fase, as gotículas explodem em gotículas menores através de um processo designado explosão de Coulomb. O processo continua até que todo o solvente evapore e restem apenas os iões livres (Figura

6). A ESI pode ser operada no modo positivo ou negativo, originando íons protonados ($[M-H]^+$) ou desprotonados ($[M-H]^-$), respetivamente.

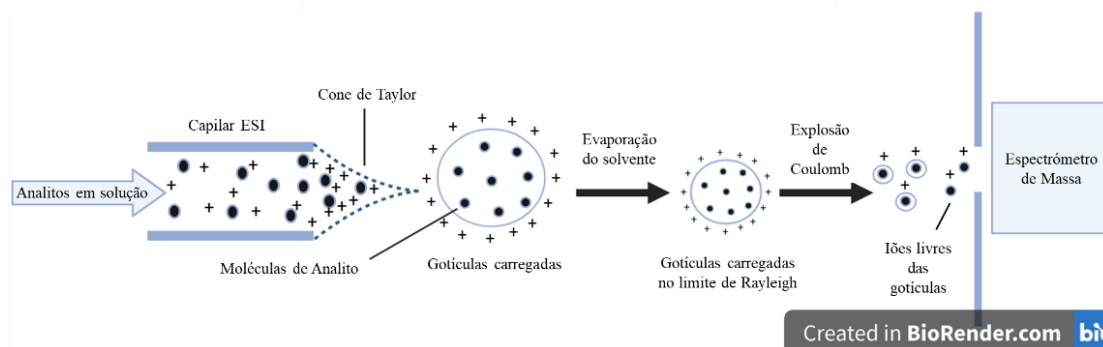


Figura 6: Representação esquemática do processo de ionização electrospray. Adaptado de [49].

A dissociação induzida por colisão ocorre quando compostos ionizados são acelerados numa pequena área por uma carga elétrica (diferença de potencial) e colidem com moléculas de gases neutros (como azoto, árgon ou hélio), fragmentando-se. A diferença de potencial pode ser otimizada para produzir as fragmentações pretendidas. A CID pode ocorrer na fonte de ionização ou no analisador de massa.

Em relação aos analisadores de massa, existem diversos tipos, mas os mais comuns são o quadrupolo e a armadilha de íons. O quadrupolo é um conjunto mecânico de 4, 6 ou 8 cilindros metálicos. A utilização de uma combinação de radiofrequências e diferenças de potencial nos grupos de cilindros diagonalmente opostos permite que apenas os íons com determinada m/z passem pelo analisador até ao detetor. Os restantes íons são defletidos pelos cilindros. Pode optar-se por analisar toda a gama de íons produzidos na fragmentação, modo de varrimento completo (SCAN), ou podem seleccionar-se fragmentos iónicos m/z específicos, modo denominado de SIM (*selected ion monitoring*). O modo SIM é mais sensível que o modo SCAN, pois o tempo de monitorização de cada ião é maior, uma vez que são menos íons. O sistema de armadilha de íons consiste num eléctrodo com abertura central e em dois eléctrodos fechados, onde, por aplicação de radiofrequências, os íons ficam “presos” no interior da armadilha. Ao alternar a radiofrequência aplicada, os íons presos ficam destabilizados e são ejetados da armadilha para o detetor [50].

Nos últimos anos, o poder de análise foi aumentado com o desenvolvimento dos sistemas de espectrometria de massa em tandem (MS/MS), que consistem na ligação sequencial de vários analisadores de massa. O equipamento utilizado neste trabalho foi um QTRAP-MS, ou seja, um analisador híbrido de triplo quadrupolo e armadilha linear

de iões. Neste equipamento, o primeiro analisador funciona como um quadrupolo “normal” (Q1), o segundo quadrupolo atua como uma célula de colisão (Q2) e o terceiro analisador (Q3) tem a capacidade de funcionar como um terceiro quadrupolo ou como armadilha linear de iões (Figura 7).

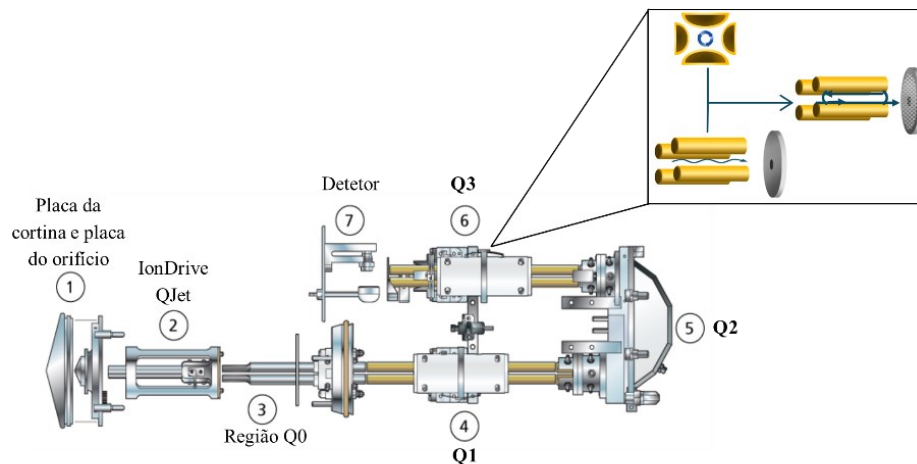


Figura 7: Representação esquemática do detetor QTRAP-MS utilizado neste trabalho. Adaptado de [51].

Uma vez que os diferentes quadrupolos podem funcionar de modos variados (p.e. SIM ou SCAN), o equipamento pode funcionar em diversos modos de análise. Neste trabalho, foi utilizado o modo de monitorização de reação múltipla (MRM). Após serem ionizados, os iões entram no espectrómetro, sendo aplicado um potencial de desagrupamento (DP), responsável por evitar a colagem/agrupamento dos iões que foram produzidos na fonte. De seguida, os iões são direcionados até ao primeiro quadrupolo, onde são sujeitos a um determinado potencial de entrada (EP). Neste primeiro quadrupolo, há um processo de filtragem, sendo selecionado somente um ião com determinada razão m/z , que se intitula ião precursor. De seguida, este mesmo ião é encaminhado para a célula de colisão, onde é fragmentado por CID com determinada energia de colisão (CE). Os iões resultantes desta fragmentação designam-se iões produto e são depois transferidos para o terceiro quadrupolo, por ação do potencial de saída da célula de colisão (CXP). Quando esses iões chegam ao terceiro quadrupolo há uma nova filtração seletiva, onde apenas os iões produto pretendidos alcançam o detetor. Esta fragmentação do ião precursor em ião produto designa-se por transição iónica [50,51].

2.3. Química Analítica Verde/Sustentabilidade da Metodologia

Nos dias de hoje, as questões da proteção/preservação ambiental e da sustentabilidade ocupam um lugar de destaque em todos os setores das sociedades,

incluindo na Ciência. Nesse sentido, foi desenvolvida a Química Analítica Verde, cujo objetivo é tornar os procedimentos químicos analíticos mais amigos do ambiente e mais seguros para os humanos, e que se baseia em 12 princípios, nomeadamente: (1) mínima preparação de amostra; (2) mínimo volume e tempo de análise de amostras; (3) análises *in situ*; (4) número mínimo de etapas do procedimento analítico; (5) miniaturização e automatização de métodos/técnicas; (6) eliminação de processos de derivatização; (7) diminuição dos resíduos laboratoriais e sua gestão/tratamento adequados; (8) preferência de métodos multi-substâncias; (9) mínimo consumo de energia; (10) utilização de materiais e reagentes oriundos de fontes renováveis; (11) reduzida utilização de reagentes tóxicos; e (12) garantir e aumentar a segurança do operador [52].

Partindo destes princípios, foram desenvolvidos vários modelos que permitem avaliar o desempenho ambiental (*greenness*) das metodologias desenvolvidas, como o National Environmental Methods Index, o Analytical Eco-Scale Metric System ou o Green Analytical Procedures Index, entre outros. No entanto, um dos modelos mais recentes e completos é o *software* AGREE (Analytical GREEnness calculator - versão online disponível em <https://agree-index.anvil.app/>), que permite avaliar a metodologia tendo em consideração os 12 princípios da Química Analítica Verde, atribuindo uma cotação de 0 a 1 para o desempenho relativamente a cada um deles. A avaliação final da metodologia é obtida pela média dos 12 fatores. O melhor desempenho corresponderá a uma pontuação de 1, enquanto uma metodologia bastante prejudicial para o ambiente terá um classificação de zero. Apesar de a Química Analítica Verde valorizar a ausência de preparação de amostra, muitas vezes isso não é possível, principalmente quando as matrizes são bastante complexas, como é o caso do sangue. Nesses casos, é igualmente importante avaliar o desempenho ecológico da etapa de preparação de amostra. Para isso, existe o *software* AGREEp (versão online disponível em <https://agreeprep.anvil.app/>) que funciona do mesmo modo que o *software* AGREE, embora baseado em apenas 10 fatores de impacto e não 12 [52,53].

2.4. Objetivo do Trabalho

A presente dissertação teve como objetivo geral o desenvolvimento de um método analítico sensível, rápido, simples e eficaz para a análise de rotina em laboratórios de toxicologia forense de 6 novos opioides sintéticos (fentanilo, norfentanilo, sufentanilo, carfentanilo, isotonitazeno e metonitazeno) e 4 alucinogénios clássicos (LSD, 2-oxo-3-

hidroxi-LSD, mescalina e psilocina) em sangue total *postmortem* e *in vivo*. Para verificar se a metodologia se poderia aplicar a outras famílias, também foi analisada uma catinona sintética, nomeadamente mefedrona (4-MMC). As fórmulas, estruturas químicas e massas moleculares destes compostos estão presentes no Anexo II.

De forma a alcançar este objetivo geral, foram estabelecidos objetivos intermédios, nomeadamente:

- Desenvolvimento e otimização da metodologia de precipitação proteica seguida de análise por UHPLC-QTRAP-MS;
- Validação da Metodologia; e
- Aplicação a amostras reais.

3. Materiais e Métodos

3.1. Solventes e Padrões Analíticos

A água (H₂O), o acetonitrilo (ACN) e o metanol (MeOH) utilizados neste trabalho foram oriundos da empresa Honeywell® (Alemanha), sendo solventes Riedel-de Haën™ da gama LC-MS Chromasolv™, com pureza $\geq 99,9\%$. O ácido fórmico (AFM) de grau LC-MS (98-100 % de pureza) e o formato de amônio (pureza $\geq 99,9\%$) foram adquiridos à empresa Merck® (Alemanha).

Os padrões analíticos certificados de fentanilo, fentanilo-D₅ (fentanilo deuterado utilizado como padrão interno (PI)), LSD, LSD-OH, mescalina, norfentanilo e sufentanilo foram adquiridos à empresa Cerilliant® (EUA). O isotonitazeno e o metonitazeno foram provenientes da empresa Cayman Chemical® (EUA). O carfentanilo foi oriundo da empresa Toronto Research Chemicals® (Canadá). O padrão de psilocina foi proveniente da empresa Lipomed® (EUA). Por último, o padrão de mefedrona (4-MMC) foi oriundo da empresa LGC Standards® (Espanha). Devido ao controlo legal a que estas substâncias estão sujeitas, estes padrões foram adquiridos com a devida autorização por parte do INFARMED (Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.).

Todos os padrões analíticos foram conservados/armazenados no congelador, a -20 °C.

3.2. Amostras

Para o desenvolvimento, otimização e validação da metodologia, foram utilizadas amostras de sangue branco, isto é, amostras sem os analitos de interesse. Depois de desenvolvida a metodologia, a sua aplicabilidade em contexto real foi testada através da análise de amostras forenses autênticas de sangue total. Foram utilizadas amostras de sangue *postmortem* e *in vivo*, de várias origens, tendo sido todas fornecidas pelo Serviço de Química e Toxicologia Forenses da Delegação Sul do INMLCF, de acordo com os protocolos de colheita e utilização/análise que têm estabelecidos/implementados. Uma vez que as amostras se encontravam armazenadas/conservadas no congelador entre -10 e -20 °C, antes de serem analisadas, foram colocadas num agitador de amostras (*roller mixer*) a fim de descongelarem e atingirem a temperatura ambiente.

3.3. Parte Experimental

3.3.1. Preparação de Soluções

A partir dos padrões analíticos adquiridos, foram preparadas soluções-stock de cada um dos analitos a uma concentração de 10 µg/mL (1 µg/mL no caso do fentanilo-D₅) em ACN ou MeOH, consoante o solvente do padrão inicial. A partir destas soluções foram depois preparadas todas as restantes soluções de trabalho. As misturas-padrão contendo todos os analitos e a solução utilizada como padrão interno, foram preparadas em ACN. Para minimizar as possíveis degradações, as soluções foram preparadas em *vials* de vidro âmbar e armazenadas no congelador a -20 °C.

Na corrida cromatográfica foram utilizadas duas fases móveis, uma orgânica e uma aquosa. A fase móvel orgânica consistiu numa solução metanólica de formato de amónio 2 mM e ácido fórmico 0,1 %. Por sua vez, a fase móvel aquosa utilizada foi uma solução aquosa de formato de amónio 2 mM e ácido fórmico 0,1 %, à qual se adiciona 1 % de fase móvel orgânica. A solução de formato de amónio utilizada nas fases móveis foi preparada a 1 M em água e mantida no frigorífico, entre 2 e 8 °C. Depois de preparadas, as fases móveis foram colocadas nos respetivos reservatórios no equipamento e mantidas à temperatura ambiente em frascos de vidro âmbar.

3.3.2. Instrumentação

Neste trabalho foi utilizado um equipamento UHPLC-QTRAP-MS. O UHPLC utilizado foi o modelo ExionLC™ AD Series da empresa Sciex® (EUA), sendo constituído por um desgaseificador; duas bombas de alta pressão (capazes de atingir cerca de 18000 psi); uma câmara de mistura de eluentes; um amostrador automático com espaço para 105 *vials* de injeção e um controlador de temperatura (4 a 40 °C); e um forno com capacidade de atingir os 90 °C, onde se encontra inserida a coluna cromatográfica, tendo sido utilizada uma coluna de fase reversa C₁₈ Acquity UPLC® HSS T3 (2,1 x 100 mm; 1,8 µm de tamanho de partícula; 100 Å de tamanho de poro) da Waters (EUA). Em relação ao espectrómetro de massa, foi utilizado o modelo QTRAP® 6500 + da empresa Sciex® (EUA), sendo constituído por uma fonte de ionização *electrospray*; um guia/focalizador iónico; três quadrupolos, sendo o segundo uma célula de colisão e o terceiro podendo operar como armadilha linear de iões; e um detetor de alta energia. Este equipamento foi operado no modo MRM, com duas transições para cada composto (uma transição de quantificação e outra de confirmação). Para a aquisição de dados, foi utilizado o Analyst®

Software (versão 1.7.3 HotFix 1, de 2022), enquanto para o processamento de dados foi utilizado o *software* Sciex OS® (versão 2.1.6.59781, de 2021), ambos da empresa Sciex® (EUA).

3.3.3. Desenvolvimento e Otimização da Metodologia

O primeiro passo no desenvolvimento da metodologia foi a otimização dos parâmetros do espectrômetro de massa para cada um dos analitos. Para isso, soluções individuais dos compostos-alvo a uma concentração de 100 ng/mL foram diretamente introduzidas na fonte de ionização (infusão direta). A otimização dos parâmetros foi feita automaticamente pelo *software* e permitiu identificar o melhor modo de ionização (positivo ou negativo) e as cinco transições (e respectivos valores de DP, EP, CE e CXP) que originavam maior sinal por parte do detetor aquando da presença de cada substância.

A ESI em modo positivo revelou-se a melhor opção para todas as substâncias, tendo sido realizada com uma voltagem (*ion spray voltage*) de 4500 V. As fontes de gás nebulizador 1 e 2 (*ion source gas*) encontravam-se a 60 psi e a temperatura da fonte de ionização foi mantida a 250 °C. Como gás de cortina (*curtain gas*) foi utilizado azoto a uma pressão de 35 psi. O EP é um valor característico do próprio equipamento, sendo definido como 10 V para todos os compostos. Para que as transições iónicas fossem o mais características possível de cada composto, o ião precursor selecionado foi aquele com m/z correspondente à sua massa molecular + 1.

A etapa seguinte foi verificar a influência da matriz e da separação cromatográfica no formato e resolução dos sinais cromatográficos, bem como avaliar a presença de eventuais interferentes. Para isso, fortificou-se uma amostra de sangue branco com todos os analitos de interesse (10 µg/mL), que foi depois sujeita a precipitação proteica de acordo com um procedimento em vigor no SQTf. O respetivo extrato foi analisado no equipamento, com recurso a um método cromatográfico em uso no laboratório, mas configurado com os parâmetros do detetor otimizados. Simultaneamente, foi preparado e analisado um controlo negativo. Através da análise dos cromatogramas obtidos, tendo por base o perfil do ruído de fundo, a razão sinal/ruído (S/N) e o formato e área absoluta do pico cromatográfico, selecionaram-se as duas melhores transições para cada substância. O método cromatográfico foi depois ajustado de forma a encurtar o tempo de corrida para 5 minutos, sem comprometer a resolução.

O passo seguinte foi otimizar a etapa de preparação de amostra, ou seja, os parâmetros de execução da precipitação proteica. O ponto de partida foi o procedimento de precipitação proteica implementado no SQTF para análise de medicamentos, que consiste essencialmente em quatro passos: adição de PI e solução de fortificação ou MeOH:H₂O (1:1, v/v); precipitação proteica com ACN refrigerado; centrifugação das amostras; e reconstituição dos extratos com fase móvel nas condições iniciais.

Numa primeira fase, realizaram-se alguns testes iniciais, somente para identificar os parâmetros que poderiam/deveriam ser otimizados por desenho experimental (DoE), tendo em vista o objetivo de desenvolver um método rápido, simples e sensível, com recurso a um volume reduzido de amostra e de solventes. Além do método em vigor no SQTF, usaram-se como referência os trabalhos de Pardi e colaboradores [54] e de Kolaczynska e colaboradores [55]. Verificou-se que a psilocina se degradava com bastante facilidade durante o processo extrativo. Com base nas soluções encontradas noutros trabalhos onde também ocorreu esta degradação [36,55–58], foi adicionado ácido fórmico (AFM) ao acetonitrilo. De seguida, procedeu-se à otimização do procedimento de precipitação proteica por desenho experimental fatorial total, utilizando amostras fortificadas a 10 ng/mL, com recurso ao *software* JMP® Statistical Discovery LLC (versão 17.2.0). Os três fatores selecionados como variáveis independentes foram: volume de solvente de precipitação (X1); percentagem de ácido fórmico a adicionar ao ACN (X2); e tempo de centrifugação (X3), com três níveis cada: X1 - 100 µL, 150 µL, 200 µL; X2 - 0,1 %, 0,3 %, 0,5 %; X3 - 2 minutos, 5 minutos, 10 minutos. Estes ensaios foram realizados em duplicado, durante dois dias, de forma aleatória, e a influência dos diversos fatores na resposta pretendida foi avaliada através da função de resposta desejável (*desirability function*), que varia entre 0 e 1, em que os valores ótimos correspondem a 1. Uma vez que estavam várias respostas em estudo, neste caso, a área relativa de cada analito, foi calculada a resposta desejável global (*global desirability*), a partir da média geométrica das respostas desejáveis individuais. Este valor global também varia entre 0 e 1. Se alguma das respostas não for aceitável, então terá um valor igual a 0, o que originará um valor global também de 0 [59].

Em todos estes ensaios, o critério de comparação foi a área relativa ($\text{Área}_{\text{analito}}/\text{Área}_{\text{PI}}$) das transições de quantificação, simultaneamente com a presença de picos bem definidos e identificáveis nas duas transições, de acordo com os critérios definidos na norma “*Minimum Criteria for Chromatographic-Mass Spectrometric*

Confirmation of the Identity of Analytes for Doping Control Purposes”, da World Anti-Doping Agency (WADA) [60], nomeadamente razão sinal/ruído (S/N) igual ou superior a 3,3 e cumprimento dos critérios apresentados na Tabela 1 em relação a uma amostra controle, preparada e analisada simultaneamente.

Tabela 1: Critérios para detecção e identificação de picos cromatográficos, em comparação com uma amostra controle, de acordo com a norma da WADA [60].

Parâmetro		Tolerância
t_R		1 % ou $\pm 0,1$ (menor)
t_{RR}^a		± 1 %
Abundância Relativa da Transição Iônica ^b	> 50	± 10
	25 – 50	± 20 %
	< 25	± 5

^a O Tempo de Retenção Relativo (t_{RR}) corresponde ao rácio t_R composto/ t_R PI.

^b A abundância relativa é calculada dividindo a área do pico de cada transição pela área da maior transição, o que faz com que a maior transição tenha sempre uma abundância de 100 %.

3.3.4. Condições Finais da Metodologia

As condições cromatográficas finais, bem como as transições MRM selecionadas para cada analito e os respetivos parâmetros otimizados estão descritos nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2: Parâmetros de funcionamento do equipamento UHPLC para a metodologia desenvolvida no presente trabalho.

Temperatura do amostrador automático	15 °C		
Velocidade de injeção	5 μ L/s		
Coluna cromatográfica	Acquity UPLC® HSS T3 (C ₁₈)		
Temperatura do forno	45 °C		
Modo de eluição	Gradiente		
	Tempo (minutos)	% Fase Aquosa	% Fase Orgânica
	0	90	10
	0,5	90	10
	3	5	95
	4	5	95
	4,1	90	10
	5	90	10
Fluxo de fase móvel	0,4 mL/min		
Duração da corrida	5 minutos		

Tabela 3: Transições MRM selecionadas, respetivos parâmetros MS otimizados e tempo de retenção de cada um dos analitos-alvo deste trabalho. As transições de quantificação estão apresentadas a negrito.

Composto	Ião Precursor (Da)	Ião Produto (Da)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)	<i>t_R</i> (min.)	Janela de detecção MRM (seg.)
4-MMC	178,1	160,2	51	17	18	2,66	40
	178,1	145,1	51	27	16	2,66	40
Carfentanilo	395,1	335,1	88	26	30	3,15	40
	395,1	246,1	88	30	22	3,15	40
Fentanilo	337,1	188,2	61	33	20	3,09	40
	337,1	105	61	51	18	3,09	40
Fentanilo-D ₅	342,1	193,2	61	33	20	3,09	40
Isotonitazeno	411,2	100,1	46	21	35	3,3	40
	411,2	72,1	46	49	35	3,3	40
LSD	324,3	223,2	86	31	14	2,94	40
	324,1	208,1	66	39	24	2,94	40
LSD-OH	356,1	237,2	66	33	24	2,5	40
	356,1	222,1	66	41	24	2,5	40
Mescalina	212,2	165,1	31	32	4	2,4	40
	212,2	133	21	35	14	2,4	40
Metonitazeno	383,2	100,1	48	21	25	3,04	40
	383,2	72,1	48	45	25	3,04	40
Norfentanilo	233,1	84,1	41	23	10	2,75	40
	233,1	150,2	41	25	18	2,75	40
Psilocina	205,1	58	36	17	26	2,01	20
	205,1	160,2	36	25	18	2,01	20
Sufentanilo	387,1	238,1	81	27	22	3,27	40
	387,1	140,2	81	35	16	3,27	40

O procedimento final da metodologia desenvolvida é aquele apresentado na Figura 8, consistindo em: num tubo cónico eppendorf® de 1,5 ou 2 mL, adicionar 5 µL de fentanilo-D₅ a 100 ng/mL (PI) e, de seguida, 5 µL de solução de fortificação (nos controlos positivos e calibradores) ou 5 µL de água (nas amostras e controlos negativos); depois, pipetar 50 µL de amostra de sangue; adicionar, gota a gota, a velocidade constante, e sob agitação no vórtex, 100 µL da solução de ACN contendo 0,1 % de Ácido Fórmico (armazenado a -20 °C); centrifugar durante 5 minutos, a 5 °C e 14000 rpm; transferir 30 µL do sobrenadante diretamente para o *vial* de injeção; por fim, injetar 2 µL no UHPLC-QTRAP-MS.

Em todas as sequências de análise, para além das amostras são sempre analisados: um branco de reagentes, um controlo negativo e 3 controlos positivos a concentração baixa, média e alta, para identificar possíveis erros que ocorram durante o procedimento.

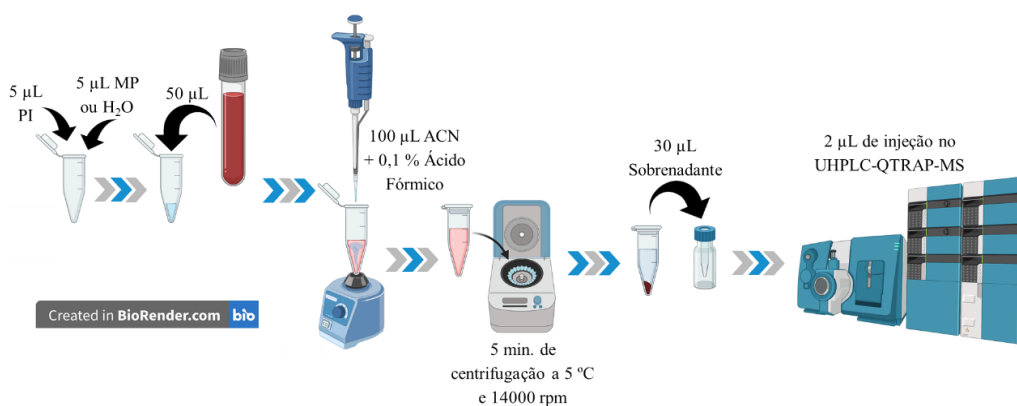


Figura 8: Representação esquemática do procedimento experimental desenvolvido e otimizado.

3.3.5. Validação da Metodologia

A metodologia foi validada segundo a norma ANSI/ASB Standard 036 – “Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology” [61]. Uma vez que se trata de uma metodologia para quantificação, foram validados os seguintes parâmetros: Seletividade/Estudos de Interferências; Efeito de Matriz (Supressão/Incremento da Ionização); Limite de Detecção (LOD); Limite Inferior de Quantificação (LLOQ); Linearidade/Modelo de Calibração; Arrastamento/*Carryover*; Precisão; Justeza; Integridade de Diluição; e Estabilidade de Amostra Processada. Todos os ensaios foram realizados de acordo com os parâmetros otimizados anteriormente e utilizando amostras brancas individuais e misturas (*pools*) de sangue *in vivo* e *postmortem*.

Os estudos de seletividade consistiram em quatro partes: interferentes de matriz; interferência do padrão interno; interferência no padrão interno; e interferência de outros analitos frequentemente encontrados. A presença de interferentes de matriz foi avaliada através da extração de 10 amostras de sangue diferentes (3 sangues *postmortem*, 1 sangue *in vivo* e 6 misturas de sangues *postmortem* e *in vivo*), sem adição de PI nem fortificação com os analitos-alvo, e verificando-se se existiam eventuais picos interferentes presentes nas janelas de detecção dos analitos. Simultaneamente, para determinar se o padrão interno condicionava/interferia com a detecção/identificação dos analitos-alvo, foi preparado um controlo negativo, ou seja, foi extraída uma alíquota de sangue com adição de fentanilo-D₅ a 100 ng/mL, mas sem a presença dos analitos-alvo. A terceira parte envolveu a extração de 3 alíquotas de sangue fortificadas, respetivamente, a concentrações de 0,2, 3 e 18 ng/mL, mas sem padrão interno, para averiguar se os analitos resultavam numa falsa detecção do PI que pudesse afetar a quantificação. No caso da mescalina e da psilocina, os sangues foram fortificados a 5, 75 e 450 ng/mL. Por último, uma alíquota, sem adição de

PI, foi fortificada com uma solução a 100 ng/mL contendo mais de 200 compostos comumente analisados e encontrados em amostras no SQTF, incluindo: anfetaminas/metanfetaminas e derivados; cocaína e metabolitos/adulterantes; canabinóides; opiáceos; pesticidas (organofosforados, organoclorados, piretroides e carbamatos); e medicamentos (antidepressivos, benzodiazepinas, antipsicóticos, anti-hipertensores, anestésicos, analgésicos, anti-inflamatórios, sedativos, entre outros). O objetivo foi verificar se essas outras substâncias interferiam com a identificação e/ou quantificação dos analitos-alvo. As interferências abaixo do LOD do método foram consideradas insignificantes.

Para avaliar o efeito de matriz e determinar o nível de supressão ou incremento iônico de cada analito, foram utilizados dois conjuntos de amostras, cada um a dois níveis de concentração (0,2 e 18 ng/mL ou 5 e 450 ng/mL no caso da mescalina e psilocina). O conjunto 1 consistiu em soluções dos analitos-alvo apenas em solvente e injetadas seis vezes cada no equipamento. O conjunto 2 correspondeu a 10 amostras (as mesmas utilizadas para avaliar a seletividade), que foram extraídas e fortificadas (a concentração alta e/ou baixa) após extração, antes da injeção no equipamento. As áreas médias dos picos dos analitos de cada conjunto foram utilizadas para estimar a supressão ou incremento iônico em cada concentração, de acordo com a Equação 6 do Anexo I, em que um resultado positivo corresponde a incremento e um valor negativo corresponde a supressão iônica.

O LOD de um método corresponde à menor concentração de analito que pode ser diferenciada de uma matriz em branco e identificada pelo método analítico de forma fiável. Neste trabalho, decidiu-se validar o LOD a um nível pré-definido, correspondente à menor concentração da gama linear, a metade dessa concentração ou a 40 % desse valor, conforme os analitos. Três amostras diferentes de sangue (1 amostra *postmortem* e 2 misturas) foram fortificadas com os analitos nas concentrações pretendidas/determinadas e injetadas em triplicado durante três dias ($n = 27$). Os critérios de detecção e identificação utilizados para aceitação do LOD foram aqueles definidos na norma da WADA anteriormente referida [60].

O LLOQ corresponde à menor concentração de um analito que pode ser quantificada numa amostra de forma confiável e com precisão e justeza adequadas. Neste trabalho, selecionou-se a menor concentração da gama linear como o valor correspondente ao LLOQ do método. À semelhança do LOD, três amostras diferentes de

sangue foram fortificadas com os analitos na concentração selecionada e injetadas em triplicado no equipamento durante três dias. Os critérios de aceitação foram os mesmos que para o LOD, à exceção de que, para a transição de quantificação, a razão sinal/ruído tinha de ser igual ou superior a 10 e era necessário cumprir os critérios de precisão e justeza, que serão apresentados mais à frente.

A linearidade da metodologia foi avaliada entre 0,1 e 20 ng/mL no sangue (2,5 – 500 ng/mL para a mescalina e psilocina), contendo oito calibradores de concentração 0,1, 0,4, 0,5, 1, 5, 10, 15 e 20 ng/mL (2,5, 10, 12,5, 25, 125, 250, 375 e 500 ng/mL para a mescalina e psilocina). Tendo em conta o procedimento experimental, as soluções de calibração utilizadas para fortificar as amostras encontravam-se 10 vezes mais concentradas. Estes ensaios foram realizados com uma mistura de sangue, diariamente durante 5 dias. Para estabelecer o modelo de calibração ideal (de equação $y = a + bx$), seguiu-se o procedimento descrito por Almeida e colaboradores [62]. A primeira etapa foi testar a homocedasticidade da metodologia, ou seja, verificar se a variância ao longo da gama linear era constante. Neste trabalho, verificou-se que existia uma diferença da variância ao longo da gama linear, pelo que foi necessário testar/aplicar fatores de ponderação. Os fatores de ponderação testados foram $1/x$, $1/x^2$, $1/x^{1/2}$, $1/y$, $1/y^2$ e $1/y^{1/2}$, utilizando as equações 7,8 e 9 do Anexo I.

O desempenho dos fatores de ponderação foi avaliado através do erro relativo percentual (ER %), que compara a concentração calculada a partir da curva de calibração (C_{Calc}) com a concentração teórica do calibrador (C_{Teor}) e se calcula através da Equação 10 do Anexo I. Através deste valor, foi possível construir gráficos ER % vs. concentração e calcular a soma dos valores absolutos de ER % (Σ ER %).

O melhor modelo de calibração foi selecionado através de um conjunto de fatores, nomeadamente: avaliação visual; maior coeficiente de determinação (r^2); distribuição aleatória e menor amplitude de ER % em torno do eixo da concentração; e menor valor de Σ ER %. Os critérios de aceitação consistiram em $r^2 \geq 0,99$; ER % compreendido entre ± 20 %; e CV % dos diferentes replicados inferior ou igual a 20 %.

A fim de identificar possíveis *outliers*, para além da avaliação visual foram calculados os residuais standardizados, através da divisão dos resíduos de cada concentração pelo desvio-padrão de todos os resíduos. Valores superiores a 3 ou inferiores a -3 foram considerados *outliers*.

A presença de arrastamento, ou seja, o aparecimento de sinal numa amostra como consequência da análise anterior de uma amostra muito concentrada, foi avaliada simultaneamente com a linearidade. Durante os 5 dias, após a injeção do calibrador de maior concentração, foram injetados 10 μ L de metanol. O arrastamento foi considerado inexistente quando, nessas amostras de metanol, não houve aparecimento de picos ou quando os picos apresentaram áreas inferiores a 10 % do LLOQ.

Os parâmetros de precisão e justeza foram analisados simultaneamente. A precisão e justeza intra-dia foram estimadas diariamente através da extração de alíquotas de uma mistura de sangue fortificadas a três níveis de concentração no sangue (baixo, médio e alto), nomeadamente 0,2, 3 e 18 ng/mL (5, 75 e 450 ng/mL no caso da mescalina e psilocina). Estes ensaios foram realizados em triplicado para cada nível de concentração. Para estimar a precisão e justeza inter-dias, este processo foi repetido durante cinco dias, sempre com curvas de calibração preparadas no mesmo dia. No total, foram analisados 15 replicados para cada nível de concentração. A justeza foi avaliada através do Bias %, que se calcula de acordo com a Equação 11 do Anexo I. A precisão, intra e inter-dias, foi avaliada através do coeficiente de variação (CV %), determinado com recurso à análise estatística ANOVA: fator único e calculado através das Equações 12 e 13 do Anexo I. Os critérios de aceitação de precisão e justeza foram $CV \% \leq 20 \%$ e Bias % compreendido entre $\pm 20 \%$, respetivamente.

Para precaver o aparecimento de amostras com concentrações superiores à gama linear, validou-se também a integridade de diluição, ou seja, testou-se se seria possível diluir as amostras e conseguir analisá-las com a mesma qualidade de resultados em termos de precisão e justeza. Assim, uma mistura de sangue foi fortificada a uma concentração na matriz de 18 ng/mL (450 ng/mL para a mescalina e psilocina) e sujeita a diluições de 1/2, 1/5 e 1/10, com água para LC-MS, antes da extração. Cada diluição foi realizada em triplicado durante 5 dias, tendo sido calculado o CV % e o Bias % intra-dia. Neste caso, o CV % foi calculado de forma diferente, mais precisamente através da Equação 14 do Anexo I. Os critérios de aceitação foram aqueles definidos para a precisão e justeza.

O último parâmetro avaliado foi a estabilidade das amostras processadas (estabilidade dos extratos obtidos após a precipitação proteica), quando armazenadas no amostrador a 15 °C ou no congelador a -20 °C. Para tal, amostras de sangue branco foram fortificadas a dois níveis de concentração (0,2 e 18 ng/mL – 5 e 450 ng/mL para a mescalina e psilocina) e várias alíquotas de cada concentração foram extraídas de acordo

com as condições otimizadas do método. De seguida, todos os extratos da mesma concentração foram misturados e homogeneizados num tubo *eppendorf*. Uma parte desses extratos foi transferida para um *vial* de injeção que ficou armazenado no amostrador. O restante extrato foi mantido no congelador, com os tubos bem fechados, apenas sendo transferido para os *vials* imediatamente antes de serem analisados. As injeções feitas no dia do processamento/extração das amostras permitiram estabelecer a resposta inicial ao tempo zero. Os *vials* que ficaram no amostrador foram analisados diariamente durante uma semana. A estabilidade no congelador foi avaliada durante 1 mês. Cada injeção foi feita em triplicado. Os analitos foram considerados estáveis enquanto a área relativa dos picos de quantificação não diferiu mais de 20 % da área relativa estabelecida ao tempo zero.

Para a validação da seletividade, do efeito de matriz e do LOD, o sinal/resposta considerado foi a área absoluta dos picos cromatográficos. Para os restantes ensaios, foi considerada a área relativa dos picos dos iões de quantificação ($\text{Área}_{\text{analito}}/\text{Área}_{\text{PI}}$). A análise de todos os dados de validação foi feita com recurso ao *software* Excel® (versão 2407 Build 16. 0. 17830. 20056) da Microsoft® (EUA).

3.3.6. Aplicação a Amostras Reais

Após o desenvolvimento, otimização e validação da metodologia, procedeu-se à análise de amostras reais *postmortem* e *in vivo*, para verificar a aplicabilidade da metodologia em contexto forense autêntico. Uma vez que a autora deste trabalho não estava autorizada a consultar processos, as amostras foram selecionadas pela orientadora, de acordo com os seguintes critérios: (1) amostras que, no rastreio, se demonstraram positivas para opioides, mas onde não foi possível identificar nenhum composto; (2) amostras positivas para algum dos analitos-alvo, mas cuja concentração se encontrava abaixo do limite de quantificação dos métodos implementados no SQTF; (3) amostras em que não foi identificada nenhuma substância psicoativa, mas em que a descrição médica indicava situações “suspeitas” (p.e. alucinações, estados psicóticos, entre outros); (4) amostras positivas para heroína, cocaína ou oxicodona, mas onde os efeitos apresentados pelas vítimas ou os resultados de rastreio pudessem indiciar a presença de algum dos analitos-alvo; (5) amostras de contexto suspeito ou desconhecido (p.e. indivíduo tratado no hospital com naloxona, mas em que apenas canabinoides foram identificados nas

amostras). De modo a não existir quaisquer identificação de dados pessoais, foram atribuídos códigos/nomes genéricos (A1, A2, A3...) às amostras reais analisadas.

No total, foram analisadas 19 amostras de sangue total. Foi analisada uma primeira alíquota das amostras para efeitos de rastreio. As amostras que apresentavam picos bem definidos para as duas transições iónicas de um analito, com S/N igual ou superior a 3,3 ou a 10, respetivamente, foram consideradas presuntivamente positivas para esse composto. De seguida, foram aplicados a essa alíquota os critérios de confirmação, nomeadamente t_R , t_{RR} e abundância relativa, calculados tal como aconteceu para a validação do LOD. Quando os critérios de confirmação estavam em conformidade, foi analisada uma segunda alíquota da amostra, simultaneamente com calibradores, para proceder à quantificação das amostras. Para o processo de quantificação foram consideradas as duas alíquotas, cuja concentração não pode variar mais de 20 % entre elas.

Para além de amostras reais de sangue total, foram também analisadas amostras provenientes de ensaios interlaboratoriais, nomeadamente uma amostra de soro oriunda de um teste de proficiência organizado pela ARVECON GmbH (Walldorf, Alemanha). O desempenho nestes testes foi avaliado através do z-score, calculado através da Equação 15 do Anexo I. Para que a participação no ensaio fosse considerada bem-sucedida, $|z\text{-score}|$ tinha de ser ≤ 2 .

4. Resultados e Discussão

4.1. Desenvolvimento e Otimização da Metodologia

A otimização dos parâmetros de detecção dos compostos tem como finalidade maximizar a sensibilidade e seletividade do espectrómetro de massa relativamente aos analitos de interesse. Neste trabalho, e de acordo com a norma WADA anteriormente referida [60], foram monitorizadas duas transições MRM para cada analito. De entre as cinco transições iónicas, e respetivos parâmetros otimizados, identificadas pelo equipamento para cada composto, as duas melhores transições foram selecionadas utilizando os critérios indicados no capítulo 3.3.3. A título exemplificativo, na Figura 9 estão apresentados os resultados relativos ao LSD-OH.

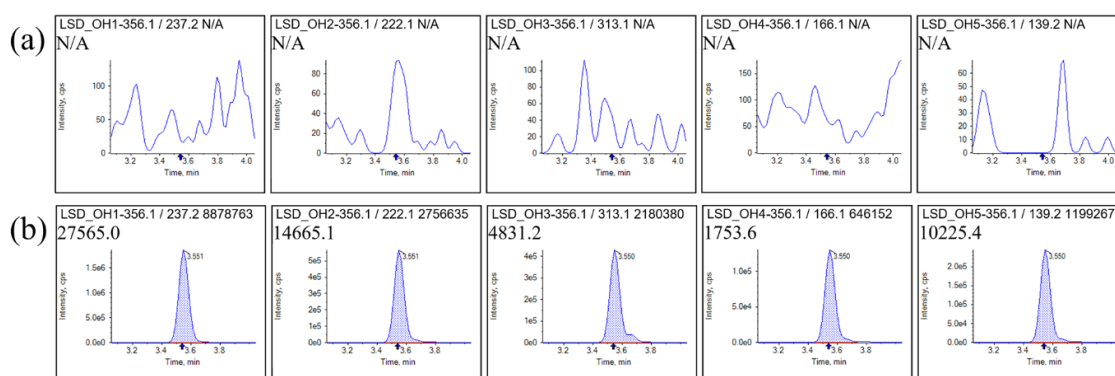


Figura 9: Cromatogramas de iões extraídos (XIC) das 5 transições de LSD-OH otimizadas pelo equipamento, de um controlo negativo (a) e de uma amostra fortificada (b). As transições estão numeradas de 1 a 5, da esquerda para a direita.

Um ruído ideal deverá apresentar um perfil sinusoidal de pequena amplitude. Como se observa na Figura 9(a), as transições 4 e 5 apresentavam um perfil de ruído irregular, pelo que foram excluídas. Analisando a Figura 9(b), verifica-se que a transição 3 apresenta um pequeno arrastamento do pico, não apresentando um formato Gaussiano ideal. Deste modo, as transições selecionadas foram a 1 e a 2. Como se pretende analisar concentrações bastante reduzidas, é importante que exista um máximo de sensibilidade, principalmente na transição de quantificação. Assim, como a primeira transição apresentou maior S/N e maior área absoluta de pico, essa foi utilizada para quantificação, enquanto a transição de confirmação foi a 2. Este processo de seleção das transições foi realizado da mesma forma para todos os compostos em estudo.

O método cromatográfico implementado no SQTF para a análise de mais de 200 medicamentos em sangue, incluindo o fentanilo, tem a duração de 14 minutos. As fases

móveis empregues são eluentes “genéricos” e bastante utilizados e que são comuns a todas as metodologias do SQTF que utilizam o UHPLC-QTRAP-MS. Por esse motivo e porque permitem uma boa separação dos analitos em estudo, foi decidido mantê-las. Alterou-se o gradiente de fase móvel de forma a que o método ficasse com uma duração de apenas 5 minutos, com as condições apresentadas nos materiais e métodos e com os compostos a eluïrem entre os 2 e os 3,3 minutos, como descrito na Tabela 3.

Na Figura 10 está apresentado um cromatograma obtido após otimização do método instrumental, com sobreposição de uma transição para cada analito-alvo, onde se verifica uma boa distribuição, separação e sinais cromatográficos de formato adequado.

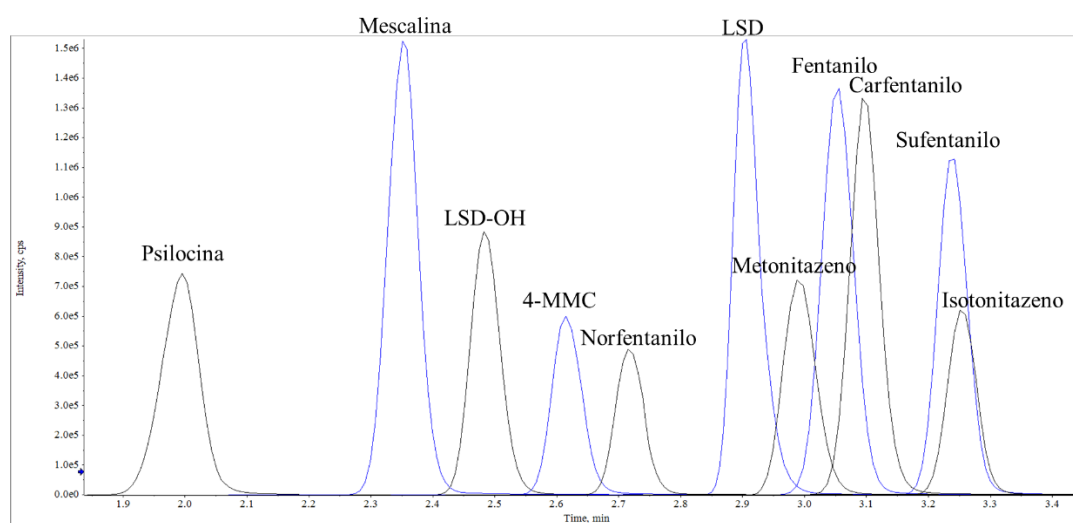


Figura 10: Cromatograma obtido para uma amostra fortificada, após análise com o método cromatográfico desenvolvido.

Para seleccionar os parâmetros que poderiam/deveriam ser otimizados no procedimento de precipitação proteica, foram realizados alguns testes iniciais, tendo-se obtido as conclusões apresentadas em seguida.

Relativamente ao solvente de precipitação, a utilização de ACN à temperatura ambiente ao invés de refrigerado não favoreceu a resposta, até porque, teoricamente, os solventes gelados favorecem a precipitação das proteínas e consequente extração dos analitos. Para além disso, verificou-se que a utilização de menor volume de solvente de precipitação, nomeadamente 500 µL de ACN, favorecia a resposta obtida (Figura 11).

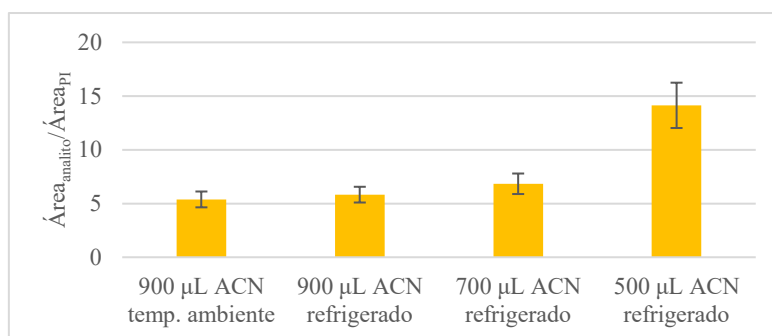


Figura 11: Gráfico de barras representativo da área relativa média da transição de quantificação do LSD obtida em cada um dos testes de solvente de precipitação e respectivas barras de erro (desvio padrão) ($n = 9$).

Tendo em conta a simplicidade e *greenness* da metodologia, optou-se por não reconstituir os extratos em fase móvel, injetando-os diretamente no equipamento, evitando o consumo de solvente e diminuindo o tempo de preparação de amostra. Optou-se por um volume de injeção de 2 µL, pois, quando se injetavam 10 ou 5 µL, era visível um interferente que coeluiu com o pico da psilocina, condicionando a sua separação, identificação e quantificação (Figura 12).

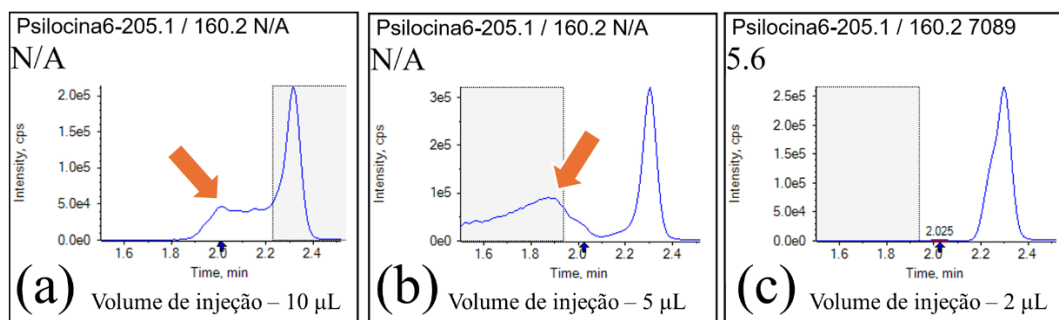


Figura 12: Cromatogramas iônicos extraídos da transição 205.1 > 160.2 da psilocina, quando amostras preparadas nas mesmas condições são injetadas em diferentes volumes: 10 µL (a); 5 µL (b); e 2 µL (c). Em (a) e (b) é visível um interferente, assinalado com uma seta.

Com base nos trabalhos de Pardi [54] e Kolaczynska [55], foi possível reduzir os volumes utilizados na precipitação proteica, utilizando apenas 50 µL de amostra, 150 µL de solvente de precipitação e 5 µL de PI e solução de fortificação.

Noutros trabalhos onde também ocorreu degradação da psilocina [36,55–58], os autores constataram que a adição de ácido ascórbico às amostras evitava a oxidação deste composto. Uma vez que este solvente não estava disponível no laboratório, foi utilizado ácido fórmico, que favorece a precipitação proteica e a extração de compostos ácidos. Em termos práticos, verificou-se que a adição de 0,1 % de AFM ao ACN permitiu a deteção de psilocina, não prejudicando o processo extrativo dos restantes compostos.

4.1.1. Ensaios de Otimização por DoE

Tendo em conta a necessidade de aumentar a sensibilidade e reduzir o tempo de preparação, foram definidos os parâmetros a otimizar no procedimento de precipitação proteica, sendo eles: volume de solvente de precipitação, concentração de AFM no solvente de precipitação e tempo de centrifugação.

Muitas vezes, este tipo de otimizações são feitas com recurso à técnica OVAT, ou seja, alterando uma única variável de cada vez. No entanto, as diversas variáveis podem interagir entre si e condicionar o resultado final, pelo que é igualmente importante analisar estas interações, algo que não é possível com esta abordagem. Uma alternativa a este problema é o Desenho Experimental (DoE) que, através da estatística, permite extrair o máximo de informação com o mínimo de ensaios experimentais, reduzindo o tempo, esforço e recursos necessários à otimização [59,63,64]. Neste trabalho, como se pretendia avaliar a influência de todos os fatores na resposta final, bem como todas as interações estabelecidas entre si, foi utilizado desenho fatorial total. Tendo em conta que o número de ensaios a realizar aumenta exponencialmente consoante o número de fatores em estudo, foi importante ter realizado os ensaios iniciais, para limitar o número de variáveis a estudar por DoE e evitar que estivessem demasiados fatores em estudo, alguns deles desnecessários, o que teria aumentado o consumo de tempo, materiais e reagentes.

Uma vez que os compostos em estudo eram vários e pertencentes a diferentes famílias, as condições definidas como ideais para os diversos parâmetros não foram iguais para todos, pelo que foi necessário fazer compromissos nalguns compostos, de modo a selecionar os valores que permitiam obter bons resultados para todos os analitos.

Na Tabela 4 está apresentada a sequência dos ensaios de DoE fatorial total realizados neste trabalho, bem como os valores de resposta desejável global obtidos para cada um dos ensaios.

Tabela 4: Sequência dos ensaios de otimização do procedimento de precipitação proteica por DoE fatorial total realizados neste trabalho e respetiva resposta desejável obtida. As três respostas mais elevadas estão destacadas a negrito.

Ordem/Número	Volume de Solvente de Precipitação (µL)	% Ácido Fórmico	Tempo de centrifugação (minutos)	Resposta Desejável
1	200	0,3	5	0
2	200	0,5	2	0,185
3	200	0,3	2	0
4	150	0,5	5	0,296

5	200	0,1	5	0,263
6	100	0,1	2	0,613
7	150	0,3	2	0
8	150	0,5	2	0,257
9	150	0,3	10	0
10	100	0,3	2	0,340
11	100	0,3	5	0,443
12	100	0,1	5	0,545
13	200	0,5	10	0
14	100	0,3	10	0,344
15	200	0,1	10	0,587
16	100	0,5	2	0,455
17	100	0,5	5	0,523
18	200	0,3	10	0
19	150	0,5	10	0,391
20	100	0,5	10	0,494
21	150	0,1	2	0,313
22	200	0,1	2	0,409
23	150	0,1	5	0,468
24	200	0,5	5	0
25	150	0,3	5	0
26	150	0,1	10	0,403
27	100	0,1	10	0,394

Apesar de os ensaios número 6 e 15 serem aqueles que obtiveram melhor resposta desejável, verificou-se que não resultam numa boa formação do *pellet*, existindo vários pequenos fragmentos de proteína misturados no sobrenadante, o que pode comprometer o desempenho e funcionamento do equipamento. Por este motivo, optou-se pelo ensaio com a terceira melhor resposta (ensaio 12) que resulta na formação de um *pellet* bastante compacto e “preso” ao fundo do tubo e um extrato límpido. No Anexo III estão apresentados os gráficos representativos da variação da resposta em função da alteração dos níveis dos fatores dos ensaios de DoE para cada composto, estando selecionadas as condições do ensaio 12, por ter sido o selecionado. Assim, as condições consideradas ótimas foram: precipitação com 100 μ L de uma solução de ACN contendo 0,1 % de Ácido Fórmico e posterior centrifugação durante 5 minutos.

4.2. Validação da Metodologia

Após o desenvolvimento e otimização da metodologia, a etapa seguinte foi proceder à sua validação, de acordo com o indicado no capítulo 3.3.5.

4.2.1. Seletividade/Estudos de Interferências

O primeiro parâmetro avaliado foi a seletividade da metodologia. Estes ensaios são importantes para garantir que existe uma correta detecção dos analitos-alvo e que não ocorrem falsos positivos ou falsos negativos que possam condicionar a interpretação toxicológica e o processo judicial.

O sangue é uma matriz bastante complexa, condicionada pelas idiossincrasias e patologias de cada indivíduo, podendo diferir nas suas propriedades físico-químicas (p.e. viscosidade ou velocidade de coagulação). Estas alterações são ainda mais evidentes em casos *postmortem*, devido aos fenómenos de putrefação. Todas estas variações nas propriedades da matriz podem condicionar uma análise, por isso é importante analisar um número considerável de amostras de origem diferente. Nesse sentido, para realizar os estudos de interferências de matriz, foram analisadas 10 amostras brancas de sangue de diferentes origens, não se tendo verificado a presença de picos interferentes que pudessem condicionar a detecção e análise de nenhum dos analitos-alvo. Apenas foram verificadas pequenas interferências na transição de quantificação do isotonitazeno, no entanto a área máxima desse picos interferentes foi inferior a 10 % da área do pico de isotonitazeno ao nível do LOD, por isso foi considerado um interferente negligenciável. Para além disso, o interferente não produz sinal na transição de confirmação, pelo que não cumpre critérios de detecção/confirmação.

A análise de uma matriz branca contendo apenas fentanilo-D₅ (controlo negativo) não provocou uma falsa identificação positiva de nenhum dos analitos, pelo que não existe interferência do padrão interno. Adicionalmente, as amostras brancas fortificadas apenas com os analitos-alvo não mostraram qualquer interferência na detecção do padrão interno, o que é essencial principalmente nos ensaios de quantificação, cuja resposta analisada é a área relativa. Por último, aquando da análise de uma amostra fortificada com mais de 200 outras substâncias comumente encontradas e analisadas rotineiramente no SQTF, nomeadamente medicamentos, pesticidas e outras drogas de abuso, não foram observadas quaisquer interferências em nenhum dos analitos-alvo nem no padrão interno, o que comprova a seletividade da metodologia desenvolvida.

4.2.2. Efeito de Matriz

A avaliação do efeito de matriz segue a mesma lógica dos estudos de interferências de matriz, razão pela qual foram utilizadas as mesmas 10 amostras de sangue branco.

Todos os compostos, à exceção da psilocina e da mescalina, cumpriram os critérios de aceitação deste parâmetro, nomeadamente CV % dos replicados inferior a 20 % e efeito de matriz compreendido entre ± 25 %, não se tendo observado uma prevalência de supressão ou incremento iónico. Em relação à psilocina, verificou-se um incremento acentuado (acima de 115 % a concentração baixa e acima de 75 % a concentração alta). No que diz respeito à mescalina, verificou-se um incremento de sinal superior a 69 % para a concentração baixa. Apesar de este valor de efeito de matriz ultrapassar os 25 %, a capacidade da metodologia analisar a mescalina não foi posta em causa, pois todos os outros parâmetros de validação foram cumpridos, incluindo o LOD e o LLOQ.

Os valores de supressão ou incremento iónico obtidos para cada transição iónica dos analitos estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Valores de supressão e/ou incremento iónico determinados para cada transição dos analitos-alvo deste trabalho. Os valores que não cumprem os critérios de aceitação estão destacados a vermelho.

Substância	Concentração Baixa (0,2 ou 5 ng/mL)		Concentração Alta (18 ou 450 ng/mL)	
	Efeito de Matriz	Supressão/ Incremento	Efeito de Matriz	Supressão/ Incremento
4-MMC 1	-6,2	Supressão	-19,6	Supressão
4-MMC 2	-4,9	Supressão	-17,0	Supressão
Carfentanilo 1	6,3	Incremento	-13,7	Supressão
Carfentanilo 2	1,8	Incremento	-14,0	Supressão
Fentanilo 1	-0,6	Supressão	-14,8	Supressão
Fentanilo 2	-2,3	Supressão	-15,8	Supressão
Isotonitazeno 1	-0,5	Supressão	-16,3	Supressão
Isotonitazeno 2	-0,7	Supressão	-19,8	Supressão
LSD 1	-3,5	Supressão	-10,1	Supressão
LSD 2	-0,1	Supressão	-9,5	Supressão
LSD-OH 1	20,2	Incremento	10,6	Incremento
LSD-OH 2	24,1	Incremento	11,8	Incremento
Mescalina 1	80,7	Incremento	6,2	Incremento
Mescalina 2	69,5	Incremento	4,2	Incremento
Metonitazeno 1	15,3	Incremento	1,1	Incremento
Metonitazeno 2	12,3	Incremento	-3,3	Supressão
Norfentanilo 1	-5,5	Supressão	-16,1	Supressão
Norfentanilo 2	-7,7	Supressão	-15,2	Supressão
Psilocina 1	128,2	Incremento	80,5	Incremento
Psilocina 2	119,0	Incremento	77,4	Incremento
Sufentanilo 1	4,7	Incremento	-13,3	Supressão
Sufentanilo 2	3,5	Incremento	-16,1	Supressão

4.2.3. LOD

No âmbito forense, quando é solicitada uma análise toxicológica, não há geralmente informação acerca das doses consumidas nem quanto tempo decorreu entre o consumo e a colheita/análise das amostras, por isso as substâncias presentes na matriz podem encontrar-se a concentrações bastante reduzidas, pelo que é importante implementar metodologias de elevada sensibilidade.

Nesse sentido, e tendo em conta as concentrações dos analitos-alvo em sangue determinadas noutros trabalhos descritos na introdução desta dissertação e as abordagens indicadas na norma de validação para estimativa deste parâmetro, optou-se por validar o LOD a um valor pré-estabelecido correspondente a metade da concentração do primeiro calibrador da curva, ou seja, 0,05 ng/mL. Para a 4-MMC, o metonitazeno e o norfentanilo, a essa concentração não se obtiveram picos cromatográficos ou não estavam cumpridos os critérios de deteção e identificação de picos, pelo que foi necessário testar uma concentração superior de LOD, que acabou por ser 0,1 ng/mL. No caso da mescalina, reduziu-se o valor de LOD para 1 ng/mL, pois a 1,25 ng/mL (metade do limite inferior da gama linear) o pico ainda era muito intenso. Em relação à psilocina a abordagem foi diferente, tendo sido testadas concentrações cada vez menores até se obter um valor que cumprisse os critérios de aceitação de LOD, que correspondeu a 5 ng/mL.

Três matrizes foram analisadas/testadas, em triplicado, aos níveis de LOD anteriormente referidos durante 3 dias ($n = 27$). Aos valores de LOD indicados, todos os critérios de aceitação foram cumpridos, em todas as matrizes utilizadas. Na Figura 13 estão apresentados os cromatogramas iónicos extraídos referentes ao isotonitazeno e ao sufentanilo a uma concentração correspondente ao respetivo LOD estimado. Os valores de LOD estimados para cada composto estão apresentados na Tabela 6.

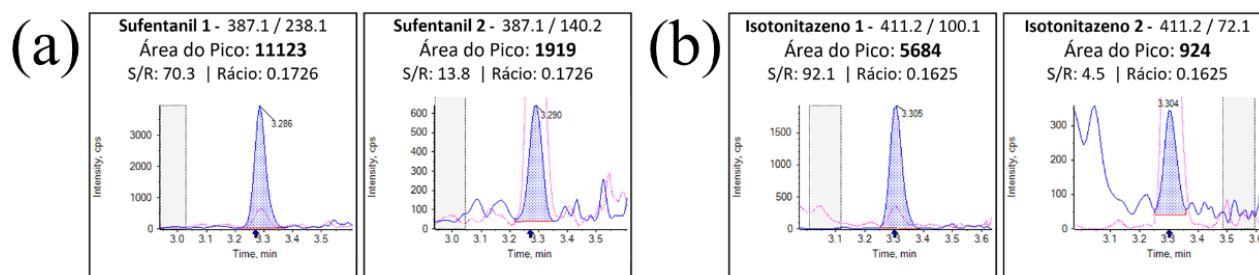


Figura 13: Cromatogramas iónicos extraídos referentes ao sufentanilo (a) e ao isotonitazeno (b) no sangue a uma concentração correspondente ao respetivo LOD estimado (0,05 ng/mL).

4.2.4. LLOQ

No presente trabalho, selecionou-se a concentração do primeiro calibrador (2,5 ng/mL para a mescalina e 0,1 ng/mL para as restantes substâncias) como o valor correspondente ao LLOQ do método. Os ensaios foram realizados da mesma forma e com as mesmas matrizes do que no LOD, fortificando as amostras com a concentração pretendida. Os critérios de aceitação foram cumpridos para todos os analitos em estudo, à exceção do norfentanilo, cujo valor de Bias % foi de cerca de 24 %, superior ao limite aceitável de 20 %. Os valores de LLOQ estimados para cada composto estão apresentados na Tabela 6.

De um modo geral, o LOD costuma corresponder a uma concentração inferior ao LLOQ. No entanto, neste trabalho, para a 4-MMC e o metonitazeno, os valores definidos como LOD e LLOQ foram iguais. Esta possibilidade está contemplada na norma de validação seguida, que indica que estes parâmetros devem ser selecionados consoante o propósito da metodologia e as necessidades do laboratório. Uma vez que os compostos apenas poderão ser quantificados se se encontrarem no intervalo de concentrações da gama linear, não seria necessário que o LLOQ fosse inferior ao valor mínimo desse intervalo. Relativamente ao LOD, tal como referido na página precedente, começou-se por testar um valor inferior ao do LLOQ. No entanto, como a essa concentração não foram cumpridos os critérios de aceitação, houve a necessidade de testar uma concentração superior. Uma vez que, tal como referido na introdução deste trabalho, as concentrações de metonitazeno encontradas em amostras reais têm sido superiores a 0,5 ng/mL, optou-se por validar também a 0,1 ng/mL, uma concentração cinco vezes inferior. Para além disso, estes valores de LOD e LLOQ são equivalentes aos estimados noutros trabalhos apresentados no Anexo V. Não obstante, os critérios de LLOQ são mais exigentes do que os do LOD, pois há a necessidade de que o S/N seja igual ou superior a 10 e que estejam cumpridos os critérios de precisão e justeza.

4.2.5. Linearidade/Modelo de Calibração e Arrastamento

A linearidade da metodologia foi validada entre 0,1 e 20 ng/mL no sangue (2,5 – 500 ng/mL para a mescalina). Esta gama de calibração foi definida com base noutros trabalhos já publicados (abordados mais adiante no capítulo 4.3.), nas concentrações esperadas em casos reais (indicadas na introdução deste trabalho) e no LOD estimado para cada composto.

O primeiro passo foi testar a homocedasticidade dos dados. Para isso, foram traçados gráficos de variância e de resíduos em função da concentração e aplicou-se o teste F para variâncias. Os resíduos foram calculados pela diferença entre os valores de y obtidos e os valores de y previstos pela reta de ajuste. O teste F para variâncias baseia-se na comparação entre os valores experimental e tabelado de F. O valor experimental de F corresponde ao quociente entre as variâncias dos calibradores de menor e maior concentração da gama linear. O valor tabelado obteve-se de uma tabela-F a um nível de confiança de 99 % e com graus de liberdade correspondentes ao número de replicados - 1, neste caso 4. Quando o valor experimental é inferior ao valor tabelado, assume-se que a variância é constante. Neste caso concreto, verificou-se que existia uma diferença da variância ao longo da gama linear, ou seja, que os dados eram heterocedásticos, pelo que foi necessário aplicar fatores de ponderação. O melhor modelo de calibração foi selecionado através dos fatores descritos no capítulo 3.3.5. Para todos os analitos em estudo, o melhor modelo de calibração correspondeu a uma ponderação de $1/x$, com um r^2 superior a 0,99.

Tal como já foi referido anteriormente, ao contrário do que acontece em âmbito terapêutico ou clínico, nos casos forenses, e especialmente em situações *postmortem*, não existe qualquer informação acerca das concentrações de analitos que podem ser encontradas nas amostras. Assim, se o tempo decorrido entre o consumo e a colheita e subsequente análise da amostra for relativamente prolongado, pode já ter ocorrido metabolização e eliminação dos compostos, pelo que a concentração encontrada no sangue será reduzida. No sentido contrário, em situações de intoxicações letais, pode ocorrer uma sobredosagem, pelo que serão determinadas concentrações elevadas no sangue. Nesse sentido, é importante que as gamas de calibração/quantificação sejam bastante abrangentes, tal como ocorreu na presente dissertação. A necessidade de utilizar ponderações decorre precisamente da extensão da gama linear.

Os principais parâmetros referentes à validação da linearidade para cada composto estão apresentados na Tabela 6. As curvas de calibração de cada analito com ponderação $1/x$ são apresentadas no Anexo IV.

Tabela 6: Valores de LOD, LLOQ e principais parâmetros de linearidade obtidos no processo de validação dos analitos em estudo neste trabalho.

Composto	LOD (ng/mL)	LLOQ (ng/mL)	Gama Linear (ng/mL)	Ponderação	r^2 médio	Σ ER % médio
4-MMC	0,1	0,1	0,1 - 20	1/x	0,9957	43,5533
Carfentanilo	0,05	0,1	0,1 - 20	1/x	0,9951	56,9714
Fentanilo	0,05	0,1	0,1 - 20	1/x	0,9958	49,6502
Isotonitazeno	0,05	0,1	0,1 - 20	1/x	0,9962	54,9857
LSD	0,05	0,1	0,1 - 20	1/x	0,9955	60,3559
LSD-OH	0,05	0,1	0,1 - 20	1/x	0,9963	55,5294
Mescalina	1	2,5	2,5 - 500	1/x	0,9935	59,9462
Metonitazeno	0,1	0,1	0,1 - 20	1/x	0,9963	50,4420
Norfentanilo	0,1	0,1*	0,1 - 20	1/x	0,9949	61,4060
Psilocina	5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sufentanilo	0,05	0,1	0,1 - 20	1/x	0,9962	51,8084

* Bias % acima do limite aceitável de 20 %
n.d. – não determinado

Para avaliar o arrastamento, durante 5 dias, após a injeção do calibrador de maior concentração, foram injetados 10 μ L de metanol LC-MS. A análise do metanol não apresentou sinais cromatográficos para a generalidade das transições monitorizadas e, nos casos em que apareceram, apresentaram áreas inferiores a 10 % do LLOQ, não sendo, portanto, significativos. Para além disso, numa segunda injeção de metanol subsequente já não foram observados sinais resultantes de arrastamento.

A validação deste parâmetro é bastante pertinente e relevante, pois a existência de arrastamento pode originar um resultado falso positivo ou uma quantificação de amostra superior ao valor real, o que condiciona toda a análise toxicológica e forense.

4.2.6. Justeza e Precisão

A precisão e justeza intra-dia foram estimadas diariamente através da extração de alíquotas de uma mistura de sangue fortificadas a três níveis de concentração no sangue. Estes ensaios foram realizados em triplicado para cada nível de concentração. Para estimar a precisão e justeza inter-dia, este processo foi repetido durante cinco dias, correspondendo a um total de 15 replicados para cada nível de concentração. Os valores de Bias % e de CV % obtidos para todos os analitos estão apresentados na Tabela 7, tendo sido obtido resultados satisfatórios (± 20 % ou ≤ 20 %, respetivamente).

Estes valores de precisão e justeza fornecem confiança e exatidão aos resultados obtidos com esta metodologia, pois indicam que, uma mesma amostra analisada várias

vezes, inclusive em dias diferentes, terá o mesmo resultado, resultado este concordante com a sua concentração “real”, o que é particularmente importante no caso de amostras que precisem de ser reanalisadas.

Tabela 7: Valores de precisão e justeza intra e inter-dias obtidos para as substâncias em estudo, a três níveis de concentração.

Composto	Concentração (ng/mL)	Precisão (CV %)		Justeza (Bias %)	
		Intra-dia (n = 3)	Inter-dias (n = 15)	Intra-dia (n = 3)	Inter-dias (n = 15)
4-MMC	0,2	8,8	11,50	16,69	7,73
	3	7,57	10,73	12,11	1,83
	18	6,63	15,62	-9,44	-3,38
Carfentanilo	0,2	8,42	12,35	15,34	5,88
	3	7,25	9,03	12,21	1,50
	18	5,02	14,67	-9,04	-2,93
Fentanilo	0,2	7,90	7,34	12,99	4,61
	3	8,58	7,91	8,76	0,92
	18	6,80	11,18	-12,61	-4,33
Isotonitazeno	0,2	9,88	10,19	19,13	6,62
	3	9,42	11,76	-15,41	0,07
	18	7,56	15,46	-13,54	-4,31
LSD	0,2	8,63	9,82	14,15	3,92
	3	9,18	8,75	-12,88	-3,29
	18	7,27	10,23	-15,73	-9,97
LSD-OH	0,2	11,74	12,31	19,42	-0,93
	3	7,36	9,79	-18,45	-3,13
	18	6,52	13,43	-16,19	-5,87
Mescalina	5	10,67	13,73	17,79	-1,57
	75	10,49	12,06	10,71	5,84
	450	7,37	15,20	-16,86	-9,87
Metonitazeno	0,2	9,57	8,37	17,00	10,14
	3	9,86	8,29	12,95	1,15
	18	6,07	10,14	-13,50	0,05
Norfentanilo	0,2	8,37	13,73	19,74	12,20
	3	9,83	12,36	13,61	3,14
	18	7,39	16,65	6,27	1,93
Sufentanilo	0,2	8,42	10,11	19,17	10,43
	3	8,89	11,23	17,37	4,72
	18	7,05	17,79	15,56	-1,26

4.2.7. Integridade de Diluição

Pelos motivos indicados no ponto 4.2.5., podem surgir no laboratório amostras com concentrações dos analitos-alvo superiores à gama de calibração estabelecida, e que, por isso, necessitem de ser diluídas para poderem ser quantificadas. Para além disso, principalmente em situações *postmortem*, por vezes o volume de amostra disponível é

muito reduzido. Apesar de a metodologia desenvolvida requerer a utilização de pouca quantidade de amostra, havendo necessidade de sujeitar essa mesma amostra a diversos ensaios laboratoriais e tendo de ser conservado/armazenado volume suficiente para possível contra-perícia, pode ser preferível diluir a amostra.

Deste modo, apesar de não ser um parâmetro de validação obrigatória, validou-se também a integridade de diluição das amostras. Os resultados de CV % e Bias % intra-dia relativos aos fatores de diluição 2, 5 e 10 foram diferentes entre os compostos, estando apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Valores de Precisão (CV %) e Justeza (Bias %) obtidos para cada analito quando as amostras foram diluídas 2, 5 ou 10 vezes. Os valores que não cumprem os critérios de aceitação estão apresentados a vermelho.

Composto	Fator de Diluição	Precisão (CV %) (n = 3)	Justeza (Bias %) (n = 3)
4-MMC	2	15,7	18,48
	5	14,39	31,84
	10	15,45	40,94
Carfentanilo	2	17,45	19,91
	5	18,56	-18,12
	10	10,69	-13,66
Fentanilo	2	15,00	17,05
	5	12,18	15,79
	10	11,72	18,93
Isotonitazeno	2	16,31	19,10
	5	6,32	17,69
	10	14,51	-14,11
LSD	2	15,41	17,74
	5	11,17	18,06
	10	15,76	35,09
LSD-OH	2	14,55	18,20
	5	12,41	18,06
	10	10,10	19,36
Mescalina	2	18,20	39,30
	5	15,09	38,90
	10	14,00	26,72
Metonitazeno	2	15,08	17,80
	5	12,46	21,17
	10	19,55	-14,63
Norfentanilo	2	14,37	32,87
	5	13,34	54,20
	10	16,33	54,74
Sufentanilo	2	13,73	19,34
	5	13,77	18,15
	10	17,50	31,59

Em termos de precisão, todos os compostos obtiveram valores de CV % aceitáveis (< 20 %) para todas as diluições realizadas. No entanto, o mesmo não se verificou com o Bias %, que foi bastante elevado em alguns casos. Nessas situações, não valerá a pena fazer a diluição das amostras, pois os resultados obtidos não serão verdadeiros/exatos, devendo indicar-se apenas que a amostra está positiva a uma concentração superior a 20 ng/mL (ou 500 ng/mL no caso da mescalina).

Pela análise da tabela acima, verifica-se que, para a mescalina e o norfentanilo, os critérios de Bias % não são cumpridos para nenhum dos fatores de diluição, pelo que não será possível fazer a quantificação de amostras contendo estes analitos a uma concentração acima da gama linear. No caso do LSD e do sufentanilo, o Bias % para a diluição 1/10 foi superior a 30 %, pelo que apenas as diluições 1/2 e 1/5 são adequadas para estes compostos. No caso do metonitazeno, os critérios são totalmente cumpridos para as diluições 1/2 e 1/10. No entanto, o Bias % referente à diluição 1/5 é ligeiramente superior a 20 % (21,17 %), pelo que poderá ter ocorrido algum pequeno erro na execução que deve ser averiguado assim que possível. Todos os outros compostos podem ser diluídos 2, 5 ou 10 vezes com total segurança dos resultados, pois o Bias % obtido foi inferior ao limite de 20 %.

4.2.8. Estabilidade de Amostra Processada

Quando se procede à extração/preparação das amostras, pressupõe-se que elas serão sujeitas a análise cromatográfica logo em seguida. Contudo, por vezes, isso pode não ser possível, quer porque o equipamento está a ser utilizado para outras análises de rotina no laboratório, quer porque ocorre algum problema técnico ou mecânico. Para além disso, se for preparado um número elevado de amostras, passará algum tempo até que as últimas sejam injetadas. Assim, é importante perceber se os extratos das amostras se mantêm estáveis durante esses períodos de espera. Nesse sentido, e apesar de, de acordo com a norma de validação utilizada, ser um parâmetro de validação opcional, validou-se também a estabilidade dos extratos quando mantidos no amostrador automático ou quando armazenados no congelador, de acordo com o indicado nos materiais e métodos.

Uma vez que esta metodologia pretende ser implementada como método de rotina num laboratório de toxicologia, a estabilidade no amostrador foi avaliada apenas durante uma semana, pois, mesmo com um fluxo elevado de amostras, as amostras não ficarão em espera no equipamento mais do que esse tempo. Caso ocorra avaria do equipamento

e os extratos não possam ser analisados dentro de pouco tempo, o armazenamento no congelador é uma melhor opção. A estabilidade no congelador foi avaliada durante um mês.

Na Figura 14 estão representados os gráficos de estabilidade do metonitazeno, a concentração alta (18 ng/mL), no amostrador e no congelador, bem como os limites aceitáveis de estabilidade ($\pm 20\%$ da área relativa obtida aquando da preparação), que permitem perceber até quando os extratos são estáveis.

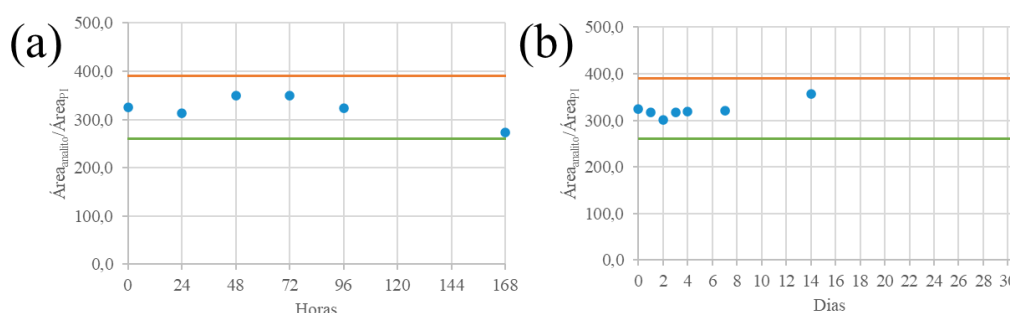


Figura 14: Gráficos de área relativa do metonitazeno em função do tempo de armazenamento no amostrador (em horas) (a) e no congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (em dias) (b), bem como os limites de estabilidade aceites em cada um dos casos (linhas horizontais cor-de-laranja e verdes).

Estes gráficos foram construídos para todos os analitos-alvo, estando os tempos limite de estabilidade apresentados na Tabela 9. Em cada dia de análise, para cada uma das concentrações, $n=3$.

Tabela 9: Limites temporais em que foi verificada a estabilidade dos analitos-alvo em extratos fortificados a concentração baixa ou alta e armazenados no amostrador ou no congelador.

Substância	Concentração Baixa (0,2 ou 5 ng/mL)		Concentração Alta (18 ou 450 ng/mL)	
	Amostrador	Congelador	Amostrador	Congelador
4-MMC	1 semana	1 mês	1 semana	1 dia
Carfentanilo	1 semana	1 mês	1 semana	1 mês
Fentanilo	1 semana	1 mês	1 semana	1 mês
Isotonitazeno	96 h (4 dias)	14 dias	96 h (4 dias)	14 dias
LSD	1 semana	1 mês	1 semana	1 mês
LSD-OH	1 semana	< 24 h	1 semana	< 24 h
Mescalina	1 semana	< 24 h	1 semana	< 24 h
Metonitazeno	96 h (4 dias)	1 mês	1 semana	1 mês
Norfentanilo	1 semana	< 24 h	96 h (4 dias)	< 24 h
Sufentanilo	1 semana	1 mês	1 semana	1 mês

Nestes ensaios verificou-se que, a concentração baixa, o isotonitazeno e o metonitazeno se mantêm estáveis no amostrador durante 4 dias (96 horas), enquanto os restantes compostos se mantiveram estáveis durante 1 semana. A concentração alta, o

isotonitazeno também só se manteve estável durante 4 dias, tal como aconteceu com o norfentanilo. Os restantes analitos não se degradaram durante 1 semana.

Relativamente à estabilidade no congelador, esta não se verificou para o LSD-OH, para a mescalina nem para o norfentanilo, que, ao fim de 24 horas, já se tinham degradado. Durante a realização deste trabalho, não foi possível estudar e identificar os fatores que fazem com que a degradação seja superior no congelador do que no amostrador. Nestes casos em que os extratos não são estáveis, será preferível analisar uma nova alíquota da amostra do que preservar os extratos no congelador. Os restantes compostos mantiveram-se estáveis no congelador durante 1 mês, à exceção do isotonitazeno, que degradou ao fim de cerca de duas semanas.

De um modo geral, a metodologia apresentou bom desempenho analítico nos ensaios de validação, pelo que provou ser uma metodologia adequada para o propósito da sua implementação, originando resultados confiáveis e exatos/verdadeiros. Adicionalmente, a validação da integridade de diluição e da estabilidade de amostras processadas fornece uma maior confiança para implementação na rotina laboratorial. Estas características são particularmente importantes para a implementação da metodologia num laboratório de toxicologia forense, em particular no SQTF, pois a rotina laboratorial é bastante exigente e existem poucos equipamentos disponíveis.

Apesar de se ter adicionado ácido fórmico na etapa de preparação de amostra para tentar resolver os problemas de instabilidade e degradação da psilocina, os resultados não foram os esperados, não tendo sido possível fazer uma validação completa para confirmação e quantificação da psilocina, tendo apenas sido validada a seletividade, o efeito de matriz e o LOD. Contudo, com esta metodologia, poderá ser feita a deteção e identificação presuntiva da psilocina, o que continua a ser importante do ponto de vista forense, pois, uma vez que não há conhecimento acerca das substâncias que vão ser detetadas em cada amostra, é proveitoso ter ao dispor a maior quantidade possível de analitos a testar, mesmo que seja só no rastreio.

Futuramente, poderá ser desenvolvida uma metodologia unicamente para a psilocina, testando a utilização de ácido ascórbico ao invés de AFM, ou alterando a coluna cromatográfica e/ou fase móveis utilizadas.

4.3. Comparação com Outras Metodologias

Depois de a metodologia ser desenvolvida, otimizada e validada, é importante compará-la com outras já descritas na literatura. A tabela presente no Anexo V apresenta os valores de LOD, limite de quantificação (LOQ), gama linear e ponderação utilizada, coeficiente de determinação, precisão (CV %), justeza (Bias %), volume de amostra requerido e tempo de corrida cromatográfica, obtidos noutros trabalhos envolvendo análise dos opioides e alucinógenos em estudo em sangue total por LC-MS/MS (triplo quadrupolo (QQQ) ou QTRAP), mas com diferente preparação de amostra. Para limitar a comparação, apenas foram selecionados artigos que apresentassem dados de validação e que tenham sido publicados a partir de 2019.

Através desta comparação, depreende-se que a metodologia desenvolvida apresenta valores de LOD e LOQ/LLOQ baixos, bem como precisão e justeza equiparáveis aos da literatura. Para além disso, a gama linear também é semelhante àquela apresentada em muitos artigos. Caso surjam amostras para análise com concentração superior à gama estabelecida, é possível diluí-las e analisá-las usando os fatores de diluição validados para cada composto.

As principais vantagens da presente metodologia são o reduzido volume de amostra e de solventes utilizados, muito inferior ao utilizado na grande maioria dos trabalhos, bem como o tempo reduzido de corrida cromatográfica e de preparação de amostra, que também é inferior ao necessário noutros trabalhos. O facto de esta metodologia envolver um reduzido tempo de análise das amostras é particularmente importante do ponto de vista forense, pois o fluxo de análises num laboratório de toxicologia é muito elevado e, deste modo, é possível agilizar o processamento das amostras recebidas, contribuindo para o aceleração dos processos judiciais.

Adicionalmente, esta metodologia permite a identificação, confirmação e quantificação simultâneas de compostos de diferentes famílias de substâncias psicoativas, o que permite reduzir o número de análises necessárias, resultando numa diminuição do consumo de materiais e reagentes, menor tempo despendido em cada análise e redução da quantidade de amostra necessária, tudo isto contribuindo para uma maior eficiência laboratorial e menor custo monetário envolvido.

Por tudo isto, esta metodologia apresenta-se como uma alternativa vantajosa a outras metodologias descritas na literatura.

4.4. Análise de Amostras Reais

A última etapa deste trabalho foi testar a aplicabilidade da metodologia desenvolvida a contextos reais, tendo sido, por isso, analisadas amostras forenses autênticas. Uma vez que o objetivo era apenas testar a performance da metodologia em amostras reais e não se pretendia fazer interpretação toxicológica nem estudo retrospectivo da presença desses analitos em amostras recebidas no SQTf, não foi solicitada autorização para consulta de processos, pelo que, nos casos positivos, não há informação sobre possíveis administrações terapêuticas ou hospitalares, nem históricos de consumo.

Estas análises foram realizadas nas condições otimizadas da metodologia. No total foram analisadas 19 amostras de sangue total oriundas de colheitas *postmortem* ou *in vivo*. No rastreio dessas amostras, 11 (58 %) revelaram-se positivas para fentanilo, norfentanilo, sufentanilo e/ou 4-MMC. Na Figura 15 está apresentada a comparação entre uma amostra considerada positiva para fentanilo no rastreio e outra negativa.

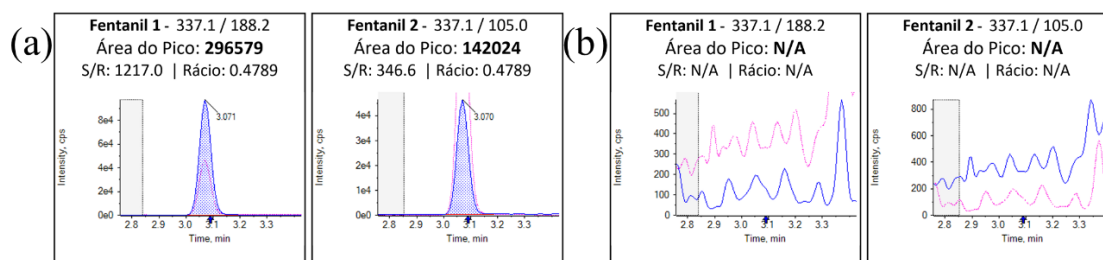


Figura 15: Cromatogramas MRM de fentanilo para uma amostra considerada positiva no rastreio (a) e outra considerada negativa (b).

Após o rastreio, as amostras presumivelmente positivas foram sujeitas a análise confirmatória, em que foram aplicados os critérios de confirmação. Nesta etapa, em 3 amostras não foram cumpridos os critérios de confirmação da presença de 4-MMC. A comparação entre um resultado de confirmação positivo e um negativo é apresentada na Tabela 10.

Por fim, as 10 amostras que se revelaram positivas tanto no rastreio como na confirmação, foram analisadas novamente, para quantificar os analitos presentes.

No total, 8 amostras apresentaram fentanilo a uma concentração média de 4,6 ng/mL (0,6 – 15 ng/mL). Norfentanilo foi encontrado em 4 amostras a concentrações entre 0,1 e 1,5 ng/mL (média de 0,75 ng/mL). Para além disso, foi também identificado sufentanilo (5,2 ng/mL) e 4-MMC (7,4 ng/mL) em uma amostra cada. Nenhuma amostra foi positiva para os restantes analitos.

Tabela 10: Registos de confirmação da presença de 4-MMC em amostras consideradas positivas no rastreio. Em (a), verificou-se total conformidade dos critérios de aceitação, pelo que a confirmação foi positiva. Em (b), a abundância relativa das áreas não estava conforme, pelo que corresponde a uma confirmação negativa.

(a)	Substância: 4-MMC								
	ISTD: Fentanil-D5						Controlo: CT1		
	Substância	t.r.	t.r.r.	Tolerância	limite inf.	limite sup.	t.r.	t.r.r.	Aceitação
	4-MMC 1	2,63		2% rel.	2,58	2,68	2,60		Conforme
	Fentanil-D5 1	3,05	0,86	1% rel.	0,85	0,87	3,04	0,86	Conforme
	Transição	Área	Área relativa	Tolerância	limite inf.	limite sup.	Área	Área relativa	Aceitação
	178 > 160	33563	100,0%	10 abs.	90,0%	110,0%	113844	100,0%	Conforme
	178 > 145	24346	72,5%	10 abs.	62,5%	82,5%	85360	75,0%	Conforme
	ISTD	Área				ng/mL	Área	gama	ng/mL
	Fentanil-D5 1	7760				0,20	10282	(-)	0,51

(b)	Substância: 4-MMC								
	ISTD: Fentanil-D5						Controlo: CT1		
	Substância	t.r.	t.r.r.	Tolerância	limite inf.	limite sup.	t.r.	t.r.r.	Aceitação
	4-MMC 1	2,63		2% rel.	2,58	2,68	2,64		Conforme
	Fentanil-D5 1	3,05	0,86	1% rel.	0,85	0,87	3,06	0,86	Conforme
	Transição	Área	Área relativa	Tolerância	limite inf.	limite sup.	Área	Área relativa	Aceitação
	178 > 160	33563	100,0%	10 abs.	90,0%	110,0%	140557	100,0%	Conforme
	178 > 145	24346	72,5%	10 abs.	62,5%	82,5%	9121	6,5%	não conforme
	ISTD	Área				ng/mL	Área	gama	ng/mL
	Fentanil-D5 1	7760				0,20	4357	(-)	1,49

A análise de amostras de casos reais permite concluir que o método pode ser aplicado na análise de rotina em contexto forense, sendo cumpridos todos os critérios em vigor no SQTf. A gama de trabalho validada é adequada às concentrações esperadas nas amostras.

Por último, foi analisada uma amostra interlaboratorial de soro, onde foi identificada a presença de fentanilo a 4,6 ng/mL e de sufentanilo a 1,1 ng/mL. Comparando estes valores obtidos com os valores reais do ensaio, os z-score calculados foram de 0,71 e 0,75, respetivamente, estando bastante abaixo do limite de 2, pelo que a análise teve um resultado satisfatório, o que demonstra a exatidão e adequabilidade da metodologia proposta, mesmo quando aplicada a amostras de soro.

4.5. Sustentabilidade da Metodologia

Para além do desempenho analítico da metodologia, também era pretendido que a mesma estivesse em concordância com os princípios da Química Analítica Verde e que fosse o mais ecológica possível.

Nesse sentido, avaliou-se a pegada ecológica da generalidade da metodologia com recurso ao *software* AGREE e, uma vez que a etapa de preparação de amostra é um passo

fundamental da metodologia, também se avaliou o seu desempenho ambiental, através do *software* AgreePrep. Neste trabalho, aos parâmetros considerados menos relevantes foi atribuído o peso de 1 e aos mais relevantes foi dado peso máximo, ou seja, 4 ou 5. Os restantes parâmetros tiveram um peso intermédio de 2 ou 3.

Os resultados obtidos para a metodologia desenvolvida são aqueles apresentados na Figura 16, verificando-se que os valores globais determinados (0,78 e 0,69) foram semelhantes e que correspondem a uma cor verde, representativa de uma boa performance ambiental.

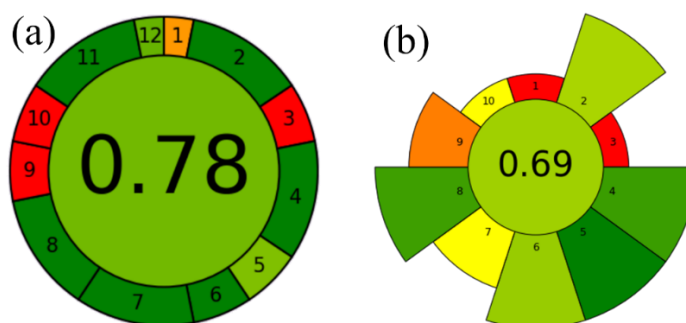


Figura 16: Resultados obtidos pela metodologia desenvolvida quando submetida a análise através dos softwares AGREE (a) [52] e AgreePrep (b) [53].

Em termos ambientais, a implementação de metodologias de análise *in situ*, com o mínimo de preparação de amostra possível, é favorecida. Contudo, tal não é possível neste trabalho, pois é utilizada uma matriz biológica complexa, o sangue, havendo a necessidade de as amostras serem colhidas em ambientes próprios e adequados, para além de a análise exigir alta sensibilidade, apenas conseguida com preparação de amostra. Ademais, podem ser solicitadas contra-análises, pelo que existe sempre a necessidade de armazenar as amostras. Por este motivo, este parâmetro foi considerado menos relevante.

A metodologia desenvolvida foi otimizada para que fosse miniaturizada e simples, envolvendo a menor quantidade de amostra e solventes possível, bem como o mínimo de etapas necessárias. Para além disso, as pipetagens das soluções podem ser feitas com recurso a pipetas automáticas, o que diminui o erro do operador e torna o processo mais rápido, pelo que estes foram parâmetro considerados muito relevantes. Outra vantagem ambiental é o facto de que, devido à pouca utilização de amostra e solventes, a quantidade de descartes produzidos é também bastante reduzida. Como se tratam de matrizes biológicas, este lixo é obrigatoriamente descartado em contentores de lixo biológico, que são depois recolhidos e incinerados por entidades competentes para o efeito.

Uma vez que a metodologia é bastante rápida e permite analisar 11 substâncias simultaneamente, o fluxo de análises é também muito rápido, o que contribui para a eficiência laboratorial, especialmente em contexto de rotina. Durante o presente trabalho conseguiram ser preparadas cerca de 20 amostras por hora.

O aspeto menos positivo para o ambiente é a utilização do UHPLC-QTRAP-MS, que tem custos de aquisição e manutenção elevados e que consome uma quantidade considerável de energia durante o seu funcionamento, para além de exigir a utilização de solventes de elevada pureza. No entanto, tal como indicado no capítulo 2.2.3., devido à sua elevada seletividade e sensibilidade, a utilização desta tecnologia é essencial na análise de matrizes biológicas, estando atualmente implementada em laboratórios forenses no mundo inteiro.

[Esta página foi propositadamente deixada em branco]

5. Conclusões e Perspetivas Futuras

A presente dissertação teve como objetivo desenvolver, otimizar e validar um método analítico multi-substância sensível para a análise de rotina de novos opioides sintéticos e alucinogénios em sangue total *in vivo* e *postmortem*, de forma rápida, simples e eficaz. Para isso, a metodologia empregue consistiu em precipitação proteica (otimizada por desenho experimental) seguida de análise por UHPLC-QTRAP-MS.

A metodologia desenvolvida permite analisar simultaneamente 11 substâncias em amostras de sangue total *in vivo* e *postmortem*, necessitando de um volume mínimo de amostra (apenas 50 μL) e com uma preparação de amostra bastante rápida (conseguem ser analisadas cerca de 20 amostras por hora) e simples, fatores particularmente úteis para implementação de rotina em laboratórios de toxicologia forense. Esta metodologia é também amiga do ambiente, pois é uma abordagem miniaturizada e com pouca utilização de solventes orgânicos.

Em termos analíticos, a metodologia demonstrou, de um modo geral, bons resultados nos ensaios de validação, o que dá segurança e confere qualidade aos resultados obtidos em análises futuras. A gama linear está compreendida entre 0,1 e 20 ng/mL (2,5 a 500 ng/mL no caso da mescalina), não tendo sido observados arrastamentos ou efeitos de matriz. A precisão e a justeza foram satisfatórias, com valores $\leq 20\%$ e entre $\pm 20\%$, respetivamente. O LOD foi estimado entre 0,05 e 1 ng/mL, consoante o composto. A seletividade foi assegurada através da análise de amostras fortificadas com mais de 200 medicamentos, pesticidas e outras drogas de abuso. Para além disso, não foram identificados interferentes de matriz.

Para verificar se compostos de outras famílias poderiam ser analisados também neste método, a mefedrona (4-MMC), pertencente ao grupo das catinonas sintéticas, foi incluída na lista de analitos, tendo sido verificados bons resultados, à semelhança dos outros analitos.

A aplicabilidade da metodologia em contexto real foi verificada através da análise de 19 amostras forenses, com 10 delas a revelarem-se positivas para a presença de fentanilo (0,6 – 15 ng/mL), norfentanilo (0,1 e 1,5 ng/mL), sufentanilo (5,2 ng/mL) e/ou 4-MMC (7,4 ng/mL). Adicionalmente, a metodologia foi aplicada à análise de amostras de soro oriundas de ensaios interlaboratoriais, tendo sido obtidos resultados bastante satisfatórios.

Futuramente, poderá ser estudada a introdução no método de outros compostos já conhecidos pertencentes às famílias em estudo ou a outras famílias de drogas, para além de que, uma vez que o mercado das NPS está em constante adaptação, também poderão ser incluídas as novas drogas que vão sendo introduzidas.

Adicionalmente, uma vez que a metodologia requer volumes bastante reduzidos de amostra, poderá ser adaptada à análise de amostras de sangue seco.

Em relação à 4-MMC, este composto apresenta isómeros de posição, nomeadamente 2-MMC e 3-MMC, pelo que será igualmente útil analisar todas estas formas isoméricas, para conseguir distingui-las/diferenciá-las.

Por último, devido ao aumento dos alertas emitidos a nível europeu relacionados com apreensões e intoxicações relacionadas com nitazenos, poderá ser interessante e pertinente utilizar a metodologia desenvolvida para fazer um estudo retrospectivo das amostras biológicas recebidas pelo SQTF desde 2019, para identificar a existência de algum caso positivo de nitazenos em Portugal em contexto toxicológico, que não tenha sido possível registar. A implementação da metodologia desenvolvida permitirá a obtenção de informações e resultados importantes para instituições internacionais, como a EUDA ou a UNODC, contribuindo assim para uma melhoria da saúde pública.

6. Referências Bibliográficas

- [1] Decreto-Lei n.º 11/98, de 24 de janeiro. Diário da República n.º 20/1998, Série I-A. Lisboa: Ministério da Justiça; Disponível em: <https://diariodarepublica.pt/dr/legislacao-consolidada/decreto-lei/1998-171672342> (Consultado a 3 de Julho de 2024)
- [2] Decreto-Lei n.º 96/2001, de 26 de Março. Diário da República n.º 72/2001, Série I-A. Lisboa: Ministério da Justiça; Disponível em: <https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/decreto-lei/96-2001-345281> (Consultado a 3 de Julho de 2024)
- [3] Decreto-Lei n.º 166/2012, de 31 de Julho. Diário da República n.º 147/2012, Série I. Lisboa: Ministério da Justiça; Disponível em: <https://diariodarepublica.pt/dr/legislacao-consolidada/decreto-lei/2012-212118500> (Consultado a 3 de Julho de 2024)
- [4] Portaria n.º 19/2013, de 21 de Janeiro. Diário da República n.º 14/2013, Série I. Lisboa: Ministérios das Finanças e da Justiça; Disponível em: <https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/portaria/19-2013-257062> (Consultado a 3 de Julho de 2024)
- [5] Lappas NT, Lappas CM. The Development of Forensic Toxicology. Em: Lappas NT, Lappas CM, editores. Forensic Toxicology. 1.^a ed. Elsevier; 2016. p. 1–24. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799967-8.00001-3>
- [6] Moffat A, Osselton M, Widdop B, Jickells S, Negrusz A. Introduction to forensic toxicology. Em: Negrusz A, Cooper GAA, editores. Clarke's Analytical Forensic Toxicology. 2.^a ed. Cornualha: Pharmaceutical Press ; 2013. p. 1–10.
- [7] Dinis-Oliveira RJ, Vieira-Coelho MA, Carvalho FD. Introdução às Toxicodependências. Em: Toxicologia Forense. Lisboa: PACTOR; 2015. p. 131–9.
- [8] Crocq MA. Historical and cultural aspects of man's relationship with addictive drugs. Dialogues in Clinical Neuroscience. 2007;9(4):355–61. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2007.9.4/macrocq>
- [9] Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (UNODC). Relatório Mundial sobre Drogas 2024 [Internet]. Viena; 2024. Disponível em:

- <https://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/world-drug-report-2024.html>
(Consultado a 3 de Julho de 2024)
- [10] Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência (EMCDDA). Relatório Europeu sobre Drogas 2024: Tendências e Desenvolvimentos [Internet]. Lisboa; 2024. Disponível em: https://www.euda.europa.eu/publications/european-drug-report/2024_en (Consultado a 3 de Julho de 2024)
- [11] Zawilska JB, Adamowicz P, Kurpeta M, Wojcieszak J. Non-fentanyl new synthetic opioids – An update. *Forensic Science International*. 2023;349. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2023.111775>
- [12] Patocka J, Wu W, Oleksak P, Jelinkova R, Nepovimova E, Spicanova L, et al. Fentanyl and its derivatives: Pain-killers or man-killers? *Heliyon*. 2024;10. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e28795>
- [13] Taoussi O, Berardinelli D, Zaami S, Tavoletta F, Basile G, Kronstrand R, et al. Human metabolism of four synthetic benzimidazole opioids: isotonitazene, metonitazene, etodesnitazene, and metodesnitazene. *Archives of Toxicology*. 2024;98:2101–16. <https://doi.org/10.1007/s00204-024-03735-0>
- [14] CDC NC for HS. U.S. Overdose Deaths Decrease in 2023, First Time Since 2018 [Internet]. 2024. Disponível em: https://www.cdc.gov/nchs/pressroom/nchs_press_releases/2024/20240515.htm (Consultado a 20 de Julho de 2024)
- [15] European Union Drugs Agency (EUDA). Fentanyl drug profile [Internet]. Disponível em: https://www.euda.europa.eu/publications/drug-profiles/fentanyl_en (Consultado a 22 de Julho de 2024)
- [16] Zawadzki M, Kowalski G, Chłopaś-Konowalek A, Siczek M, Sobieszczańska M, Leppert W, et al. Rapid Determination of Sufentanil in Human Plasma by UHPLC-QqQ-MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology*. 2021;45:605–11. <https://doi.org/10.1093/jat/bkaa123>
- [17] Noble C, Papsun DM, Diaz S, Logan BK. Detection of two potent synthetic opioids carfentanil and 3-methylfentanyl in forensic investigations during a four-year period 2017–2020. *Emerging Trends in Drugs, Addictions, and Health*. 2021;1. <https://doi.org/10.1016/j.etdah.2021.100022>

- [18] Zawilska JB, Kuczyńska K, Kosmal W, Markiewicz K, Adamowicz P. Carfentanil – from an animal anesthetic to a deadly illicit drug. *Forensic Science International*. 2021;320. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.110715>
- [19] Papsun DM, Krotulski AJ, Logan BK. Proliferation of Novel Synthetic Opioids in Postmortem Investigations After Core-Structure Scheduling for Fentanyl-Related Substances. *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*. 2022;43(4):315–27. <https://doi.org/10.1097/PAF.0000000000000787>
- [20] Walton SE, Krotulski AJ, Logan BK. A Forward-Thinking Approach to Addressing the New Synthetic Opioid 2-Benzylbenzimidazole Nitazene Analogs by Liquid Chromatography-Tandem Quadrupole Mass Spectrometry (LC-QQQ-MS). *Journal of Analytical Toxicology*. 2022;46(3):221–31. <https://doi.org/10.1093/jat/bkab117>
- [21] European Union Drugs Agency (EUDA). EU Early Warning System Intensive Monitoring: N,N-Dimethyl etonitazene under intensive monitoring as of 5 July 2024. EU-EWS-IM-2024-0005. Lisboa; 2024 Jul.
- [22] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), Europol. EU Drug Market: New psychoactive substances — In-depth analysis [Internet]. Lisboa; 2024. Disponível em: https://www.euda.europa.eu/publications/eu-drug-markets/new-psychoactive-substances_en (Consultado a 20 de Julho de 2024)
- [23] dos Santos RG, Hallak JEC. Therapeutic use of serotonergic hallucinogens: A review of the evidence and of the biological and psychological mechanisms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2020;108:423–34. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.12.001>
- [24] Lowe H, Toyang N, Steele B, Grant J, Ali A, Gordon L, et al. Psychedelics: Alternative and Potential Therapeutic Options for Treating Mood and Anxiety Disorders. *Molecules*. 2022;27(8). <https://doi.org/10.3390/molecules27082520>
- [25] Geyer MA. A Brief Historical Overview of Psychedelic Research. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*. 2024;9:464–71. <https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2023.11.003>

- [26] Vamvakopoulou IA, Narine KAD, Campbell I, Dyck JRB, Nutt DJ. Mescaline: The forgotten psychedelic. *Neuropharmacology*. 2023;222. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2022.109294>
- [27] Ley L, Holze F, Arikci D, Becker AM, Straumann I, Klaiber A, et al. Comparative acute effects of mescaline, lysergic acid diethylamide, and psilocybin in a randomized, double-blind, placebo-controlled cross-over study in healthy participants. *Neuropsychopharmacology*. 2023;48:1659–67. <https://doi.org/10.1038/s41386-023-01607-2>
- [28] Dimitrova A, Di Milia MG, Rensi R, Grassi S, Gualco B, Vaiano F. Determination of Lysergic Acid Diethylamide and 2-Oxo-3-Hydroxy-LSD in Blood: Validation and Comparison of Two Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Methods. *Separations*. 2023;10. <https://doi.org/10.3390/separations10090502>
- [29] Darke S, Duflou J, Peacock A, Farrell M, Hall W, Lappin J. A retrospective study of the characteristics and toxicology of cases of lysergic acid diethylamide (LSD)- and psilocybin-related death in Australia. *Addiction*. 2024; <https://doi.org/10.1111/add.16518>
- [30] Coppola M, Bevione F, Mondola R. Psilocybin for Treating Psychiatric Disorders: A Psychonaut Legend or a Promising Therapeutic Perspective? *Journal of Xenobiotics*. 2022;12:41–52. <https://doi.org/10.3390/jox12010004>
- [31] Lappas NT, Lappas CM. Analytical Samples. Em: Lappas NT, Lappas CM, editores. *Forensic Toxicology*. 1.^a ed. Elsevier; 2016. p. 113–42. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799967-8.00008-6>
- [32] Lappas NT, Lappas CM. Types of Interpretations. Em: Lappas NT, Lappas CM, editores. *Forensic Toxicology*. 1.^a ed. Elsevier; 2016. p. 199–227. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799967-8.00012-8>
- [33] Bell S. *Forensic Chemistry*. 3.^a ed. Boca Raton: CRC Press; 2022. <https://doi.org/10.4324/9780429440915>
- [34] Flanagan RJ, Cuypers E, Maurer HH, Whelpton R. *Fundamentals of Analytical Toxicology: Clinical and Forensic*. 2.^a ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Ltd; 2020.

- [35] Ferslew KE. Specimen Preparation/Extraction. Em: Levine BS, Kerrigan S, editores. *Principles of Forensic Toxicology*. 5.^a ed. Cham: Springer; 2020. p. 109–25. https://doi.org/10.1007/978-3-030-42917-1_9
- [36] Martin R, Schürenkamp J, Gasse A, Pfeiffer H, Köhler H. Determination of psilocin, bufotenine, LSD and its metabolites in serum, plasma and urine by SPE-LC-MS/MS. *International Journal of Legal Medicine*. 2013;127:593–601. <https://doi.org/10.1007/s00414-012-0796-1>
- [37] Vaiano F, Bertol E, Mineo M, Pietrosevoli L, Rubicondo J, Supuran CT, et al. Development of a New LC-MS/MS Screening Method for Detection of 120 NPS and 43 Drugs in Blood. *Separations*. 2021;8(11). <https://doi.org/10.3390/separations8110221>
- [38] Palmquist KB, Truver MT, Shoff EN, Krotulski AJ, Swortwood MJ. Review of analytical methods for screening and quantification of fentanyl analogs and novel synthetic opioids in biological specimens. *Journal of Forensic Sciences*. 2023;68(5):1643–61. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.15282>
- [39] Tabarra I, Soares S, Rosado T, Gonçalves J, Luís Â, Malaca S, et al. Novel synthetic opioids—toxicological aspects and analysis. *Forensic Sciences Research*. 2019;4(2):111–40. <https://doi.org/10.1080/20961790.2019.1588933>
- [40] Ahmad SM, Gonçalves OC, Oliveira MN, Neng NR, Nogueira JMF. Application of microextraction-based techniques for screening-controlled drugs in forensic context—a review. *Molecules*. 2021;26(8). <https://doi.org/10.3390/molecules26082168>
- [41] Massano M, Incardona C, Gerace E, Negri P, Alladio E, Salomone A, et al. Development and validation of a UHPLC-HRMS-QTOF method for the detection of 132 New Psychoactive Substances and synthetic opioids, including fentanyl, in Dried Blood Spots. *Talanta*. 2022;241. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123265>
- [42] Ververi C, Galletto M, Massano M, Alladio E, Vincenti M, Salomone A. Method development for the quantification of nine nitazene analogs and buprenorphine in Dried Blood Spots utilizing liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Journal*

- of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2024;241.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2024.115975>
- [43] Castro-Perez J, Prakash C. Recent advances in mass spectrometric and other analytical techniques for the identification of drug metabolites. Em: Identification and Quantification of Drugs, Metabolites, Drug Metabolizing Enzymes, and Transporters. 2.^a ed. Elsevier; 2020. p. 39–71. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-820018-6.00002-8>
- [44] Grabenauer M, Stafford DT. Chromatography. Em: Levine BS, Kerrigan S, editores. Principles of Forensic Toxicology. 5.^a ed. Cham: Springer; 2020. p. 135–62. https://doi.org/10.1007/978-3-030-42917-1_11
- [45] Flanagan RJ, Cuypers E, Maurer HH, Whelpton R. Separation Science: Theoretical Aspects. Em: Fundamentals of Analytical Toxicology: Clinical and Forensic. 2.^a ed. Nova Jérĩa: John Wiley & Sons, Ltd; 2020. p. 169–81.
- [46] Lappas NT, Lappas CM. Methods of Detection, Identification, and Quantitation. Em: Lappas NT, Lappas CM, editores. Forensic Toxicology. Elsevier; 2016. p. 161–81. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799967-8.00010-4>
- [47] Kupiec T, Slawson M, Pragst F, Herzler M. High-performance liquid chromatography. Em: Negrusz A, Cooper GA, editores. Clarke's Analytical Forensic Toxicology. 2.^a ed. Cornualha: Pharmaceutical Press; 2013. p. 529–51.
- [48] Flanagan RJ, Cuypers E, Maurer HH, Whelpton R. Liquid Chromatography. Em: Fundamentals of Analytical Toxicology: Clinical and Forensic. 2.^a ed. Nova Jérĩa: John Wiley & Sons Ltd.; 2020. p. 223–63.
- [49] Sabitri Lamichhane. Electrospray ionization (ESI) [Internet]. BioRender. 2023. Disponível em: <https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/all/t-63ffbcdecffcb5667d27ed8-electrospray-ionization-esi> (Consultado a 8 de Agosto de 2024)
- [50] Vorce SP. Mass Spectrometry. Em: Levine BS, Kerrigan S, editores. Principles of Forensic Toxicology. 5.^a ed. Cham: Springer; 2020. p. 197–220. https://doi.org/10.1007/978-3-030-42917-1_14
- [51] SCIEX. Powerful Scan Modes of QTRAP ® System Technology [Internet]. Technical Note RUO-MKT-02-8611-A. 2019. Disponível em:

- <https://sciex.com/content/dam/SCIEX/pdf/tech-notes/all/QTRAP-Scan-Modes.pdf> (Consultado a 1 de Maio de 2024)
- [52] Pena-Pereira F, Wojnowski W, Tobiszewski M. AGREE - Analytical GREENness Metric Approach and Software. *Analytical Chemistry*. 2020;92:10076–82. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01887>
- [53] Wojnowski W, Tobiszewski M, Pena-Pereira F, Psillakis E. AGREEprep – Analytical greenness metric for sample preparation. *Trends in Analytical Chemistry*. 2022;149. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116553>
- [54] Pardi J, Ford S, Cooper G. Validation of an analytical method for quantitation of metonitazene and isotonitazene in plasma, blood, urine, liver and brain and application to authentic postmortem casework in New York City. *Journal of Analytical Toxicology*. 2023;47(8):648–55. <https://doi.org/10.1093/jat/bkad062>
- [55] Kolaczynska KE, Liechti ME, Duthaler U. Development and validation of an LC-MS/MS method for the bioanalysis of psilocybin's main metabolites, psilocin and 4-hydroxyindole-3-acetic acid, in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2021;1164. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122486>
- [56] Gomonit MM, Skillman B, Swortwood MJ. Quantification of psilocin in human whole blood using liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS). *Journal of Forensic Sciences*. 2024;69(2):678–87. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.15454>
- [57] Wood ME, Brown GJ, Karschner EL, Seither JZ, Brown JT, Knittel JL, et al. Screening and confirmation of psilocin, mitragynine, phencyclidine, ketamine and ketamine metabolites by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*. 2024;48(2):111–8. <https://doi.org/10.1093/jat/bkae002>
- [58] Martin R, Schürenkamp J, Pfeiffer H, Lehr M, Köhler H. Synthesis, hydrolysis and stability of psilocin glucuronide. *Forensic Science International*. 2014;237:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.01.006>
- [59] Dogan A, Tobiszewski M. Optimization of liquid chromatographic separation of pharmaceuticals within green analytical chemistry framework. *Microchemical Journal*. 2020;152. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104323>

- [60] World Anti-Doping Agency (WADA). Minimum Criteria for Chromatographic-Mass Spectrometric Confirmation of the Identity of Analytes for Doping Control Purposes, TD2023IDCR [Internet]. 2023. Disponível em: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/2023-02/td2023idcrv1.1_eng_final.pdf (Consultado a 19 de Fevereiro de 2024)
- [61] AAFS Standards Board. ANSI/ASB Standard 036 – Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology [Internet]. 2019. Disponível em: https://www.aafs.org/sites/default/files/media/documents/036_Std_e1.pdf (Consultado a 19 de Fevereiro de 2024)
- [62] Almeida AM, Castel-Branco MM, Falcão AC. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. *Journal of Chromatography B*. 2002;774(2):215–22. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00244-1](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00244-1)
- [63] Beg S, editor. *Design of Experiments for Pharmaceutical Product Development*. Vol. 1. Singapore: Springer Singapore; 2021. <https://doi.org/10.1007/978-981-33-4717-5>
- [64] Beg S, Raza K. Full Factorial and Fractional Factorial Design Applications in Pharmaceutical Product Development. Em: Beg S, editor. *Design of Experiments for Pharmaceutical Product Development*. Singapore: Springer; 2021. p. 43–53. https://doi.org/10.1007/978-981-33-4717-5_4
- [65] Decreto-Lei n.º 15/93, de 22 de janeiro. *Diário da República* n.º 18/1993, Série I-A. Lisboa: Ministério da Justiça; Disponível em: <https://diariodarepublica.pt/dr/legislacao-consolidada/decreto-lei/1993-58872437> (Consultado a 15 de Julho de 2024)
- [66] Truver MT, Brogan SC, Jaeschke EA, Kinsey AM, Hoyer JL, Chronister CW, et al. A quantitative LC-MS/MS analysis of Xylazine, p-Fluorofentanyl, Fentanyl and Fentanyl-Related compounds in postmortem blood. *Journal of Chromatography B*. 2024;1237. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2024.124059>
- [67] Schüller M, Lucic I, Øiestad ÅML, Pedersen-Bjergaard S, Øiestad EL. High-Throughput quantification of emerging «nitazene» benzimidazole opioid analogs by microextraction and UHPLC-MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology*. 2023;47:787–96. <https://doi.org/10.1093/jat/bkad071>

-
- [68] Farley M, Tran H, Towler S, Gevorkyan J, Pearing S, Rodda LN. A Single Method for 127 Recommended and Additional DUID Drugs in Blood and Urine by LC–MS–MS. *Journal of Analytical Toxicology*. 2022;46(6):658–69. <https://doi.org/10.1093/jat/bkab075>
- [69] Orfanidis A, Gika HG, Theodoridis G, Mastrogianni O, Raikos N. A UHPLC–MS–MS Method for the Determination of 84 Drugs of Abuse and Pharmaceuticals in Blood. *Journal of Analytical Toxicology*. 2021;45(1):28–43. <https://doi.org/10.1093/jat/bkaa032>
- [70] Krotulski AJ, Papsun DM, Walton SE, Logan BK. Metonitazene in the United States—Forensic toxicology assessment of a potent new synthetic opioid using liquid chromatography mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis*. 2021;13(10):1697–711. <https://doi.org/10.1002/dta.3115>
- [71] Giorgetti A, Barone R, Pelletti G, Garagnani M, Pascali J, Haschimi B, et al. Development and validation of a rapid LC–MS/MS method for the detection of 182 novel psychoactive substances in whole blood. *Drug Testing and Analysis*. 2022;14(2):202–23. <https://doi.org/10.1002/dta.3170>
- [72] Adamowicz P, Bakhmut Z, Mikolajczyk A. Screening procedure for 38 fentanyl analogues and five other new opioids in whole blood by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Applied Toxicology*. 2020;40(8):1033–46. <https://doi.org/10.1002/jat.3962>
- [73] Danaceau JP, Wood M, Ehlers M, Rosano TG. Analysis of 17 fentanyls in plasma and blood by UPLC–MS/MS with interpretation of findings in surgical and postmortem casework. *Clinical Mass Spectrometry*. 2020;18:38–47. <https://doi.org/10.1016/j.clinms.2020.10.003>
- [74] Qin N, Xiang P, Shen B, Zhuo X, Shi Y, Song F. Application of a validated UHPLC–MS/MS method for 28 fentanyl–analogue and novel synthetic opioids in whole blood in authentic forensic cases. *Journal of Chromatography B*. 2019;1124:82–99. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.05.025>
-

[Esta página foi propositadamente deixada em branco]

Anexos

Anexo I: Formulário de equações mencionadas/utilizadas na presente dissertação

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M} \quad (\text{Equação 1})$$

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} \quad (\text{Equação 2})$$

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{W}\right)^2 \quad (\text{Equação 3})$$

$$H = \frac{L}{N} \quad (\text{Equação 4})$$

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right) \times \left(\frac{k'_B}{k'_B + 1}\right) \quad (\text{Equação 5})$$

$$\text{Efeito de Matriz (\%)} = \left(\frac{\text{Área Média Conjunto 2}}{\text{Área Média Conjunto 1}} - 1\right) \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

$$b = \frac{\sum w_i \times \sum w_i x_i y_i - \sum w_i x_i \times \sum w_i y_i}{\sum w_i \times \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2} * \quad (\text{Equação 7})$$

$$a = \frac{\sum w_i x_i^2 \times \sum w_i y_i - \sum w_i x_i \times \sum w_i x_i y_i}{\sum w_i \times \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2} * \quad (\text{Equação 8})$$

$$r = \frac{\sum w_i \times \sum w_i x_i y_i - \sum w_i x_i \times \sum w_i y_i}{\sqrt{\sum w_i \times \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2} \times \sqrt{\sum w_i \times \sum w_i y_i^2 - (\sum w_i y_i)^2}} * \quad (\text{Equação 9})$$

$$ER (\%) = \left(\frac{C_{Calc} - C_{Teor}}{C_{Teor}}\right) \times 100 \quad (\text{Equação 10})$$

$$\text{Bias \%} = \frac{\text{Média das Concentrações Calculadas} - \text{Concentração Teórica}}{\text{Concentração Teórica}} \quad (\text{Equação 11})$$

$$CV \% \text{ intra} - \text{dia} = \frac{\sqrt{MQ_{DG}}}{\text{Média Inter-dias de cada concentração}} \times 100 ** \quad (\text{Equação 12})$$

$$CV \% \text{ inter} - \text{dia} = \frac{\sqrt{\frac{MQ_{EG} + (n-1) \times MQ_{DG}}{n}}}{\text{Média Inter-dias de cada concentração}} \times 100 ** \quad (\text{Equação 13})$$

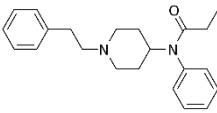
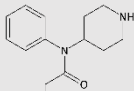
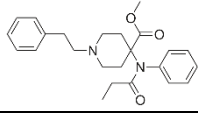
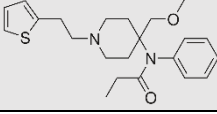
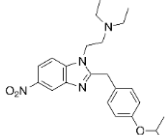
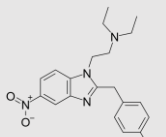
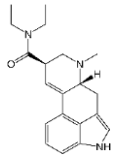
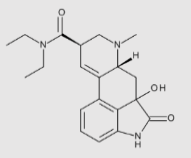
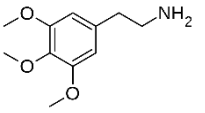
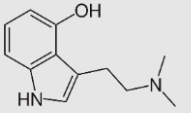
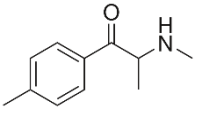
$$CV (\%) = \left(\frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Média}}\right) \times 100 \quad (\text{Equação 14})$$

$$z - \text{score} = \left(\frac{\text{Concentração}_{Obtida} - \text{Concentração}_{Real}}{0,3 \times \text{Concentração}_{Real}}\right) \quad (\text{Equação 15})$$

* - “b” representa o declive da reta, “a” a ordenada na origem, “r” o coeficiente de correlação, sendo “w” o fator de ponderação aplicado e “x” a concentração e “y” a resposta obtida, para um determinado calibrador “i”. O símbolo “Σ” indica a realização de um somatório.

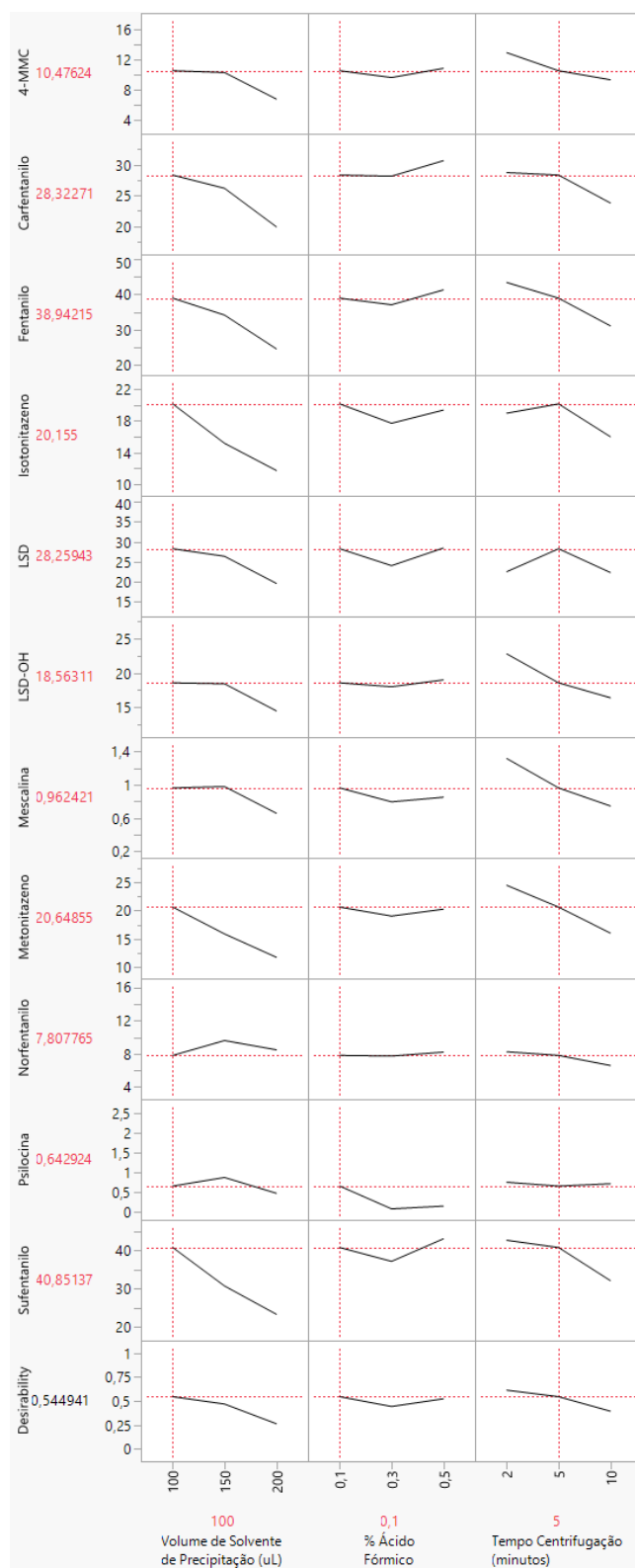
** - MQ_{DG} corresponde à média dos quadrados dentro dos grupos, MQ_{EG} à média dos quadrados entre grupos e “n” ao número de replicados de cada dia.

Anexo II: Estruturas e fórmulas químicas e respetivas massas moleculares dos analitos-alvo deste trabalho.

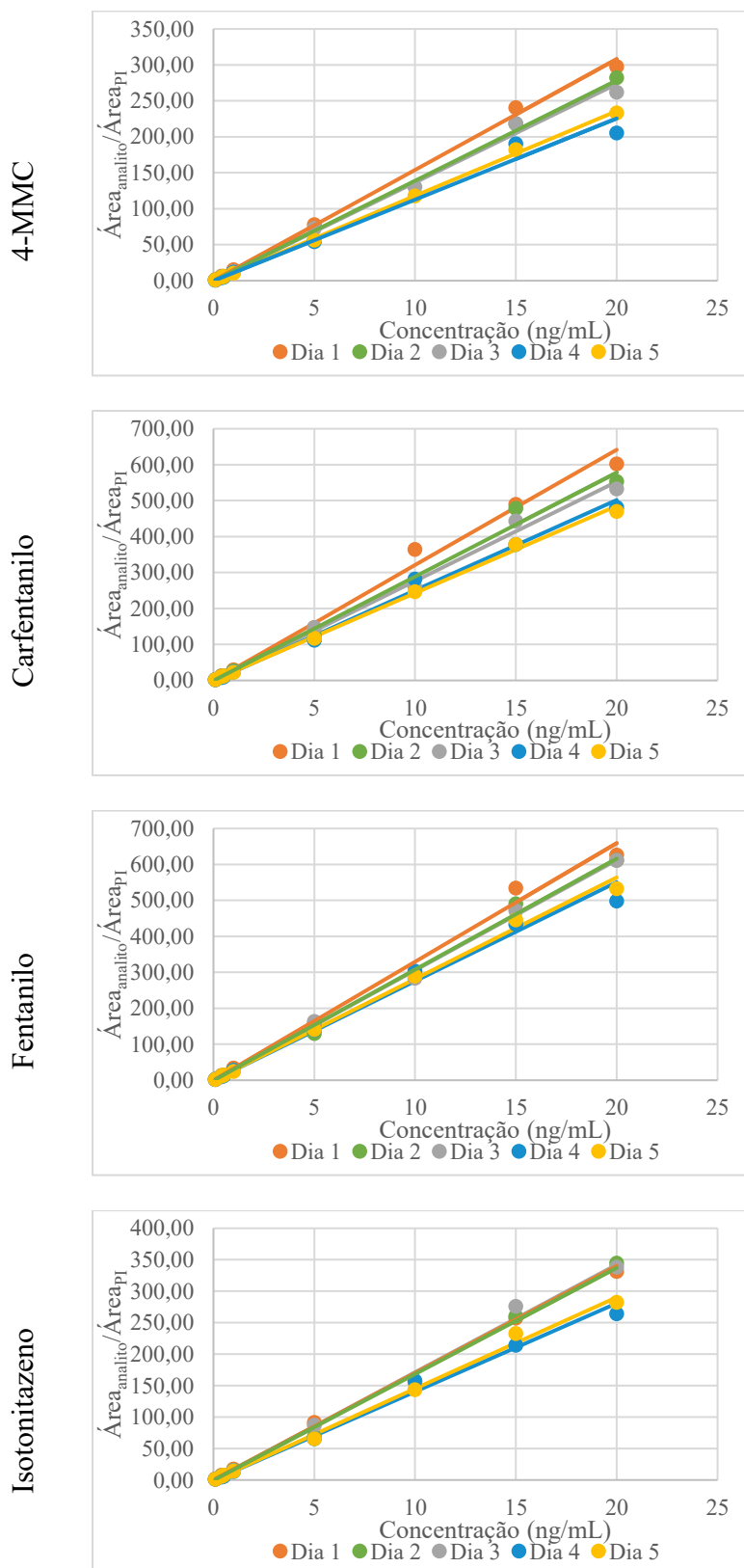
Composto ^a	Estrutura Química	Fórmula Química	Massa Molecular (Da)
Fentanilo		C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O	336,5
Norfentanilo		C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O	232,3
Carfentanilo		C ₂₄ H ₃₀ N ₂ O ₃	394,5
Sufentanilo		C ₂₂ H ₃₀ N ₂ O ₂ S	386,6
Isotonitazeno		C ₂₃ H ₃₀ N ₄ O ₃	410,5
Metonitazeno		C ₂₁ H ₂₆ N ₄ O ₃	382,5
LSD		C ₂₀ H ₂₅ N ₃ O	323,4
2-oxo-3-hidroxi-LSD (LSD-OH)		C ₂₀ H ₂₅ N ₃ O ₃	355,4
Mescalina		C ₁₁ H ₁₇ NO ₃	211,3
Psilocina		C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O	204,3
Mefedrona		C ₁₁ H ₁₅ NO	177,2

^a Todos os compostos, à exceção do LSD-OH, estão legalmente controlados ao abrigo do Decreto-Lei n.º 15/93, de 22 de janeiro (32ª versão atualizada até à Lei n.º 55/2023, de 8 de setembro) [65].

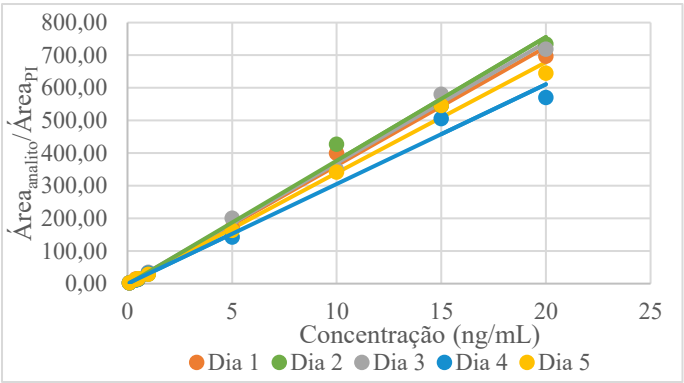
Anexo III: Gráficos representativos da variação da resposta (área relativa) em função da alteração dos níveis dos fatores em estudo nos ensaios de DoE fatorial total para cada composto, estando selecionadas as condições do ensaio 12, por terem sido as escolhidas.



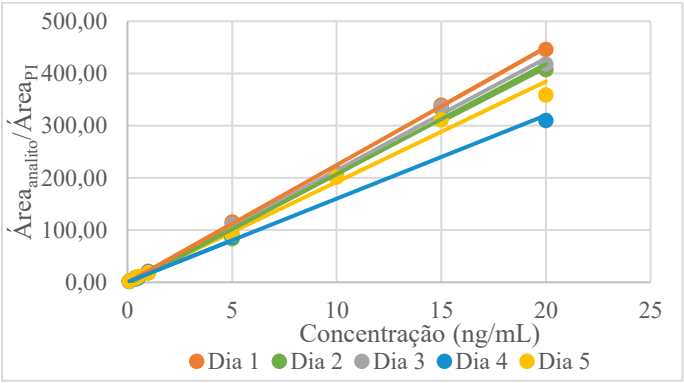
Anexo IV: Curvas de calibração área relativa vs concentração, obtidas para cada um dos analitos-alvo durante os 5 dias de validação de linearidade, com uma ponderação de 1/x.



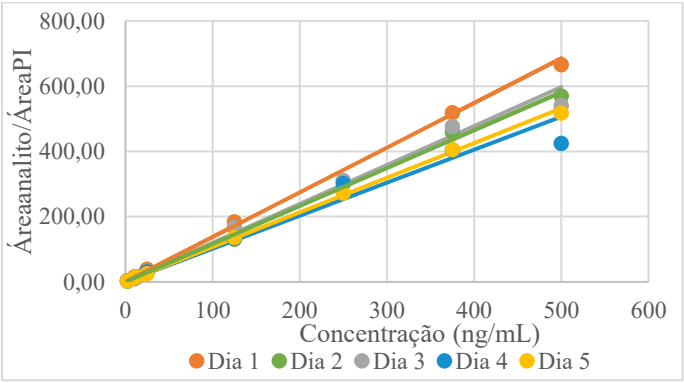
LSD



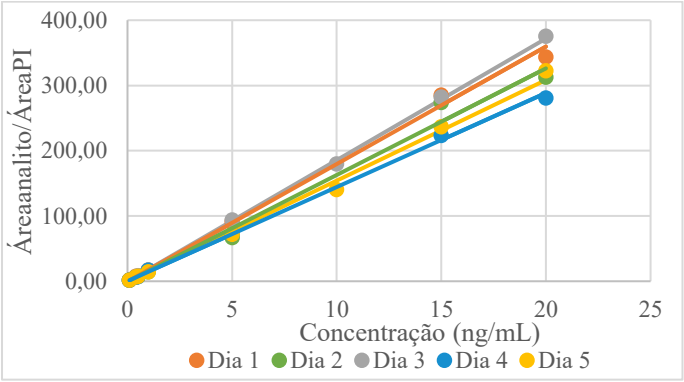
LSD-OH



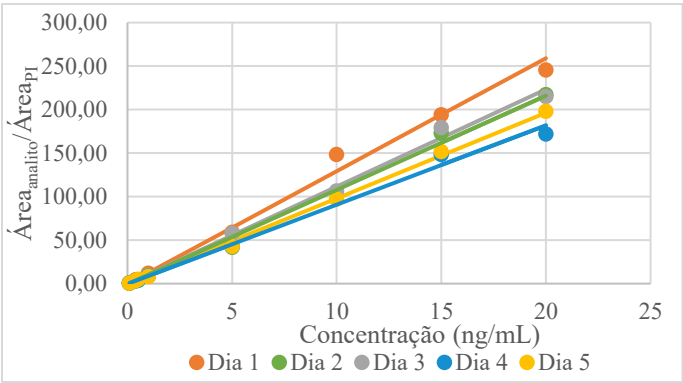
Mescalina



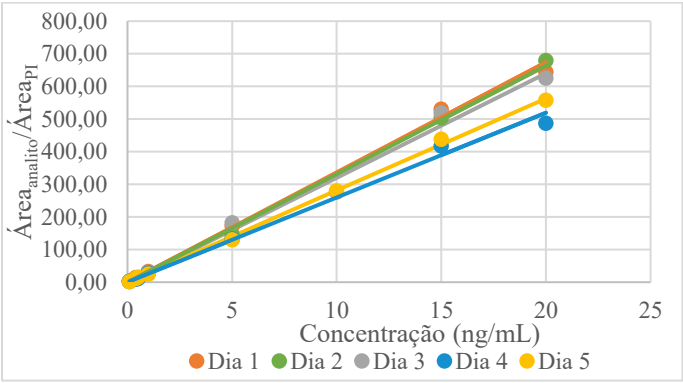
Metonitazeno



Norfentanilo



Sufentanilo



Anexo V: Tabela com resumo das principais características e parâmetros de validação de trabalhos semelhantes para comparação com a metodologia desenvolvida.

Referência	Ano	Técnica Cromatográfica	Preparação de Amostra	Volume de Amostra (µL)	Tempo de Corrida (minutos)	Compostos	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Gama Linear (ng/mL)	Ponderação	r ²	CV %	Bias %
[66]	2024	LC-QQQ-MS	SPE ^a	1000	11	Fentanilo	0,1	0,1	0,1 - 100	1/x linear	n.d.	5,3	-13,1
						Norfentanilo	0,1	0,1	0,1 - 100	1/x linear	n.d.	3,1	-5,5
[67]	2023	LC-QQQ-MS	Microextração em fase líquida - Extração com eletromembrana	120	5,5	Isotonitazeno	0,02 nM	0,1 nM	0,1 - 50 nM	1/x ² quadrático	0,998	12	6
						Metonitazeno	0,05 nM	0,5 nM	0,5 - 50 nM	1/x ² quadrático	0,998	13	5
[54]	2023	LC-QQQ-MS	PP ^b	50	8,5	Isotonitazeno	0,1	0,1	0,1 - 100	1/x linear	> 0,99	12,44	-4,28
						Metonitazeno	0,1	0,1	0,1 - 100	1/x linear	> 0,99	12,4	-1,46
[28]	2023	LC-QQQ-MS	PP	200	39	LSD	0,01	0,0375	0,0375 - 10		0,9918	5,4	-9,2
						LSD-OH	0,005	0,0187	0,0187 - 10		0,9995	3,1	19,1
			LLE ^c	200	12,5	LSD	0,005	0,025	0,025 - 10		0,9914	17,9	-12,7
						LSD-OH	0,0025	0,0125	0,0125 - 10		0,9997	17,7	-15,5
[68]	2022	LC-QTRAP-MS	PP - Extração por Filtração	150	8	Fentanilo	0,1	0,5	0,5 - 25	1/x quadrático	> 0,99	8,8	-3,8
						Norfentanilo	0,25	0,5	0,5 - 25	1/x quadrático	> 0,99	5,3	-14,8
[69]	2021	LC-QQQ-MS	Mini-QuEChERS	200	17	4-MMC	1,24	3,72	5 - 6000		0,9963	9,86	14,3
						Fentanilo	1,22	3,66	5 - 6000		0,998	14,23	11,4
						Mescalina	1,61	4,83	5 - 6000		0,9902	14,74	9,1
						Norfentanilo	1,65	4,95	5 - 6000		0,989	12,31	13,2
[70]	2021	LC-QQQ-MS	LLE	500	7	Metonitazeno	0,1	0,5	0,5 - 50		0,998	<9	4,4
[71]	2021	LC-QQQ-MS	PP	500	17	Carfentanilo	0,07	0,25	0,25 - 25		0,996	8,68	8,1
						Fentanilo	0,07	0,23	0,25 - 25		0,996	6,25	7,4
						Norfentanilo	0,08	0,27	0,25 - 25		0,998	5,36	11,35
[17]	2021	LC-QQQ-MS	PP + SPE	500	6,5	Carfentanilo	s.d.	0,05	0,05 - 25	1/x quadrático	s.d.	s.d.	s.d.
[72]	2020	LC-QQQ-MS	LLE		13	Fentanilo	0,05	0,1	0,1 - 100		0,994	11,9	2,2

						Norfentanilo	0,06	0,1	0,1 - 100		0,9974	7,7	18,1
						Sufentanilo	0,2	0,2	0,2 - 100		0,9966	9,5	7,2
[73]	2020	LC-QQQ-MS	PP - SPE	300 uL	4	Carfentanilo	s.d.	50 pg/mL	50 - 20000 pg/mL		≥ 0,997	16,1	-8,3
						Fentanilo							
						Norfentanilo							
						Sufentanilo							
[74]	2019	LC-QTRAP-MS	LLE	100	8	Carfentanilo	0,02	0,05	0,05 - 40	1/x linear	0,998	14,69	9,68
						Fentanilo	0,03	0,2	0,2 - 40	1/x linear	0,993	12,87	12,64
						Norfentanilo	0,1	0,2	0,2 - 40	1/x linear	0,995	18,26	11,31
						Sufentanilo	0,02	0,05	0,05 - 40	1/x linear	0,992	12,32	-8,61
Presente Trabalho	2024	LC-QTRAP-MS	PP	50	5	4-MMC	0,1	0,1	0,1 - 20	1/x linear	0,9957	15,62	16,69
						Carfentanilo	0,05	0,1	0,1 - 20	1/x linear	0,9951	14,67	15,34
						Fentanilo	0,05	0,1	0,1 - 20	1/x linear	0,9958	11,18	12,99
						Isotonitazeno	0,05	0,1	0,1 - 20	1/x linear	0,9962	15,46	19,13
						LSD	0,05	0,1	0,1 - 20	1/x linear	0,9955	10,23	-15,73
						LSD-OH	0,05	0,1	0,1 - 20	1/x linear	0,9963	13,43	19,42
						Mescalina	1	2,5	2,5 - 500	1/x linear	0,9935	15,20	17,79
						Metonitazeno	0,1	0,1	0,1 - 20	1/x linear	0,9963	10,14	17,00
						Norfentanilo	0,1	0,1	0,1 - 20	1/x linear	0,9949	16,65	19,74
						Sufentanilo	0,05	0,1	0,1 - 20	1/x linear	0,9962	17,79	19,17

^a Extração em Fase Sólida

^b Precipitação Proteica

^c Extração Líquido-Líquido
s.d.- sem dados