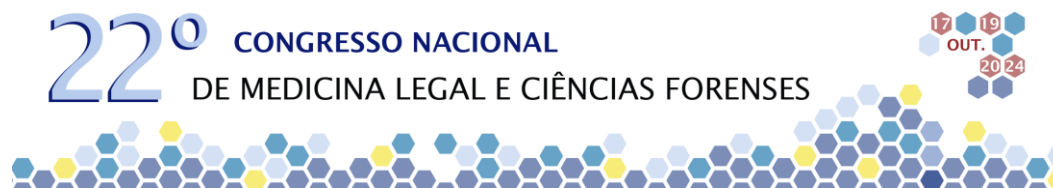


Evolução analítica no Serviço de Química e Toxicologia Forenses – Os últimos 20 anos

Susana Simões, Antonio Castañera, João Miguel franco
Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses



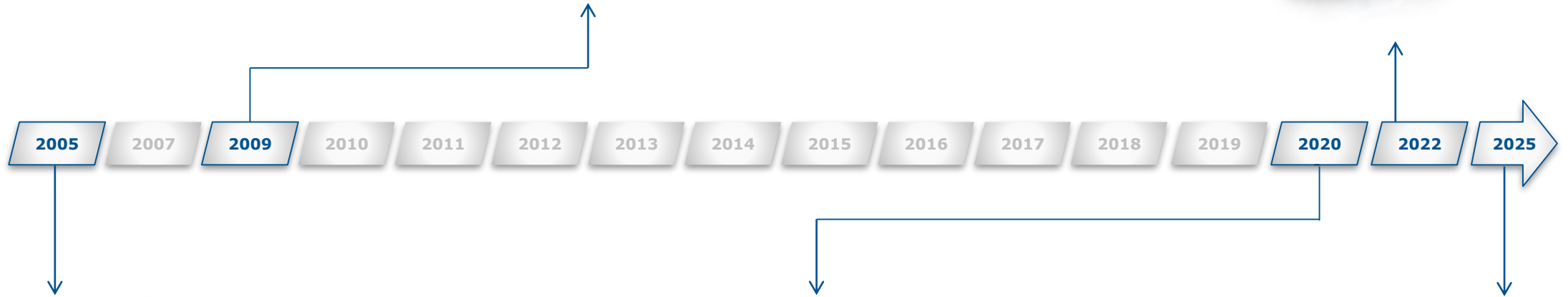


Agilent GC/MS 5973



Waters - UPLC/MSMS TQD

Bruker - GC/LC QToF Impact II HRMS



Waters - LC/MSMS Quattro Micro



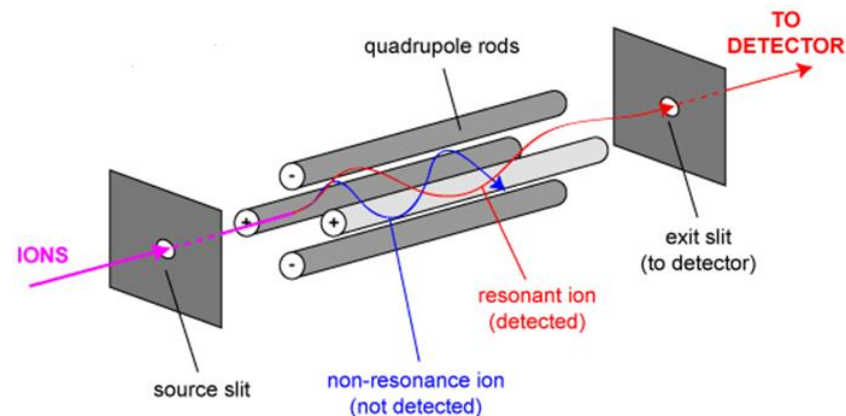
Sciex - LC/MSMS QTrap 6500 +

**Aquisição de novos equipamentos:
LC-MS/MS Triplo quadrupolo
LC-QToF HRMS**



Técnica analítica: Gas Chromatography / Mass Spectrometry (GC/MS)

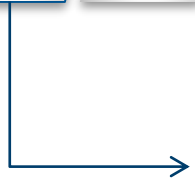
- Detetor: Simples quadrupolo
- Modos de aquisição:
 - **SIM (Single Ion Monitorization)**
 - **Full Scan**



2004

Grupo	Técnica analítica	Procedimento extração	Derivatização	Substâncias pesquisadas
Medicamentos	GC/MS	SPE	Não	50-60
Pesticidas	GC/MS	SPE	Não	20-40
Opiáceos	GC/MS	SPE	Sim	3-10
Cocaína	GC/MS	SPE	Sim	3-5
Canabinoides	GC/MS	SPE	Sim	1-3
Anfetaminas	GC/MS	SPE	Sim	5-10

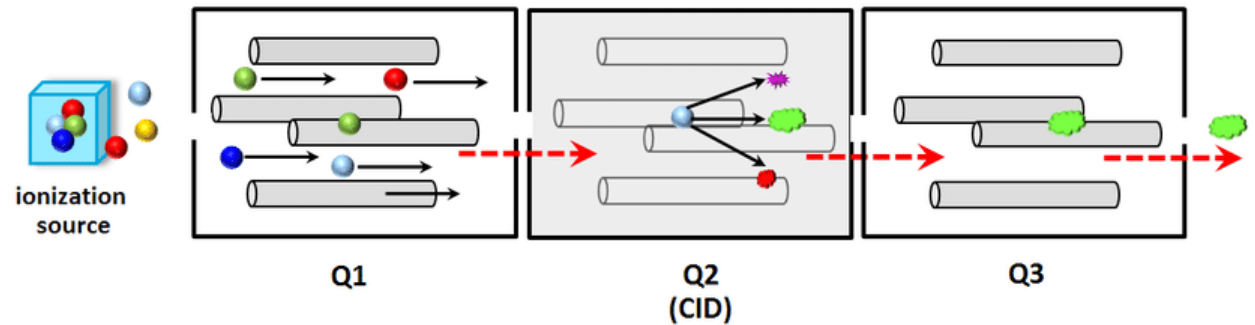
- **Procedimentos de preparação das amostras mais complexos**
- **Não adequado para análise de substâncias termolábeis**
- **Volume de amostra: 0,5 – 1 mL**
- **Implica o desenvolvimento de várias metodologias analíticas**



Waters - LC/MSMS Alliance 2795/QuattroMicro

Técnica analítica: Liquid Chromatography / Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

- Detetor: Triplo quadrupolo
- Modos de aquisição principais:
 - **Product ion scan**
 - **MRM**



- **Maior seletividade e sensibilidade**
- **Adequada para a análise de substâncias termolábeis**
- **Procedimentos de preparação das amostras mais simples**
- **Análises “Target”**
- **Métodos de triagem, confirmação e quantificação**
- **Identificação por comparação com materiais de referência e/ou livrarias de espetros**

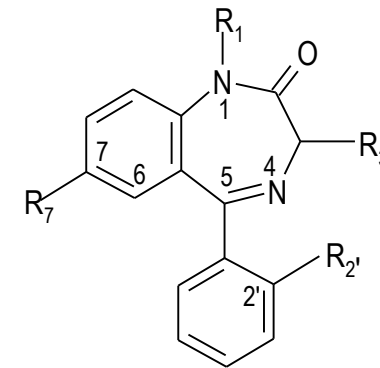


Waters - LC/MSMS Alliance 2795/QuattroMicro

Confirmação e Quantificação de Benzodiazepinas em amostras de sangue

2005-2006

Grupo	Técnica analítica	Procedimento extração	Derivatização	Substâncias pesquisadas
Medicamentos	GC/MS	SPE	Não	50-60
Benzodiazepinas	LC-MS/MS	SPE	Não	30
Pesticidas	GC/MS	SPE	Não	20-40
Opiáceos	GC/MS	SPE	Sim	3-10
Cocaína	GC/MS	SPE	Sim	3-5
Canabinoides	GC/MS	SPE	Sim	1-3
Anfetaminas	GC/MS	SPE	Sim	5-10





Waters - UPLC/MSMS Acquity UPLC / TQ Detector

Técnica analítica: Ultra Performance Liquid Chromatography / Tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS)

Advantages of UPLC Technology for SEC Separations

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Columns and Instruments both Minimize Band Spreading

Alliance 2795 / QuattroMicro → Acquity UPLC / TQ Detector

- Pressões até 18000 psi
- Colunas com diâmetro de partícula < 2 µm
- Detector mais rápido

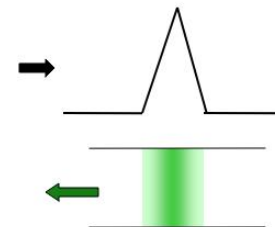


- Incremento na resolução, eficiência, sensibilidade e velocidade de análise

HPLC



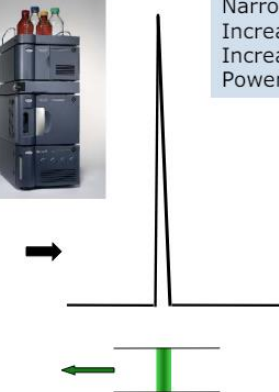
Broad Band
Broad Peak
Less Sensitivity
Less Resolving Power



Waters UPLC®
Technology



Narrow Peak
Increased Sensitivity
Increased Resolving Power

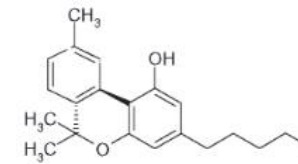




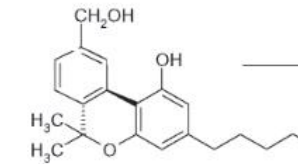
Waters - UPLC/MSMS Acquity UPLC / TQ Detector

Confirmação e quantificação de canabinoides em amostras de sangue

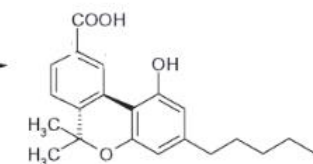
- **A droga de abuso mais popular no mundo**
- **Para poder avaliar sobre o estado de influência as técnicas analíticas devem poder identificar as substâncias ativas (THC, 11-OH-THC)**
- **O THC e o 11-OH-THC estão presentes, muitas vezes, em concentrações muito baixas (1 – 2 ng/mL)**



Delta-9-THC



11-hydroxy-Delta-9-THC
(Active)



9-Carboxy-Delta-9-THC
(Inactive)

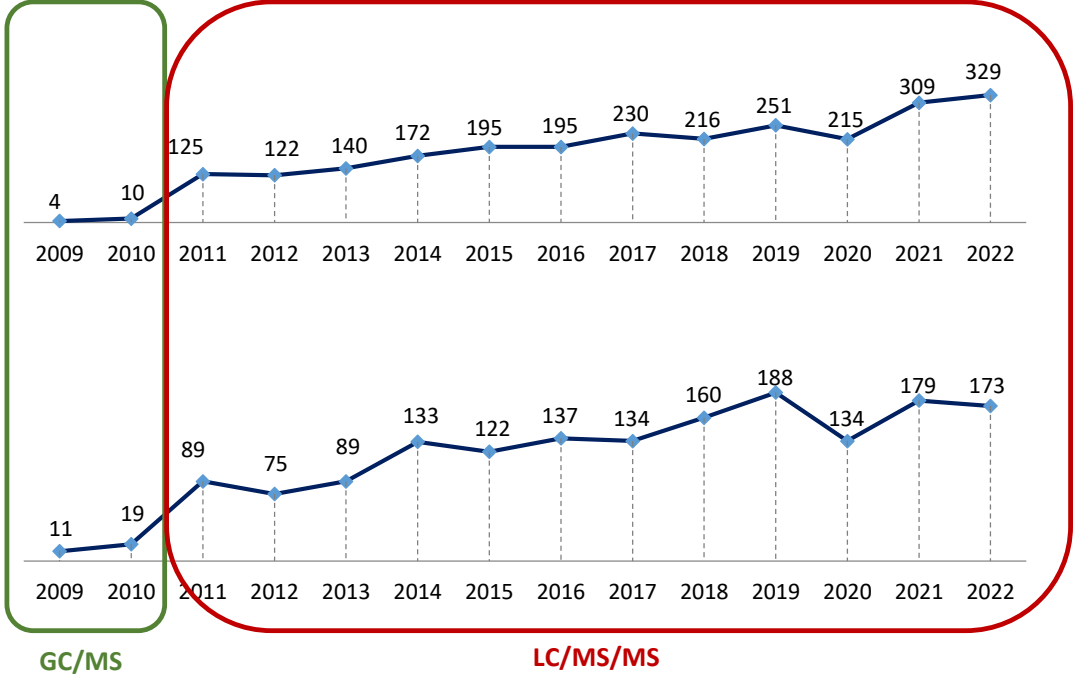


Confirmação e quantificação de canabinoides em amostras de sangue

Waters - UPLC/MSMS Acquity UPLC / TQ Detector

	LD (ng/mL)	LQ (ng/mL)
THC	3	9
11-OH-THC	3	9
THC-COOH	3,8	11,4

% Positivos (aprox.):
 THC-COOH **100%**
 11-OH-THC **15%**
 THC **8%**



THC

LD (ng/mL)	LQ (ng/mL)	C média (ng/mL)
0,2	1,0	6,3
1,3	2,0	3,4
1,4	3,0	32

11-OH-THC

% Positivos (aprox.):
 THC-COOH **100%**
 11-OH-THC **60%**
 THC **90%**

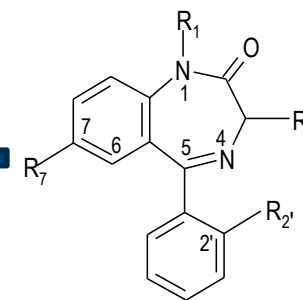




Waters - UPLC/MSMS Acquity UPLC / TQ Detector

2009-2010

Grupo	Técnica analítica	Procedimento extração	Derivatização	Substâncias pesquisadas
Medicamentos	GC/MS	SPE	Não	50-60
Benzodiazepinas	LC-MS/MS	SPE	Não	30
Pesticidas	GC/MS	SPE	Não	20-40
Opiáceos	GC/MS	SPE	Sim	3-10
Cocaína	GC/MS	SPE	Sim	3-5
Canabinoides	UPLC-MS/MS	SPE	Não	3
Anfetaminas	GC/MS	SPE	Sim	5-10





Waters - LC/MSMS Alliance 2795 /QuattroMicro



Waters - UPLC/MSMS Acquity UPLC /TQ Detector

		Projeto	Descrição
2007 - 2009		European Integrated Project DRUID (Driving Under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines)	Projeto que envolveu 18 países europeus Colhidas e analisadas, aprox. 4000 amostras de saliva
2014 - ...		Projeto Europeu SCORE (análise de águas residuais)	Projeto que envolve 112 cidades europeias para estudar os hábitos de consumo de droga dos seus habitantes.
2016 - ...		Doseamento de bussulfano em amostras de plasma por UPLC-MS/MS	Projeto de colaboração, para o doseamento dos níveis séricos de bussulfano em amostras de sangue de doentes seguidos na Unidade de Transplantação de Progenitores Hematopoiéticos do IPOLFG.
2017 - 2018		Projeto Europeu NPS euronet - Identification and Assessment of New Psychoactive Substances: A European Network	Identificar e avaliar as NPS (“New Psychoactive Substances”) mais utilizadas na Europa, e estimar a sua extensão e padrão de utilização. Amostras de águas residuais (de 4 ETARs) e urinas (colhidas nas urgências de 5 hospitais: Porto, Coimbra, Lisboa, Faro e Portimão)

2005

2007

2009

2010

2011

2012

2013

2014

2015

2016

2017

2018

2019

2020

2022

2025



Waters - UPLC/MSMS Acquity UPLC / TQ Detector

Triagem, confirmação e quantificação de drogas de abuso em matrizes biológicas por LC-MSMS



2004



GC/MS Agilent 5973

- Volume de amostra: 0,5 mL
- Procedimentos analíticos: 5 (THC; OPI; COC; ANF; MET)
- Procedimento de preparação de amostras: SPE
- Tempo por análise: 20 min
- Substâncias pesquisadas: 20



Triagem, confirmação e quantificação de medicamentos em matrizes biológicas por LC-MSMS

2020

- Volume de amostra: 0,2 mL
- Procedimentos analíticos: 2 (THC; Drogas de abuso)
- Procedimento de preparação da amostras: PP
- Tempo por análise: 15 min
- Substâncias pesquisadas: > 40

2005

2007

2009

2010

2011

2012

2013

2014

2015

2016

2017

2018

2019

2020

2022

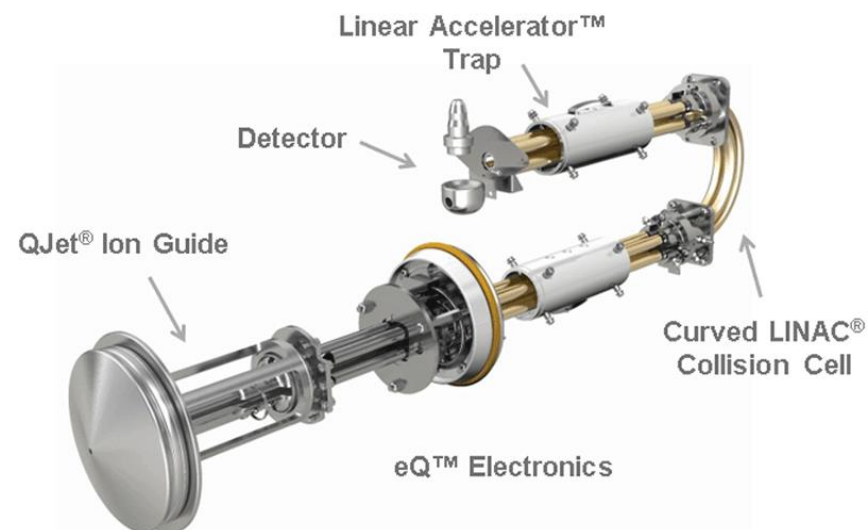
2025

Técnica analítica: Ultra High Performance Liquid Chromatography / QTRAP Triple Quad Mass Spectrometry (UHPLC-QTRAP MS/MS)

- Detetor: Triplo quadrupolo híbrido com armadilha de iões linear (Qtrap)
- Modos de aquisição principais:
 - **Product ion scan**
 - **MRM**
 - **MS³ (Q-Trap)**



Sciex - LC/MSMS QTrap 6500 +





Triagem, confirmação e quantificação de medicamentos em matrizes biológicas por LC-MSMS



Sciex - LC/MSMS QTrap 6500 +



GC/MS Agilent 5973

2004

- Volume de amostra: 1 mL
- Procedimento de preparação de amostras: SPE
- Tempo por análise: 35 min
- Substâncias pesquisadas: 50 - 60



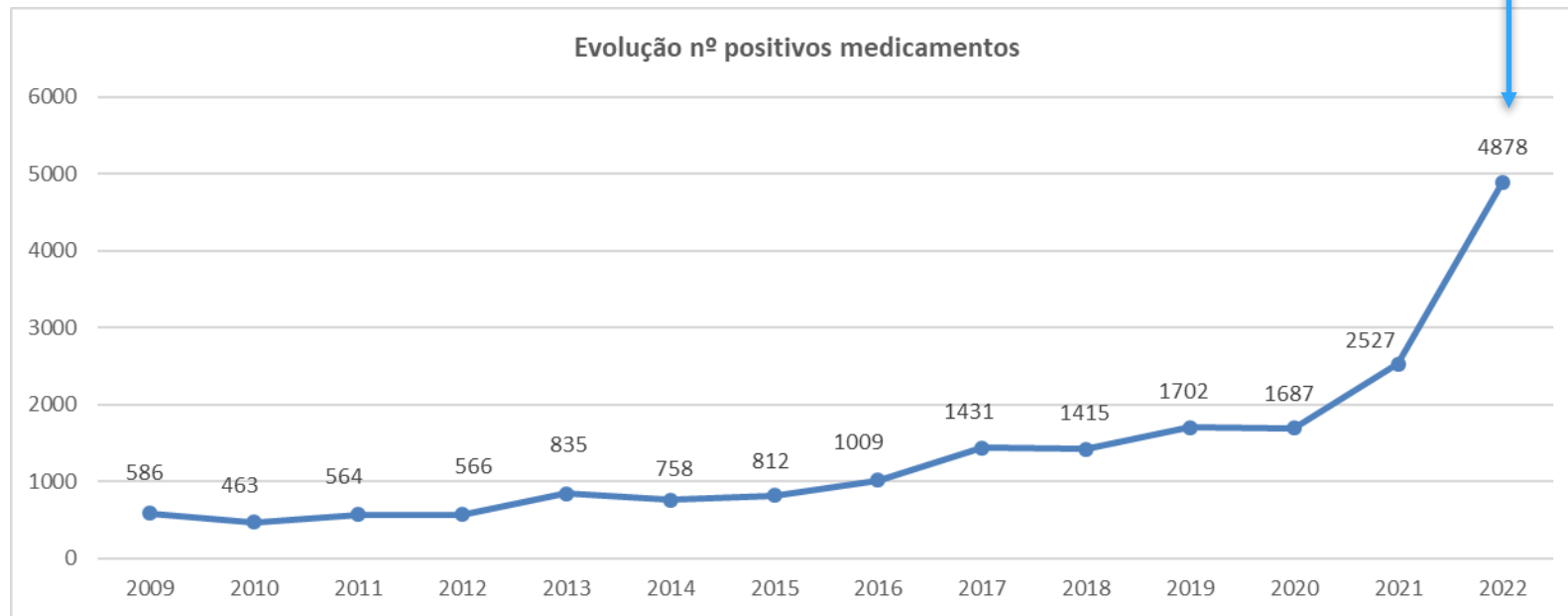
2022

- Volume de amostra: 0,2 mL
- Procedimento de preparação da amostras: PP
- Tempo por análise: 15 min
- Substâncias pesquisadas: > 200

Triagem, confirmação e quantificação de medicamentos em matrizes biológicas por LC-MSMS



Sciex - LC/MSMS QTrap 6500 +



2005

2007

2009

2010

2011

2012

2013

2014

2015

2016

2017

2018

2019

2020

2022

2025



Waters - UPLC/MSMS Acquity UPLC / TQ Detector



Sciex - LC/MSMS QTrap 6500 +

2022

Grupo	Técnica analítica	Procedimento extração	Derivatização	Substâncias pesquisadas
Medicamentos	UHPLC-MS/MS	PP	Não	> 200
Pesticidas	UHPLC-MS/MS	PP	Não	> 40
Drogas de abuso	UPLC-MS/MS	PP	Não	> 40
Canabinoides	UPLC-MS/MS	PP	Não	5

2005

2007

2009

2010

2011

2012

2013

2014

2015

2016

2017

2018

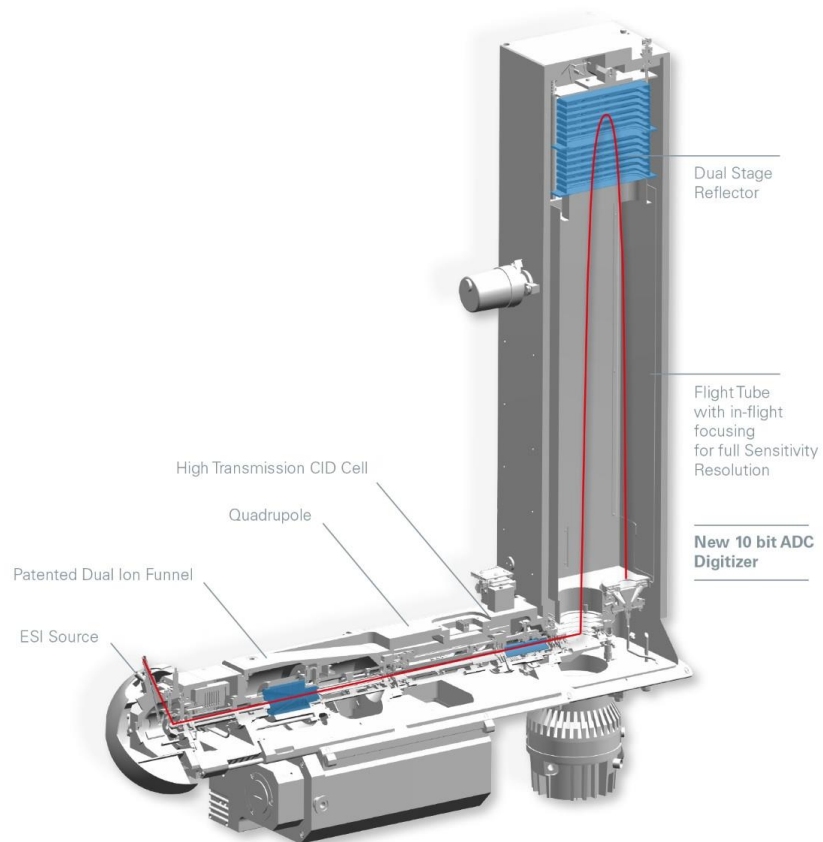
2019

2020

2022

2025

Técnica analítica: Liquid Chromatography or Gas Chromatography / High Resolution Mass Spectrometry (QToF)



**Bruker – GC/LC QToF Impact II
HRMS**



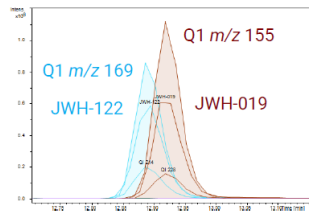
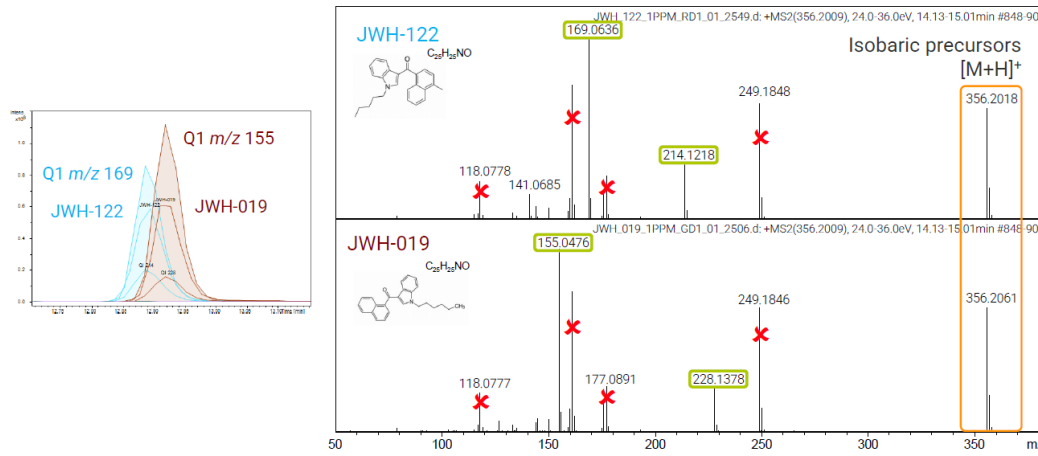
- **Detetor: Quadrupolo Tempo de Voo (QToF)**
- **Modos de aquisição principais:**
 - **Data Independent Acquisition (DIA) / bbCID**
 - **Data Dependent Acquisition (DDA) / AutoMSMS**



Técnica analítica: Liquid Chromatography or Gas Chromatography / High Resolution Mass Spectrometry (QToF)

Broad band Collision Induced Dissociation (bbCID)

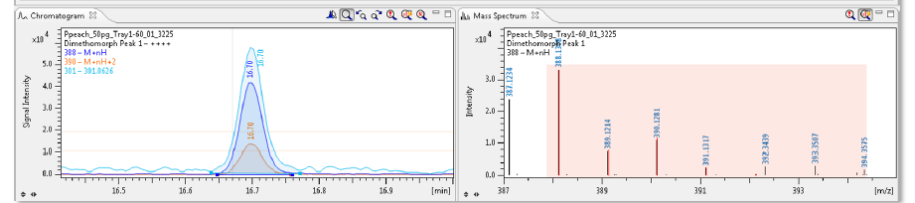
Bruker – GC/LC QToF Impact II HRMS



M R S Q
 Mass accuracy
 Retention time (RT)
 mSigma (Isotope pattern)
 Qualifier (Diagnostic Ions)

Row	Analyte	Formula	m/z exp.	m/z meas.	$\Delta m/z$ (ppm)	$\Delta m/z$ (mDa)	ΔRT (min)	mSigma	m/z Score	RT Score	mSigma Score	Isotope Score	Lines	Intensity	Quantity	Recovery (%)	Accur.
25	Demethoate		230.0869	230.0871	0.4540	0.1046	0.02	2.9	***	***	***	***	22988	14588	0.16	-	-
26	Demethoate Fragment 139		230.0647	230.0650	0.5020	0.1150	0.02	6.0	***	***	***	***	50173	36989	66.4	-	-
27	Demethomorph Peak 1		310.1578	310.1579	-0.2450	-0.2189	0.03	29.5	***	***	***	***	30195	49556	66.4	-	-
28	Demethomorph Peak 2		310.1318	310.1318	-0.2304	-0.2470	0.03	23.0	***	***	***	***	81128	30818	0.18	-	-
29	EPH		324.9454	324.9457	0.8196	0.2956	0.02	10.2	***	***	***	***	395278	193954	66.8	-	-
30	Etison		324.9149	324.9152	0.7592	0.2923	0.02	10.4	***	***	***	***	24888	10440	57.6	-	-
31	Etison Fragment 203		325.9011	325.9011	0.6000	0.1983	0.02	8.9	***	***	***	***	29796	55497	59.1	-	-
32	Demethomorph Peak 351		351.2086	351.2090	0.7541	0.2709	0.02	6.4	***	***	***	***	121649	72552	64.5	-	-

Row	Analyte	Formula	Ion Type	Found	Area	m/z meas.	RT (min)	ΔRT (min)	mSigma	$\Delta m/z$ (Da)	$\Delta m/z$ (ppm)	Res.	Intensity	S/N	MRSQ	Reference Ion	Valid Ratio
1	Demetho...	C21H29ClN2O4P1	M+H+2	318...	300.8291	16.70	0.03	29.3	4.2168	-8.5586	353...	13603	263			M+H+	
2	Demetho...	C21H29ClN2O4P1	M+H+	318...	308.8100	16.70	0.03	29.6	-8.2118	-8.5456	308...	40966	387				
3	Demetho...	undefined		311...	304.8926	16.79	0.03	n.a.	0.8293	0.8374	322...	57864	35				

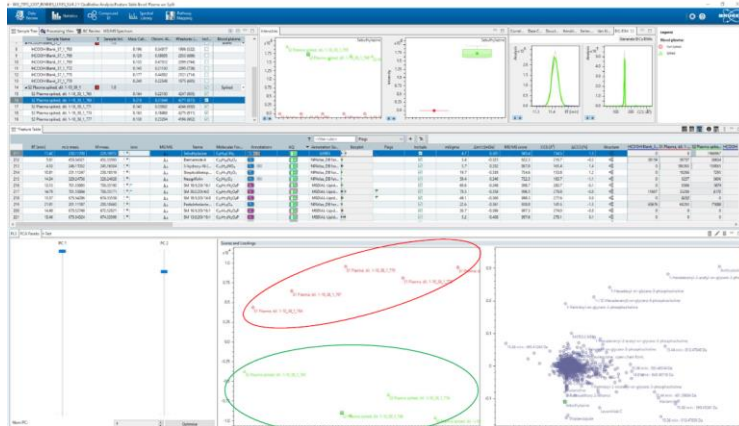




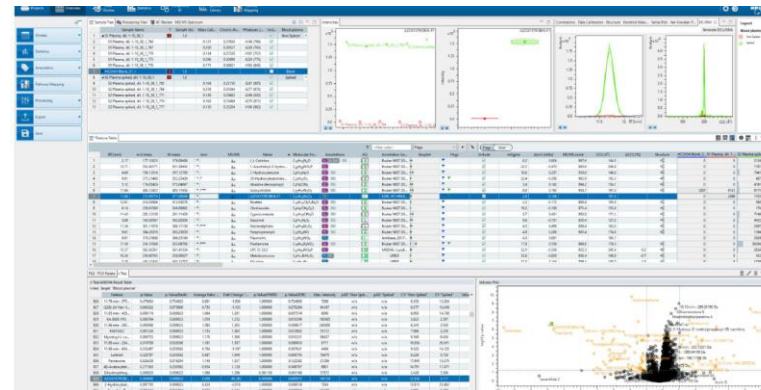
Técnica analítica: Liquid Chromatography or Gas Chromatography / High Resolution Mass Spectrometry (QToF)

AutoMSMS

Bruker – GC/LC QToF Impact II HRMS



- TL** User-defined Target List
- SL** Spectra Library Search (MS/MS)
- SE** SmartFormula 3D: automatic generation of elemental composition
- CC** CompoundCrawler: Structure assignment
- MF** MetFrag: In-silico fragmentation



- Chips
- Statistics
- Annotation
- Pathway Mapping
- Processing
- Export
- Save

- nl. new PCA Model ...
- nl. new PLS Model ...
- nl. new t-Test/ANOVA
- nl. new Clustering ...
- nl. new AUC for (time) series



2005

2007

2009

2010

2011

2012

2013

2014

2015

2016

2017

2018

2019

2020

2022

2025

Técnica analítica: Liquid Chromatography or Gas Chromatography /
High Resolution Mass Spectrometry (QToF)

Vantagens:

- Pesquisa de outras substâncias fora da lista habitual/desconhecidos
- Permite a análise retrospectiva das amostras

Desvantagens / Desafios:

- Elevado investimento económico
- Níveis de sensibilidade inferiores aos triplos quadrupolos topo de gama
- Exige a formação de recursos humanos

**Bruker – GC/LC QToF Impact II
HRMS**



2005

2007

2009

2010

2011

2012

2013

2014

2015

2016

2017

2018

2019

2020

2022

2025

Futuro

- Aquisição de novos equipamentos LC-MS/MS Triplos quadrupolos:
 - **Substituição do equipamento Acquity UPLC-TQ Detector Waters**
 - **Melhorar o desempenho, aumentando o número de substâncias pesquisadas e os níveis de sensibilidade**
 - **Backup do equipamento Sciex - LC/MSMS QTrap 6500 +**
 - **Desenvolvimento de novas metodologias**

- Aquisição de novos equipamentos GC/LC-QToF.

- *Evolução tecnológica/analítica:*
 - *Exige um elevado investimento económico (na aquisição dos equipamentos e na sua manutenção)*
 - *Todos os procedimentos analíticos concentrados em poucos equipamentos, implica um elevado risco de paragem das análises em situações de avaria, pelo que contratos de manutenção de proteção total são fundamentais.*
 - *A formação de recursos humanos é essencial.*

Conclusão:

- Nos últimos 20 anos, o laboratório de química e toxicologia forense sofreu uma grande transformação tecnológica.
- A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa/massa (LC/MSMS) passou a ser a tecnologia mais utilizada para a maioria dos procedimentos analíticos (triagem, confirmação e quantificação).
- A aquisição da tecnologia LC-MS/MS veio permitir:
 - **A simplificação dos procedimentos de preparação das amostras:**
 - Com a consequente redução de custos (ex. reagentes, solventes, consumíveis) e de tempo
 - Menor impacto para o meio ambiente
 - **A utilização de menores volumes de amostra**
 - **Melhorar o desempenho, com o aumentar o número e tipo de substâncias pesquisadas**
 - **Confirmar a presença de outras substâncias que possam estar presentes e que não sejam pesquisadas por rotina (LC-QToF)**



Obrigada pela vossa atenção.