



**Maria João dos
Santos Baptista**

**Determinação de drogas terapêuticas e não
terapêuticas e de alguns metabolitos em cabelo**



**Maria João dos
Santos Baptista**

**Determinação de drogas terapêuticas e não
terapêuticas e de alguns metabolitos em cabelo**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Toxicologia, realizada sob orientação científica da Dr.^a Estela dos Santos de Freitas Gouveia Pinho Marques, Investigadora Principal, de nomeação definitiva da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

o júri

presidente

Prof. Doutor Amadeu Mortágua Velho da Maia Soares
Professor Catedrático da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Maria da Conceição Gonçalves de Oliveira Castilho
Professora Auxiliar de nomeação definitiva da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Prof. Doutor Victor Manuel dos Santos Quintino
Professor Auxiliar de nomeação definitiva da Universidade de Aveiro (co-orientador)

Dr.a Estela dos Santos de Freitas Gouveia Pinho Marques
Investigadora Principal de nomeação definitiva da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (orientadora)

agradecimentos

Ao terminar este trabalho quero agradecer:

À Dr.a Estela Pinho Marques, por ter aceite orientar esta dissertação, pelos esforços desencadeados na obtenção de todo o suporte material, permanente disponibilidade, mesmo nos momentos de maior sobrecarga de trabalho, compreensão, confiança, incentivo e amizade, bem como pela revisão crítica do manuscrito.

Ao Professor Doutor Victor Quintino, meu Co-orientador e Coordenador do Mestrado, o despertar para as questões da toxicologia, o apoio, compreensão e incentivo proporcionados, bem como, o exemplo de profissionalismo.

Ao Professor Doutor Duarte Nuno Vieira, Director do Instituto Nacional de Medicina Legal, pela disponibilidade em acolher a realização de um trabalho de investigação desta índole, pelos esforços desencadeados na obtenção de todo o material necessário, pelo incentivo, confiança e integração numa equipa tão dinâmica.

À Dr.a Alda Fidalgo, pela sua amizade incondicional, colaboração e incentivo constantes, permanente disponibilidade, troca de ideias e companheirismo nas inúmeras horas que trabalhamos em conjunto, quer durante a parte lectiva do mestrado quer laboratorial.

À Dr.a Paula Monsanto pelo exemplo de rigor e dedicação, o que sempre constituiu uma referência em todo o meu trabalho, pela sua amizade, disponibilidade e persistência demonstrada, sobretudo no âmbito das análises por GC/MS-NCI, e também, pelo incentivo permanente e conselhos sábios.

À Dr.a Sofia Ávila pela disponibilidade demonstrada, mesmo nos momentos de maior sobrecarga de trabalho, optimismo, amizade e incentivo.

À Técnica Alice Castanheira pelo exemplo de dedicação, o que constituiu uma referência em todo o meu trabalho, pelo auxílio que me prestou no laboratório, bem como pela amizade e incentivo nas horas mais difíceis.

À Dr.a Paula Proença pelo companheirismo e amizade bem como pela simpatia e apoio que tanto contribuíram para um bom ambiente de trabalho.

À Dr.a Cláudia Margalho pela disponibilidade e pronta colaboração sempre que solicitada.

À Mestre Helena pela boa disposição, companheirismo, incentivo e colaboração, sobretudo nas concepções gráficas, reflexo do seu bom gosto.

Ao Dr. Mário Barroso pela disponibilidade e pronta colaboração sempre que solicitada.

À D. Idalina que prontamente me proporcionou todo o material nas condições necessárias, mesmo nos momentos de maior sobrecarga de trabalho.

Aos restantes técnicos do laboratório de Toxicologia Forense do Instituto Nacional de Medicina Legal, Coimbra, pela sua compreensão e camaradagem com que me acolheram e incentivaram.

Aos meus pais, irmã, cunhado e sobrinho pelo apoio incondicional, incentivo e compreensão.

Aos meus amigos e colegas de trabalho que sempre me incentivaram.

resumo

Neste trabalho descreve-se o desenvolvimento e validação de um método para identificação e quantificação simultânea de drogas e metabolitos em cabelo, por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, nomeadamente: diazepam, nordiazepam, flunitrazepam, Δ^9 -tetrahydrocannabinol, ácido 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol, canabinol, canabidiol, 6-monoacetilmorfina, morfina, codeína, normorfina, cocaína, benzoilecgonina, éster metílico de ecgonina, cocaetilenol, norcocaína, anfetamina e clorpromazina.

Para libertação das drogas da matriz foi utilizado um procedimento por digestão enzimática com β -glucuronidase/arylsulfatase durante duas horas a 40°C. Desenvolveu-se e aplicou-se um procedimento de extracção líquido/líquido com clorofórmio/isopropanol, em meio alcalino, seguido com *n*-hexano/acetato de etilo, em meio ácido.

Nos extractos por derivatizar foram analisados os seguintes compostos: diazepam, flunitrazepam, canabinol, canabidiol, cocaína, norcocaína, cocaetilenol e clorpromazina, usando a cromatografia gasosa acoplada a um detector de espectrometria de massa, com ionização por impacto electrónico. Após derivatização com anidrido pentafluoropropiónico e pentafluoropropanol foram analisados: Δ^9 -tetrahydrocannabinol, ácido 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol, 6-monoacetilmorfina, morfina, codeína, normorfina, benzoilecgonina, éster metílico de ecgonina e anfetamina. O diazepam, nordiazepam, flunitrazepam e o ácido 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol derivatizado foram igualmente analisados por cromatografia gasosa acoplada com detecção por espectrometria de massa, com ionização química negativa, utilizando o metano como gás reagente. Compararam-se os resultados obtidos usando a análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa com ionização por impacto electrónico com os obtidos usando a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa com ionização química negativa, para o diazepam, flunitrazepam e ácido 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol. Os resultados evidenciam que a metodologia de análise desenvolvida permite a detecção e quantificação de todas as drogas e metabolitos anteriormente referidos, no entanto é mais adequada para benzodiazepinas, canabinóides, éster metílico de ecgonina, cocaetilenol, norcocaína, morfina, codeína e normorfina. A análise do diazepam, flunitrazepam e do ácido 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa com ionização química negativa, em vez de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa com ionização por impacto electrónico, é mais adequada por evitar a ocorrência de alguns falsos negativos.

Aplicou-se a metodologia de análise desenvolvida a 87 amostras de cabelo. Detectou-se frequentemente, em cada amostra, mais de um grupo de drogas e metabolitos. Os opiáceos foram os mais frequentes seguindo-se as benzodiazepinas, a cocaína e os canabinóides. Estes resultados sugerem um consumo frequente de polidrogas sendo a heroína e as benzodiazepinas as substâncias preferidas pelos indivíduos envolvidos no estudo.

abstract

In this work we describe the development and validation of a method for simultaneous identification and quantification some drugs and metabolites in human hair by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, namely: diazepam, nordiazepam, flunitrazepam, Δ^9 -tetrahydrocannabinol, 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-carboxylic acid, cannabidiol, 6-monoacetylmorphine, morphine, codeine, normorphine, cocaine, benzoylecgonine, ecgonine methyl ester, cocaethylene, norcocaine, amphetamine and chlorpromazine. Enzymatic hydrolysis with β -glucuronidase/arylsulfatase for 2 hours at 40°C was used for drug liberation from the matrix. We applied and developed a liquid-liquid extraction procedure with chloroform/isopropyl alcohol in alkaline medium and with n-hexane/ethyl acetate, after acidification. The extracts were analysed before derivatization for diazepam, flunitrazepam, cannabidiol, cocaine, norcocaine, cocaethylene and chlorpromazine, using a gas chromatographer/mass spectrometer detector in electron impact mode. After derivatization with pentafluoropropionic anhydride and pentafluoropropanol the extracts were analysed for Δ^9 -tetrahydrocannabinol, 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-carboxylic acid, 6-monoacetylmorphine, morphine, codeine, normorphine, benzoylecgonine, ecgonine methyl ester and amphetamine, using the same analysis conditions. Diazepam, nordiazepam, flunitrazepam and derivatized 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-carboxylic acid were also analysed using a gas chromatographer/mass spectrometer detector, in negative ion chemical ionization mode using methane as the reagent gas. The results of the analysis by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, in electron impact mode and Gas Chromatography/Mass Spectrometry, in negative ion chemical ionization mode obtained for diazepam, flunitrazepam and 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-carboxylic acid were compared. The results showed that the developed analytical methodology allows detection and quantification of all the mentioned drugs and metabolites; however it's more appropriate for benzodiazepines, cannabinoids, ecgonine methyl ester, cocaethylene, norcocaine, morphine, codeine, normorphine and 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-carboxylic acid. The quantification of the diazepam, flunitrazepam and 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-carboxylic acid using Gas Chromatography/Mass Spectrometry, in negative ion chemical ionization mode instead of Gas Chromatography/Mass Spectrometry, in electron impact mode, is more reliable to avoid false negatives. This work also describes the application of the established method to the analysis of 87 hair samples. Frequently, it was detected more than one drug group in each hair sample. Opiates were the main detected drugs followed by benzodiazepines, cocaine and cannabinoids. These results suggest a frequent consumption of polydrugs by the individuals involved in this work and show that heroin and benzodiazepines were the main chosen drugs.

ÍNDICE

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E COMPOSTOS	i
INTRODUÇÃO	1
OBJECTIVO	3
ESTRUTURA DE APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO	4
<i>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</i>	7
CAPÍTULO 1- O cabelo, matriz para análise de drogas e metabolitos	9
1.1- A matriz cabelo	11
1.1.1- Características anatómicas e fisiológicas do cabelo	11
1.1.2- Incorporação de drogas e metabolitos	14
1.1.3- Interpretação dos resultados das análises de drogas e metabolitos	15
1.1.4- Vantagens e desvantagens do uso do cabelo comparativamente ao sangue e à urina ...	18
1.1.5- Possíveis aplicações da análise de drogas e metabolitos	20
CAPÍTULO 2- Noção de droga e algumas das suas classificações	23
2.1- Noção de droga	25
2.2- Classificação das drogas	25
CAPÍTULO 3- Grupos de drogas terapêuticas e não terapêuticas que constam do estudo a realizar	31
3.1- Benzodiazepinas	33
3.1.1- Introdução	33
3.1.2- História	35
3.1.3- Efeitos	35
3.1.4- Indicações clínicas	37
3.1.5- Situação Portuguesa	37
3.1.6- Farmacocinética	
Administração, metabolismo e eliminação	39
3.1.7- Benzodiazepinas na toxicologia	42
3.1.8- Métodos de pesquisa e dosagem em cabelo	43
3.1.8.1- Metodologia analítica por GC/MS	45
Tamanho da amostra e descontaminação	46
Libertação e extração	47
Análise	49
Derivatização e métodos de detecção	49
Limite de detecção e concentrações determinadas em amostras	50
Limites de Positividade	54
3.2- Canabinóides	54
3.2.1- Introdução	54
3.2.2- História	57
3.2.3- Efeitos dos canabinóides	58
3.2.4- Indicações clínicas	59
3.2.5- Situação Portuguesa	59

3.2.6- Farmacocinética	
Administração, metabolismo e eliminação	59
3.2.7- <i>Cannabis</i> na toxicologia	62
3.2.8- Métodos de pesquisa e dosagem em cabelo	63
3.2.8.1- Metodologia analítica por GC/MS	65
Tamanho da amostra e descontaminação	65
Libertação e extracção	67
Análise	71
Derivatização e métodos de detecção	71
Limite de detecção e concentrações determinadas em amostras	72
Limites de Positividade	78
3.3- Opiáceos	79
3.3.1- Introdução	79
3.3.2- História	80
3.3.3- Efeitos	80
3.3.4- Indicações clínicas	81
3.3.5- Situação Portuguesa	81
3.3.6- Farmacocinética	
Administração, metabolismo e eliminação	82
3.3.7- Opiáceos na toxicologia	84
3.3.8- Métodos de pesquisa e dosagem em cabelo	86
3.3.8.1- Metodologia analítica por GC/MS	88
Tamanho da amostra e descontaminação	88
Libertação e extracção	90
Análise de opiáceos	93
Derivatização e métodos de detecção	93
Limite de detecção e concentrações determinadas em amostras	94
Limites de Positividade	99
3.4- Cocaína e metabolitos	99
3.4.1- Introdução	99
3.4.2- História	101
3.4.3- Efeitos	101
3.4.4- Indicações clínicas	102
3.4.5- Situação Portuguesa	102
3.4.6- Farmacocinética	
Administração, metabolismo e eliminação	103
3.4.7- Cocaína na toxicologia	107
3.4.8- Métodos de pesquisa e dosagem em cabelo	107
3.4.8.1- Metodologia analítica por GC/MS	111
Tamanho da amostra e descontaminação	111
Libertação e extracção	114
Análise	119
Derivatização e métodos de detecção	119
Limite de detecção e concentrações determinadas em amostras	120
Limites de Positividade	127
3.5- Anfetamina	128
3.5.1- Introdução	128
3.5.2- História	129
3.5.3- Efeitos	129
3.5.4- Indicações clínicas	130
3.5.5- Situação Portuguesa	130
3.5.6- Farmacocinética	
Administração, metabolismo e eliminação	131

3.5.7- Anfetamina na toxicologia	132
3.5.8- Métodos de pesquisa e dosagem em cabelo	133
3.5.8.1- Metodologia analítica por GC/MS	135
Tamanho da amostra e descontaminação	135
Libertação e extracção	136
Análise	139
Derivatização e métodos de detecção	139
Limite de detecção e concentrações determinadas em amostras	140
Limites de Positividade	144
3.6- Fenotiazinas: Clorpromazina	144
3.6.1- Introdução	144
3.6.2- História	145
3.6.3- Efeitos	146
3.6.4- Indicações clínicas	146
3.6.5- Situação Portuguesa	146
3.6.6- Farmacocinética	
Administração, metabolismo e eliminação	147
3.6.7- Clorpromazina na toxicologia	148
3.6.8- Métodos de pesquisa e dosagem em cabelo	148
3.6.8.1- Metodologia analítica por GC/MS	149
Tamanho da amostra e descontaminação	149
Libertação e extracção	150
Análise	151
Derivatização e métodos de detecção	151
Limite de detecção e concentrações determinadas nas amostras	152

PARTE EXPERIMENTAL 155

CAPÍTULO 4- Método múltiplo de análise de drogas, terapêuticas e não terapêuticas, e seus metabolitos em cabelo, por GC/MS e sua validação	157
4.1- Material	159
4.1.1- Amostras utilizadas nos ensaios	159
4.1.2- Químicos e soluções	159
4.1.2.1- Padrões de drogas e metabolitos	159
4.1.2.2- Padrões internos (deuterados e outros)	160
4.1.2.3- Reagentes e soluções usados nos processos de libertação das drogas e metabolitos do cabelo, extracção e reconstituição	160
4.1.2.4- Reagentes derivatizantes	161
4.1.2.5- Reagentes para silanização	162
4.1.3- Gases	162
4.1.4- Equipamento usado	162
4.1.4.1- Na preparação de soluções	162
4.1.4.2- Na colheita, preparação e tratamento do cabelo	163
4.1.4.3- Na libertação e extracção das drogas	163
4.1.4.4- Na derivatização das drogas	164
4.1.4.5- Instrumentação de análise das drogas e condições operacionais	165
4.2- Método	167
4.2.1- Silanização do material de vidro	167
4.2.2- Corte e descontaminação	167
4.2.3- Libertação das drogas	168
4.2.4- Extracção das drogas	169
4.2.5- Derivatização das drogas	170
4.2.6- Análise de drogas por GC/MS	173
4.3- Resultados e discussão	174

4.3.1- Libertação e extracção	174
4.3.2- Derivatização	181
4.3.3- Fragmentação	182
4.4- Procedimentos de avaliação do método desenvolvido. Validação do método	191
4.4.1- Selectividade	200
4.4.2- Linearidade	201
4.4.3- Recuperação	202
4.4.4- Precisão	204
4.4.5- Limite de detecção e quantificação	204
4.4.5.1- Limite de detecção	205
4.4.5.2- Limite de quantificação	206
CAPÍTULO 5- Análise de drogas e metabolitos por GC/MS-EI e GC/MS-NCI, em cabelo - Aplicação da metodologia desenvolvida na análise de amostras reais	209
5.1- Preparação e tratamento das amostras	211
5.2- Condições de positividade	215
5.3- Resultados e discussão	216
CAPÍTULO 6- Conclusões da parte experimental	223
Conclusões	225
Nota final	227
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	229

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS e COMPOSTOS

<- Menor

>- Maior

≈- Aproximadamente igual a

≤- Menor ou igual a

≥- Maior ou igual a

11-OH- THC -- 11 hidroxil- Δ^9 -tetrahydrocannabinol

4-MTA- 4-metiltoanfetamina

6-MAM ou **6-AM** -- 6- Monoacetilmorfina ou 6-Acetilmorfina

8 β OH- THC -- 8 β hidroxil- Δ^9 -tetrahydrocannabinol

a.C.- Antes de Cristo

AEME- Éster metílico de anidroecgonina

AP- Anfetamina

APCI- Ionização química a pressão atmosférica

BE- Benzoilecgonina

BSA- *N,O*-bis(trimetilsilil) acetamida

BSTFA- *N,O*-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida

BZD- Benzodiazepina(s)

CBD- Canabidiol

CBN- Canabinol

CE- Electroforese capilar

CH₂Cl₂- Diclorometano

CH₃- Metil (grupo alquilo)

CHCl₃- Triclorometano

CI- Ionização química

cm- Centímetro

COC- Cocaína

COC.HCl- Cloridrato de cocaína

COC-base- Cocaína de base livre ou cocaína alcaloidal

COCE- Cocaetileno

COD- Codeína

COH- Grupo que caracteriza os aldeídos (um átomo de hidrogénio ligado ao grupo carbonilo)

CPZ- Clorpromazina

Cut-off Limite de positividade

CV- Coeficiente de variação

CZE- Electroforese capilar de zona

d.C.- Depois de Cristo

d₃ ou d₅ ou d₇ ou d₁₁– Deuterados (tri, penta....)

DIAZ- Diazepam

DOB- 2,5-dimetoxi-4-bromoanfetamina

DOM- 2-amino-1-(2,5-dimetoxi-4-metil) fenil propano

DTT- Ditiotreitól

DVB- Polidivinilbenzeno

ECD- Detector de captura de electrões

ECG- Ecgonina

EDDP-- 2-etil-1,5-dimetil-3,3 difenilpirolina

EEE- Éster etílico de ecgonina

EI- Ionização por impacto electrónico ou ionização electrónica

EIA- Enzimoimunoensaio

ELISA- Técnica de enzimoimunoensaio competitiva ou do tipo sandwich

EME- Éster metílico de ecgonina

EMIT- Técnica de enzimoimunoensaio (marca-se um transportador com uma enzima que compete, no meio de reacção, com a substância que se pretende detectar na amostra problema, pela ligação a anticorpos específicos).

ES- Electropulverização

EtOH- Etanol

eV- Electrão-volt

FD- Detecção por fluorescência

FID- Detector de ionização de chama

FLU- Flunitrazepam

FPIA- Imunoensaio por polarização de fluorescência

g- aceleração da gravidade

g- grama

GC- Cromatografia gasosa ou Cromatógrafo gasoso

GC/MS- Cromatografia gasosa acoplada a detector de espectrometria de massa
Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massa

GC/MS/MS- Cromatografia gasosa acoplada a detector de espectrometria de massa em
Tandem

GC/MS-NCI- Cromatografia gasosa acoplada a detector de espectrometria de massa com
ionização química negativa

GC/MS-PCI- Cromatografia gasosa acoplada a detector de espectrometria de massa com
ionização química positiva

GC-CIMS- Cromatografia gasosa acoplada a detector de espectrometria de massa com
ionização química

Gluculase- β -glucuronidase/arylsulfatase

H- Hidrogénio

h- Hora(s)

H⁺- Protão

H₂O- Água

H₂SO₄- Ácido sulfúrico

H₃PO₄- Ácido fosfórico

HCl- Ácido clorídrico

HERO- Heroína; diacetilmorfina

HFB- Derivados heptafluorobutíricos

HFB-Cl- *heptafluoro-n-butyryl chloride*

HFBA- Anidrido heptafluorobutírico

HFIP- Hexafluoroisopropanol

HFPOH- Hexafluoropropanol

HP- *Hewlett Packard*

HPLC- Cromatografia líquida de alta eficiência

HS- *Headspace*

HS-SPDE- Extração dinâmica por fase sólida em modo *headspace*

HS-SPME- Micro-extração por fase sólida em modo *headspace*

I.D. (i.d.)- Diâmetro interno

ICD-10 – Classificação Internacional de Doença

IDT- Instituto da Droga e da Toxicodependência

INML-DC- Instituto Nacional de Medicina Legal Delegação de Coimbra.

IPDT- Instituto Português da Droga e da Toxicodependência (actualmente IDT)

IS (p.i. ou PI)- Padrão interno

K₂HPO₄- Hidrogenofosfato de potássio

KOH- Hidróxido de potássio

KP- Cetoprofeno

L- Litro

Lab.- Laboratório

LC- Cromatografia líquida

LC/MS- Cromatografia líquida- Espectrometria de Massa

LC/MS/MS- Cromatografia líquida acoplada a detector de espectrometria de massa em *Tandem*

LLE- Extração líquido-líquido

LOD- Limite de detecção da tecnologia analítica

LOQ- Limite de quantificação

LSD- Ácido lisérgico

m- metro

M- Molar

mm- Milímetro

m/z – Relação massa/carga dos fragmentos iónicos formados num espectrometro de massa; a massa é expressa em daltons ou em unidades de massa atómica (amu)

M⁺- Ião molecular. É um pico do espectro de massa que corresponde à molécula ionizada contendo apenas os isótopos de maior abundância natural

M-3-G-- Morfina-3-glicuronoconjugado ou Morfina-3-glucuronoconjugado

M-6-G-- Morfina-6-glicuronido ou Morfina-6-glucuronido

MA- Metanfetamina

MBDB- 3,4-metilenadioxifenilbutano

MBHFBA- N-metil-bis-heptafluorobutiramida

MBTFA- N-metil-bis-trifluoroacetamida

MDA-- 3,4-metilenadioxianfetamina

MDEA ou **MDE** -- metilenadioxietilamfetamina

MDMA-- 3,4-metilenadioximetanfetamina

MeOH- Metanol

mg- Miligrama
mg/d- Miligrama por dia
min- minutos
mL- Mililitro
mm- Milímetro
mM- Milimolar
MOR- Morfina
MRM- Monitorização de reacção múltipla
MS ou **MSD**- Detector de massa
MS/MS- Espectrometria de massa em *Tandem*
MSHFBA- *N*-metil-*N*- trimetilsililheptafluorobutiramida
MSTFA- *N*-metil-*N*- trimetilsilil-trifluoroacetamida
MTBSTFA- *N*-metil-*N*-*tert.*-butildimetilsililtrifluoroacetamida
N- Normal (Normalidade)
N₂- Azoto
Na₂S- Sulfureto de sódio
NaCl- Cloreto de sódio
NaHCO₃- Bicarbonato de sódio
NAL- Nalorfina
NaOH- Hidróxido de sódio
NCI- Ionização química negativa
ND- Não detectado
ng- Nanograma
NH₂- Grupo amina
nm- Nanómetro
NO₂- Dióxido de azoto
NORBE- Norbenzoilecgonina
NORCE- Norcocaetileno
NORCOC- Norcocaína
NORCOD- Norcodeína
NORDIAZ- Nordiazepam (N-Desmetildiazepam)
NORMOR- Normorfina (Desmetilmorfina)
NPD- Detector de azoto-fósforo ou detecção selectiva de azoto e fósforo

NR- Não refere

°C- Grau Celsius

OH- Grupo hidroxilo

OMS- Organização Mundial de Saúde

PA- Anidrido propiónico

PCI- Ionização química positiva

PCP- Fenciclidina

PDA- Detecção por fotodíodos

PDMS- Polidimetilsiloxano

PFP- Grupo pentafluoropropionil

PFPA- Anidrido pentafluoropropiónico

PFPOH- Pentafluoropropanol

pg- Picograma

pKa = $-\log K_a$ Sendo K_a , a constante de acidez

PMA-- 4 α -metoxi-metilfeniletilamina

PRAZ- Prazepam

PSA- Ácido propiónico

r- Coeficiente de correlação

R²- Coeficiente de determinação

RIA- Radioimunoensaio

rpm- Rotações por minuto

S/N- razão ou *ratio* sinal/ruído

SD- Desvio padrão

SDS- Dodecil sulfato de sódio

SFC- Método cromatográfico por fluidos supercríticos

SFE- Extracção por Fluido Supercrítico

SH- Grupo sulfídrico

SIM- Monitorização Selectiva de Iões

SKF 525A- Proadifeno

SNC- Sistema Nervoso Central

SoHT- *Society of Hair Testing*

SPDE- Extracção Dinâmica em Fase Sólida

SPE- Extracção em Fase Sólida

SPME- Micro-Extracção em Fase Sólida
S-S-- Ligações dissulfureto
STF- Serviço de Toxicologia Forense do INML-DC
TBDMS- *tert*-butildimetilsilil
TFAA ou **TFA**- Anidrido trifluoroacético
TIC- Correntes iónicas totais
TLC- Cromatografia em Camada Fina
TMCS- Trimetilclorossilano
TMS- Derivados trimetilsilílicos
TMSIM- N-trimetilsililimidazole
Torr- Símbolo da unidade de pressão torr
t_R- Tempo de retenção
Tris-- Trishidroximetilaminometano
UV- Ultra-violeta; região do espectro electromagnético que abrange as radiações invisíveis com comprimento de onda situado entre 4 nm e 400 nm
v/v- volume/volume
w/v- peso/ volume
w/w- peso/ peso
Δ⁹-THC -- Δ⁹-Tetrahydrocannabinol ou Δ⁹-Tetraidrocanabinol
Δ⁹-THC-COOH -- Ácido-11-nor-delta-9-tetrahydrocannabinol
λ- comprimento de onda
μg- micrograma
μL- microlitro
μm- micrómetro

ERRATA

Página 3- Onde se lê: 77 indivíduos, deve ler-se: 75 indivíduos.

Página 39- No rodapé da tabela 3.3 retirar a legenda SD.

Página 53- Onde se lê: Estes valores são inferiores aos obtidos por Cirimele *et al.* [54, 55] (5 pg/mg e 10 pg/mg para o LOD e LOQ, respectivamente). Deve ler-se: O valor do LOD é inferior aos obtidos por Cirimele *et al.* [54, 55].

Página 65- Onde se lê: (Tabela 3.9 e 3.10), deve ler-se: (Tabela 3.9, 3.10 e 3.11).

Página 113- Onde se lê: ...não só os compostos... como também os metabolitos..., deve ler-se: ...não só dos compostos... como também dos metabolitos.
Onde se lê: ...é usado igualmente no processo de extracção (Tabela 3.23), deve ler-se: ... é usado igualmente no processo de extracção (Tabela 3.24).

Página 118- Onde se lê: [93, 253, 254, 323, 346], deve ler-se: [93, 253, 254, 323].

Página 135- Onde se lê: ... e a tabela 3.27, deve ler-se: ... e a tabela 3.28.
Onde se lê: O tamanho da amostra é variável (Tabela 3.28) (0,5-200 mg), deve ler-se: O tamanho da amostra é variável (Tabela 3.28) (0,5-285 mg).

Página 137- Onde se lê: (Tabela 3.28), deve ler-se: (Tabela 3.29).

Página 144- Onde se lê: (Figura 3.32), deve ler-se: (Figura 3.12).

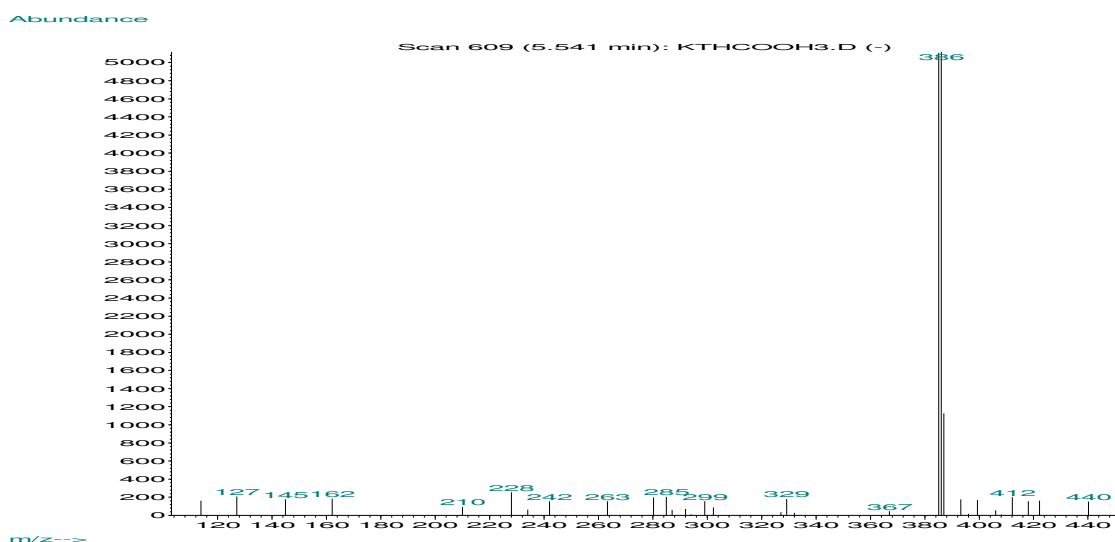
Página 161- Onde se lê: ... clorofórmio/isopropanol, nas proporções 93:3 (*v/v*), deve ler-se: ... clorofórmio/isopropanol, nas proporções 97:3 (*v/v*).

Página 169 - Substituir a tabela 4.1 pela seguinte:

Composto	Padrão interno (IS)	IS alternativo
6-MAM	6-MAM-d ₃	
MOR	MOR-d ₃	
NORMOR	MOR-d ₃	NAL
COD	COD-d ₃	
COC	COC-d ₃	
NORCOC	COC-d ₃	-----
BE	BE-d ₃	
EME	EME-d ₃	NAL
COCE	COC d ₃	-----
AP	NAL	-----
CPZ	Ketamina	-----
Δ ⁹ -THC	KP	Ketamina
CBD	Ketamina	
CBN	Ketamina	
Δ ⁹ -THC-COOH	KP	
DIAZ	PRAZ	
NORDIAZ	PRAZ	
FLU	PRAZ	

Página 174- A seguir ao ponto 4.3 incluir o subtítulo: Estudos efectuados para seleccionar o método analítico eficaz na determinação dos vários compostos.

Página 186- A Figura 4.10 deverá ser substituída pelo seguinte espectro de massa:



Página 190- Onde se lê: Caso o CBN não seja detectado..., deve ler-se: Caso o CBD não seja detectado...

Página 200- Onde se lê: ...injecção de solução aquosa do analito, nas mesmas condições, a uma concentração próxima do limite de quantificação..., deve ler-se:... injecção da solução metanólica dos analitos, nas mesmas condições, a concentrações próximas dos limites de quantificação...

Página 202- Onde se lê: ...a 6-MAM teve um r, somente,> a 0,68...,deve ler-se:...a 6-MAM teve um r, somente, > a 0,67...

Página 205- Onde se lê: (próximas do LOD), deve ler-se (próximas, superiores, ao LOQ).

Página 206- Onde se lê: Para a CPZ obtivemos um valor de 1 ng/mg, o qual..., deve ler-se: Para a CPZ obtivemos um valor de 0,1 ng/mg, o qual é semelhante aos valores obtidos por outros autores [306].

Página 207- Deve ler-se, no 3º parágrafo: Nos opiáceos o *cut-off* para a 6-MAM é inferior a alguns trabalhos [217, 252] e é igual ao adoptado por outros autores [218]. No 4º parágrafo deve ler-se: Para a cocaína, BE e EME os *cut-off* foram iguais ou inferiores aos publicados em diversos trabalhos [101, 158, 167, 182, 217, 218, 252, 300, 347]. No 5º parágrafo deve ler-se: Para a anfetamina foi menor comparativamente ao adoptado por diversos investigadores [57, 100, 152, 182, 346, 365].

Página 215- Onde se lê: CBN e CBD, em 77 amostras, deve ler-se: CBN e CBD, em 78 amostras...

O ponto 5.2 deve ler-se: 5.2- Condições de identificação.

Página 216- Na tabela 5.1 substituir o número de amostras positivas do DIAZ de 77 para 68.

Página 218- Onde se lê: A NORMOR foi detectada em 9 amostras, deve ler-se: A NORMOR foi detectada em 11 amostras.

Página 219- Onde se lê: O DIAZ e o NORDIAZ foram detectados em simultâneo em 57 amostras, deve ler-se: O DIAZ e o NORDIAZ foram detectados em simultâneo em 58 amostras.

Página 220- Onde se lê: A tabela 5.2 mostra-nos..., deve ler-se: A tabela 5.1 mostra-nos...

INTRODUÇÃO

A evolução tecnológica tem proporcionado avanços ao nível analítico que têm conduzido a metodologias cada vez mais eficientes para determinar drogas terapêuticas e não terapêuticas.

Em Portugal, os exames periciais relacionados com o estado de toxicod dependência e intoxicação aguda envolvem, de forma complementar, a clínica e a toxicologia forense. São usadas predominantemente as amostras biológicas sangue e urina. A análise nestas matrizes revela, normalmente, os consumos recentes. No entanto, para poder acompanhar a evolução do uso de drogas, num período de tempo longo, será vantajoso utilizar amostras que sejam facilmente acessíveis e registem esse consumo [55, 248].

Nos últimos anos o uso do cabelo humano (em menor grau de outros pêlos) para detecção do abuso de drogas tem vindo a aumentar em larga escala [118]. Esta matriz tem a possibilidade de incorporar e aprisionar drogas e metabolitos, à medida que ocorre o seu crescimento. Estes compostos permanecem inalterados no cabelo, por longos períodos de tempo [107, 261, 328, 333, 364].

Em países como a Espanha, a Itália, a Alemanha, a França, o Canadá e os Estados Unidos da América, a análise de drogas em cabelos faz parte das metodologias de rotina dos laboratórios, com aplicação nos mais diversos campos, como no trabalho, essencialmente nas profissões de risco, na aquisição e/ou renovação de cartas de condução de veículos, na adopção de crianças e no acompanhamento clínico de mulheres grávidas.

No nosso país foi publicado por Marques *et al.* [190], em 1996, um estudo comparativo de quatro procedimentos de isolamento de opiáceos e cocaína e metabolitos, em cabelo humano, que foi desenvolvido no Serviço de Toxicologia Forense do Instituto Nacional de Medicina Legal – Delegação de Coimbra. Os resultados do estudo levaram à adopção da digestão enzimática com β -glucuronidase, na libertação das drogas do cabelo. Este procedimento, seguido de análise por GC/MS, tem sido usado, desde então, em algumas solicitações (poucas) ligadas a profissões de risco e à toxicologia forense.

Como se encontra descrito na literatura é frequente o consumo de polidrogas, pelo que será vantajoso o desenvolvimento de uma metodologia analítica que permita a detecção e quantificação, em simultâneo, dum maior número de compostos. Até este momento, de

acordo com os nossos conhecimentos, não existe nenhuma metodologia como a que nos propomos desenvolver para determinar em cabelo humano drogas terapêuticas e ilícitas.

Considera-se de relevante importância o desenvolvimento desta metodologia, pois crê-se que em Portugal deverá ser criada, a curto prazo, legislação nesta área semelhante à existente nos países referidos, e assim sendo o nosso país estará preparado para responder adequadamente às solicitações decorrentes desta nova legislação.

OBJECTIVO

O objectivo do nosso trabalho experimental consta de duas partes:

- **Primeira parte** – desenvolvimento de um método de análise, por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, com utilização de modos de impacto electrónico e de ionização química negativa, para determinação simultânea de drogas e metabolitos, em cabelo humano:

- 1- Benzodiazepinas (BZD)- diazepam (DIAZ), nordiazepam (NORDIAZ), flunitrazepam (FLU).
- 2- Canabinóides - Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), ácido 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC-COOH), cannabinol (CBN), canabidiol (CBD).
- 3- Opiáceos - 6-monoacetilmorfina (6-MAM), morfina (MOR), codeína (COD); normofina (NORMOR).
- 4- Cocaína (COC) e metabolitos - benzoilecgonina (BE), éster metílico de ecgonina (EME), cocaetileno (COCE), norcocaína (NORCOC).
- 5- Anfetamina (AP).
- 6- Clorpromazina (CPZ).

- **Segunda parte** - aplicação do método validado na análise de 87 amostras de cabelo provenientes de 77 indivíduos, de nacionalidade espanhola, que prestaram depoimento em tribunal, por delitos cometidos relacionados com a droga.

Serão pesquisados as drogas e metabolitos estudados no método desenvolvido e quantificados os detectados, de modo a poder concluir se houve ou não consumo de drogas.

ESTRUTURA DE APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

A dissertação está estruturada em três blocos:

- Revisão bibliográfica;
- Parte experimental;
- Conclusões finais.

- A revisão bibliográfica inclui três capítulos. No primeiro referem-se as características da matriz cabelo e as vantagens e desvantagens da sua utilização na análise de drogas e metabolitos, comparativamente a outras matrizes, bem como possíveis aplicações dessas análises. No segundo capítulo define-se droga e apresentam-se algumas das suas classificações. No capítulo três abordam-se, individualmente, as classes de drogas/metabolitos incluídas no trabalho, dando particular ênfase aos métodos de análise baseados na técnica por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS), com modos de ionização por impacto electrónico (EI) e ionização química negativa (NCI).
- A parte experimental inclui dois capítulos (quatro e cinco), referentes às duas partes em que se dividiu o trabalho.

O capítulo quatro corresponde ao desenvolvimento e optimização da metodologia para análise simultânea de drogas e metabolitos, em cabelo, por GC/MS. Encontra-se organizado da seguinte forma:

- Inicialmente, apresenta-se o material (amostras, reagentes e equipamento) usado na execução da parte experimental desta dissertação.
- Depois, descrevem-se os procedimentos ensaiados nas diversas etapas necessárias à análise dos compostos na matriz cabelo, para escolher um que evidencie os melhores resultados. Apresentam-se os procedimentos de libertação e extracção e, sempre que necessário, de derivatização e, ainda, de análise das drogas e metabolitos, durante a fase de desenvolvimento e optimização do método múltiplo de análise.
- Em seguida, relatam-se os procedimentos efectuados para a validação do método analítico.
- Posteriormente, apresentam-se os resultados e a sua discussão.

O capítulo cinco corresponde à aplicação da metodologia desenvolvida na análise de drogas e metabolitos em amostras de cabelo dos casos reais em estudo. Apresentam-se os resultados (qualitativos e quantitativos) obtidos e efectua-se a sua discussão.

- No terceiro bloco da dissertação (capítulo seis) apresentam-se as conclusões relativas ao estudo experimental e paralelamente sugestões para trabalhos subsequentes.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO 1

O cabelo, matriz para análise de drogas e metabolitos

1.1 - A MATRIZ CABELO

A análise toxicológica de drogas está em constante mutação. A selecção e recolha de amostras biológicas acompanham igualmente a evolução no que respeita ao momento de colheita, à conservação, à análise e interpretação dos resultados.

Tradicionalmente, o estabelecimento do uso efectivo de drogas por parte de um indivíduo assenta maioritariamente na análise à urina e, embora não tão frequente, ao sangue (incluindo o plasma ou soro) [222]. São, no entanto, inúmeras as possibilidades que o toxicologista dispõe relativamente às matrizes que podem ser usadas na detecção e quantificação de drogas e/ou metabolitos, algumas das quais, sendo de uso exclusivo em situações *postmortem*. A título de exemplo, referem-se as vísceras e o humor vítreo [149], o mecónio [224, 368], o sangue do cordão umbilical, o sangue do neonato ou líquido amniótico [164, 165, 222], as unhas [65, 282], o cabelo e os pêlos [118].

A utilização do cabelo como amostra para identificação de tóxicos inorgânicos não é recente [204]. No entanto, foi apenas a partir da publicação dos trabalhos de Goldblum *et al.* [97] e de Baumgartner *et al.* [15] que se começou a encarar o cabelo como matriz alternativa e/ou complementar à urina na análise de drogas [222].

Teoricamente, todos os xenobióticos de natureza orgânica podem ser objecto de dosagem, no cabelo. Apesar da maioria das substâncias revelar uma boa fixação, torna-se difícil evidenciar certas moléculas devido às baixas concentrações no sangue circulante (como os digitálicos) e/ou devido a uma fraca incorporação consequência das propriedades físico-químicas da molécula [16].

O acréscimo de dados proporcionados pela análise de drogas em cabelo, comparativamente aos obtidos nas matrizes tradicionalmente usadas, têm estado na base da sua crescente utilização no âmbito da toxicologia. Incidiremos sobretudo nesta matriz uma vez que foi a base de todo o trabalho experimental desenvolvido.

1.1.1 - Características anatómicas e fisiológicas do cabelo

O cabelo é um tipo de pêlo terminal. A haste capilar corresponde à porção que surge acima do nível da epiderme, encontrando-se a porção não visível do cabelo no interior do

folículo piloso [127] (Figura 1.1). O folículo piloso apresenta, na fase de crescimento do cabelo, uma dilatação terminal – bulbo piloso – no centro da qual se encontra a papila dérmica. As células que recobrem a papila dérmica formam a raiz de onde emerge o eixo do cabelo.

O crescimento do cabelo inicia-se no centro de germinação localizado na base do folículo. As células centrais da raiz produzem células grandes vacuolizadas e fracamente queratinizadas que formam a *medula*. Envolvendo a medula diferenciam-se células fusiformes mais queratinizadas que se dispõem de forma mais compacta constituindo o *córtex*. A *cutícula* surge a partir de células mais periféricas da raiz e é constituída por uma única camada de células alongadas e achatadas fortemente queratinizadas. A partir das células epiteliais da raiz, originam-se duas bainhas epiteliais – a interna e a externa que envolvem o eixo do cabelo na sua porção inicial. O folículo piloso está separado do tecido conjuntivo envolvente pela membrana vítrea (lâmina basal muito desenvolvida). O tecido conjuntivo que se encontra a envolver o folículo piloso é muito espesso e designa-se por bainha conjuntiva do folículo piloso (Figura 1.1) [127, 134].

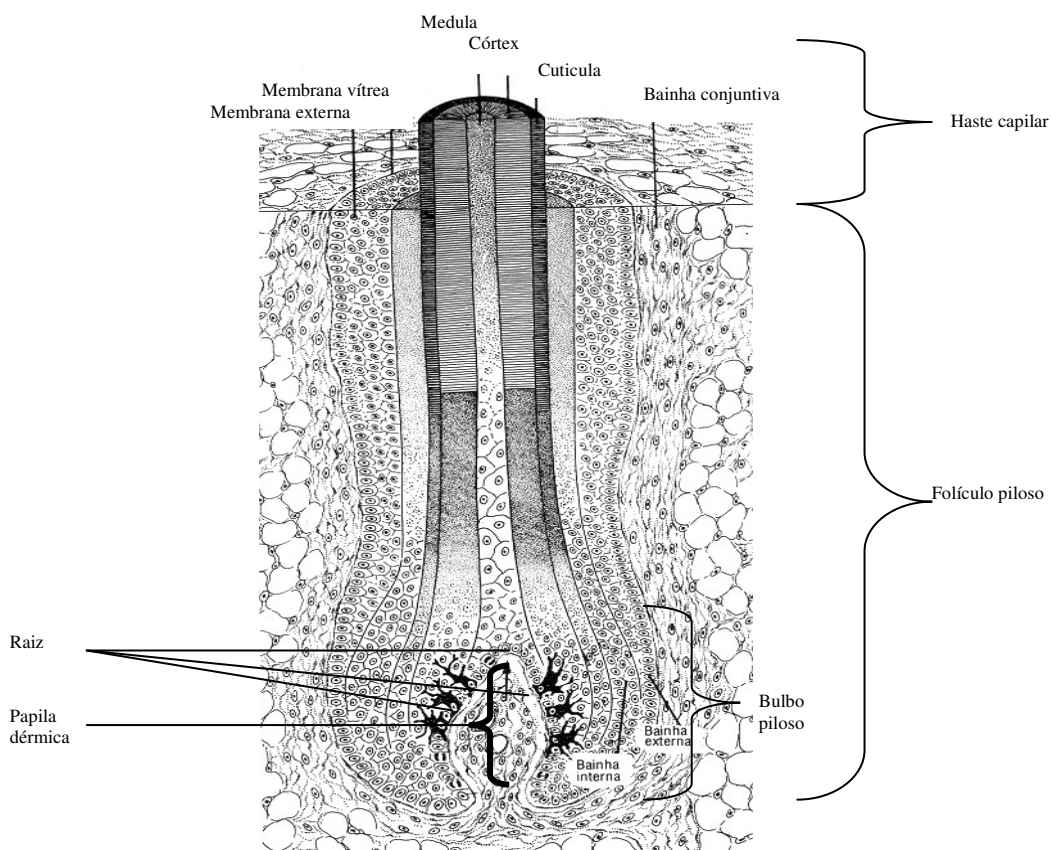


Figura 1.1 - Anatomia do cabelo (adaptado de [134]).

O diâmetro das hastes pode variar, no Homem, entre 15 a 120 μm dependendo do tipo de pêlo e da região do corpo onde está localizado o folículo [102].

A cor, tamanho, textura e disposição dos pêlos são variáveis com a raça e a localização corporal, mas parecem não existir diferenças raciais ou sexuais, significativas, no número de folículos [39].

O crescimento ocorre em ciclos não sincrônicos, isto é, cada cabelo entra em cada uma das fases ou estádios do ciclo de crescimento em tempos diferentes [127]. A percentagem de cabelos, em cada fase, é variável com o sexo, situação (ou não) de gravidez e época do ano [264]. O comprimento possível do cabelo e a densidade no couro cabeludo depende da relação entre os estádios e o grau de crescimento [287]. A duração dos estádios é variável com a espécie e a idade [39] não sendo consensuais os valores médios apresentados pelos diversos autores [127, 231, 264, 287]: 2 a 8 anos para o estágio de anagénesse (crescimento); 2 a 10 semanas para o estágio de catagénesse (transição); 3 a 6 meses para o estágio de telogénese (expulsão do cabelo). A velocidade de crescimento é igualmente variável entre 0,8 a 1,3 cm/mês [287] dependendo da espécie e, na mesma espécie, do tipo de pêlo (espessura e localização), sexo e idade [39, 231].

Na tabela 1.1 evidenciam-se taxas de crescimento de pêlos, no homem, em função da localização.

Tabela 1.1 - Taxa de crescimento média, diária, de alguns pêlos no homem (adaptado de [264]).

Tipos de pêlos	Taxa de crescimento (mm/dia)
Cabelo da região do vértice posterior ou coroa	0,44
Cabelo da zona temporal	0,39
Barba	0,38
Axilar	0,30
Pestanas	0,16

Os melanócitos, situados nas células da raiz (Figura 1.1), sintetizam melanina e transferem-na, via dendrites, no interior de grânulos chamados melanossomas, aos queratinócitos. No cabelo os grânulos de melanina distribuem-se pelo córtex, sendo mais abundantes na periferia. A cutícula é desprovida de melanina.

Sob o ponto de vista químico, existem dois tipos distintos de pigmentos de melanina: eumelaninas, pigmentos de castanho-escuro a preto (desprovidos de enxofre), e feomelaninas, pigmentos de avermelhado a amarelo [247, 310] (com enxofre e solúveis nos alcalis [264]).

A cor do cabelo é dependente do número e do tipo de melanossomas presentes no córtex. Um cabelo castanho ou preto possui mais eumelanossomas melanizados, um cabelo ruivo e louro contém mais feomelanossomas encontrando-se os eumelanossomas, no cabelo louro, incompletamente melanizados. Um cabelo grisalho contém poucos melanócitos no bulbo piloso e os seus melanossomas estão também incompletamente melanizados. Os melanócitos foliculares só estão activos durante a anagénesse.

O cabelo apresenta uma composição variável [144] em proteínas (65 - 95%), água (15 - 35%), lípidos (1 - 9%) e minerais (0,2 - 0,8%) [98, 102]. A proteína mais abundante é a queratina, a qual é muito rica em cisteína (aminoácido rico em enxofre). Primariamente, o cabelo consiste em duas ou três cadeias de α -queratina enroladas em hélice formando cordões chamados microfibrilas. Estas microfibrilas estão organizadas em feixes largos chamados macrofibrilas os quais abrangem o volume do córtex. A estabilidade dos cordões deve-se a ligações dissulfureto (S-S) e de hidrogénio [358]. Assim, na haste do pêlo formam-se fibras longas, as quais começam a ligar-se fortemente, através da substituição dos grupos sulfídricos (SH), por ligações S-S e ligações químicas transversais com outras proteínas resultando uma estrutura muito estável e firme. Os lípidos derivam do *sebum* e das secreções da glândula apócrina.

1.1.2 - Incorporação de drogas e metabolitos

Os fundamentos da análise ao cabelo para determinação de consumo de drogas de abuso residem no facto das drogas consumidas ficarem aprisionadas e estabilizadas naquela matriz [204].

O mecanismo, ou mecanismos envolvidos na incorporação das drogas e metabolitos ao longo do cabelo ou os factores que influenciam a sua incorporação ainda não se encontram esclarecidos [107]. Desta forma, dos vários modelos sugeridos podemos considerar resumidamente, que a incorporação da droga no cabelo é resultante [364]:

- da difusão activa e/ou passiva do sangue até às células em crescimento no folículo piloso;
- da difusão das secreções corporais (ex. suor e sebo) durante a formação da haste de cabelo;
- da difusão de fontes ambientais externas depois da formação da haste do cabelo.

A incorporação da droga no cabelo é influenciada principalmente pela sua afinidade para a melanina, lipofilicidade, basicidade [364], pelo gradiente de pH dentro e fora das membranas

celulares e pelo gradiente de concentração [87]. Apesar das dúvidas que ainda persistem, acerca dos constituintes do cabelo aos quais as drogas se ligam/incorporam, têm sido hipoteticamente apontados a queratina, os grânulos de melanina e o complexo membranar das células [333].

1.1.3 - Interpretação dos resultados da análise

Os resultados obtidos na análise de drogas e metabolitos, em cabelo, podem ser influenciados por inúmeros factores, os quais têm de ser ponderados antes das diversas tomadas de decisão por parte do toxicologista. Salientam-se o modo de preparação, tratamento e análise da amostra, as variações interpessoais, a quantidade e as propriedades dos compostos consumidos, os tratamentos cosméticos dados ao cabelo, a radiação solar e os limites de positividade estabelecidos.

Relativamente ao modo de preparação e tratamento das amostras as opções são inúmeras. A colheita pode realizar-se cortando, o mais junto possível da raiz [193], ou puxando os pêlos/cabelos [24]. O arrancamento permite a inclusão do bulbo, porção que revela os consumos mais recentes, constituindo-se, deste modo, uma amostragem mais completa. Se a opção for a realização de uma análise segmentar, os segmentos mais afastados da superfície corporal correspondem aos consumos menos recentes. A descontaminação da amostra com vista à remoção de substâncias endógenas (via suor e sebo) e exógenas, não específicas, (tratamentos efectuados ao cabelo e contaminantes ambientais) adsorvidas no cabelo [333] tem gerado inúmeras reflexões. Tem-se demonstrado que um cabelo fortemente contaminado não é inteiramente descontaminado pelas lavagens. Além disso, na aplicação de lavagens mais extensivas podem remover-se compostos resultantes do consumo individual [333]. Se por um lado, críticos às análises ao cabelo defendem a impossibilidade de distinguir, adequadamente, entre o uso activo de drogas e a contaminação inadvertida [144], outros autores [206] baseados na ideia que as forças de ligação resultantes de uma exposição ambiental são mais fracas, que as existentes quando as drogas são consumidas, defendem que os contaminantes ambientais, na maioria das circunstâncias, podem ser removidos por lavagens apropriadas do cabelo [204]. Para uma selecção mais ajustada dos procedimentos de libertação e extracção dos compostos da matriz há que atender ao tipo de droga a analisar, à estabilidade dos analitos em diferentes sistemas hidrolíticos, ao objectivo da investigação e ao

método a usar subsequentemente para determinação qualitativa e/ou quantitativa [134]. Alguns compostos são quimicamente instáveis sofrendo degradação durante o processo extractivo, o que se reflectirá nos resultados da análise. As metodologias analíticas existentes são diversas, pelo que a opção terá de ser o mais ajustada possível de acordo com os analitos a pesquisar e o objectivo da análise, de forma a garantir a sensibilidade e selectividade necessárias.

A ocorrência de variações interpessoais relativamente ao valor da droga consumida/droga recuperada do cabelo, podem ser imputadas às diferenças na velocidade de crescimento dos pêlos, consequência da sua natureza e localização bem como, do sexo, idade e raça do indivíduo. Torna-se difícil estimar a quantidade de droga consumida em função da quantidade recuperada a partir do cabelo, uma vez que este valor é influenciado pelas características individuais [204]. As amostras alvo de análise poderão ser constituídas por pêlos recolhidos no couro cabeludo (cabelos), na região púbica (pêlos púbicos) [168], axilar (pêlos axilares) [168, 187, 246], facial (barba) [59, 266], ou noutra local da superfície corporal (pêlos do braço) [62]. Preferencialmente a colheita ocorre no couro cabeludo por se verificar uma maior velocidade de crescimento comparativamente a outros locais (Tabela 1.1). A região da coroa (ou vértice posterior), situada na cabeça, é o local mais apropriado para a colheita [24, 102, 167, 170] por possuir maior proporção de folículos em fase anagénica (85%), taxa de crescimento mais elevada [24, 102] e relativamente constante (1 cm/mês) [193] e, também, por ser a menos influenciada pelas variações sexuais e da idade [17]. Apesar das vantagens referidas, o cabelo possui elevada exposição a contaminações ambientais, sofre a influência dos tratamentos cosméticos aplicados, dos elementos climáticos, nomeadamente da luz ultravioleta (UV), bem como a acção das secreções glandulares sebáceas e sudoríparas. A realização de colorações, descolorações ondulações permanentes e desfrisamentos parecem ser responsáveis pela alteração da estabilidade das drogas e metabolitos aprisionados no cabelo, originando uma diminuição na concentração determinada [260]. A radiação UV é dos elementos climáticos mais destruidor, tendo sido observada, em consequência desta radiação, uma diminuição da concentração com o aumento da distância à raiz [255]. É particularmente importante a especificação da natureza do pêlo que se utiliza, uma vez que têm sido determinadas diferentes concentrações de drogas e metabolitos em pêlos púbicos, axilares ou cabelos, pertencentes ao mesmo indivíduo [168, 170]. A cor evidenciada pelo cabelo tem sido invocada para justificar diferentes concentrações de drogas, determinadas em cabelos mais claros e mais escuros. Sugere-se um aumento de concentração pela ligação da droga a

componentes das células do cabelo, nomeadamente à melanina [310, 324]. No entanto, nas situações de albinismo, a droga é igualmente incorporada no cabelo, ainda que em menor quantidade [310]. Estudos recentes têm evidenciado, para algumas drogas e metabolitos, a inexistência de uma relação significativa entre a concentração determinada e cor do cabelo [205].

Um outro aspecto gerador de alguma controvérsia refere-se à interpretação dos valores resultantes do consumo passivo e inadvertido da droga. Este uso pode produzir o mesmo resultado biológico qualitativo e o mesmo resultado metabólico do “uso com conhecimento”. Parte-se do pressuposto, já anteriormente referido, que o “uso” (a ingestão, inalação, troca de fluidos corporais como sémen ou suor) inadvertido e casual difere do uso activo, na dimensão quantitativa [204]. No uso inadvertido a exposição é em menor grau, salvo em raras excepções, por comparação com a utilização voluntária, normalmente caracterizada por um consumo em larga escala. Um dos problemas que se coloca nesta situação é a definição de um valor que ao ser ultrapassado, o resultado da análise seja rotulado como resultado de diagnóstico positivo. Este valor, vulgarmente designado por limite de positividade (*cut-off*), é distinto de um positivo técnico o qual é definido pelo limite de detecção da tecnologia analítica (LOD) [204]. Assim, um teste diagnóstico negativo pode resultar de uma amostra tecnicamente positiva. Isto significa que a amostra tem uma quantidade tecnicamente detectável mas inferior ao *cut-off*. Não há uma resposta técnica uniforme para definir o valor limiar do diagnóstico positivo, sendo controverso o estabelecimento do valor, a partir do qual normalmente se reconhece que as explicações da exposição inadvertida ou passiva são improváveis. Se o *cut-off* for muito baixo as quantidades detectadas podem corresponder a exposições ambientais; se for elevado podem não ser detectados os casos de consumo ligeiro [24].

A incorporação da droga no cabelo depende da concentração presente no sangue, a qual, por sua vez, é consequência da dose, frequência de consumo e via de administração [107]. No entanto, alguns resultados sugerem que as propriedades físico-químicas das várias substâncias têm igualmente influência na quantidade e taxa de incorporação [261]. A maioria das drogas são bases fracas ou ácidos que estão presentes no sangue em ambas as formas, ionizada e não ionizada. As membranas plasmáticas apresentam baixa permeabilidade a moléculas polares [261]. Assim, as moléculas ionizadas raramente são capazes de penetrar na membrana lipídica das células. São as moléculas livres não ionizadas e suficientemente lipossolúveis as que se difundem, mais facilmente, através da membrana das células, como já

referido. Estas moléculas atravessam a membrana por difusão passiva devido à sua solubilidade e à interação com o ambiente hidrofóbico da bicamada lipídica, sendo o processo directamente proporcional ao gradiente de concentração através da membrana e ao coeficiente de partição lípido/água da droga em causa. No interior da célula a molécula de droga sem carga pode dissociar-se, dependendo do valor de pK_a . Num meio ambiente em particular, a dependência do pH na dissociação e na solubilidade da substância pode originar distribuição desigual da droga por compartimentos com valores de pH diferentes, favorecendo a acumulação das moléculas básicas indissociadas em compartimentos com elevada concentração de H^+ . O ponto isoeléctrico das fibras queratinizadas de cabelo é próximo do pH 6 e indica a natureza ácida do cabelo [261]. Está demonstrado que as drogas básicas tais como a COC ($pK_a=8,6$), MOR ($pK_a=8,1$) e AP ($pK_a=9,9$) são facilmente incorporadas a partir do sangue (pH 7,4) para o cabelo (pH 5,5), por oposição aos compostos ácidos tais como o Δ^9 -THC-COOH com um baixo pK_a [53].

Regra geral, as drogas surgem no cabelo 4 a 7 dias após o seu consumo ficando retidas por forças iónicas [328]. Deste modo, as diferenças de carga da droga afectam a quantidade retida. Uma vez que o cabelo contém aminoácidos carregados negativamente, as espécies aniónicas tais como o Δ^9 -THC-COOH são pouco retidas [328], enquanto que as substâncias cationicas tais como as tintas para cabelo e a maioria das drogas de abuso, podem ligar-se em elevadas concentrações [328]. Por vezes a baixa razão de incorporação das drogas ácidas é compensada pela elevada concentração sanguínea que pode ser centenas de vezes superior à das drogas básicas.

No cabelo abundam aminoácidos que formam ligações transversais S-S (ex. cistina) estabilizando o entrelaçado da fibra proteica. As drogas que se difundem para o cabelo podem ligar-se deste modo, no entanto este mecanismo é sobretudo mais favorecido para os catiões divalentes que podem formar rapidamente ligações covalentes directas, estáveis [107].

1.1.4 - Vantagens e desvantagens do uso do cabelo comparativamente ao sangue e à urina

Por continuarem a ser, a urina e o sangue, as matrizes mais utilizadas na detecção de medicamentos e drogas de abuso resumimos, comparativamente, características inerentes às mesmas e às da matriz cabelo (Tabela 1.2).

Tabela 1.2 - Características das principais matrizes utilizadas em exames toxicológicos - comparação com o cabelo (adaptado de [13, 35, 98, 183, 203, 333, 364]).

Matriz	Características
Sangue	<ul style="list-style-type: none"> • Obtenção por procedimentos invasivos • A colheita da amostra tem de ser efectuada por pessoal especializado e exige equipamento específico • Amostra disponível em pequenas quantidades • A obtenção de uma segunda amostra, num momento diferente da primeira, não pode servir de contra-análise • Alteração da amostra à temperatura ambiente • O transporte e armazenamento da amostra exige cuidados especiais de acondicionamento e refrigeração • Existência de risco de falsificação por abstinência temporal ou adulteração da amostra • Níveis de concentração das drogas baixo • A análise determina apenas a quantidade absoluta. Não permite identificações retrospectivas. • Geralmente apenas apresenta resultados positivos num curto período de tempo após o consumo- Janela de detecção de horas • São necessários apenas minutos, após o consumo, para que a droga e/ou os metabolitos possam ser detectáveis
Urina	<ul style="list-style-type: none"> • Obtenção por procedimentos invasivos (ainda que em menor escala, por comparação com o sangue) • Não é necessário pessoal especializado para a colheita da amostra • Amostra disponível em grandes quantidades • A obtenção de uma segunda amostra, num momento diferente da primeira, não pode servir de contra-análise • Alteração da amostra à temperatura ambiente • O transporte e armazenamento da amostra exige cuidados especiais de acondicionamento e refrigeração • Existência de risco de falsificação por abstinência temporal ou adulteração da amostra • Níveis de concentração das drogas e metabolitos elevado • A excreção das drogas é afectada pela diluição e pH da urina • Contém metabolitos • A análise determina apenas a quantidade total. Regra geral não permite identificações retrospectivas. • Apresenta resultados positivos, no período de tempo após o consumo, de dias ou várias semanas- Janela de detecção de dias a semanas • São necessários minutos, após o consumo, para que a droga e/ou os metabolitos possam ser detectáveis
Cabelo	<ul style="list-style-type: none"> • A obtenção da amostra pode ser efectuada sob observação sem invadir a privacidade do indivíduo • Não é necessário pessoal especializado para a colheita da amostra • Amostra geralmente disponível em grandes quantidades • Possibilidade de obter uma segunda amostra, num momento diferente, para efeitos de identificação do xenobiótico, comparação ou contra-análise. • Estabilidade da amostra e dos analitos presentes na mesma, (ausência de metabolismo da droga no cabelo) inclusive em condições ambientais adversas • Possibilidade de armazenamento da amostra sem refrigeração, quase de forma indefinida • Inexistência de risco de falsificação por abstinência temporal ou adulteração da amostra • É um dos veículos principais de excreção de substâncias do corpo humano; as concentrações das substâncias eliminadas podem atingir níveis dez vezes superiores aos encontrados no sangue e urina • Além de metabolitos, contém sobretudo a droga mãe • A análise proporciona informação sobre o tempo e a intensidade de consumo (estimar a partir da droga recuperada no cabelo a quantidade envolvida no consumo – relação entre dose consumida/dose recuperada*) [222]. Permite uma identificação retrospectiva. • Grande janela de detecção (maior que 3 dias- meses/anos) dependente do comprimento da haste do cabelo. Identificação retrospectiva longa de classes de drogas que normalmente desaparecem rapidamente do sangue ou do plasma. • Permite o estudo de um consumo crónico e a determinação do perfil farmacológico do indivíduo. • São necessários alguns dias após o consumo para que a droga seja detectável

* está ainda limitado devido a diferenças interpessoais.

Como hipótese de trabalho, o cabelo é visto como um “monitor integrador” das drogas presentes na corrente sanguínea e da sua concentração, a qual depende, sobretudo, da quantidade ingerida, da via de administração, do metabolismo, excreção e distribuição a outros compartimentos [333].

Podemos considerar a análise de drogas e metabolitos em cabelo como um método complementar ao da análise ao sangue e à urina. A urina permite identificar um consumo recente de vários dias a uma semana (excepcionalmente mais, para alguns compostos como a *Cannabis* [165]). A análise ao sangue é a mais credível quando se pretende determinar o grau de influência exercido pela droga, no momento da colheita [111]. As amostras de cabelo documentam o consumo de drogas durante períodos de tempo muito prolongados, cuja duração pode oscilar entre uma semana a vários meses ou mesmo anos, estando limitado pelo comprimento do cabelo [98, 162, 168, 203]. Apesar das janelas de detecção do sangue e da urina não se sobreporem à do cabelo (Figura 1.2), as análises ao cabelo podem ser usadas para validar um resultado positivo de análise à urina [148]. Além disso, em caso de necessidade, é possível, na maioria dos casos, estimar aproximadamente o grau de exposição e o tempo do uso de uma droga, medindo a concentração da mesma em segmentos sequenciais de cabelo [149, 203, 222, 344].

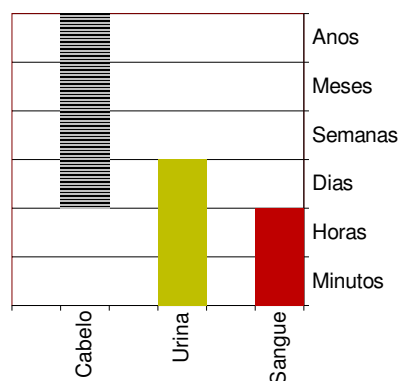


Figura 1.2 - Janelas de detecção das matrizes cabelo, urina e sangue (adaptado de [35]).

1.1.5 - Possíveis aplicações da análise de drogas e metabolitos

A testagem de drogas tem-se alargado do quadro clínico original, em que os resultados visavam a melhoria dos cuidados terapêuticos do adicto, para outras áreas da sociedade tais

como segurança nos locais de trabalho, ciência forense, prisões, medicina das companhias de seguros, condução sob o efeito de drogas e programas “anti-doping” no desporto.

O acréscimo de dados, numa análise de drogas e metabolitos em cabelo, relativamente aos conseguidos noutras matrizes, fazem com que, nos nossos dias, seja reconhecido como o terceiro espécime biológico para testagem de drogas, a seguir à urina e ao sangue [231].

Na literatura podemos constatar que as circunstâncias em que são solicitadas análises de drogas ou outros compostos em cabelo são diversas e dependem do quadro legal vigente em cada país. A aplicabilidade, em qualquer circunstância, é decorrente da possibilidade em se obter um registo das exposições repetidas ou crónicas, tornando possível o estabelecimento do perfil de consumo de um indivíduo a longo termo e a sua evolução [149]. A título de exemplo referem-se algumas situações em que foram aplicadas e que, por uma questão de sistematização, se englobaram em cinco classes (Tabela 1.3) não pretendendo, de forma alguma, negar o relacionamento que eventualmente exista entre elas.

Tabela 1.3- Exemplos de aplicações de análises ao cabelo.

Área de aplicação	Exemplos	Referência
Clínica	Exposição a drogas durante o período intra-uterino	[26, 107, 148, 164, 165, 168, 173, 182]
	Programas de terapia de toxicodependentes	[26, 107, 148, 193]
	Triagem do uso de drogas por atletas	[107, 163, 168, 274]
	Avaliação da exposição a drogas	[107, 163]
	Monitorização de drogas terapêuticas e determinação do historial de medicação	[16, 99, 148, 211, 262, 342]
	Estudos de correlação entre a concentração no cabelo e o efeito da droga	[231]
Ambiental/ ocupacional	Diagnóstico clínico	[12, 34, 204, 271, 286, 360]
	Acompanhamento da exposição ocupacional, de agentes policiais, a drogas	[204]
	Identificação de consumidores de drogas (trabalhadores e em situação de pré-emprego)	[16, 60, 255]
	Exposição a toxinas	[16]
Forense e judicial	Técnica consultiva nos tribunais (crimes)	[107, 199]
	Concessão e restituição de cartas de condução	[210, 218, 286, 330, 336]
	Confirmação de declarações judiciais relativas a consumo de drogas	[210, 367]
	Determinação de tipos de consumo	[344]
	Distinção entre consumidor e traficante	[344]
	Testes <i>postmortem</i>	[71, 87, 286, 333]
	Confirmação de delitos sob influencia de drogas	[89, 210]
	Decisão na atribuição da custódia de crianças e em adopções	[182]
	Identificação de corpos	[87]
	Tecnologia de monitorização em vários contextos de justiça criminal (ex. supervisão da liberdade condicional)	[16, 77, 204]
Epidemiológica	Condução sob influencia de drogas	[53, 89, 330]
	Controlo oficial do doping no desporto	[151, 155, 231, 274]
	Estudo da exposição de populações a drogas	[145, 268, 273]
Estudos históricos e antropológicos	Determinação do uso de drogas pelo Homem, no passado mais ou menos recente (ex. populações pré-históricas, múmias)	[7, 17, 317]

CAPÍTULO 2

Noção de droga e algumas classificações

2.1 - NOÇÃO DE DROGA

O termo droga é amplo e antigo. Teve origem a partir da palavra do holandês antigo “droog” (folha seca). Utilizou-se na farmacologia clássica designando medicamento no estado bruto, tal como aparece na natureza [223]. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (1961) “droga é qualquer substância que introduzida num organismo vivo, pode modificar uma ou várias das suas funções” [223, 238, 272]. Baseados nesta definição considera-se qualquer medicamento uma droga (penicilina e heroína (HERO) encontram-se no mesmo grupo).

Em 1982, a OMS, na tentativa de delimitar as substâncias que produzem dependência utilizou o termo “droga de abuso” referindo-se a um tipo de substâncias de uso não médico com efeitos psicoativos (capazes de produzir alterações no estado de percepção, no estado de ânimo, na consciência e no comportamento) criando hábito de consumo e apresentando uma sintomatologia psíquica e/ou de dependência [223, 238].

Actualmente, desde a perspectiva médica à científica, o termo droga é utilizado para designar um conjunto de substâncias que verificam as seguintes condições [223]:

- introduzidas no organismo são capazes de alterar ou modificar uma ou várias funções psíquicas (carácter psicotrópico ou psicoactivo);
- induzem auto-administrações repetidas, pelo prazer que causam;
- a cessação do seu consumo causa grande mal estar físico e/ou psíquico (dependência física e/ou psíquica);
- não têm indicação médica e se a possuem podem ser usadas com fins não terapêuticos.

2.2 - CLASSIFICAÇÃO DAS DROGAS

Existem vários critérios para classificar as drogas. O criador da psicofarmacologia moderna Louis Lewin [181] classificou-as, em 1924, em cinco tipos: *eufórica* (ópio e seus derivados e COC), *fantástica* (mescalina, marijuana...), *inebriante* (álcool, éter, clorofórmio, benzina...), *hipnótica* (barbitúricos e outros soporíferos) e *excitante* (café, cafeína, tabaco, cola...). Desde então, têm surgido classificações mais complexas.

A característica comum e mais importante das drogas psicoactivas é a sua acção sobre o sistema nervoso central (SNC) [298]. Deste modo, é vulgar encontrar-se uma classificação simples baseada na acção predominante sobre o SNC surgindo, assim, o agrupamento das drogas em três categorias [255, 270, 298]:

- Depressoras - Substâncias com efeito depressor do SNC (substâncias psicolépticas), como por exemplo os opiáceos (ex. HERO, MOR, COD, ópio), medicamentos ansiolíticos (ex. BZD, buspirona), solventes, e outros tranquilizantes e hipnóticos (ex. barbitúricos, BZD). Moral & Fernández [223] incluem também nesta categoria o álcool. Estas drogas enfraquecem a actividade nervosa e diminuem o ritmo das funções corporais.

- Estimulantes - Substâncias com efeito estimulante do SNC (substâncias psicoanalépticas), como por exemplo a coca e os seus derivados, anfetaminas, cafeína, nicotina e as chamadas drogas de desenho. Estas drogas excitam a actividade nervosa e incrementam o ritmo das funções corporais.

- Alucinogénias - Substâncias com efeito perturbador do SNC (substâncias psicodislépticas), como a *Cannabis* (erva, resina, óleo), os alucinogénios (ácido lisérgico (LSD)) e determinados medicamentos que secundariamente podem ter efeitos perturbadores. As drogas *Cannabis* e LSD são consideradas as representantes mais características da classe psicodisléptica que se caracteriza pela inclusão de drogas causadoras de deformação da percepção. Alguns autores incluem, nesta categoria, o etanol.

Na literatura são apresentadas outras classificações de base única. Atendem a aspectos químicos, farmacológicos ou bioquímicos, ao uso clínico ou à origem. Relativamente a este último critério são estabelecidas três classes:

- Substâncias naturais - Substâncias de origem natural onde também se incluem os seus produtos psicoactivos desde que não exijam um tratamento complexo. Pertencem a esta classe a maior parte das drogas de uso mais frequente tais como os produtos da planta *Cannabis*, bebidas alcoólicas e ópio.

- Substâncias semi-sintéticas - Substâncias produzidas com base noutras naturalmente psicoactivas que ocorrem naturalmente (ex. HERO a partir de MOR).

- Substâncias sintéticas - Substâncias que não existem na natureza e que são sintetizadas a partir de outras, como por exemplo o *ecstasy*, anfetaminas, BZD, barbitúricos.

Em 1975, a OMS sugeriu uma classificação em oito grupos, que continua actual, e à qual Moral & Fernández [223] adicionaram um grupo: as drogas de desenho (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Classificação das drogas segundo a OMS (1975) completada com a de Moral & Fernández (adaptado de [223]).

Grupo	Nome	Exemplos
1º	Opiáceos	Ópio e derivados naturais, semi-sintéticos ou sintéticos.
2º	Psicodpressores	Barbitúricos, benzodiazepinas e análogos.
3º	Álcool etílico	
4º	Psicoestimulantes major	Cocaína e derivados (<i>crack</i>), anfetaminas e derivados.
5º	Alucinogénios	LSD, mescalina, psilocibina.
6º	<i>Cannabis</i>	Marijuana, haxixe, óleo
7º	Substâncias voláteis	Solventes voláteis como o tolueno, acetona, gasolinas, éter, óxido nitroso.
8º	Psicoestimulantes minor	Tabaco, infusões com cafeína, colas.
9º	Drogas de desenho (Estimulantes de síntese)	Ecstasy (MDMA), “Eva” (MDEA), Pílula do amor (MDA).

MDMA- 3,4-metilenadioximetanfetamina; MDEA- metilenadioxietilamfetamina; MDA- 3,4-metilenadioxianfetamina

Esta classificação difere pouco da da própria OMS, englobada no sistema de Classificação Internacional de Doenças (ICD-10) de 1992, a qual é defendida actualmente. Na ICD-10 aplica-se o critério de substâncias que podem produzir dependência: álcool, opiáceos, canabinóides, sedativos e hipnóticos, COC e outros estimulantes (incluindo a cafeína), alucinógenos, tabaco e solventes voláteis (Tabela 2.1). A OMS deixa margem para que nesta lista se possam incorporar outras substâncias psicotrópicas.

A Associação Americana de Psiquiatria, na quarta edição do manual de diagnóstico e estatística, (DSM-IV), estabelece como substâncias que podem produzir dependência: álcool; opiáceos; sedativos, hipnóticos ou ansiolíticos; COC; *Cannabis*; AP; alucinogénios; substâncias voláteis; fenciclidina (PCP) e nicotina. Também deixa margem para incorporação, na lista definida, de outras substâncias psicotrópicas.

Adoptando uma perspectiva legal, surge-nos outra classificação onde as drogas se agrupam em quatro categorias [223]:

- Drogas institucionalizadas - a produção e o tráfico são legais;
- Drogas que são medicamentos - substâncias com indicações médicas;
- Drogas de utilização industrial - a sua comercialização é legal mas não são aptas para consumo humano (lacas, solventes, colas);
- Drogas clandestinas - a produção e o tráfico são ilegais.

Como nenhuma base isolada para classificação de drogas é satisfatória, a tendência é para que seja efectuada com base em esquemas híbridos.

O legislador português [70] adopta, relativamente às drogas ilícitas categorias semelhantes às usadas pelas convenções das Nações Unidas (Tabela 2.2). Os critérios são a

utilidade medicinal e a capacidade toxicomanogénica das substâncias no que respeita: ao potencial tóxico (o risco de provocar a morte), à intensidade dos sintomas de abuso, aos riscos de abstinência e ao grau de dependência.

Tabela 2.2 - Classificação simplificada - Convenções das Nações Unidas (adaptado de [350, 351]).

I	HERO, alucinogénios, produtos psicoactivos da <i>Cannabis</i> .	Elevada capacidade toxicomanogénica; baixa utilidade.
II	COD, barbitúricos, anfetaminas	
III	Aspirina com COD	
IV	BZD	Baixa capacidade toxicomanogénica; elevada utilidade.

As tabelas das plantas, substâncias e preparações sujeitas a controlo, constantes na Lei nº 45/96 (regime jurídico aplicável ao tráfico e consumo de estupefacientes, de substâncias psicotrópicas e de precursores) [70] estão, de modo geral, organizadas como se apresenta na tabela 2.3.

Tabela 2.3 - Organização das plantas, substâncias e preparações sujeitas a controlo na legislação portuguesa (adaptado de [70]).

Tabelas	Substâncias
I- A	Ópio, os seus derivados e outros compostos dos quais se possa obter opiáceos naturais
I- B	Folhas de coca, e os seus derivados com efeito estimulante no SNC
I- C	<i>Cannabis</i> e seus derivados com efeitos psicoactivos, assim como as substâncias sintéticas que se lhe assemelhem
II- A	Substâncias naturais ou sintéticas que possam provocar alucinações ou profundas distorções sensoriais
II- B	Substâncias do tipo anfetamínico que tenham efeitos estimulantes no SNC. Estão incluídos isómeros do Δ^9 -THC
II- C	Substâncias do tipo barbitúrico de absorção rápida e de acção curta, e outras substâncias do tipo hipnótico não barbitúrico
III	Preparações que contenham substâncias inseridas na tabela I-A, quando pela sua composição qualitativa e quantitativa apresentem riscos de abuso
IV	Medicamentos epilépticos comprovados, e substâncias ansiolíticas que pela composição qualitativa e quantitativa apresentem riscos de abuso

Das inúmeras classificações possíveis, algumas mais adaptadas à investigação, outras mais conformes com o aspecto farmacológico, apresentamos uma classificação, a que se julga ser útil para no nosso trabalho de análise de drogas e metabolitos em cabelo (Tabela 2.4).

Tabela 2.4 - Classificação das drogas (adaptado de [70, 255, 270, 298, 299, 338]).

Tipo de Droga	Definição/Principais efeitos	Sinónimos	Exemplos
<i>Sedativos ansiolíticos, Sedativos hipnóticos</i>	Causam sono e reduzem a ansiedade	Hipnóticos, sedativos, tranquilizantes minor	Barbitúricos, BZD, etanol, metaqualona ¹
<i>Antipsicóticos</i>	Eficazes no alívio dos sintomas de doença esquizofrénica	Neurolépticas, antiesquizofrénicas, tranquilizantes major	Fenotiazinas e butirofenonas
<i>Antidepressivos</i>	Aliviam os sintomas de doença depressiva	Timolépticos	Antidepressivos tricíclicos, tetracíclicos e outros.
<i>Estupefacientes Analgésicos e outros</i>	Euforia; redução da tensão e ansiedade; indiferença à dor física e psíquica; redução da acuidade visual; diminuição da concentração; possível psicose e depressão respiratória	Analgésicos opiáceos; Opióides e derivados da morfina	COD, HERO ⁴ , metadona , meperidina, levorfanol, nalbufina, pentazocina, MOR, ópio , hidromorfona, oximorfona, oxicodona, butorfanol, buprenorfina
<i>Estimulantes psicomotores</i>	Causam euforia	Psicoestimulantes	AP ² , COC , cafeína, nicotina, MA ² , metilfenidato ²
<i>Alucinogénios e outros</i>	Causam distúrbio da percepção (particularmente alucinações visuais) e do comportamento	Drogas psicodislépticas, agentes psicotomiméticos	Dietilamida do LSD ⁴ , mescalina ⁴ , PCP e análogos, psilocibina
		<i>Cannabis</i> ³	Resina, erva e óleo da Cannabis ⁴ , Δ^9-THC (em doses muito elevadas)
		Anfetamina alucinogénia	DOB ⁴ , DOM ⁴ ,
		Grupo ecstasy	MDA ⁴ , MDMA ⁴ , MDE ⁴

¹ Retirado do mercado farmacêutico, em vários países, como sedativo hipnótico devido aos problemas causados pelo abuso [270].

² Não se encontra licenciada em Portugal [123].

³ Geralmente com efeitos depressivos mas, como os estimulantes, aumenta a frequência cardíaca.

⁴ Sem uso médico aprovado [255, 270].

A negrito indicam-se as drogas de abuso mais comuns [255].

A sublinhado indicam-se os compostos alvo na parte experimental desta dissertação.

MA- Metanfetamina; DOB- 2,5-dimetoxi-4-bromoanfetamina; DOM- 2-amino-1-(2,5-dimetoxi-4-metil) fenil propano.

CAPÍTULO 3

**Grupos de drogas terapêuticas e
não terapêuticas que constam do
estudo a realizar**

3.1 - BENZODIAZEPINAS

3.1.1 - Introdução

Devido à sua ampla aplicabilidade, a análise de medicamentos em cabelo pode constituir uma ferramenta útil em diversas áreas. É disso exemplo a possibilidade da sua utilização para monitorização de compostos, verificação do cumprimento dum programa de prescrição medicamentosa [178], estabelecimento da história individual de consumo, identificação de causas de morte, quando as matrizes clássicas se encontram indisponíveis (ex. corpos em elevado estado de decomposição) [87, 333].

As BZD são substâncias depressoras do SNC e incluem-se no grupo dos fármacos ansiolíticos e hipnóticos [270].

Atendendo à sua estrutura química classificam-se em vários grupos [76, 120, 299, 353]. As BZD clássicas baseiam-se na estrutura 5-aryl-1,4-benzodiazepina, caracterizada por um anel de benzeno fundido nas posições 10- e 11- a um anel 1,4-diazepina [76] (Figura 3.1), derivando daqui o termo benzodiazepina. Na maioria dos casos, os átomos de azoto encontram-se na posição 1,4 do anel diazepínico, pertencendo deste modo, o DIAZ e o NORDIAZ ao grupo das 1,4 benzodiazepinas [120, 353]. Focalizaremos a nossa abordagem neste grupo e no das 7-nitro-1,4-benzodiazepinas (nitrobenzodiazepinas – possuem uma nitro-substituição no anel de benzeno isto é, na posição R₇ existe um grupo NO₂ [76, 120]), por ser neles que se incluem as BZD alvo do nosso trabalho: DIAZ, NORDIAZ (N-Desmetildiazepam) e FLU [72, 200].

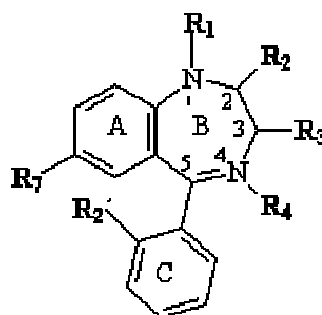


Figura 3.1 - Estrutura de base das 1,4-benzodiazepinas e dos seus principais locais de substituição (adaptado de [340, 353]). A - Anel de benzeno; B - Anel diazepínico; C - Grupo fenilo [76].

Contrariamente ao verificado para o DIAZ e NORDIAZ, o FLU apresenta na posição 2 (R₂) do grupo fenilo (C), um átomo de flúor e, na posição 7 do anel de benzeno, um grupo NO₂ (Figura 3.2 e Figura 3.3).

O DIAZ e o FLU são drogas básicas [87, 239 241]; o NORDIAZ é uma droga neutra [87].

As BZD são utilizadas com fins terapêuticos [49, 76, 196, 270], constituindo os medicamentos mais prescritos em todo o mundo destinados ao alívio da ansiedade e à indução do sono [72, 299, 370].

Paralelamente à prescrição terapêutica observa-se uma tendência ao abuso [76] como forma de reduzir a tensão quotidiana e de desfrutar o repouso nocturno [270].

O uso incorrecto, com vista a usufruir das propriedades ansiolíticas ou tranquilizantes, pode ocorrer isoladamente ou em associação com o álcool, morfínomiméticos (analgésicos e antitússicos), antidepressivos, sedativos, neurolépticos ou drogas de abuso [48, 49, 54, 72, 74] (ex. COC, *Cannabis*, opiáceos [72, 74], AP [74]). O DIAZ é o composto alvo de maior abuso quer pela facilidade de administração (absorção óptima por via oral) quer pela sua capacidade indutora de euforia discreta e sensação de complacência (sobretudo se combinado com o álcool [270]) e, ainda, por ser relaxante muscular.

A capacidade das BZD alterarem o estado de espírito, combinada com a de retardar os efeitos do síndrome de abstinência a opiáceos, favorece à sua disponibilidade no mercado das drogas ilícitas [200].

Observações clínicas têm confirmado que as BZD são alvo de uso incorrecto por utilizadores de polidrogas [48, 55, 72, 74, 76, 246] verificando-se, a nível mundial, um aumento do seu abuso [186, 370]. Detectam-se, particularmente, em indivíduos que frequentam programas de tratamento com metadona [72, 248].

O FLU é salientado por figurar entre os compostos que mais frequentemente se encontram na posse de adictos de HERO, bem como, pela elevada percentagem do seu consumo entre esses indivíduos [28, 48, 55]. Os resultados obtidos por Druid *et al.* [74] verificando a presença concomitante de FLU e de anfetaminas, ou de opiáceos ou de outra droga ilícita, nos casos de condução sob influência de drogas e nos casos de abuso de drogas ilícitas, sugerem que o FLU é um composto consumido por toxicodependentes. Trata-se de uma substância dez vezes mais potente do que o DIAZ [239].

A indústria farmacêutica sintetiza cerca de 2000 BZD, as quais diferem na velocidade de absorção, duração e potência da acção. As encontradas no mercado ilícito são, sobretudo,

desviadas do comércio legítimo e, apenas uma pequena fracção, resulta da síntese em laboratórios clandestinos [299].

3.1.2 - História

Data de 1961 a síntese da molécula original, o clordiazepóxido, protótipo de cerca de dois mil produtos diferentes entre os quais se usam, amplamente em todo o mundo, cerca de trinta [270].

Quase de uma forma simultânea à comercialização do clordiazepóxido, surgiram no mercado o DIAZ, FLU, oxazepam e lorazepam, as chamadas “benzodiazepinas clássicas”. Posteriormente apareceram as “benzodiazepinas de segunda geração” todas elas precursoras metabólicas do NORDIAZ (responsável pelos efeitos farmacológicos) e praticamente análogas entre si relativamente ao tipo e duração dos efeitos. Com um anel suplementar, as “benzodiazepinas da nova geração” são as mais recentes no mercado [270].

3.1.3 - Efeitos

Acções farmacológicas e reacções adversas

Os seus efeitos variam desde sedação e indução do sono, passando pela hipnose até à anestesia geral [299].

As BZD desencadeiam no SNC cinco tipos de efeitos [191]:

1- Ansiolítico (redução da ansiedade e da agressão). A sedação é produzida com a administração de pequenas doses dos preparados. Ocorre diminuição da actividade motora espontânea e da capacidade de pensar.

Um comportamento desinibido é conseguido com doses superiores às sedantes [2]. Há perda do autocontrolo e ocorre alteração do exercício mental.

2- Hipnótico (indução do sono). A dose óptima para induzir o sono é variável, dependendo do estado psicológico e fisiológico do indivíduo [2]. Existe um aumento do tempo total do sono e da eficácia do sono [295]. Obtém-se com a administração de doses mais elevadas relativamente às produtoras do efeito ansiolítico [191].

3- Anticonvulsivante. Todas as BZD produzem este efeito [270], no entanto, no controlo de convulsões são geralmente usadas BZD de acção ampla, como o clordiazepóxido [2] e o DIAZ.

4- Amnésiante. Ocorrência de memória insuficiente dos factos, no prazo de duração do efeito do medicamento [2]. Produz-se sobretudo com o uso de BZD de vida curta [191].

5- Miorrelaxante. Redução do tónus muscular e coordenação. A dose necessária para produzir miorrelaxamento é semelhante à que produz sedação, daí a limitação no seu uso [295]. O FLU reduz a rigidez muscular, em gatos [270].

A sonolência mais ou menos marcada depende da sensibilidade do indivíduo, da dose administrada, da meia-vida do fármaco em causa, da existência de metabolitos activos e da sua meia-vida. Como tranquilizantes e hipnóticos são responsáveis por modificações no comportamento psicomotor ocasionando capacidades reduzidas ou alteradas de reacção [312].

Todas as BZD têm potencial para induzir tolerância, dependência física e psíquica [2, 123, 191, 301]. Estes efeitos manifestam-se em indivíduos consumidores de doses elevadas durante longos períodos de tempo [2, 191] ou em condições favoráveis (dependência de outros medicamentos, álcool...) com suspensão, mais ou menos abrupta, da administração ou mudança de substância [191].

A intoxicação aguda por BZD pode causar sonolência, debilidade muscular, confusão mental e coma [2]. Apesar de serem raros [2, 340] os casos de morte por intoxicação aguda isoladamente, devido à incapacidade destes fármacos produzirem inibição cardiorespiratória, estes podem ocorrer com FLU, DIAZ, nitrazepam, alprazolam, triazolam, temazepam e flurazepam, observando-se mais frequentemente com BZD de acção curta e intermédia [340]. O consumo simultâneo de outros depressores do SNC (ex. álcool, opiáceos, antidepressivos, neurolépticos, barbitúricos) pode causar depressão respiratória grave capaz de ameaçar a vida [270].

As BZD revelam-se com elevado interesse para os toxicologistas devido ao seu uso frequente e ao seu potencial efeito perturbador no desempenho, nomeadamente na condução de veículos motorizados (automóveis, motas, aviões, etc.), no manuseamento de máquinas (em ambiente laboral) [2, 115, 196] especialmente em combinação com o álcool [312] e, também, porque podem, como já se referiu, conduzir à dependência [2, 123, 301] ou causar intoxicação [2, 270, 301]. Estão associadas não só a acidentes rodoviários e laborais mas também a casos de suicídio, assassinato, e envenenamento agudo [2, 29, 49, 65, 270]. Verifica-se uma

associação significativa entre utilização de tranquilizantes menores e o risco de acidentes rodoviários graves [191, 312].

Na tabela 3.1 refere-se a duração de acção das BZD incluídas no nosso estudo. Esta é inversamente proporcional ao potencial de indução de dependência. Assim, as BZD de curta duração de acção são as que têm maior potencial de induzir dependência [123].

Tabela 3.1 – Duração de acção de algumas BZD (adaptado de [340]).

Substâncias farmacêuticas mais comuns	Duração da acção*
DIAZ (Valium)	Longa
NORDIAZ (Sopax)	Longa
FLU (Rohypnol)	Intermédia

* Curta: meia-vida < 10 horas; Intermédia: meia-vida 10-24 horas; Longa: meia-vida > 24 horas

3.1.4 - Indicações clínicas

As BZD podem ser usadas:

- Como hipnóticos (ex. tratamento de insónia): utilização a curto prazo de, por exemplo, temazepam ou flurazepam [191, 270] ou FLU [29, 55, 74, 239]. Prescrevem-se essencialmente moléculas com meia-vida curta [190, 271].
- Como ansiolíticos (ex. tratamento de estados de ansiedade): utilização a curto prazo (ansiedade grave) de, por exemplo, DIAZ ou clordiazepóxido; Prescrevem-se essencialmente as moléculas com meia-vida longa [190, 271].
- Como anticonvulsivo (ex. tratamento de convulsões epilépticas). O DIAZ é empregue na rotina pela sua acção anticonvulsiva [270].
- Na pré- medicação operatória e na indução da anestesia geral. Utiliza-se o midazolam [123, 270]. O FLU é também usado pelas suas propriedades anestésicas [55, 74, 239].
- Como relaxantes musculares (ex. tratamentos de espasmos musculares). O tetrazepam é prescrito exclusivamente como miorrelaxante [270] e o DIAZ é também utilizado.

3.1.5 - Situação Portuguesa

Em Portugal, são comercializadas pela indústria farmacêutica, 28 classes de BZD (Tabela 3.2) onde se incluem o DIAZ (Bialzepam, Diazepam, Metamidol, Stesolid, Unisedil,

Valium), FLU (Rohypnol e Sedex) e NORDIAZ (Sopax) [123]. As mais vendidas são o alprazolam (Xanax), o lorazepam (Lorenin) e o bromazepam (Lexotan) [122].

Como se apresenta na tabela 3.2 as BZD distinguem-se, principalmente, entre hipnóticas e ansiolíticas. Esta classificação é considerada artificial uma vez que todas elas são ansiolíticas e podem modificar o sono desde que se atinjam doses eficazes. Torna-se contudo importante referir que as hipnóticas podem modificar o sono em doses relativamente baixas; as ansiolíticas são fármacos menos potentes permitindo uma acção ansiolítica sem interferir significativamente com o sono [123].

Tabela 3.2 - Classes de BZD comercializadas em Portugal e principais indicações (adaptado de [29, 123, 191, 270]).

Depressores do SNC benzodiazepínicos	
Principais indicações: Hipnóticos (Usados para o tratamento da insónia)	
	Brotizolam
	Estazolam
	FLU
	Flurazepam
	Loprazolam
	Lorazepam
	Lormetazepam
	Nitrazepam
	Quazepam
	Temazepam
	Triazolam
Principais indicações: Ansiolíticos (Usados para tratar sintomas de ansiedade)	
	Alprazolam ¹
	Bromazepam
	Cetazolam
	Clobazepam
	Clorazepato de potássio
	Clordiazepóxido
	Cloxazolam
	DIAZ ²
	Halazepam
	Loflazelato de Etilo
	Lorazepam ³
	Medazepam
	Mexazolam
	NORDIAZ
	Oxazepam
	Prazepam
	Tofisiopam
Principais indicações: situações relativas a cirurgias/anestésias	
	Midazolam

¹Também usado como antidepressivo

²Também usado como anticonvulsivante e relaxante muscular

³Também usado na terapêutica adjuvante da anestesia e em estado de mal epilético

3.1.6 – Farmacocinética

Administração, metabolismo e eliminação

Na tabela 3.3 resumem-se as principais características das BZD incluídas no nosso estudo.

Tabela 3.3 - Características das BZD incluídas no nosso estudo (adaptado de [2, 123, 270, 295, 340]).

Benzodiazepina/ Metabolitos activos	Principal indicação	Dose diária aproximada (mg) (2)	Meia-vida plasmática do composto original (horas)	União a proteínas (%)	Lipos- -solubilidade	Níveis terapêuticos no plasma (g/L)	Principais metabolitos na urina (3)
DIAZ (1)/ NORDIAZ Oxazepam 3-Hidroxi-diazepam	Anticonvulsivante	5-40	Longa (20-50)	96-98	1,0	100-1500	Oxazepam Temazepam
NORDIAZ (1)/ Oxazepam	Ansiolítico	5-10	Longa (40-60)	98	0,79	100-2000	Oxazepam
FLU/ 7-Aminoflunitrazepam Desmetilflunitrazepam	Hipnótico	0,5-2	Intermédia (9-25)	78	0,31	5-50	7-Aminoflunitrazepam

(1) O NORDIAZ é o metabolito principal destes fármacos e tem uma meia-vida de 60 h; (2) Em função da principal indicação; (3) A maior parte dos metabolitos encontram-se na urina sob a forma de sulfato ou de glucuronato.

A via de administração embora seja normalmente oral [270] pode ocorrer de forma rectal, endovenosa ou intramuscular (ex. DIAZ) [123]. Neste último caso a absorção é lenta [270]. As BZD orais caracterizam-se por uma rápida e completa absorção [191, 270] ao nível do tracto digestivo, sobretudo as que possuem elevada lipossolubilidade como o DIAZ [2, 295], atingindo-se um pico plasmático (concentração plasmática máxima) 1 a 3 horas (h) após a ingestão [270, 295]. A ligação a proteínas plasmáticas é elevada e independente da concentração (ligações hidrofóbicas) [191] (Tabela 3.3).

A maior parte das moléculas sofre no fígado reacções de desmetilação e/ou hidroxilação originando metabolitos activos ou inactivos que são secundariamente glucuronoconjugados. As 1,4-benzodiazepinas, que são hidroxiladas na posição 3, são directamente glucuronoconjugadas [191]. A excreção de metabolitos faz-se essencialmente por via renal, sendo excretada na urina, apenas uma pequeníssima fracção (não ultrapassa 1%) da droga inalterada [191].

As BZD diferem umas das outras na sua farmacocinética e, na maioria delas, originam-se vários metabolitos farmacologicamente activos [29, 122].

O grau de lipossolubilidade é responsável pela duração dos efeitos: moléculas pouco solúveis possuem meia-vida mais prolongada [2].

A Classificação em compostos de acção rápida ou curta, média ou intermédia e prolongada ou longa tem por base a formação, ou não, de metabolitos de acção prolongada e farmacologicamente activos, como por exemplo o NORDIAZ [270]. A meia-vida deste composto, encontrado na via metabólica de muitos benzodiazepínicos, é aproximadamente 60 h, sendo responsável pela tendência de muitos benzodiazepínicos em produzir efeitos cumulativos e longas ressacas, quando administrados em intervalos regulares [270]. Os compostos de acção rápida são os metabolizados directamente por conjugação com o ácido glucurónico [270].

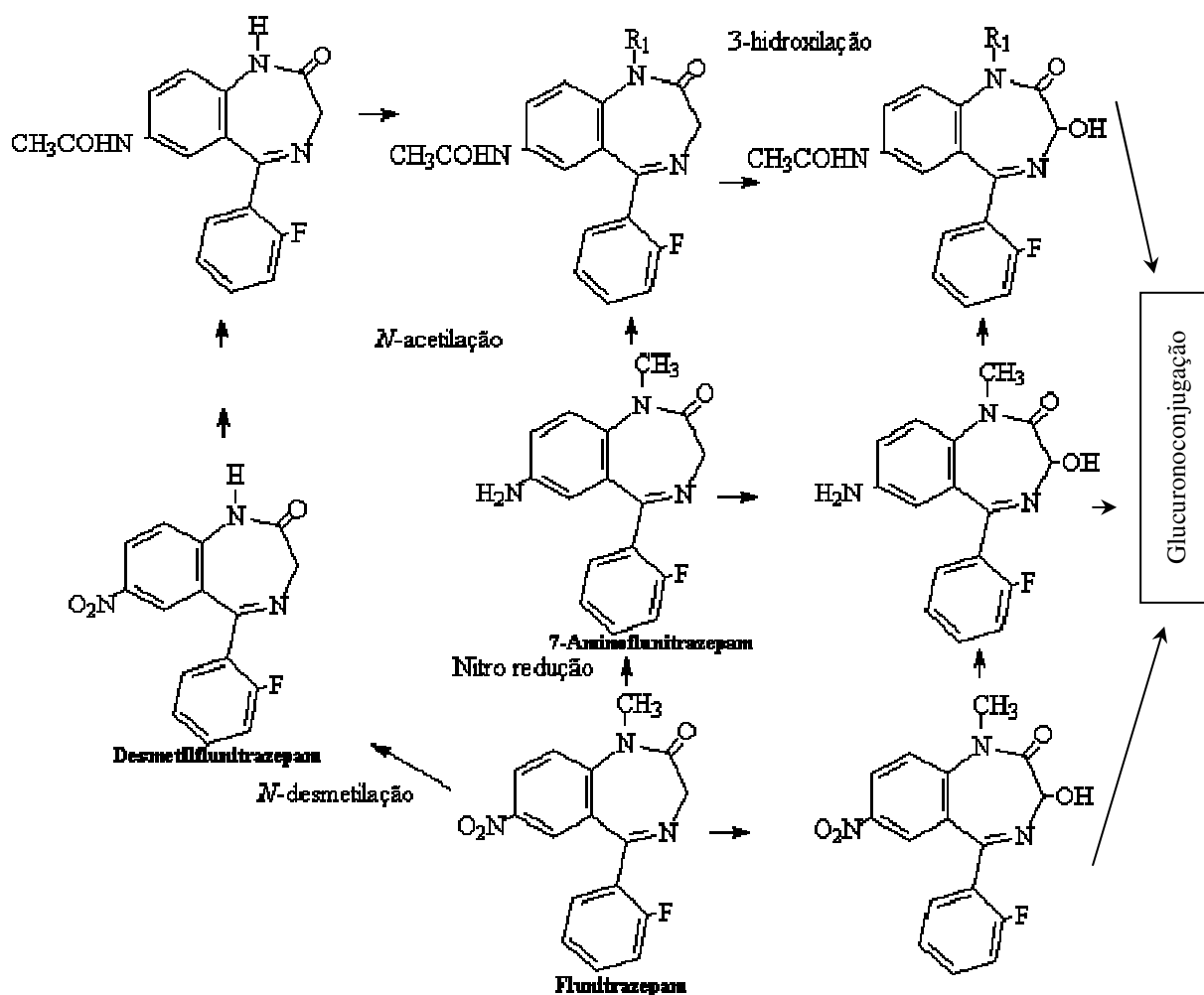


Figura 3.2 - Metabolismo do FLU (adaptado de [120]).

A eliminação faz-se quase exclusivamente por biotransformação seguindo-se excreção urinária [80]. O oxazepam é portanto um dos metabolitos alvo, a pesquisar na urina, para a maioria das 1,4-benzodiazepinas [76].

Todas as nitrobenzodiazepinas originam durante a sua transformação um metabolito 7-amino, o qual será um alvo a pesquisar na urina e no sangue *antemortem* e *postmortem* [76].

O FLU segue a sua biotransformação via *N*-desmetilação, 3-hidroxilação e conjugação ou então redução do grupo nitro a uma amina com subsequente acetilação, 3-hidroxilação e conjugação ou, ainda, redução do grupo nitro a uma amina, 3-hidroxilação e conjugação ou simplesmente 3-hidroxilação e conjugação (Figura 3.2) [55, 120]. Os principais metabolitos são o desmetilflunitrazepam e o 7-aninoflunitrazepam os quais são activos [55], como já se referiu.

O DIAZ é metabolizado a NORDIAZ, por *N*-desalquilação, o qual por sua vez é metabolizado a oxazepam, por 3-hidroxilação (Figura 3.3) [76, 365, 370].

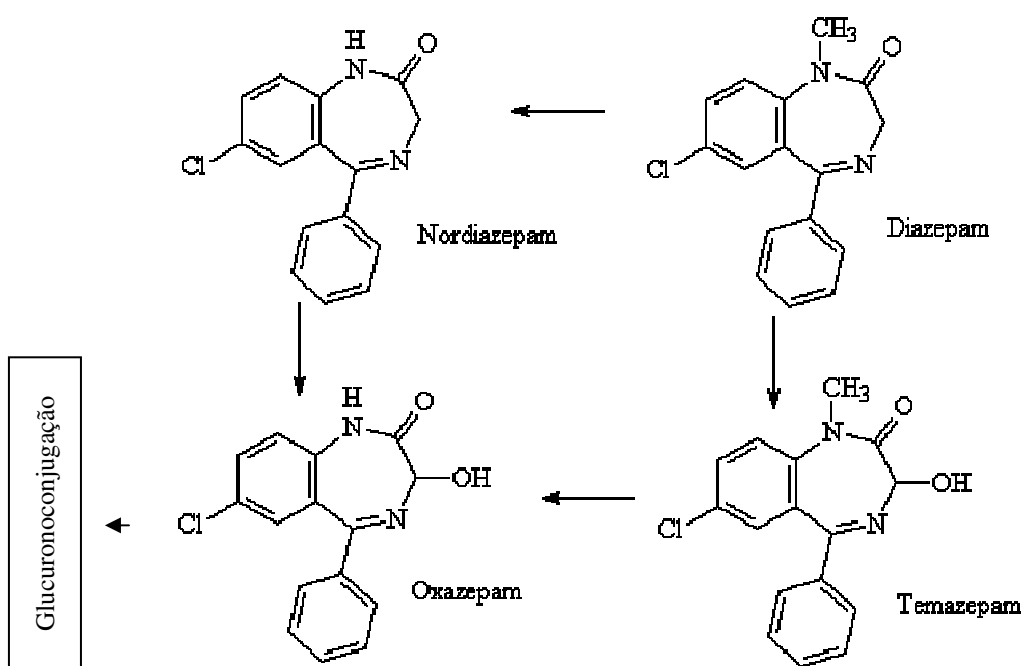


Figura 3.3 - Metabolismo do DIAZ (adaptado de [370]).

O NORDIAZ é um composto que pode estar presente no organismo por consumo como droga mãe ou resultante do metabolismo de outras BZD tais como o DIAZ, prazepam (PRAZ), clorazepato, oxazolam, halazepam, clordiazepóxido e demoxepam [76, 120, 353].

Outros compostos como o ketazolam, camazepam, oxazolam, pinazepam, PRAZ, halazepam e medazepam são prodrugas que são metabolizadas a oxazepam através do DIAZ ou do NORDIAZ ou do temazepam [76].

3.1.7 - Benzodiazepinas na toxicologia

As BZD estão associadas a um conjunto de situações das quais salientamos, intoxicação aguda voluntária ou involuntária, dependência, toxicodependência, problemas amnésicos e reacções de paroxismo [340].

Associado aos casos de intoxicação aguda involuntária ou voluntária destaca-se o FLU [340]. O frequente abuso sexual a indivíduos sob efeito de FLU constituiu um dos factores decisivos para que o mesmo deixasse de ser prescrito nos Estados Unidos da América, sendo banido do circuito farmacêutico [239]. Na Suécia, o FLU foi classificado, em 2001, como substância pertencente à tabela II [74] (categorias estabelecidas nas Convenções das Nações Unidas de 1961 e 1971).

O abuso de BZD é definido como o uso que causa danos e disfunções no bem estar social, ocupacional, emocional, fisiológico ou físico dos pacientes [340]. A dependência relaciona-se com o desenvolvimento de uma tolerância psíquica e síndrome de abstinência, sendo um processo crónico, progressivo, patológico com componentes biopsicossociais que geralmente incluem uma compulsão para o uso, perda de controlo no uso e uso continuado, não obstante as consequências adversas [340].

O baixo custo, a facilidade de obtenção e a capacidade indutora de dependência fazem com que tenham elevado potencial toxicomanogénico [80]. São os medicamentos mais consumidos pelos toxicómanos para que possam reencontrar as sensações produzidas pelos opiáceos ou aliviar os sintomas decorrentes do síndrome de abstinência [80]. Entre as BZD utilizadas com esses fins destacam-se o FLU seguido do clorazepato dipotássico [80].

As BZD são detectadas frequentemente em pacientes com dependência cruzada com outros fármacos ou com o álcool [295]. Os indivíduos alcoólicos e adictos de outros compostos utilizam como droga de abuso, sobretudo, BZD de acção curta ou as mais lipossolúveis (DIAZ, lorazepam, alprazolam, triazolam), devido ao seu efeito mais imediato [295].

Os problemas amnésicos e as reacções de paroxismo são favorecidos pela administração concomitante com o álcool [80]. Os compostos envolvidos, de forma mais frequente, são o FLU, triazolam e lorazepam [80]. Encontram-se referidas na literatura [80] situações de agressões sexuais, de acidentes ou actos violentos em pessoas sob os efeitos produzidos pela administração de FLU combinado com o álcool, e dos quais as vítimas não se conseguem recordar [80]. A rapidez exigida nas investigações toxicológicas urinárias e sanguíneas, por estarem geralmente envolvidas BZD activas a baixas concentrações e com meia-vida curta [80], nem sempre é possível.

Apesar de se mencionarem apenas dois casos em que se detectaram BZD, no total de número de mortes relacionadas com o consumo de drogas em Portugal, em 2003, estes compostos foram referidos por 2% dos utentes, que frequentaram as primeiras consultas destinadas a tratamento, como sendo a droga principal consumida [125].

3.1.8 - Métodos de pesquisa e dosagem em cabelo

A frequente impossibilidade de detecção no plasma ou na urina devido a factores de diluição associados à urina, de tempo desde a toma até à colheita da amostra, ou de dosagem administrada (ex. uma toma em dose terapêutica baixa, como acontece em particular com algumas BZD), pode ser solucionada por uma análise ao cabelo, matriz onde a droga é incorporada e permanece por um período de tempo superior ao de detecção em outras matrizes [239]. Negrusz *et al.* [239] sugeriram ser necessário decorrer, aproximadamente, 7 dias desde a toma até à colheita da amostra de cabelo, para que a mesma possa ser usada na análise, isto é, para que possam ser detectados os compostos consumidos. No entanto, Negruz *et al.* [240] detectaram, em amostras de cabelo, 7-aminoflunitrazepam, 24 h após o consumo de uma única dose de 2 mg de Rohypnol.

A detecção de BZD, as drogas medicamentosas alvo de maior abuso em todo o mundo [48, 160], em cabelo humano não se encontra bem documentada [48, 55].

Na actualidade há referência à análise de várias BZD/metabolitos em cabelo, destacando-se o DIAZ [48, 75, 82, 87, 154, 162, 168, 169, 200, 248, 318, 371, 372], o FLU [48, 54, 55, 75, 82, 162, 168, 239, 240, 344] e o NORDIAZ [48, 75, 82, 87, 160, 162, 168, 200, 248, 354, 371, 372]. A primeira referência à detecção de BZD em cabelo humano data de 1992 e é atribuída a Sramek *et al.* [318]. Na análise foi usado um imunoensaio, o *Abuscreen* RIA, tendo

sido pesquisado DIAZ, em diversas amostras de cabelo colhidas em doze indivíduos consumidores de pelo menos uma das BZD referidas, e em que a dose e a duração do consumo eram conhecidas. Kintz *et al.* [162] também figuram entre os investigadores pioneiros na pesquisa de BZD em cabelo. Na análise utilizaram um imunoensaio, o FPIA, para triagem e a GC/MS para confirmação e quantificação. É aconselhável que se efectue a confirmação dos resultados obtidos pelos imunoensaios [162, 318] por forma a evitarem-se os falsos positivos [162].

Couper *et al.* [67] estabeleceram um procedimento para análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com detecção por UV, de drogas psicotóxicas, em cabelo humano. Esta técnica é considerada, na opinião de Cirimele *et al.* [48], inadequada à detecção de BZD em cabelo. Desta forma, embora possa ser utilizada a análise por HPLC [67, 186, 291, 333], a mesma revela pouca sensibilidade [48] e torna necessário a utilização de uma grande gama de solventes devido à grande variedade de polaridade que as BZD apresentam [186].

Até 1996 foram publicados poucos artigos no âmbito da análise de BZD em cabelo. Destaca-se, na análise, a utilização predominante de imunoensaios, nomeadamente os RIA [162, 246, 318, 338] aplicados apenas em exames de triagem, carecendo de confirmação [333].

A primeira referência à detecção de NORDIAZ em cabelo humano, utilizando GC/MS-NCI, foi efectuada por Kintz *et al.* [160].

A identificação de FLU, em cabelo humano, utilizando GC/MS-NCI, foi pela primeira vez efectuada por Cirimele *et al.* [54]. Este trabalho surgiu face à solicitação efectuada por um juiz, e teve como objectivo determinar se um indivíduo seria, ou não, consumidor crónico de FLU. Cirimele *et al.* [55] estabeleceram um procedimento analítico para detecção de FLU e de um dos seus principais metabolitos, 7-aminoflunitrazepam, em cabelo de utilizadores de polidrogas, utilizando GC/MS-NCI. Negrusz *et al.* [239] desenvolveram e validaram um método de confirmação por GC/MS-NCI, após extracção por fase sólida, dos compostos FLU e 7-aminoflunitrazepam da matriz cabelo.

Há também referência à análise de BZD (onde se incluem o DIAZ, NORDIAZ e FLU) em cabelo humano, utilizando a electroforese capilar (CE) [200, 334, 370] com detecção por UV e por MS. São, no entanto, necessários mais estudos por forma a melhorar a sensibilidade e reprodutibilidade [200, 333]. McClean *et al.* [200] referem que apesar da eficiência separativa obtida pela CE ser superior, comparativamente à utilização da cromatografia líquida (LC), a LC/MS possui sensibilidade superior para identificação das

1,4-benzodiazepinas. Numa análise efectuada por cromatografia líquida acoplada a um detector de espectrometria de massa em *tandem* (LC/MS/MS) obtêm-se LOD's aceitáveis para o DIAZ, NORDIAZ, temazepam e oxazepam, para utilização na rotina laboratorial com objectivos clínicos ou forenses [200]. Kronstrand *et al.* [178] desenvolveram um método de LC/MS/MS para análise de DIAZ, NORDIAZ, FLU e de outras BZD. Concluíram que se trata de um procedimento adequado para detecção de BZD em cabelo.

Kintz & Mangin [169] utilizaram cabelo de recém-nascidos para confirmar a exposição fetal a drogas (BZD e outras). As drogas consumidas, pela mãe, durante a gravidez são transferidas para o feto, através da placenta, ficando retidas no cabelo dos mesmos. Os resultados sugerem que a concentração de drogas no cabelo dos recém-nascidos é superior à presente no cabelo dos adultos (mães), o que possivelmente estará relacionado com a taxa de crescimento e o comprimento do cabelo [169].

Para determinação de BZD são também utilizados, embora com menor frequência do que o cabelo, pêlos axilares e púbicos [246]. Os resultados evidenciam uma tendência para maior concentração nos pêlos púbicos comparativamente aos pêlos axilares e ao cabelo [246].

A revelação de um consumo crónico de BZD, tornada possível através da análise ao cabelo confere-lhe um papel complementar às análises clássicas ao sangue, as quais revelam mais especificamente um consumo agudo [191, 372] (reflectem o uso passado imediato (horas) [318]), e à urina [248] que fornecem informação do uso da droga a curto prazo (alguns dias) [318].

3.1.8.1 - Metodologia analítica por GC/MS

A GC/MS constitui uma das técnicas mais populares de análise de BZD em cabelo [48, 301, 371], quer no modo de detecção com EI quer com NCI [76, 240, 241] devido à sua especificidade e sensibilidade. Por esta razão e também por utilizarmos essa técnica no nosso trabalho, a revisão bibliográfica que a seguir se apresenta abrange sobretudo os artigos que se referem à sua utilização nas análises que envolvem as BZD alvo do nosso trabalho.

Tamanho da amostra e descontaminação

A descontaminação visa não só a eliminação da possível contaminação externa mas também a limpeza da amostra, principalmente, no que se refere às gorduras [55]. Na análise de cabelo de recém-nascidos a descontaminação é, igualmente, importante porque o líquido amniótico constitui uma das formas de excreção das drogas maternas. O contacto do cabelo do feto com o líquido amniótico poderá ser uma das formas de incorporação das drogas, a qual se pretende eliminar numa análise [169].

Na tabela 3.4 resumem-se, com base na revisão bibliográfica efectuada, os parâmetros: tamanho, procedimento de descontaminação e preparação dada à amostra de cabelo, a qual foi usada para determinar os mesmos tipos de BZD das incluídas no nosso trabalho, antes das etapas de extracção e análise usando a GC/MS.

Tabela 3.4 - Tamanho, procedimento de descontaminação e preparação das amostras de cabelo.

Composto	Tamanho da amostra (mg)	Descontaminação	Preparação da amostra	Ref
DIAZ NORDIAZ FLU	50	5 mL EtOH	NR	[162, 168]
DIAZ	8-37	5 mL CH ₂ Cl ₂	NR	[169]
NORDIAZ	50	2X (5 mL CH ₂ Cl ₂)	Pulverizada	[160, 354]
FLU	50	CH ₂ Cl ₂	Pulverizada	[54]
FLU	50	2X (5 mL CH ₂ Cl ₂)	Pulverizada	[55]
DIAZ NORDIAZ	30-50	H ₂ O morna; 2X acetona	Pulverizada	[372]
FLU	10	1 mL <i>n</i> -hexano; 1 mL acetona	Segmentos	[344]
DIAZ NORDIAZ	75	3X H ₂ O quente; 2X CH ₂ Cl ₂	Pulverizada	[87]
DIAZ NORDIAZ FLU	50	2X (5 mL de CH ₂ Cl ₂)	Pulverizada	[48]
FLU	50	H ₂ O desionizada	Pulverizada	[239]
DIAZ NORDIAZ FLU PRAZ	50-150	5 mL H ₂ O desionizada; 5 mL acetona; 5 mL éter de petróleo	Pequenos fragmentos	[82]
DIAZ NORDIAZ	Variável (9,7- 99,1)	5 mL CH ₂ Cl ₂	Pequenos fragmentos	[248]
DIAZ NORDIAZ	30	H ₂ O morna; 2X acetona	Pulverizada	[371]

EtOH- Etanol; NR- Não refere; CH₂Cl₂- Diclorometano; H₂O- Agua

O tamanho, o procedimento de descontaminação e a preparação da amostra são variáveis, sendo mais usual amostras de 50 mg, o emprego do solvente diclorometano na descontaminação e a redução a pequenos fragmentos ou a pulverização da amostra.

Libertação e Extração

Os principais objectivos da preparação da amostra são a libertação e extração dos analitos, de modo a conseguir-se o mínimo de interferências na análise [87]. A situação ideal será aquela em que se verifica a manutenção do analito intacto durante esta etapa [200].

Na tabela 3.5 resumem-se, com base na revisão bibliográfica efectuada, os procedimentos de libertação e extração aplicados às amostras de cabelo, usadas para determinar as BZD incluídas no nosso trabalho, antes da análise por GC/MS.

As condições ácidas ou básicas fortes não podem ser utilizadas nas etapas de pré-tratamento da amostra uma vez que as BZD são compostos quimicamente instáveis podendo ser facilmente decompostos [67, 87, 89, 160, 291, 372], havendo formação de, por exemplo, benzofenonas [60, 89, 291]. Além disso, as BZD são também compostos termolábeis [186]. Couper *et al.* [67] constataram que sob condições alcalinas, a 70°C, ocorre degradação de algumas BZD. Höld *et al.* [115] demonstraram que o alprazolam não sofre degradação empregando-se NaOH (hidróxido de sódio) na hidrólise.

Uma incubação em metanol não afecta a estabilidade das BZD [115]. No entanto, a extração directa com este solvente, após a aplicação de ultrassons, não é vulgarmente adoptada porque se obtêm extractos pouco limpos [248], o que faz decrescer bastante a razão sinal/ruído (S/N) [89], além das concentrações determinadas serem menores comparativamente às obtidas quando se usa a incubação em tampão Sörensen [160].

Quando os analitos são compostos quimicamente instáveis é aconselhada a aplicação de uma digestão enzimática [178, 246, 372]. Desta forma, este procedimento é um dos utilizados no isolamento de BZD das amostras de cabelo [372].

A extração líquido-líquido (LLE) constitui o procedimento mais comum na extração de BZD em cabelo (Tabela 3.5). Embora a adopção deste procedimento permita obter extractos bastante puros, com a utilização da extração por fase sólida (SPE) pode obter-se uma pureza equivalente [87] sendo, por isso, também utilizada em alguns casos [87, 239, 371, 372].

Gaillard *et al.* [87] desenvolveram um procedimento de extração em meio ácido e em meio básico seguida de análise, por GC/MS-EI ou por HPLC com detecção por fotodíodos (PDA) permitindo efectuar um exame de triagem ao cabelo. As BZD foram um dos compostos alvo, no entanto, o FLU não foi incluído por ser necessário NCI para a sua

detecção [87]; o NORDIAZ evidenciou melhores resultados (recuperação e precisão) aplicando o método de extracção ácido em vez de básico [87].

Cirimele *et al.* [48] estabeleceram um procedimento de triagem para detecção simultânea, por GC/MS-NCI, de BZD relevantes sob o ponto de vista forense onde constava o DIAZ, o NORDIAZ e o FLU. A utilização de PRAZ-d₅ como padrão interno (I.S.) permitiu obter resultados satisfatórios do método que, na opinião dos autores, poderiam ser melhorados com a utilização dos deuterados análogos de todas as BZD pesquisadas.

Há alguns estudos (Tabela 3.5) onde os I.S. são os análogos deuterados das BZD.

Tabela 3.5 - Padrões internos, métodos de libertação e extracção de BZD em cabelo.

Composto	Padrão interno (I.S.)	Libertação	Extracção	Ref
DIAZ NORDIAZ FLU	SKF 525A	3 mL NaOH 1M a 100°C, 1 h; neutralizar com HCl 3M.	(LLE) 5 mL clorofórmio/isopropanol/ <i>n</i> -heptano (50:17:33, <i>v/v</i>)	[162]
DIAZ NORDIAZ FLU	SKF 525A	1 mL NaOH 1M a 100°C, 10 min; neutralizar com HCl 3M.	(LLE) 5 mL clorofórmio/isopropanol/ <i>n</i> -heptano (50:17:33, <i>v/v</i>)	[168]
DIAZ	SKF 525A	1 mL HCl 1M a 50°C, 12 h	(LLE) 10 mL clorofórmio/isopropanol/ <i>n</i> -heptano (50:17:33, <i>v/v</i>); alcalinizar com 1 mL de tampão fosfato (pH 8,4); agitar e centrifugar; extrair as drogas da fracção orgânica em 5 mL de HCl 0,2M; reextrair com 5 mL de clorofórmio, após adição de 2 mL de tampão fosfato e 0,5 mL de solução de amónia concentrada.	[169]
NORDIAZ	NORDIAZ-d ₅	Tampão fosfato Soerensen (pH 7,6) a 40°C, 20 h	(LLE) 5 mL éter/clorofórmio (80:20, <i>v/v</i>); agitar 10 min; centrifugar (10 min, 2000 g)	[160, 354]
FLU	DIAZ-d ₅	Tampão fosfato Soerensen (pH 7,6) a 40°C, 2 h	(LLE) 5 mL éter/clorofórmio (80:20, <i>v/v</i>); agitar 20 min; centrifugar (15 min, 4000 rpm)	[54]
FLU	DIAZ-d ₅	Tampão fosfato Soerensen (pH 7,6) a 40°C, 2 h	(LLE) 5 mL éter/clorofórmio (80:20, <i>v/v</i>); agitar 20 min; centrifugar (15 min, 4000 rpm)	[55]
DIAZ NORDIAZ	DIAZ-d ₅ NORDIAZ-d ₅	Tampão acetato (pH 4,0), 70 µL β-glucuronidase/arylsulfatase a 40°C, 2 h; 2 mL H ₂ O destilada	(SPE) (Colunas Chromabond C ₁₈) Acondicionamento: 6 mL MeOH, 3 mL H ₂ O destilada. Verter amostra. Lavagem: 3 mL H ₂ O; 3 mL NaHCO ₃ 0,6M; 3 mL H ₂ O destilada. Eluição: 2 mL acetona/diclorometano (3:1, <i>v/v</i>).	[372]
FLU	NR	MeOH em ultrassons a 40°C, 1 h; decantação da fase metanólica após repouso toda a noite.		[344]
DIAZ NORDIAZ	PRAZ	1 mL HCl 0,1M a 56°C, 12 h; centrifugar (1500 g) 5 min; adicionar ao pelet 1 mL HCl 0,1M, agitar e centrifugar; juntar as duas fracções; neutralizar com NaOH 1M; tamponizar com 2 mL bicarbonato de sódio 0,2M contendo 10 % de MeOH (pH 8,6)	(SPE) (Colunas C ₁₈) Acondicionamento: 4 mL MeOH, 2 mL tampão bicarbonato. Verter amostra. Lavagem: 1 mL H ₂ O; 1 mL de H ₂ O com 10% de MeOH. Eluição: 3X 500 µL (MeOH contendo 0,5% de ácido acético glacial).	[87]
NORDIAZ	Bupivacaína	1 mL H ₂ O a 56°C, 12 h; centrifugar (1500 g) 5 min; adicionar ao pelet 1 mL H ₂ O, agitar e centrifugar; juntar as duas fracções; acidificar com 2 mL HCl 0,02M	Acondicionamento: 4 mL MeOH, 2 mL HCl 0,01M. Verter amostra. Lavagem: 1 mL H ₂ O; 1 mL de Hexano. Eluição: 3X 500 µL (MeOH com 1% de amónia).	
DIAZ NORDIAZ FLU	PRAZ-d ₅	Tampão fosfato Soerensen (pH 7,6) a 40°C, 2 h	(LLE) 5 mL éter/clorofórmio (80:20, <i>v/v</i>); agitar 20 min; centrifugar (20 min, 2200 g)	[48]
FLU	FLU-d ₇	3 mL MeOH, 1 h no ultrassons; decantar e guardar MeOH no frigorífico; incubar toda a noite a 55°C as amostras em 3 mL de HCl 0,1N; centrifugar (400 g) 5 min; combinar MeOH, HCl, 1 mL de ácido acético glacial 1,93M, 9 mL de água desionizada	(SPE) (Colunas Mixed-mode Isolute H ₂ CX SPE) Acondicionamento: 3 mL MeOH, 3 mL água desionizada, 1 mL de ácido acético glacial 1,93M. Verter amostra. Lavagem: 3 mL H ₂ O desionizada; 1 mL de HCl 0,1N (secar 1-2 min); 3 mL MeOH (secar 5 min). Eluição: diclorometano/isopropanol/hidróxido de amónia (78:20:2, <i>v/v</i>).	[239]

DIAZ NORDIAZ FLU PRAZ	FLU-d ₇	Tampão fosfato Soerensen a 50°C, 5 h no ultrassons	6 mL clorobutano; oscilação 1 min; centrifugar (3 min, 3000 rpm)	[82]
DIAZ NORDIAZ	Oxazepam-d ₅	2 mL MeOH, a 45°C, 18 h		[248]
DIAZ NORDIAZ	DIAZ-d ₅ NORDIAZ-d ₅	Solução de ureia 8M-tioglicolato 0,2M, a pH 3, durante 2 h, a 60°C; ajustar para pH 8.	(SPE) (Colunas <i>Chromabond C₁₈</i>) Acondicionamento: 6 mL MeOH, 3 mL H ₂ O destilada. Verter amostra. Lavagem: 3 mL H ₂ O; 3 mL NaHCO ₃ 0,6M; 3 mL H ₂ O destilada. Eluição: 2 mL acetona/diclorometano (3:1, v/v).	[371]

SKF 525A- Proadifeno; min- minutos; °C- Grau Celsius; MeOH-Metanol; HCl- Ácido clorídrico; DTT- Ditiotreitól; d₃, d₅, d₇ -deuterados; NaHCO₃- Bicarbonato de sódio; N- Normal; M- Molar; rpm- rotações por minuto; g- aceleração da gravidade; NaOH- hidróxido de sódio.

Análise

Derivatização e métodos de detecção

Embora em muitos casos não seja efectuada derivatização de BZD [48, 82, 87, 168, 344, 371, 372] alguns autores acham conveniente a sua realização, quando a análise ocorre por GC/MS, por forma a melhorar a estabilidade dos compostos [76, 160] ou para obter espectros de massa com mais informação estrutural (ex. para melhorar a cromatografia na resolução cromatográfica derivatiza-se o alprazolam com BSTFA + TMCS a 1 %) [76, 115, 301].

O método de derivatização, mais popular, das BZD é a sililação [48, 160, 169, 248, 301, 354] (Tabela 3.6). A formação clássica de éteres TMS tem sido muito frequente, usualmente empregando BSTFA, isoladamente [301], ou em conjunto com TMCS [48, 160, 169, 301, 354]. A utilização de MTBSTFA em substituição de BSTFA + TMCS a 1 % origina derivados TBDMS muito mais resistentes à hidrólise relativamente aos derivados TMS correspondentes [248, 301].

Tanto na análise no modo EI como no modo de ionização química (CI) podem ser usados substitutos azotados ou halogenados nas BZD [301]. Pode ser obtida adicionalmente uma resposta mais elevada pela formação de derivados HFB [301], usando o HFBA ou PFPA como agentes de acilação.

A detecção de BZD a partir de amostras de cabelo não é tarefa fácil: constituem um grupo de substâncias que são incorporadas no cabelo em baixas concentrações [288, 370]. A técnica de eleição para detectar baixas concentrações de BZD no cabelo é a GC/MS-NCI [48, 54, 55, 82, 115, 160, 239, 240, 242, 291, 344, 354] devido ao carácter electrofílico dos analitos [291]. As BZD possuem grupos halogéneo (grupos funcionais electronegativos), localizados nos anéis aromáticos, com elevada densidade negativa que dará mais estabilidade aos aniões formados na fonte iónica. Na GC/MS, comparando o modo de EI ou de ionização química

positiva (PCI) com NCI verifica-se que este permite um aumento de sensibilidade [49, 76, 241]. A razão S/N obtida com NCI é alguns milhares de vezes superior à obtida por EI demonstrando-se, assim, que o modo NCI é a escolha adequada para a análise de BZD, dada a baixa concentração em que se encontram no cabelo [54, 55, 160, 370] além de, como já se referiu, do elevado carácter electrofílico dos analitos [54, 55, 89].

A concentração de FLU no cabelo é muito baixa (na ordem do pg/mg) necessitando do uso de detecção com NCI [54, 55, 87, 239, 240, 241]. Apesar da baixa dosagem do FLU, a sua detecção no cabelo é efectuada com facilidade por GC/MS/MS usando NCI como demonstrou, pela primeira vez, Uhl [344].

Limite de detecção e concentrações determinadas em amostras

Na tabela 3.6 apresentam-se os LOD's e as concentrações de BZD determinadas em amostras de cabelo analisadas por GC/MS ou por GC/MS/MS.

Tabela 3.6 - Técnicas de análise de BZD em cabelo e resultados.

Composto	Derivatização	Reconstituição	Análise (cromatógrafo) (detector)	LOD (pg/mg)	Nº de casos analisados	Nº de casos positivos	Intervalo (média) (ng/mg)	Ref
DIAZ NORDIAZ FLU	TFA	Sem reconstituição	GC/MS-EI (NR) (NR)	NR	5	1 2 1	1,37 1,04-1,47 0,41	[162]
DIAZ NORDIAZ FLU	Sem derivatização	20 µL de CH ₂ Cl ₂	GC/MS-EI (Perkin Elmer 8500) (Ion Trap)	NR	NR (Dois anos de análise)	1 3 1	1,37 1,04-2,41 (1,64) 0,41	[168]
DIAZ	BSTFA+TMCS 1% (70°C, 20 min)	Sem reconstituição	GC/MS-EI (Perkin Elmer 8500) (Ion Trap)	100	56	8	3,36-17,55 (NR)	[169]
NORDIAZ FLU	35 µL BSTFA+TMCS 1% (90°C, 20 min)	Sem reconstituição	GC/MS-NCI (HP 5890) (HP 5989B Engine)	10	30	13	0,25-18,87 (4,16)	[160, 354]
FLU	150 µL HFBA/acetato de etilo (2:1, v/v) (60°C, 30 min) ^o	25 µL acetato de etilo	GC/MS-NCI (HP 5890) (HP 5989B)	30	1 (3 segmentos)	1 (3 segmentos)	0,0895 0,0778 0,0720	[54]
FLU	150 µL HFBA/acetato de etilo (2:1, v/v) (60°C, 30 min) ^o	25 µL acetato de etilo	GC/MS-NCI (HP 5890) (HP 5989B Engine)	15	40	14	0,031-0,129 (0,06)	[55]
DIAZ NORDIAZ	Sem derivatização	50 µL acetato de etilo	GC/MS-EI (HP5890 series II) (MSD HP 5971A)	10 100	21	15 20	0,01-2,21 (0,31) 0,13-1,83 (0,49)	[372]
FLU	Sem derivatização	10 µL acetato de etilo	GC/MS/MS-NCI (Varian 3400) (Finnigan TSQ-700)	NR	1	1	NR	[344]
DIAZ NORDIAZ	Sem derivatização	20 µL MeOH	GC/MS-EI (HP5890 series II) (MSD HP 5972)	NR	4	1 2	7,2 0,6-3,3	[87]
DIAZ NORDIAZ FLU	35 µL BSTFA+TMCS 1% (70°C, 20 min) ^o	NR	GC/MS-NCI (HP 5890) (MSD HP 5989B)	11 4 15	115	ND 42 31	ND 0,20-18,87 (NR) 0,019-1,48 (NR)	[48]
FLU	50 µL HFBA (60°C, 30 min) ^o	25 µL acetato de etilo	GC/MS-NCI (HP 6890) (MSD HP 5973)	1,5	4	2	0,00176- 0,023 (0,0124)	[239]

DIAZ NORDIAZ FLU PRAZ	Sem derivatização	50 µL acetato de etilo	GC/MS-NCI (HP 6890) (MSD HP 5973)	NR	NR	NR	NR	[82]
DIAZ NORDIAZ	25 µL MTBSTFA, (90°C, 1 h)	----	GC/MS-EI (HP6890 series II) (MSD HP 5973)	110 210	20	0 7	---- ----	[248]
DIAZ NORDIAZ	Sem derivatização	40 µL acetato de etilo	GC/MS-EI (HP6890 series II) (MSD HP 5973)	20 80	1	1 1	0,06 ^{a)} 0,04 ^{b)} 0,99 ^{a)} 0,32 ^{b)}	[371]

BSTFA- *N,O*-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida; TMCS- Trimetilclorossilano; HFBA- Anidrido heptafluorobutírico; TFA- Anidrido trifluoroacético; MTBSTFA- *N*-metil-*N-tert*-butildimetilsililtrifluoroacetamida; ND- Não detectado; ---- Não efectuado; a) Resultado obtido no cabelo não tratado; b) Resultado obtido no mesmo cabelo descolorado; c) esta derivatização foi efectuada porque também se pretendia analisar o 7-aminoflunitrazepam; d) Só para o NORDIAZ, oxazepam, bromazepam e lorazepam.

As concentrações das BZD detectadas nas amostras de cabelo são geralmente baixas. São referidas concentrações compreendidas entre 0,01-17,55 ng/mg, 0,13-18,87ng/mg e 0,00176-0,41 ng/mg para o DIAZ, NORDIAZ e FLU, respectivamente (Tabela 3.6).

O NORDIAZ figura entre as BZD detectadas com maior frequência [160, 161, 372].

Sramek *et al.* [318] detectaram DIAZ em todos os casos de indivíduos consumidores de DIAZ. As concentrações determinadas para o DIAZ foram $\geq 0,2$ ng/mg sendo inexistente uma correlação entre a média de dosagem (mg/d) e os valores determinados de DIAZ nas amostras pertencentes a diferentes indivíduos. A falta de correlação entre a dose consumida e a concentração determinada no cabelo é, na opinião destes autores, resultado de factores biológicos (ligações proteicas, lipossolubilidade, meia-vida no soro) e de diferenças individuais na biodisponibilidade da droga para incorporação no cabelo em crescimento. A análise segmentar (nesta as variações interindividuais são inexistentes) revelou, no entanto, uma relação positiva entre as variações de dosagem e os valores de DIAZ determinados no cabelo. Assim sendo, os resultados sugerem que a análise segmentar pode ser usada como ferramenta para caracterizar a severidade e a extensão (duração) do consumo (dependendo do comprimento do cabelo usado na análise).

Paterson *et al.* [248] detectaram apenas três casos positivos para NORDIAZ, e nenhum para DIAZ, em cinco casos de pacientes aos quais estava a ser administrado diariamente DIAZ. Do mesmo modo, não verificaram uma correlação entre a concentração diária administrada e a positividade no cabelo. Foram apontadas para o sucedido várias razões possíveis: a presença de DIAZ no cabelo em concentrações abaixo do LOD, o não cumprimento pelos pacientes do tratamento ou o tamanho reduzido da amostra, o qual foi < 25 mg, em 13 casos analisados. Em qualquer destas circunstâncias uma análise à urina seria vantajosa na tentativa de esclarecimento dos resultados.

Não existem estudos, do nosso conhecimento, relativamente ao intervalo de tempo que decorre desde a tomada de DIAZ ou de NORDIAZ, até que sejam detectados no cabelo, a droga mãe e/ou os metabolitos [370].

Relativamente ao FLU, não existem estudos (do nosso conhecimento), sobre a relação dose administrada/concentração detectada no cabelo. Negruz [240] referiu que uma única administração de FLU (2 mg de Rohypnol) se revela, em alguns casos, numa análise ao cabelo logo após 24 h, detectando-se (mais precocemente, ou mais tardiamente- só após 21 dias) nos 10 casos analisados o metabolito 7-aminoflunitrazepam e, em apenas algumas amostras, a droga mãe. A concentração determinada para a droga mãe foi inferior à do metabolito.

Maior concentração de droga mãe não significa necessariamente maior concentração do metabolito [54, 55, 160, 372].

Podem determinar-se concentrações dos metabolitos das BZD inferiores ou superiores às da droga mãe dado que alguns são, também, comercializados como droga mãe. A concentração pode, assim, reflectir o consumo simultâneo do metabolito e da droga mãe que o origina (ex. DIAZ e NORDIAZ; NORDIAZ e oxazepam) [48]. Gaillard *et al.* [87] referiram um caso de um indivíduo consumidor de DIAZ, determinando-se, no cabelo, uma concentração de 7,2 ng/mg de DIAZ e 0,6 ng/mg de NORDIAZ. Yegles *et al.* [371] determinaram maior concentração de NORDIAZ comparativamente ao DIAZ (droga mãe).

O desconhecimento do padrão de uso (identificação da droga e da quantidade consumida) dos adictos não permite excluir que as concentrações determinadas de NORDIAZ e oxazepam se devem à absorção de DIAZ ou NORDIAZ ou oxazepam ou à soma das três [160, 370, 372].

É muito importante o conhecimento da história cosmética da amostra de cabelo analisada, uma vez que a descoloração faz diminuir consideravelmente a concentração de BZD (DIAZ, NORDIAZ) incorporadas no cabelo [371]. Esta diminuição ocorre por degradação causada pelos agentes descolorantes, e não pela remoção do cabelo [371]. A percentagem de decréscimo de abundância é função da natureza da droga, verificando-se uma perda superior para o NORDIAZ e menor para o DIAZ [371]. Até à data não há dados publicados, que sejam do nosso conhecimento, quanto à estabilidade do FLU nas amostras de cabelo.

Na tabela 3.7 representa-se a comparação do LOD obtido na análise de três BZD por GC/MS *versus* EI/NCI e *versus* agente de derivatização utilizado.

Tabela 3.7 - Comparação do LOD determinado por GC/MS-NCI e por GC/MS-EI, em função do agente de derivatização utilizado, para o DIAZ, NORDIAZ e oxazepam. (adaptado de [370]).

GC/MS	Agente de derivatização	m/z	Diazepam	Nordiazepam	Oxazepam
NCI	Sem derivatização	m/z	284, 286	270, 272	268, 270
		LOD (pg/mg)	0,8	6	>2000
	PFPA	m/z	284, 286	566, 568	564, 566
		LOD (pg/mg)	2,1	15	16
	HFBA	m/z	284, 286	440, 442	408, 410
		LOD (pg/mg)	4,5	103,6	200
BSTFA	m/z	284, 286	342, 344	268, 270	
	LOD (pg/mg)	0,6	1	1	
EI	Sem derivatização	m/z	256, 283	242, 270	230, 231
		LOD (pg/mg)	20	80	200

m/z - Relação massa/carga dos fragmentos iónicos formados num espectrometro de massa;

Os dados apresentados na tabela 3.7 sugerem que a análise do DIAZ e do NORDIAZ deve ocorrer por GC/MS-NCI, utilizando como agente de derivatização o BSTFA ou, em alternativa, não derivatizando os compostos.

Na análise do FLU não se utilizam agentes de derivatização [49, 54, 55, 239].

Os LOD's obtidos para o FLU, analisado por GC/MS-EI/NCI variam de 1,5 a 15 pg/mg, sendo os valores mais elevados obtidos em procedimentos de triagem (não específicos) para detecção e quantificação do composto [49]. Negrusz *et al.* [239] conseguiram obter para o FLU um LOD de 1,5 pg/mg e um limite de quantificação (LOQ) de 2,5 pg/mg, quando analisado por GC/MS-NCI. O valor do LOD é inferior aos obtidos por Cirimele *et al.* [54, 55]. A detecção e quantificação de FLU e 7-aminoflunitrazepam numa amostra de cabelo grisalho, com apenas 9 mg, pertencente a um consumidor habitual de BZD, coloca a hipótese da sensibilidade do método aplicado ser suficiente para determinação do uso de FLU em doses muito menores, possivelmente em situações de administração única [239].

Na tabela 3.8 são apresentados os parâmetros m/z , dos fragmentos iónicos formados nos espectrómetros de massa que foram seleccionados para pesquisa e/ou quantificação de diversas BZD, bem como, as colunas usadas na técnica separativa (cromatografia gasosa) de BZD. Estas são colunas capilares apolares com composição 5% fenilo-95% metilo (HP-5 MS, DB-5, HP ultra 2) isto é, 5% dos átomos de silício têm ligado um anel fenilo e os restantes 95% um grupo metilo.

No modo NCI, um único íão específico é indicador da presença de uma molécula, sobretudo quando se possuem outras informações de suporte tais como o tempo de retenção e resultados positivos obtidos através de um exame de triagem [239].

Tabela 3.8 – Colunas e íões usados na identificação e quantificação de BZD.

Totalidade de Compostos	Coluna	Íões (m/z) ^{a)}	Ref
DIAZ	Capilar BP 5 (12 m X 0,22 mm i.d.)	DIAZ (m/z =355)	[169]
NORDIAZ	Capilar HP-5MS (30 m X 0,25 mm i.d. X 0,25 μ m de película de revestimento)	NORDIAZ (m/z =234, 254, 342)	[160, 354]
FLU	Capilar HP-5MS (30 m X 0,25 mm i.d.)	FLU (m/z =313, 297, 281)	[54]
FLU	Capilar HP-5MS (30 m X 0,25 mm i.d.)	FLU (m/z =313, 297, 281)	[55]
DIAZ	Capilar HP-Ultra 2	DIAZ (m/z =256, 283)	[372]
NORDIAZ	(12 m X 0,2 mm i.d. X 0,33 μ m de película de revestimento)	NORDIAZ (m/z =242, 270)	
FLU	Capilar de sílica fundida J&W DB-5MS (30 m X 0,32 mm i.d. X 0,25 μ m de película de revestimento)	FLU (m/z =313, 278, 218)	[344]
DIAZ	Capilar HP-5MS	DIAZ (m/z =284, 268)	
NORDIAZ	(30 m X 0,25 mm i.d. X 0,25 μ m de película de revestimento)	NORDIAZ (m/z =234, 242)	[48]
FLU	Capilar HP-5MS (30 m X 0,25 mm X 0,25 μ m de película de revestimento)	FLU (m/z =313, 297)	[239]
DIAZ	Capilar J&W DB-5MS	DIAZ (m/z =284, 286, 285)	
NORDIAZ	(30 m X 0,25 mm X 0,25 μ m de película de revestimento)	NORDIAZ (m/z =270, 272, 271)	[82]
FLU		FLU (m/z =313, 314, 315)	
PRAZ		PRAZ (m/z =324, 325, 326)	
DIAZ	Capilar HP-5MS	DIAZ (m/z =256, 283, 284, 221)	
NORDIAZ	(30 m X 0,25 mm i.d. X 0,25 μ m de película de revestimento)	NORDIAZ (m/z =384, 327, 329, 383)	[248]
DIAZ	Capilar HP-Ultra 2	DIAZ (m/z =256, 283)	[371]
NORDIAZ	(12 m X 0,2 mm X 0,33 μ m de película de revestimento)	NORDIAZ (m/z =242, 270)	

i.d.- Diâmetro interno; a) Os íões sublinhados foram os usados na quantificação.

Limites de positividade

Kintz *et al.* [160] definiram como limite de positividade para o NORDIAZ 0,1 ng/mg que corresponde a dez vezes mais o LOD obtido.

3.2 – CANABINÓIDES

3.2.1 - Introdução

As preparações da planta *Cannabis* têm sido utilizadas desde os tempos mais remotos com fins medicinais e/ou recreativos [38, 46]. Na actualidade, os canabinóides incluem-se no grupo das drogas mais utilizadas mundialmente à semelhança do álcool etílico e das

preparações da *Nicotiana tabacum*. O seu consumo efectua-se frequentemente associado a outras drogas [38].

De acordo com o definido na convenção das Nações Unidas de 1961 [350] consideram-se “plantas cannabis” todas as que estiverem incluídas no Género *Cannabis*. Destaca-se, como espécie principal, a *Cannabis sativa* L. (1735). Trata-se de um arbusto anual, dioico que cresce em zonas temperadas e tropicais do mundo [299].

Os canabinóides representam um grupo de mais de 60 compostos presentes na planta *Cannabis*, sendo frequente generalizar o termo (estratégia que adoptámos) de forma a também abranger os metabolitos no Homem e nos outros animais [38]. Na maioria não são conhecidas propriedades psicoactivas, desconhecendo-se os seus efeitos fisiológicos [94]. Quimicamente, são aldeído-fenóis, compostos orgânicos cíclicos que possuem, em simultâneo, o grupo OH, dos fenóis, e o COH, dos aldeídos [3].

Entre os canabinóides presentes na planta salientamos: o delta-9-tetrahydrocannabinol ou tetrahydrocannabinol (Δ^9 -Tetrahydrocannabinol, Δ^9 -THC ou THC), um psicodisléptico considerado a principal substância psicoactiva, ou ingrediente activo, que pode ser isolado a partir das plantas *Cannabis spp.* [221, 225, 299]; o CBD precursor de outros canabinóides e com propriedades anti-inflamatórias e sedativas [225]; o CBN, incluído no grupo dos constituintes secundários visto tratar-se de um produto final da degradação de canabinóides na planta (catabolismo *in situ*). Este composto tem uma actividade anti-inflamatória e não possui efeitos psicotrópicos [225].

Os canabinóides localizam-se fundamentalmente nos pêlos secretores da planta, podendo, deste modo, relacionar-se o seu conteúdo com o número de pêlos. Os pêlos são abundantes nas folhas e brácteas maduras sendo, por isso, nas folhas mais desenvolvidas que o teor em canabinóides é mais elevado [38]. Nos países mais quentes (regiões tropicais), a *Cannabis sativa* produz uma resina (especialmente abundante nas folhas e nas flores femininas) como medida de protecção contra a seca, a qual é igualmente rica em canabinóides [225].

Durante muito tempo acreditou-se que apenas as plantas femininas produziam o princípio activo Δ^9 -THC. Hoje sabe-se que as plantas masculinas também o fazem, no entanto demoram mais tempo a atingir a maturidade [88]. Desta forma, o Δ^9 -THC extrai-se principalmente a partir das florescências ou frutos do topo, folhas e resina das plantas femininas de *Cannabis sativa* [157]. As sementes da *Cannabis* não contêm qualquer substância psicoactiva [225].

O Δ^9 -THC é um composto não cristalino, muito lipofílico, facilmente degradável em presença de calor, luz, ácidos e do oxigénio atmosférico (as preparações perdem eficácia com o tempo) [38].

As concentrações das substâncias psicoactivas diferem com o tipo de planta: a *C. sativa* cultivada para obtenção de fibra possui elevada concentração de CBD e baixa de Δ^9 -THC (< 0,25%), enquanto que a cultivada para uso como droga de abuso tem maior quantidade de Δ^9 -THC (2 - 6%) [38].

Exceptuando o álcool e o tabaco, o Δ^9 -THC, é a droga de “rua” mais consumida no mundo [157]. Comercializa-se, principalmente, sob três formas, nas quais a concentração de Δ^9 -THC é variável [157, 299]: cannabis (erva) (Δ^9 -THC 0,2% – 10%), resina cannabis (Δ^9 -THC 5% - 20%) e óleo cannabis (Δ^9 -THC 40% - 80%) [157].

As diversas denominações existentes para os derivados da planta *Cannabis* variam com o lugar geográfico e o modo de preparação.

A cannabis é uma mistura de flores, folhas e frutificações (excluindo sementes e folhas que não pertençam ao topo da planta), a partir das quais não se tenha extraído a resina [350]. Apresenta-se como uma espécie de tabaco com coloração esverdeada ou acastanhada [299] e com um odor característico.

A cannabis é conhecida por diversos nomes de rua tais como: marijuana, erva, ganja [299], entre outros.

No que concerne ao padrão de abuso é usualmente fumada (0,5 g a 1,0 g de material da planta) [299] isoladamente ou misturada com tabaco [225].

O termo cannabis é também usado para descrever genericamente produtos obtidos da planta *Cannabis* [299].

A resina cannabis corresponde à secreção resinosa, em bruto ou purificada, obtida a partir da planta *Cannabis* [350]. Apresenta uma cor castanha ou preta e poderá ser obtida ilicitamente mediante a aplicação de vários procedimentos [299]. Para fabricar 1,0 Kg de “resina” são normalmente necessários 45 Kg - 70 Kg de “erva” [225].

Os nomes de rua vulgarmente usados para designar a resina cannabis são o hash, haxixe e shit [225, 299].

Relativamente ao padrão de abuso, a resina cannabis pode ser fumada, isoladamente ou misturada com tabaco (aproximadamente 0,1 g), ou ingerida (misturada nos alimentos, chá) [225, 299].

O óleo da canabis apresenta-se com um aspecto viscoso, semelhante a alcatrão, de cor avermelhada a castanho ou verde [88].

Como padrão de abuso, o óleo de canabis pode ser fumado (1 - 2 gotas colocadas no tabaco ou no papel de enrolamento) ou ingerido [299].

Actualmente as plantas *Cannabis* são, também, usadas na preparação de shampoos e géneros alimentícios (óleos, bolachas, massas,..., ou bebidas (ex. chá)). Regra geral o teor de Δ^9 -THC é $< 1\%$ podendo, em alguns casos atingir 3% , de forma a eliminar-se os efeitos psicoactivos [47].

3.2.2 - História

As referências históricas mais antigas do uso dos derivados da *Cannabis* remontam ao século III a.C. (2727 a.C.), na famosa farmacopeia atribuída tradicionalmente ao imperador chinês Shen Nung, tanto pelas suas propriedades medicinais como para extracção de fibras [90]. Na Índia, em 2000 a.C. eram empregues em cerimónias religiosas [38, 90, 94].

Provavelmente a planta teve origem na Ásia Central, estendendo-se o seu cultivo até ao ocidente com vários fins: extrair fibras para fabrico de tecidos; alimentar pequenos animais domésticos (gatos e aves); condimentar sopas e doces; preparar de tintas e vernizes. Estes usos chegaram ao Mediterrâneo em 1500 a.C. Herodoto (450 a.C.) mencionou a utilização da *Cannabis* por parte de alguns povos indo-europeus da Ásia Menor. A expansão da *Cannabis* pela Europa ocorreu com as migrações para oeste dos povos indo-europeus. Apesar dos médicos gregos conhecerem a planta, não há indícios da sua utilização [94].

Os romanos utilizaram-na para extrair fibra têxtil e incorporaram-na na farmacopeia ocidental.

A expansão do Islão teve um papel importante na difusão da *Cannabis* e no seu emprego como substância indutora de embriaguez. Parece que a planta foi introduzida nos países árabes no século IX. O cânhamo foi consumido como substância psicoactiva por algumas seitas islâmicas ajudando a suportar longas horas de meditação e o jejum [38].

A introdução da *Cannabis* em África ocorreu na Idade Média devido à expansão muçulmana para sul. O seu uso estendeu-se à Europa a partir das campanhas napoleónicas no Egipto. Foi na primeira metade do século XVII que a planta chegou ao continente americano, transportada pelos espanhóis, e ao Canadá, pelos ingleses. Espanha e Inglaterra pretendiam

incrementar o cultivo do cânhamo destinado à extracção de fibra necessária à armada espanhola e à frota inglesa.

Os europeus não tinham por hábito o uso da *Cannabis* como fonte de substâncias embriagantes. Por isso, só na segunda metade do século XIX foram criados, em França, os *clubs des bachischins* (à semelhança dos dos fumadores de ópio) frequentados por algumas personalidades célebres desse século (Baudelaire, Gautier, Hugo) [38, 90]. A popularização ocidental do consumo das preparações de *Cannabis* ocorreu nos anos sessenta, no seio do ambiente juvenil [90], assistindo-se, desde então, a um aumento em quase todos os países do mundo.

3.2.3 - Efeitos dos canabinóides

Os efeitos variam em função da quantidade consumida, qualidade do produto, tolerância, personalidade e estado de espírito do sujeito no momento do consumo, o contexto do consumo, e a forma de consumo (isoladamente ou em associação com outras drogas - álcool, medicamentos) [2, 225]. Salientam-se alguns efeitos, entre os psicológicos e fisiológicos:

Psicológicos

O Δ^9 -THC, consumido em doses baixas, pode induzir ao nível do SNC vários efeitos tais como: euforia (numa fase inicial), relaxamento (numa fase mais tardia), passividade, alteração das funções motoras complexas (alteração na percepção das distâncias e um aumento do tempo de reacção, o que implica riscos na condução de veículos ou na manipulação de máquinas), aumento das sensações auditivas, visuais e gustativas. A doses moderadas assistimos a uma intensificação destes efeitos, podendo surgir falta de memória, lapsos de atenção e decréscimo de capacidade de aprendizagem. As doses elevadas podem produzir alteração da imagem corporal, como a desorientação, paranóia e acentuada distorção de sensações. Com a marijuana podem ocorrer delírio e alucinações, resultantes da própria preparação ou como consequência da mistura com outras drogas adulterantes [3, 2].

Fisiológicos

Os efeitos cardiovasculares, a doses baixas e moderadas, incluem taquicardias sinusais [38, 3].

A injeção intravenosa de água, onde tenha sido fervida marijuana, produz toxicidade múltipla nomeadamente mialgias, diarreia, alterações renais e trombocitopenia [3].

O fumo da *Cannabis* pode induzir broncodilatação [38] e ser a causa de cancro pulmonar [2, 3] pela alta concentração de hidrocarbonetos poliaromáticos carcinógenos (superior ao tabaco), e longa retenção do fumo.

3.2.4 - Indicações clínicas

O Δ^9 -THC foi usado, apesar dos efeitos secundários, com fins terapêuticos, como antiemético, broncodilatador, antiglaucomatoso, analgésico, relaxante muscular e anticonvulsivo. Provavelmente haverá outros canabinóides que possuam propriedades terapêuticas ainda por explorar [38]. Em Portugal não tem utilização clínica.

3.2.5 - Situação Portuguesa

A produção, venda e o consumo dos derivados da *Cannabis* são considerados ilegais.

Existem dois tipos de indicadores quantitativos da oferta de drogas: a quantidade apreendida e o número de apreensões. Baseados nestes indicadores tem-se registado, de acordo com os dados estatísticos do IDT de 2003 [125], um aumento, no global, da quantidade apreendida e do número de apreensões, desde 1993. Tal como acontece em todos os países da União Europeia, a *Cannabis* é a substância ilícita de maior consumo, em Portugal [244].

3.2.6 - Farmacocinética

Administração, metabolismo e eliminação

A via de administração, mais frequente, dos derivados da *Cannabis* é a inalação do fumo resultante da combustão dos mesmos. A quantidade de Δ^9 -THC inalada durante o acto

de fumar depende de vários factores: velocidade com que se fuma; do volume inalado; do tempo de retenção do fumo; da forma como se fuma (cigarro ou cachimbo) e do tipo e quantidade de substância que se está a usar (“erva”, resina ou óleo) [94].

O consumo oral é menos eficaz que a dose inalada e, regra geral, terá de ser três a cinco vezes maior para que se produzam efeitos similares [94]. Quando o Δ^9 -THC é ingerido, a absorção sanguínea é de 5% a 10%, manifestando-se os efeitos iniciais 30 - 60 minutos após a ingestão podendo durar cinco ou mais horas (sintomas mais tardios e de maior duração, comparativamente aos resultantes da inalação) [3].

A via intravenosa está praticamente restringida a estudos científicos devido à baixa solubilidade do Δ^9 -THC, em água, e à dificuldade de obtenção desse composto puro [94].

A forma como se metabolizam os canabinóides e os seus efeitos psicoactivos estão directamente relacionados com a sua elevada solubilidade nos lípidos e baixa, em água [94].

Após inalação do fumo da *Cannabis*, uma percentagem de Δ^9 -THC é absorvida para o fluxo sanguíneo obtendo-se um pico plasmático em 7 - 8 min [225]. O Δ^9 -THC abandona rapidamente o fluxo sanguíneo, fixando-se nos tecidos ricos em lípidos, pulmão, fígado, rim, coração, baço e glândulas mamárias de onde é libertado lentamente. Só 3% do Δ^9 -THC circula livre no plasma, 97% encontra-se ligado a proteínas plasmáticas, principalmente às LDL [38].

No Homem, o Δ^9 -THC é rapidamente metabolizado [343] por enzimas hepáticas, pulmonares e cerebrais em dois compostos hidroxilados, o 11 hidroxilado- Δ^9 -tetrahydrocannabinol e o 8 β hidroxilado- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (11-OH- THC e 8 β OH- THC) [38, 221, 225, 226]. Estes dois metabolitos são potencialmente muito activos. No entanto, como as concentrações plasmáticas e o tempo de meia-vida são muito baixos, não contribuem para os efeitos farmacológicos da *Cannabis* [225]. A partir destes compostos formam-se outros, também hidroxilados, mas considerados inactivos [221]. Da oxidação do 11-OH- THC forma-se o Δ^9 -THC-COOH, que é um composto desprovido de toda a actividade psicotrópica [322], o qual é conjugado com o ácido glucurónico numa extensão variável (Figura 3.4) [221]. O Δ^9 -THC-COOH começa a surgir nos minutos seguintes à inalação [225].

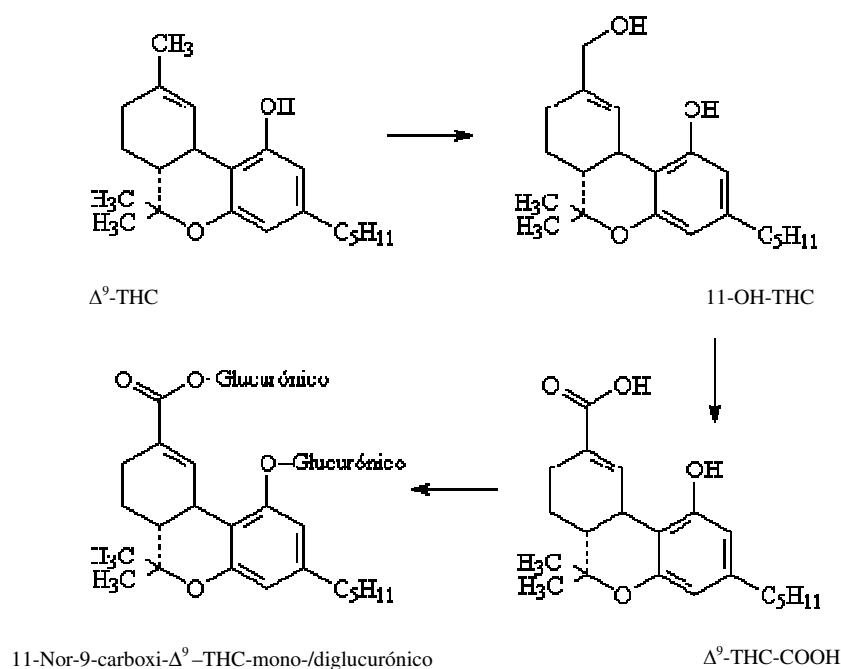


Figura 3.4 - Principais vias metabólicas do Δ^9 -THC (adaptado de [225, 226]).

A permanência média do Δ^9 -THC nos tecidos é de sete dias, mas uma simples dose de Δ^9 -THC pode levar trinta [3], ou mais dias [225, 226] a ser completamente eliminada.

Embora a eliminação dos canabinóides ocorra essencialmente através da bÍlis e das fezes, a urina, o suor, o leite materno e o cabelo são igualmente meios importantes [27].

As maiores fracções de Δ^9 -THC aparecem nas fezes, sendo a eliminação lenta porque além da reabsorção renal [226], cerca de 15% de Δ^9 -THC fica sujeito a recirculação êntero-hepática [3, 225] contribuindo este mecanismo para prolongar a sua retenção [38].

Na figura 3.5 representam-se as percentagens de Δ^9 -THC, de 11-OH-THC e Δ^9 -THC-COOH existente em cinco matrizes.

Na urina, existem vestÍgios de Δ^9 -THC inalterado enquanto que o 11-OH-THC, sob a forma de conjugado, não representa mais que 2% da dose inicial. O composto mais abundante na urina é o Δ^9 -THC-COOH, embora outros metabolitos ácidos, ainda não identificados, possam estar presentes [146, 224].

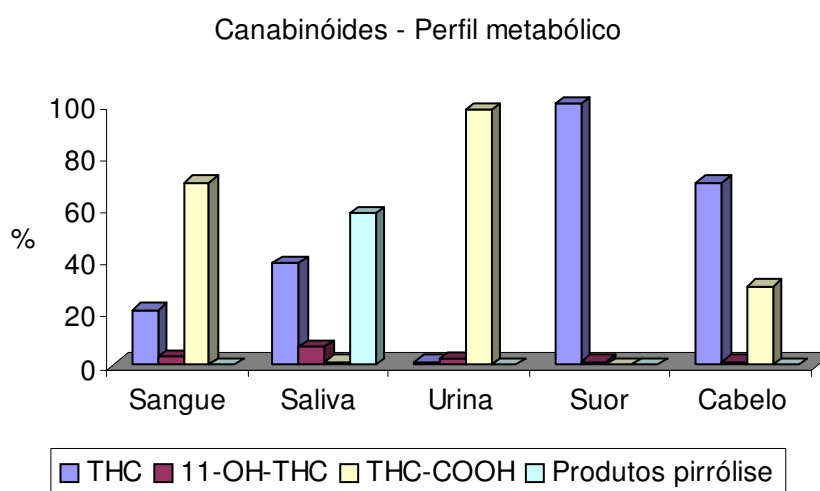


Figura 3.5 - Percentagem de canabinóides, metabolitos, ou compostos associados presentes em diversas matrizes (adaptado de [314, 322]).

A saliva contém essencialmente a droga “mãe” e a passagem de canabinóides e metabolitos do sangue para a saliva é quase inexistente, o que significa que esses compostos são pouco excretados na saliva [322].

No sangue, contrariamente ao que sucede no cabelo, o Δ^9 -THC-COOH é mais abundante comparativamente ao Δ^9 -THC [215, 216, 278, 322]. A meia-vida do Δ^9 -THC é de 3 - 8 h e a do Δ^9 -THC-COOH é de 24 - 72 h [226].

No suor não é excretado o Δ^9 -THC-COOH, sendo o Δ^9 -THC o composto mais abundante [322].

3.2.7 - *Cannabis* na toxicologia

De acordo com os dados estatísticos do Instituto da Droga e da Toxicodependência (IDT) [125], em 2003, 22% das mortes relacionadas com o consumo de drogas, envolveram canabinóides, algumas vezes em associação com outras substâncias (6%).

Estes dados são indicadores do reduzido interesse, sob o ponto de vista toxicológico, comparado com o de outras classes de drogas (ex. COC, opiáceos).

Devido aos efeitos que produzem têm estado na origem de acidentes rodoviários [216] ou no meio laboral. Desta forma, o número de análises a canabinóides, em diversas matrizes, tem aumentado nos últimos anos.

3.2.8 - Métodos de pesquisa e dosagem em cabelo

O cabelo surge como um substrato interessante na investigação da exposição crónica a substâncias psicoactivas. No entanto, no que concerne aos canabinóides tem sido usado com menor frequência, por comparação com a COC e os opiáceos [203].

Como os canabinóides são compostos lipossolúveis a sua excreção é lenta fazendo com que a janela de detecção na urina seja mais elevada (Figura 3.6) (2 - 3 semanas ou meses em caso de consumo crónico) comparativamente à dos opiáceos, COC e anfetaminas [77, 203]. Esta propriedade é apontada como uma das possíveis razões para o número reduzido de trabalhos relativos à análise de canabinóides em cabelo. Não obstante a prevalência de consumo a nível mundial, as escassas investigações no âmbito da análise destes composto em cabelo, está também relacionada com: a sua baixa toxicidade; um potencial de abuso, habituação ou dependência menos alarmante comparativamente a outras substâncias psicoactivas; a prioridade social no controlo de consumo de opiáceos e COC; questões económicas; a baixa concentração presente no cabelo, 100 - 1000 vezes menor, comparativamente à dos opiáceos e COC [203, 343]. A fraca taxa de incorporação do Δ^9 -THC-COOH no cabelo é justificável se considerarmos que a mesma é afectada, principalmente, por três factores: lipofilicidade, afinidade pela melanina e a permeabilidade através da membrana celular [156], como já se referiu. Apesar da afinidade do Δ^9 -THC-COOH pela melanina, ele é menos incorporado no cabelo, relativamente a drogas básicas (COC, opiáceos e anfetaminas), porque a permeabilidade através da membrana é baseada na diferença de pH entre o sangue (pH 7,4) e o cabelo (pH <5). As reduzidas concentrações presentes na matriz exigem detecções e quantificações no nível do picograma, o que aumenta o preço do ensaio e o potencial de erro. Os canabinóides correspondem ao grupo das drogas mais difíceis de determinar, no cabelo [138].

A análise segmentar sequencial do cabelo pode revestir-se de grande interesse para confirmar o uso regular de *Cannabis* (em caso de litígio) ou averiguar interrupções no consumo [226].

A janela de detecção, no cabelo, é elevada. No entanto, são necessários, em média, 10 dias após o consumo, para que a droga possa ser determinada nessa matriz (Figura 3.6).

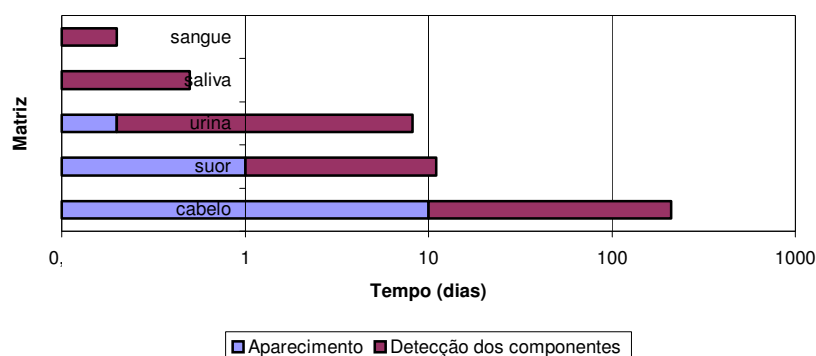


Figura 3.6 - Comparação entre diversas matrizes relativamente ao período médio de detecção de canabinóides e ao tempo necessário para o aparecimento dos compostos na matriz, após o consumo de marijuana (adaptado de [226]).

As bases da decisão acerca da positividade, ou não, de uma amostra de cabelo relativamente a *Cannabis*, são variáveis. Alguns laboratórios pesquisam apenas um analito (Δ^9 -THC), outros pesquisam dois (Δ^9 -THC e Δ^9 -THC-COOH), ou mesmo três (Δ^9 -THC, CBN, CBD). Não encontramos descrito na literatura, um método que permitisse a pesquisa e quantificação, em simultâneo e na mesma matriz, dos quatro analitos alvo do nosso trabalho (Δ^9 -THC, CBD, CBN e Δ^9 -THC-COOH) com o objectivo de se aplicar no trabalho de rotina de um laboratório.

A análise de canabinóides começou por se efectuar através da pesquisa exclusiva do Δ^9 -THC, em amostras de cabelo, utilizando as técnicas RIA e GC/MS [46, 208]. Foi Möeller (1992) [208] quem analisou pela primeira vez o Δ^9 -THC-COOH derivatizado com a mistura PFPA/PFPOH, usando a técnica GC/MS-EI.

Os toxicologistas forenses são frequentemente confrontados com limitações relativamente ao tamanho da amostra tornando-se, deste modo, vantajosa uma análise que permita detectar/quantificar, em simultâneo, vários tipos de compostos [135]. Na literatura encontramos trabalhos dedicados exclusivamente à análise de canabinóides em cabelo [6, 33, 44, 47, 51, 56, 78, 114, 137, 156, 203, 221, 227, 290, 344, 366] bem como, à análise em conjunto com outros compostos [7, 50, 88, 135, 136, 142, 143, 162, 168, 205, 268, 276, 303, 316, 326, 347].

Entre os métodos analíticos refere-se a utilização de imunoenaios (RIA, FPIA, ELISA) [17, 143, 203, 268], da HPLC [322] e, em maior número, da GC/MS ou da GC/MS/MS (Tabela 3.11).

A maioria dos imunoenaios usados para evidenciar o uso de marijuana têm-se tornado cada vez menos específicos para o Δ^9 -THC e mais específicos para o Δ^9 -THC-COOH [278, 314]. Este analito encontra-se em concentrações muito reduzidas no cabelo, abaixo dos LOD's dos imunoenaios [278]. Assim, um imunoenasiao que seja usado para detectar o consumo de marijuana, pela análise ao cabelo, tem que possuir uma elevada reactividade cruzada com o próprio Δ^9 -THC. Presentemente os imunoenaios que preenchem este requisito são os RIA *Imunoanálises* para canabinóides e os *microplate* EIA Cozart [314].

A GC/MS é considerada actualmente como técnica de referência incluída nos exames de confirmação do consumo de canabinóides. A análise por esta técnica também poderá ser efectuada através da combinação MS/MS [348]. Esta permite obter elevada sensibilidade e especificidade por eliminar a presença de interferentes que existem, mesmo após a aplicação de processos extractivos extensos, ocasionados pelos componentes da matriz cabelo [44, 180].

Além do cabelo têm sido utilizados, com menor frequência, na detecção e/ou quantificação de canabinóides, pêlos axilares [46] e púbicos [51].

3.2.8.1 - Metodologia analítica por GC/MS

Na revisão bibliográfica que a seguir se apresenta seleccionaram-se os artigos que se referem à utilização da GC/MS ou da GC/MS/MS, na análise de canabinóides em cabelo, por serem as mais utilizadas (Tabela 3.9, 3.10 e 3.11) e nelas se incluir a metodologia analítica que desenvolvemos.

Tamanho da amostra e descontaminação

A identificação de Δ^9 -THC, CBD e CBN em cabelo descontaminado indica exposição a *Cannabis* [47, 56, 290]. Como esses compostos estão presentes no fumo da *Cannabis* poderão contaminar o cabelo por fontes externas e, como tal, gerar falsos positivos por exposição passiva [348]. Esta é a principal limitação nas análises ao cabelo, particularmente na

interpretação de resultados forenses [47]. Apesar dos inúmeros procedimentos de descontaminação nenhum se revela absolutamente seguro na prevenção de falsos positivos [156]. Destacam-se neste campo os trabalhos desenvolvidos por Strano-Rossi *et al.* [326] e Wilkins *et al.* [366] que estudaram a eficiência de procedimentos de descontaminação.

Na tabela 3.9 resumem-se, com base na revisão bibliográfica efectuada, os parâmetros: tamanho, procedimento de descontaminação e preparação da amostra cabelo, usados para determinar os canabinóides e metabolitos incluídos no nosso trabalho.

Tabela 3.9 - Tamanho, procedimento de descontaminação e preparação das amostras de cabelo.

Composto	Tamanho da amostra (mg)	Descontaminação	Preparação da amostra	Ref
THC-COOH	50	5 mL EtOH	NR	[162]
THC-COOH	50	5 mL EtOH	NR	[168]
THC/THC-COOH	100	2x (5 mL CH ₂ Cl ₂)	Pulverizada	[50]
THC-COOH	100	2x (5 mL CH ₂ Cl ₂)	Pulverizada	[156]
THC/THC-COOH/ 11-OH-THC	20	3X (1 mL MeOH) 3X (1 mL CH ₂ Cl ₂) 3X (1 mL Isopropanol) 3X (1 mL Tampão fosfato pH 6,0)	Pequenos fragmentos	[366]
THC/CBD/CBN	50	2X CH ₂ Cl ₂	Inteiro	[50]
THC/CBD/CBN	50	2X (5 mL CH ₂ Cl ₂)	Pulverizada	[56]
THC/THC-COOH	50	2X (5 mL CH ₂ Cl ₂)	Pulverizada	[137]
THC	50-200	5 mL H ₂ O; 5 mL acetona; 5 mL éter de petróleo	Pequenos fragmentos	[142]
THC-COOH	10	1 mL de H ₂ O desionizada	NR	[33]
THC-COOH	15	NR	NR	[344]
THC/THC-COOH	50	2X CH ₂ Cl ₂	NR	[136]
THC-COOH	50	NR	Pequenos fragmentos	[114]
THC	100-150	5 mL H ₂ O; 5 mL acetona; 5 mL éter de petróleo	Pequenos fragmentos	[78]
THC/CBD/CBN	50	2X (5 mL CH ₂ Cl ₂)	NR	[47]
THC/CBD/CBN	50	Éter de petróleo	NR	[326]
THC/THC-COOH	NR	CH ₂ Cl ₂	Pequenos fragmentos	[135]
THC	10	1 mL <i>n</i> -hexano; 1 mL acetona	Pequenos fragmentos	[347]
THC-COOH	15		Pequenos fragmentos	[345] ^{b)}
THC/CBN/CBD	50	3X (5 mL de clorofórmio)	NR	[268]
THC-COOH	100	NR	Pequenos fragmentos	[290]
THC	Variável (35-285)	5 mL H ₂ O; 5 mL acetona; 5 mL hexano	Pequenos fragmentos	[276]
THC/CBD/CBN	50-100	Solvente não polar; hexano; etanol	NR	[7]
THC/CBD/CBN	30	Água desionizada e acetona	Pequenos fragmentos	[316]
THC-COOH	20	1,5 mL CH ₂ Cl ₂	Pequenos fragmentos	[221]
THC/CBN/CBD	NR	2 min 5 mL CH ₂ Cl ₂	Pulverizada	[303]
THC /CBD/CBN	10	5 mL de água desionizada; éter de petróleo; CH ₂ Cl ₂	Pequenos fragmentos	[227]
THC-COOH	40	Isopropanol 15 min a 37°C; 3X (30 min de tampão fosfato 0,5M, pH 6,4, a 37°C)	Segmentos de 3,9 cm	[205]
THC/CBD/CBN	10	5 mL de água desionizada; éter de petróleo; CH ₂ Cl ₂	Pequenos fragmentos	[180]

a) Comparação dos 4 procedimentos; b) Só para THC-COOH.

Apesar de alguns autores considerarem ser possível a completa descontaminação do cabelo resultante da exposição passiva ao fumo de haxixe [326] e, por isso, a detecção de Δ^9 -THC, CBN e CBD presumir um uso de *Cannabis*, apenas a presença de metabolitos no cabelo poderá fornecer evidência convincente desse uso [114, 156, 203, 205, 290, 366]. Deste modo, o Δ^9 -THC-COOH, não detectado nas amostras de haxixe, marijuana ou no seu fumo,

pode ser considerado como um potencial marcador à exposição crónica de *Cannabis* e também da ocorrência de metabolização de Δ^9 -THC, após uso activo [46, 221, 290]. Além disso, como este metabolito nunca foi detectado no suor [343], a sua presença no cabelo, não pode ser atribuída a esta via. Cirimele *et al.* [56] propuseram um método para triagem rápida de compostos da *Cannabis* (Δ^9 -THC, CBN e CBD), no cabelo, e defendem a confirmação dos resultados positivos pela identificação do metabolito Δ^9 -THC-COOH.

O tamanho da amostra, usado na detecção e/ou quantificação de canabinóides e metabolitos, é variável entre 10 e 285 mg, sendo 50 mg o usual (Tabela 3.9).

Na descontaminação das amostras, o diclorometano é o solvente mais utilizado (Tabela 3.9). Antes da extracção, o cabelo, é reduzido a pequenos fragmentos ou pulverizado para aumentar, em alguns casos, a eficiência do processo extractivo (Tabela 3.9). No caso do processo extractivo vir a ocorrer por fluidos supercríticos (SFE), a pulverização da amostra não melhora a recuperação, não sendo, por isso, necessária [50].

O Δ^9 -THC em soluções aquosas fixa-se imediatamente na superfície do vidro [2]. A fim de evitar esta adsorção dos canabinóides, a qual terá reflexo nos resultados das análises, deve ser usado material de vidro silanizado [78, 142, 157, 221].

Libertação e Extracção

Como os canabinóides são compostos quimicamente estáveis, as condições de libertação e extracção não são tão críticas como se os analitos alvo fossem a HERO e a COC [75], ou mesmo as BZD.

Na tabela 3.10 resumem-se, com base na revisão bibliográfica efectuada, os procedimentos de libertação e extracção aplicados às amostras de cabelo, usadas para determinar os canabinóides incluídos no nosso trabalho, antes da análise por GC/MS ou GC/MS/MS.

A hidrólise alcalina, empregando NaOH, é claramente o procedimento mais utilizado, sendo variáveis a concentração a temperatura e o tempo de duração da hidrólise. A digestão enzimática e o uso de solventes orgânicos são empregues sobretudo se se pretender analisar compostos quimicamente instáveis.

Anteriormente a 1992 [208] a detecção de Δ^9 -THC-COOH por GC/MS, era precedida por uma hidrólise do cabelo em solução alcalina seguida de SPE em colunas *Baker C₁₈*.

O efeito da concentração de NaOH na digestão do cabelo foi verificada no trabalho desenvolvido por Wilkins *et al.* [366]. Concluíram que o NaOH 1N seria o mais indicado por permitir uma rápida e completa solubilização da amostra. Na opinião desses autores só a completa solubilização garante a libertação, na totalidade, da droga aprisionada nas regiões mais internas do cabelo.

Tabela 3.10 - Padrões internos, métodos de libertação e extracção de canabinóides em cabelo.

Composto	Padrão Interno (I.S.)	Libertação	Extracção	Ref
THC-COOH	SKF 525A	3 mL NaOH 1M a 100°C, 1 h; alcalinizar com tampão fosfato (pH 9,2) a 1 mol/L	(LLE) 5 mL clorofórmio/isopropanol/ <i>n</i> -heptano (50:17:33, <i>v/v</i>)	[162]
THC-COOH	Levalorfan	1 mL NaOH a 100°C, 10 min; neutralizar com HCl	(LLE) 5 mL clorofórmio/isopropanol/ <i>n</i> -heptano (50:17:33, <i>v/v</i>)	[168]
THC THC-COOH	THC-d ₃ THC-COOH-d ₃	1 mL NaOH 1N a 95°C, 10 min; acidificar com 0,5 mL ácido acético concentrado	(LLE) 5 mL <i>n</i> -hexano/acetato de etilo (90:10, <i>v/v</i>); lavar fase orgânica com 1 mL NaOH 0,1N e com 1 mL HCl 0,1N	[51]
THC-COOH	THC-COOH-d ₃	1 mL NaOH a 95°C, 30 min; acidificar com 1 mL de ácido acético	(LLE) 5 mL <i>n</i> -hexano/acetato de etilo (90:10, <i>v/v</i>); lavar fase orgânica com 1 mL NaOH 0,1N e com 1 mL HCl 0,1N	[156]
THC 11-OH-THC THC-COOH	THC-d ₃ THC-COOH-d ₃ 11-OH-THC-d ₃	2 mL NaOH a 37°C, toda a noite <i>β</i> -glucuronidase ^a (<i>Helix pomatia</i> , 2000 unidades/mL, em tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,6)	(LLE) 2 mL <i>n</i> -hexano/acetato de etilo (90:10, <i>v/v</i>); lavar fase orgânica com 2 mL HCl 0,1N; lavar fase aquosa com 1 mL de HCl 6N e extrair com 2 mL de <i>n</i> -hexano/acetato de etilo (90:10, <i>v/v</i>); secar os dois extractos sob corrente de ar a 40°C.	[366]
THC/ CBD/ CBN	THC-d ₃	-----	Extracção por fluido supercrítico (SFE)	[50]
THC/THC-COOH	THC-d ₃ THC-COOH-d ₃	Enzimática	(LLE) <i>n</i> -hexano/acetato de etilo	[203]
THC/CBD/CBN	THC-d ₃	1 mL NaOH 1N a 95°C, 10 min	(LLE) 5 mL <i>n</i> -hexano/acetato de etilo (90:10, <i>v/v</i>)	[56]
THC/THC-COOH	THC-d ₃ THC-COOH-d ₃	A 10 gotas de KOH 11,8M, 10 min temperatura ambiente; 1,3 g de ácido maleico B [51]	(LLE) 2X [5 mL <i>n</i> -hexano/acetato de etilo (90:10, <i>v/v</i>)] (LLE) [51]	[137]
THC	Metaqualona	4 mL MeOH a 50°C em ultrassons durante 5 h	(LLE) 2 mL <i>n</i> -hexano/acetato de etilo (90:10, <i>v/v</i>) que se rejeita; Extrair fracção aquosa, acidificada com 200 µL HCl 12N, com 3,2 mL <i>n</i> -hexano/acetato de etilo (90:10, <i>v/v</i>)	[142]
THC-COOH	THC-COOH-d ₃	200 µL EtOH+ 2 mL H ₂ O desionizada + 200 µL NaOH 10N a 70°C, 60 min.	(SPE) Acondicionamento: MeOH, H ₃ PO ₄ 0,05N. Verter a amostra acidificada (pH 4-5). Lavagem: acetoneitrilo/ácido clorídrico 0,1N (2:3, <i>v/v</i>). Eluição: acetato de etilo/ <i>n</i> -hexano (1:1, <i>v/v</i>).	[33]
THC-COOH	THC-COOH-d ₃	0,5 mL MeOH, 0,5 mL de KOH 10N (10 min a 70°C em ultrassons); acidificar com ácido acético	(SPE) Acondicionamento: MeOH, H ₃ PO ₄ 0,05N. Verter a amostra acidificada (pH 4-5). Lavagem: acetoneitrilo/HCl 0,1N (2:3, <i>v/v</i>). Eluição: 1,5 mL acetato de etilo/ <i>n</i> -hexano (1:1, <i>v/v</i>).	[344]
THC THC-COOH	THC-d ₃ THC-COOH-d ₃	10 gotas de KOH 11,8M, 10 min, temperatura ambiente; 1,3 g de ácido maleico	(LLE) 2X (5 mL <i>n</i> -hexano/acetato de etilo (9:1, <i>v/v</i>))	[136]
THC THC-COOH	NR THC-COOH-d ₃	1 mL NaOH 1N a 70°C, 10 min; acidificar com 0,3 mL de ácido acético	(SPE) (Colunas <i>narc-1 da Baker</i>) Acondicionamento: 2 mL MeOH, 2 mL H ₃ PO ₄ 0,05N. Verter amostra acidificada (pH 4-5). Lavagem: acetoneitrilo/HCl 0,1N (2:3, <i>v/v</i>). Eluição: 1,5 mL acetato de etilo/ <i>n</i> -hexano (1:1, <i>v/v</i>).	[114]
THC	THC-d ₃	4 mL MeOH a 50°C em ultrassons durante 5 h	(LLE) 5 mL <i>n</i> -hexano/acetato de etilo (9:1, <i>v/v</i>)	[78]
THC/ CBD/ CBN	THC-d ₃	1 mL NaOH a 95°C, 10 min;	(LLE) 5 mL <i>n</i> -hexano/acetato de etilo (9:1, <i>v/v</i>)	[47]
THC/ CBD/ CBN	THC-d ₃	200 µL NaOH 1M a 90°C, 10 min; neutralizar com HCl 6M; 200 µL tampão fosfato pH 7,5	Microextracção por fase sólida (SPME) Mergulhar fibra de 30 mm de PDMS 15 min em 200 µL de cabelo digerido neutralizado; Desadsorção a 260°C durante 2 min.	[326]
THC THC-COOH	THC-d ₃ THC-COOH-d ₃	10 gotas de KOH 11,8M, temperatura ambiente, 10 min; 1,3 g de ácido maleico	(LLE) 2X [<i>n</i> -hexano/acetato de etilo (9:1, <i>v/v</i>)]	[135]

THC	THC-d ₃	0,5 mL MeOH em ultrassons a 40°C, 1 h; decantar a fase metanólica após repouso toda a noite; evaporar sob corrente de N ₂ e derivatizar		
THC-COOH	THC-COOH-d ₃	0,5 mL MeOH+ 0,5 mL KOH 10N em ultrassons a 70°C, 30 min; ajustar pH 4-3 com ácido acético	(SPE) (Colunas Bakerbond) Acondicionamento: 2X MeOH; 1 mL H ₃ PO ₄ . Verter amostra, 1 mL H ₃ PO ₄ . Lavagem: 2 mL acetonitrilo/HCl 0,1N (2:3, v/v). Secar sob vácuo. Eluição: 1,5 mL acetato de etilo/ <i>n</i> -hexano (1:1, v/v).	[347] [345] ^b
THC/CBN/CBD	THC-d ₃	0,5 mL NaOH 1M a 70°C, 10 min; neutralizar com HCl 12N e 0,4 mL de H ₂ O desionizada	(LLE) 5 mL <i>n</i> -hexano/acetato de etilo (9:1, v/v)	[268]
THC-COOH	THC-COOH-d ₃	2 mL NaOH 2M a 95°C, 30 min; neutralizar com 1 mL ácido glacial	(LLE) 6 mL <i>n</i> -hexano/acetato de etilo; lavar fracção orgânica: 1 mL NaOH 0,5M, 1 mL HCl 0,1M. Separação por HPLC. Reextração, após adição de 1 mL H ₃ PO ₄ 0,05M, com <i>n</i> -hexano/acetato de etilo	[290]
THC	THC-d ₃	4 mL MeOH em ultrassons a 50°C, 4 h; evaporar, reconstituir o resíduo em 7 mL de tampão fosfato (0,1M, pH 6,0) contendo 400 mg de albumina de soro de bovino	(SPE) para o THC (Colunas Bakerbond C ₁₈) Acondicionamento: 2 mL MeOH, 2 mL tampão fosfato (0,1M, pH 6,0). Lavagem: 1 mL de ácido acético 0,1M, secar 10 min sob vácuo. Eluição: 3 mL diclorometano/acetona (1:1, v/v).	[276]
THC/ CBD/ CBN	NR	2 mL NaOH 1M a 90°C, 45 min	(LLE) 3 mL <i>n</i> -hexano/acetato de etilo (6:1, v/v)	[7]
THC/ CBD/ CBN	THC-d ₃	1 mL NaOH a 4% a 100°C, 30 min; ajustar pH 4-9 com 32-70 µL ácido ortofosfórico 85%; 5 min sob corrente de N ₂ ; 0,5 g sulfato de sódio	Micro-extração por fase sólida em modo <i>Headspace</i> (HS-SPME) Adsorção a 100°C, 30 min, numa fibra PDMS/DVB	[316]
THC-COOH	THC-COOH-d ₃	1,0 mL NaOH 1M a 80°C, 30 min; centrifugar 10 min; adicionar o sobrenadante a tubos contendo 1 mL ácido acético+3 mL ácido acético 1M+2 mL tampão de acetato de sódio 0,1M (pH 4,5)	(SPE) (Colunas ZSTHC020) Acondicionamento: 3 mL MeOH; 3 mL água desionizada; 1 mL HCl 0,1M. Verter a amostra. Lavagem: 2 mL água desionizada; 2 mL HCl 0,1M/acetonitrilo (70:30, v/v). Secar sob vácuo; Eluição: 3,0 mL <i>n</i> -hexano/acetato de etilo (75:25, v/v)	[221]
THC/ CBN/ CBD	NR	1,0 mL NaOH 1M a 95°C, 10 min;	NR	[303]
THC/ CBN/ CBD	THC-d ₃	1,0 mL NaOH 1M e 0,5 g carbonato de sódio a 90°C, 5 min.	(HS-SPME), exposição da agulha durante 25 min	[227]
THC-COOH	NR	Dissolução enzimática; centrifugação	NR	[205]
THC CBN CBD	THC-d ₃	1,0 mL NaOH 1M; agitação magnética 5 min a 90°C	Extração dinâmica por fase sólida no modo <i>headspace</i> (HS-SPDE) 30 ciclos de SPDE a 50 µL/s, com agitação magnética, 20 min a 90°C	[180]

---- Não se utiliza ou não se efectua; * Experiência englobada nas investigações preliminares; H₃PO₄- Ácido fosfórico; KOH- Hidróxido de potássio; PDMS- Polidimetilsiloxano; DVB- Polidivinilbenzeno; ^b só para THC-COOH; A Metodologia A; B Metodologia B; N₂-Azoto.

A LLE [6, 7, 47, 51, 56, 135, 137, 156, 162, 168, 188, 203, 268, 290, 366], e a SPE [6, 88, 114, 188, 221, 276, 344, 345, 347] são as mais utilizadas para purificação das amostras e concentração dos canabinóides (Tabela 3.10). Mais recentemente, têm sido empregues processos de SPME [326], HS-SPME [227, 316] e HS-SPDE [180].

Entre os solventes mais utilizados no processo extractivo, destaca-se a mistura *n*-hexano/acetato de etilo. São variáveis as proporções (v/v) dos componentes da mistura e o pH de extração (Tabela 3.10). Felgate *et al.* [83] verificaram, pela aplicação de diferentes solvente e misturas de solventes na extração de Δ⁹-THC e Δ⁹-THC-COOH, que a mistura *n*-hexano/acetato de etilo possibilitava, não só a obtenção de recuperações mais elevadas de ambos os compostos, como não produzia interferências e era de rápida evaporação. Apenas as

misturas com um componente polar (ex. acetato de etilo) garantem elevadas recuperações do Δ^9 -THC-COOH [83].

Alguns autores [78, 142, 347] recorrem exclusivamente ao uso do metanol para extracção de canabinóides e metabolitos do cabelo. Trata-se de um procedimento que permite uma extracção rápida do Δ^9 -THC por se tratar de um composto não polar [78, 142]. A adição de pequenas quantidades de ácido ao solvente promove a hidrólise de compostos quimicamente instáveis e a diminuição da taxa de extracção do Δ^9 -THC [142]. Nos casos em que é preciso confirmar o consumo de *Cannabis*, deve determinar-se o Δ^9 -THC-COOH, aplicando outro método de extracção [78].

A extracção de canabinóides (Δ^9 -THC, CBD e CBN) pode ser, também, efectuada por SFE, tendo sido descrita pela primeira vez por Cirimele *et al.* [50].

O uso da SPME para detecção dos principais canabinóides (Δ^9 -THC, CBN, CBD), no cabelo, permite uma rápida e fácil identificação. No entanto, o Δ^9 -THC-COOH não pode ser detectado, após extracção por esta técnica, se se seguir uma análise por GC/MS, porque o composto tem de ser previamente derivatizado [326].

A situação ideal para extracção por HS-SPME é a digestão da matriz em solução alcalina (se os analitos forem estáveis nestas condições) e, para se evitarem interferências da matriz, as amostras deverão ser pequenas [227, 316]. A dissolução e extracção da amostra ocorre sem recurso a solventes orgânicos e no mesmo contentor. É pré-requisito que a droga se encontre na solução aquosa num estado não ionizado [316]. Como os canabinóides possuem grupos fenólicos -OH e, em alguns casos, -COOH, é necessário ajustar o pH da solução, após hidrólise alcalina (antes da HS-SPME) para que a extracção ocorra em condições neutras ou ácidas. O Δ^9 -THC, CBN e CBD possuem os pré-requisitos para extracção por *headspace*: são lipofílicos, semi-voláteis e com propriedades adequadas em GC sem derivatização. Sporkert & Pragst [316] e Musshoff *et al.* [227] desenvolveram um método para extracção de Δ^9 -THC, CBD e CBN do cabelo por HS-SPME. Os melhores resultados na extracção verificaram-se a pH 4 - 7 [316].

A HS-SPDE é similar à HS-SPME, no entanto, é um processo de extracção dinâmico em que é usada uma seringa, controlada por computador, para efectuar repetidas aspirações e foi usada por Lachenmeier *et al.* [180] para extracção de Δ^9 -THC, CBN e CBD em amostras de cabelo. É referida uma agitação magnética, durante o processo extractivo, no sentido de minorar as desvantagens causadas pela baixa volatilidade dos canabinóides [180].

Na análise devem ser usados sobretudo padrões internos deuterados dos compostos, sendo esta a situação ideal, como já referimos. Nos diversos trabalhos publicados empregam-se principalmente padrões internos deuterados do Δ^9 -THC e do Δ^9 -THC-COOH. Não há referência ao uso de padrões internos deuterados do CBN e do CBD, quantificando-se os compostos com o deuterado do Δ^9 -THC.

Análise

Derivatização e métodos de detecção

A derivatização de compostos com agentes perfluorinados é indicada para análise utilizando detectores de massa (GC/MS, GC/MS/MS) no modo NCI [33, 301, 345, 347], ou detectores de captura de electrões (ECD) [86], uma vez que com a introdução de átomos halogenados a sensibilidade aumenta.

Para análise por GC/MS de *Cannabis* no cabelo têm sido usados preferencialmente, como agentes de derivatização, anidridos perfluorinados (Tabela 3.11).

Os trabalhos mais antigos [46, 208] referem uma derivatização do Δ^9 -THC com PFPA e, do Δ^9 -THC-COOH com iodeto de metilo ou com PFPA e PFPOH. O PFPA derivatiza a metade fenol do Δ^9 -THC-COOH enquanto que o PFPOH converte a função ácido carboxílico ao éster correspondente [156]. Embora a combinação HFBA/HFIP, em substituição de PFPA/PFPOH, como agentes de derivatização, altere os LOD's do Δ^9 -THC e do Δ^9 -THC-COOH, analisados por GC/MS em modo EI, que passam de 100 pg/mg para 10 pg/mg [51, 135], em modo NCI, a substituição referida não melhora o LOD do Δ^9 -THC-COOH mas permite que se obtenha, nas condições de análise, um pico iónico de massa mais elevada ($m/z=670$ em vez de $m/z=622$) [156].

Cirimele *et al.* [51], em investigações preliminares, obtiveram melhores recuperações (análise efectuada por GC/MS-EI) em extractos derivatizados com BSTFA/TMCS mas abandonaram este tipo de derivatização devido a picos interferentes no mesmo tempo de retenção do Δ^9 -THC.

Möeller [208] analisou o Δ^9 -THC-COOH utilizando para o efeito a GC/MS-EI, após derivatização com PFPA e PFPOH.

Devido à baixa concentração do metabolito Δ^9 -THC-COOH no cabelo, torna-se particularmente difícil a sua detecção e quantificação nessa matriz. Apenas se pode detectar e

identificar de forma conclusiva usando um método de análise com elevada especificidade e LOD's baixos [156]. Reconhecendo as vantagens da GC/MS/MS na determinação de drogas existentes em baixas concentrações no cabelo, são descritos procedimentos para análise de Δ^9 -THC-COOH por essa técnica usando a EI ou a NCI [44, 344, 348]. Estes procedimentos são, no entanto, caros, restringindo-se quase exclusivamente à investigação [86, 156] por não serem acessíveis à maioria dos laboratórios [290]. Além disso, nem sempre se tem verificado a possibilidade de detectar Δ^9 -THC-COOH em cabelo proveniente de consumidores de *Cannabis*, usando a GC/MS/MS [203]. O modo monitorização de reacção múltipla (MRM), tem permitido obter uma maior sensibilidade e selectividade, na determinação de drogas no cabelo, em particular dos canabinóides, comparativamente ao modo SIM [180].

Por conseguinte, a GC/MS tem sido a técnica mais utilizada na análise de canabinóides no cabelo. A sensibilidade no modo NCI é superior, comparativamente ao modo EI, [11, 141] tornando-o apropriado para análise de canabinóides, sobretudo do Δ^9 -THC e do Δ^9 -THC-COOH [11, 114, 156]. Comparando uma análise efectuada por GC/MS-EI [51] com GS/MS-NCI [156], usando o mesmo processo de preparação da amostra, extracção e derivatização verifica-se uma diminuição em 20 vezes no LOD pela aplicação da última técnica.

Limite de detecção e concentrações determinadas

Os resultados qualitativos não evidenciam qualquer relação entre os compostos (canabinóides e metabolitos) presentes na matriz.

Descrevem-se as seguintes situações:

- o CBN e o CBD são de mais fácil detecção do que o Δ^9 -THC [56], verificando-se menor número de casos positivos para Δ^9 -THC [56, 326];
- o Δ^9 -THC e o CBN são mais frequentes do que CBD [303];
- o CBN e o Δ^9 -THC estão presentes nas amostras com CBD [303];
- o CBN, Δ^9 -THC e Δ^9 -THC-COOH estão presentes, em simultâneo, em todos os segmentos de cabelo [343];
- o Δ^9 -THC-COOH detecta-se, na globalidade, em menos casos do que o Δ^9 -THC [51, 114, 137, 203, 210, 290, 366];
- o Δ^9 -THC pode estar presente, sem se detectar Δ^9 -THC-COOH [114, 203, 210, 290, 366] e 11-OH-THC [366];

- o Δ^9 -THC-COOH pode estar presente, sem se detectar o Δ^9 -THC [203, 290, 343];
- o Δ^9 -THC e o Δ^9 -THC-COOH presentes, em simultâneo [203, 290].

Na tabela seguinte apresentam-se as técnicas de análise e os resultados.

Tabela 3.11 - Técnicas de análise de canabinóides em cabelo e resultados.

Composto	Derivatização	Reconstituição	Análise (cromatógrafo) (detector)	LOD pg/mg	Nº de casos analisados	Nº de casos positivos	Intervalo (média) (pg/mg)	Ref
THC-COOH	TFA	Sem reconstituição	GC/MS-EI (Perkin Elmer) (<i>Ion Trap</i>)	NR	29	27	400-2700 (NR)	[162]
THC-COOH	BSTFA + TMCS 1%	20 µL de diclorometano	GC/MS-EI (Perkin Elmer 8500) (<i>Ion Trap</i>)	NR	NR (dois anos de análises)	32	270-2910 (NR)	[168]
THC	100 µL PFPA+ 75 µL PFPOH (60°C, 30 min)	25 µL de acetato de etilo	GC/MS-EI (HP 5890) (MSD HP 5971)	100	43	15	260-2170 (740 cabelo) 340-3910 (1350 púbicos)	[51]
THC-COOH	100 µL PFPA+ 75 µL PFPOH (60°C, 30 min)	25 µL de acetato de etilo	GC/MS-EI (HP 5890) (MSD HP 5971)	100	43	15	70-330 (160 cabelo) 70-830 (280 púbicos)	[51]
THC-COOH	100 µL PFPA+ 75 µL PFPOH (70°C, 30 min)	25 µL de ciclohexano	GC/MS-NCI (HP 5890) (MS HP 5989 B Engine)	5	30	17	20-390 (120)	[156]
THC	TFAA (70°C, 30 min) em 100 µL de clorofórmio	50 µL de <i>n</i> heptano	GC/MS-NCI (Varian 3400) (Finnigan MAT 4500)	10	8	0	25,6-1061 (296,4) ^a 24,2-623,8 (226,5) ^b 18,6-552,3 (176,8) ^c 32,1-669,4 (263,5) ^d 39,2-611,0 (210,5) ^e	[366]
11-OH-THC	500 µL MeOH-BF ₃ (70°C, 10 min); 100 µL TFAA (70°C, 10min) em 100 µL de CHCl ₃	50 µL de <i>n</i> heptano	GC/MS-NCI (Varian 3400) (Finnigan MAT 4500)	250	8	0	Sem resultados positivos	[366]
THC-COOH	100 µL TFAA (70°C, 10min) em 100 µL de CHCl ₃	50 µL de <i>n</i> heptano	GC/MS-NCI (Varian 3400) (Finnigan MAT 4500)	10	8	0	Sem resultados positivos	[366]
THC CBD CBN	NR	NR	GC/MS-EI (HP 5890) (MS HP 5971)	NR	1	1	1 560 1 2870 1 600	[50]
THC THC-COOH	HFBA+ HFIP	NR NR	GC/MS/MS-NCI (Varian 3400) (Finnigan TSQ-700)	0,02 0,02	93	89	85 3 – 438 (43,1) 65 0,03 – 1,53 (0,322)	[203]
THC CBD CBN	Sem derivatização	20 µL de ciclohexano	GC/MS-EI (HP 5890) (MS HP 5989 B Engine)	100 20 10	30	23	5 100-290 (150) 23 30-3000 (440) 22 10-1070 (130)	[56]
THC/ THC-COOH	A 100 µL hexano + 60 µL HFBA + 50 µL HFPOH (10 min a 100°C)	100 µL de hexano	GC/MS-EI (HP 5890A) (MSD HP 5970)	THC 14 THC-COOH 10	10	70	49/45 340-1600 (712) 20-290 (124)	60-7630(970) 50- 3870(500)
	B 50 µL PFPA+ 25 µL HFIP (30 min a 70°C)	25 µL de ciclohexano	GC/MS-NCI (HP 5890) (MS HP 5989 B engine)	THC 10 THC-COOH 5	98	10/10	54/33 290-1320 (600) 40-260 (151)	20-2170(630) 50- 390(100)
THC	50 µL PSA (1 h a 100°C)	50 µL de acetato de etilo contendo 5% de PSA	GC/MS (HP 6890) (MSD HP 5973)	100 ^b	850	104	9-1670 (1500)	[142]
THC-COOH	50 µL HFIP+ 50 µL HFBA (60 min a 70°C)	20 µL de tolueno	GC/MS/MS-NCI (Varian 3400) (Finnigan TSQ-700)	NR	1	1	1,6	[33]
THC-COOH	100 µL PFPA + 25 µL HFIP (30 min a 70°C)	10 µL de acetato de etilo	GC/MS/MS- NCI (Varian 3400) (Finnigan TSQ -700)	NR	NR	NR	NR	[344]
THC THC-COOH	100 µL hexano+ 60 µL HFBA+ 50 µL HFPOH (10 min a 100°C)	100 µL de hexano	GC/MS-EI (HP 5890 SérieII) (MSD HP 5971)	NR	10	4 4	300-1900 (763) 100-700 (350)	[136]

THC	100µL PFPA+ 75µL HFIP (70°C, 30 min)	40 µL de acetato de etilo	GC/MS-NCI (HP 6890) (Finnigan 4500)	NR	60	60	NR (NR)	[114]
THC-COOH				10		0	Sem resultados positivos	
THC	50 µL PSA (45 min a 100°C)	50 µL de acetato de etilo contendo 1% de PSA	GC/MS (HP 5890) (MSD HP 5970)	NR	377	119	20-5580 (NR)	[78]
THC	Sem derivatização	20 µL de ciclohexano	GC/MS-EI (HP 5890) (MS HP 5989 B)	50	3	0	Sem casos positivos	[47]
CBD				20				
CBN				10				
THC	Sem derivatização	Sem reconstituição	GC/MS-EI (HP 5890 A) (MS HP 5971)	100	20	20	12	100-700 (NR)
CBD				200			20	700-14100 (NR)
CBN				100				400-700 (NR)
THC	100 µL hexano+ 60 µL HFBA+ 50 µL HFPOH (10 min a 100°C)	100 µL de hexano	GC/MS-EI (HP 5890 SérieII) (MS HP 5971A)	14	70	49	NR	60-7630 (970)
THC-COOH				10			NR	60-3870 (500)
THC	50µL PFPA+ 25 µL HFIP (30 min a 70°C)	100 µL de acetato de etilo	GC/MS/MS-PCI (Varian 3400) (Finnigan TSQ 700)	NR	NR	NR	NR	[347, 345]
THC-COOH			GC/MS/MS-NCI (Varian 3400) (Finnigan TSQ 700)		1	1	≈0,16	
THC	Sem derivatização	25 µL de acetato de etilo	GC/MS-EI (HP 6890 A) (MSD HP 5973)	100	10 ^f + 5 ^g	4+1	NR	[268]
CBD								
CBN								
THC	100 µL PFPA+ 25 µL HFIP (30 min a 70°C)	40 µL de acetato de etilo	GC/MS-NCI (HP 6890) (MDS HP 5973)	NR	157	134	130	Geralmente < 5ng/mg (NR)
THC-COOH				0,3			89	< 10pg/mg (NR)
THC	Iodeto de metilo	50 µL de acetato de etilo	GC/MS-EI (HP 6890) (MSD HP 5973)	NR	11	7	NR (NR)	[276]
THC	Sem derivatização	50 µL de acetato de etilo	GC/MS-EI (HP 5890) (MSD HP 5972)	NR	90	0	Sem casos positivos	[7]
CBD								
CBN								
THC	Sem derivatização	Sem reconstituição	GC/MS-EI (HP6890) (MS HP 5973)	NR	1	1	0	ND
CBD							0	ND
CBN							1	1300
THC-COOH	20 µL HFIP+ 40 µL TFAA (45 min a 80°C)	30 µL de tolueno	GC/MS-NCI (HP 6890) (MDS HP 5973)	0,3	155 + 6	144 + 5	0,5-2,5 (NR)	0,60-12,9 (3,262)
THC	NR	NR	GC/MS-EI (NR)	100	84	7	7	130-7250 (2140)
CBD				20			7	50-2270 (550)
CBN				20			5	230-2790 (966)
THC	25 µL MSTFA (8 min a 90°C)	Injecção directa	GC/MS-EI (Agilent 6890) (MSD Agilent 5973N)	50	25	NR	NR	290-2200 (1700)
CBD				140				550-4540 (1200)
CBN				80				530-18360 (1300)
THC-COOH	NR	NR	GC/MS/MS (NR)	NR	89775	3678	NR (0,716)	[205]
THC	25 µL MSTFA, 6 ciclos SPDE	---	GC/MS/MS (Agilent 6890) (Kodiac 1200)	40	---	---	---	[180]
CBD				51				
CBN				52				

HFIP- Hexafluoroisopropanol; HFPOH- Hexafluoropropanol; PSA- Ácido propiónico; MSTFA- *N*-metil-*N*- trimetilsilil-trifluoroacetamida; TFAA- Anidrido trifluoroacético; ≈ aproximadamente igual; **a** sem lavar; **b** lavado com MeOH; **c** lavado com CH₂Cl₂; **d** lavado com tampão fosfato; **e** lavado com isopropanol anidro; **f** positivos pela análise por RIA; **g** brancos; **h** quando analisado pelo menos 50 mg de cabelo; **i** só para THC-COOH; **A** Metodologia A; **B** Metodologia B; CHCl₃- Triclorometano

Os resultados quantitativos obtidos nas análises ao cabelo de consumidores de *Cannabis* são, igualmente, bastante heterogéneos. Nas concentrações determinadas são apresentadas as seguintes situações:

- Δ⁹-THC < CBN < CBD, contrariando as análises ao haxixe de rua (concentração de Δ⁹-THC mais elevada) [50, 227, 326, 343];

- CBN < CBD < Δ^9 -THC [303];
- a uma maior concentração em Δ^9 -THC nem sempre corresponde a maior concentração em CBN e/ou de CBD [303];
- aumento da concentração de CBN e Δ^9 -THC com aumento da distância à raiz do cabelo [343, 346, 347];
- diminuição da concentração de Δ^9 -THC-COOH com o aumento da distância à raiz do cabelo [343, 346, 347];
- Δ^9 -THC-COOH < Δ^9 -THC [51, 75, 135, 137, 343];
- Δ^9 -THC-COOH > Δ^9 -THC (concentração média) [210].

As maiores concentrações de Δ^9 -THC, CBN, CBD e Δ^9 -THC-COOH determinadas foram 7639 pg/mg [137], 4540 pg/mg [227], 18360 pg/mg [227] e 5580 pg/mg [78], respectivamente. Nos pêlos púbicos a concentração de Δ^9 -THC e Δ^9 -THC-COOH é superior à determinada no cabelo do mesmo indivíduo [51]. Relativamente às concentrações determinadas para o Δ^9 -THC-COOH, no cabelo, são controversas. Os laboratórios que utilizam detectores MS encontram elevadas concentrações de Δ^9 -THC-COOH [135, 156]. Por oposição, os que usam técnicas *Tandem* MS encontram, em amostras de cabelo de consumidores de *Cannabis*, valores geralmente abaixo de 10 pg/mg (Tabela 3.11) [205, 344].

Na interpretação dos resultados obtidos deverá ter-se em conta uma multiplicidade de aspectos. A variedade individual no metabolismo da droga, os ciclos de crescimento do cabelo, a concentração residual da droga em cabelos telogénicos e catagénicos, a contaminação exógena, a via de administração, a perda de droga do cabelo são factores que podem influenciar a concentração das drogas nessa matriz [142]. A acrescentar às diferenças individuais, à frequência de consumo, à dose e à heterogeneidade da *Cannabis* de rua [56], os resultados quantitativos (concentração absoluta) dos canabinóides são muito diversos em consequência de diferenças na metodologia analítica, tais como a preparação da amostra, segmentação do cabelo, procedimentos de descontaminação, de extracção e análise [137, 366].

No que concerne às concentrações de Δ^9 -THC determinadas, não se verifica uma relação com a frequência de consumo de marijuana, ou com a idade do indivíduo, o sexo ou raça [366]. Do mesmo modo, maiores concentrações de Δ^9 -THC-COOH não significam maior frequência de consumo de marijuana [221].

Uhl & Sporket [343] alertam-nos para um conjunto de seis factores especiais que podem influenciar os resultados quantitativos do Δ^9 -THC, CBN, CBD e Δ^9 -THC-COOH: radiação UV intensa; tratamento cosmético intensivo (coloração, descoloração e ondulação),

uso de produtos de lavagem especiais; uso de shampoos contendo canabinóides; ingestão de produtos alimentares derivados da *Cannabis*; cor do cabelo. A exposição do cabelo à radiação solar origina um decréscimo nos canabinóides que são principalmente analisados nessa matriz (Δ^9 -THC, CBN e CBD). Por isso, os segmentos distais ao couro cabeludo são os mais afectados pela radiação UV [309]. Os produtos usados no tratamento cosmético intensivo são bases fortes, causando danos no cabelo [136, 343]. Verifica-se um decréscimo nas concentrações de Δ^9 -THC (variam entre 12,3% a 61%) e Δ^9 -THC-COOH (variam entre 5% a 77,6%) nas porções de cabelo tratado (coloração/descoloração) comparativamente às do não tratado [136]. O uso de produtos especiais de limpeza, nomeadamente o shampoo especial de ultra limpeza, afectam os resultados da análise ao cabelo [277]. Verifica-se um decréscimo de 36% na concentração de Δ^9 -THC apenas com uma lavagem [277]. Kelly *et al.* [143] obtiveram maior percentagem de casos positivos para Δ^9 -THC na classe de cabelo com cor castanho médio, o que poderá indicar uma tendência de consumo e não uma dependência do teor de melanina.

Os resultados da análise de Δ^9 -THC e Δ^9 -THC-COOH em pêlos púbicos e cabelos pertencentes ao mesmo indivíduo, aplicando a mesma metodologia analítica [51], evidenciam sobretudo a importância da localização da amostragem.

A determinação de casos positivos para Δ^9 -THC e negativos para Δ^9 -THC-COOH pode ser devido às baixas concentrações do metabolito, inferiores ao LOD [114, 366]. Um resultado negativo para Δ^9 -THC não exclui o consumo de *Cannabis* [203, 290, 348]. A concentração de Δ^9 -THC-COOH não tem uma associação significativa com a cor do cabelo em que é determinada não havendo, por isso, um efeito demonstrável da cor [205].

Apesar de não existir uma relação exacta entre dose consumida/concentração detectada [78], Kauert *et al.* [142] e Eckhardt & Cirimele [78] classificaram o comportamento de consumo em dois grupos, tendo por base a concentração de Δ^9 -THC detectada no cabelo e os auto-relatos dos consumidores: concentrações de Δ^9 -THC entre 0,1 ng/mg e 1,0 ng/mg sugerem um consumo de *Cannabis* semanal a diário (ocasional) e concentrações acima de 1 ng/mg parecem associar-se a um consumo diário, várias vezes ao dia (frequente). É possível detectar, numa amostra de cabelo, um consumo ocasional de uma toma de droga por semana [142].

Não há nenhum trabalho, do nosso conhecimento, onde se efectue uma análise quantitativa, em cabelo, dos compostos CBN, CBD, Δ^9 -THC e Δ^9 -THC-COOH, em

simultâneo, para que se pudesse avaliar a existência de uma possível correlação entre as suas concentrações.

Independentemente das relações quantitativas entre os vários canabinóides, os dados apresentados na tabela 3.11 evidenciam que os mesmos estão presentes no cabelo em concentrações reduzidas, sobretudo o Δ^9 -THC-COOH. Conseqüentemente, nos métodos analíticos desenvolvidos, têm de se conseguir LOD's muito reduzidos. Para o Δ^9 -THC-COOH os valores mais comuns, usando a GC/MS-NCI, são 5 e 10 pg/mg (Tabela 3.11). Na totalidade dos canabinóides, os LOD's variaram entre 0,3 pg/mg e 250 pg/mg, usando a análise por GC/MS-EI ou GC/MS-NCI (Tabela 3.11).

Na tabela 3.12 apresentam-se as condições operacionais por GC/MS e alguns limites de positividade.

Tabela 3.12 – Colunas, iões usados na identificação e quantificação de canabinóides e alguns limites de positividade.

Composto	coluna	Limites de positividade	Iões m/z *	Ref
THC THC-COOH	Capilar HP-5MS (30 m X 0,25 mm i.d.)	NR	THC ($m/z=377, 317, 460$) THC-COOH ($m/z=459, 607, 623$)	[51]
THC-COOH	Capilar HP-1 (12 m X 0,20 mm i.d.)	0,05 ng/mg	THC-COOH ($m/z=602, 622, 474$)	[156]
THC 11-OH-THC THC-COOH	Capilar Restek Rtx® 200-15M-0,25 μ m (30 m X 0,25 mm i.d. X 0,2 μ m de película de revestimento)	Confirmação por GC/MS dos resultados positivos por EMIT	THC ($m/z=410$) NR THC-COOH ($m/z=454$)	[366]
THC CBD CBN	Capilar HP-5MS (30 m X 0,25 mm X 0,25 μ m de película de revestimento)	NR	THC ($m/z=299$) CBD ($m/z=231$) CBN ($m/z=295$)	[50]
THC CBD CBN	Capilar HP- 5MS (30 m X 0,25 mm i.d.)	NR	THC ($m/z= 299, 271, 314$) CBD ($m/z= 231, 246, 314$) CBN ($m/z= 295, 238, 310$)	[56]
THC THC-COOH	Capilar de sílica fundida J&W DB-5MS (30 m X 0,32 mm i.d. X 0,25 μ m de película de revestimento)	NR 0,16 pg/mg	NR THC-COOH ($m/z =620, 383, 492$)	[30] [58] ^o
THC/ THC-COOH	A Capilar HP Ultra1 (25 m X 0,2 mm i.d. X 0,33 μ m de película de revestimento) B Capilar HP Ultra 1 (12 m X 0,20 mm i.d.)	THC 14 pg/mg THC-COOH 10 pg/mg	THC ($m/z=427, 510$) THC-COOH ($m/z=477, 539$)	[137]
THC	Capilar DB1 (20 m X 0,25 mm i.d. X 0,25 μ m de película de revestimento)	NR	THC ($m/z=297, 313, 370$)	[142]
THC-COOH	Capilar de sílica fundida J&W DB-5MS (15 m X 0,25 mm i.d. X 1,0 μ m de película de revestimento)	0,05 pg/mg	THC-COOH ($m/z=344, 492$)	[33]
THC-COOH	Capilar de sílica fundida J&W DB-5MS (30 m X 0,32 mm i.d. X 0,25 μ m de película de revestimento)	NR	THC-COOH ($m/z =383, 620$)	[344]
THC THC-COOH	Capilar HP-5MS (30 m X 0,25 mm i.d. X 0,25 μ m de película de revestimento)	NR	NR THC-COOH ($m/z=472, 492, 620$) ^o	[136]
THC	Capilar J&W DB-5MS (20 m X 0,25 mm i.d. X 0,25 μ m de película de revestimento)	NR	THC ($m/z=297, 313, 370$)	[78]
THC CBD CBN	Capilar HP-5MS (30 m X 0,25 mm i.d.)	NR	THC ($m/z=299$) CBD ($m/z=231$) CBN ($m/z=295$)	[47]
THC CBD CBN	Capilar de sílica fundida HP-5MS (12 m X 0,32 mm i.d. X 0,33 μ m de película de revestimento)	NR	THC ($m/z=231, 299, 314$) CBD ($m/z =231, 246, 314$) CBN ($m/z =295, 296, 310$)	[326]
THC THC-COOH	Capilar HP-Ultra 1 (25m X 0,2 mm i.d. X 0,33 μ m de película de revestimento)	NR	THC ($m/z =427, 510$) THC-COOH ($m/z=477, 539$)	[135]

THC CBD CBN	Capilar de sílica fundida HP-5MS (12 m X 0,2 mm i.d. X 0,33 µm de película de revestimento)	Confirmação por GC/MS dos resultados positivos por RIA	THC ($m/z=231, 314, 299$) CBD ($m/z=246, 231, 314$) CBN ($m/z=295, 296, 310$)	[268]
THC THC-COOH	Capilar HP-5MS (30 m X 0,25 mm i.d. X 0,25 µm de película de revestimento)	NR	NR THC-COOH ^{b)} ($m/z=472, 492, 620, 623$)	[290]
THC	Capilar HP-5MS (30 m X 0,25 mm i.d. X 0,25 µm de película de revestimento)	NR	THC ($m/z=328, 313, 285, 245$)	[276]
THC CBD CBN	Capilar HP Ultra 1 (25 m X 0,2 mm i.d. X 0,11 µm de película de revestimento)	NR	THC ($m/z=231, 299, 314$) CBD ($m/z=231, 299, 314$) CBN ($m/z=238, 295, 310$)	[7]
THC-COOH	Capilar HP-5MS (30 m X 0,25 mm i.d. X 0,25 µm de película de revestimento)	0,5 pg/mg	THC-COOH ($m/z=422,2, 628,2, 590,2$)	[221]
THC CBN CBD	Capilar HP-5MS (30 m X 0,25 mm i.d. X 0,25 µm de película de revestimento)	NR	THC ($m/z=303, 371, 386$) CBN ($m/z=367, 368, 382$) CBD ($m/z=301, 337, 390$)	[227]
THC CBN CBD	Capilar de sílica fundida J&W DB-5MS (30 m X 0,25 mm i.d. X 0,25 µm de película de revestimento)	NR	THC ($m/z=303, 371, 386$) CBN ($m/z=367, 368, 382$) CBD ($m/z=301, 337, 390$)	[180]

* Os iões sublinhados foram os usados na quantificação; ^{a)} A níveis de concentração <50 pg/mg tem-se apenas, no cromatograma um ião, o 620. Os iões 472 e 492 não são visíveis a baixas concentrações. Para se decidir se a amostra é, ou não, positiva só com base no ião 620 utiliza-se o tempo de retenção do IS (THC-COOH-d) que é 0,5-1 segundo posterior ao do composto;^{b)} Perto do limite de quantificação apenas a massa 620 tem um *ratio S/N* aceitável; ^{c)} Só para THC-COOH; A- Metodologia A; B- Metodologia B.

Relativamente às colunas usadas no processo separativo de canabinóides, por GC, verifica-se a utilização, em mais de 70% dos casos de colunas capilares apolares (HP-1, HP-ULTRA 1, HP-5MS, DB-5, BP-5) (Figura 3.7).

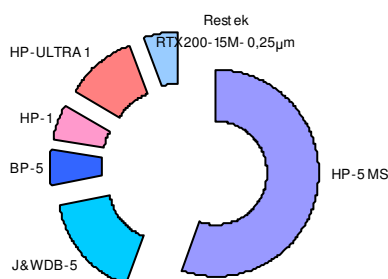


Figura 3.7 - Colunas usadas e frequência relativa de aplicação, para separação de canabinóides, por cromatografia gasosa.

Limites de positividade

São adoptados diferentes limites de positividade para o Δ^9 -THC e o Δ^9 -THC-COOH. Os valores para o Δ^9 -THC-COOH variam entre 0,05 pg/mg – 50 pg/mg [33, 137, 143, 156, 221, 345, 347], e para o Δ^9 -THC variam ente 5 pg/mg – 50 pg/mg [137, 143, 150], analisados por GC/MS/MS-NCI, GC/MS-NCI ou por GC/MS-EI. Os valores mais usuais para o Δ^9 -THC-COOH são 5 e 10 pg/mg, no entanto, no final do terceiro encontro, no Texas, em

1999, o grupo de trabalho da análise ao cabelo recomendou, para confirmação do Δ^9 -THC, a pesquisa do analito Δ^9 -THC-COOH usando o *cut-off* de 0,05 pg/mg [346].

3.3 – OPIÁCEOS

3.3.1 - Introdução

Os opiáceos englobam substâncias naturais, onde se incluem o ópio, a MOR e a COD; substâncias semi-sintéticas (produzidas por alterações químicas nos produtos básicos da papoila *Papaver somniferum* L) tais como a HERO que é um derivado sintético diacetilado da MOR; substâncias sintéticas (ex. a buprenorfina e a metadona).

O ópio é o extracto seco da cápsula da papoila *Papaver somniferum* L e contém mais de 50 alcalóides, destacando-se com interesse médico a MOR (10- 20%), COD (0,5%), tebaína, papaverina (1%), narcotina (6%) e a narceína (0,3%) [294]. A MOR, COD e tebaína pertencem ao grupo dos derivados fenantrénicos caracterizando-se como bases fortes, analgésicos, estimulantes do músculo liso e capazes de gerar dependência e tolerância [294].

Existem dois tipos de HERO comercializada nas vias do narcotráfico [250]: a chamada pura que se apresenta sob a forma de um pó branco, solúvel e facilmente injectável via intravenosa; a chamada impura, de cor castanha e que é a mais consumida na Europa. Esta é uma forma de cloridrato menos pura e, como tal, menos solúvel pelo que antes de ser injectada sofre aquecimento em meio ácido aumentando, assim, a sua solubilidade.

A rapidez do metabolismo da HERO no sangue torna a sua detecção muito rara nos fluidos biológicos pelo que a presença de 6-MAM funciona como indicador do seu consumo. É consensual que a detecção de 6-MAM resulta da absorção ou da contaminação externa pela HERO ou pela própria 6-MAM [166, 210].

3.3.2 - História

O conhecimento dos efeitos do ópio e o seu uso com fins médicos data dos tempos pré-históricos, mas só a partir dos séculos III e IV d.C. as referências são mais claras, aparecendo incluído em todas as farmacopeias [294].

A MOR foi isolada do ópio por J. P. Derosne em 1803 [250]. Em 1832 foi isolada, a partir do mesmo produto, a COD (metil-morfina) [294]. A sua produção comercial é também possível por O-metilação da MOR [250]. Em 1975 Beckelet Wright sintetiza a HERO (diacetilmorfina ou diamorfina) a partir da MOR [250]. A HERO começou a ser comercializada como sedativo em 1880. Durante a primeira guerra mundial contribuiu para atenuar a dor aos militares feridos [250]. Em 1922 foi inscrita na lista dos estupefacientes e actualmente a sua produção, consumo e venda estão interditos em todo o mundo, à excepção de alguns países que a autorizam com fins terapêuticos (tratamento da dor) [250].

Historicamente, o abuso de opiáceos que se verificou na Europa e nos Estados Unidos, na viragem do séc. XIX, foi resultante da compra legal de MOR e compostos relacionados, principalmente por mulheres de classe média. Os opiáceos foram submetidos a controlo legal no início de 1900, tendo-se verificado, desde então, o uso nocivo “de rua” destas substâncias [96]. É desde meados dos anos 60, que o abuso destas substâncias se estendeu de novo à classe média, sendo obtidas principalmente no “mercado negro”.

3.3.3 - Efeitos

Acções farmacológicas e reacções adversas

As reacções adversas mais frequentes são as tonturas, sedação, náuseas, vômitos e sudção. Além destas podem ocorrer: euforia, disforia, estados confusionais, insónia, agitação, medo, alucinações, sonolência, incoordenação dos movimentos, cefaleias, alteração da visão, tremor, convulsões, aumento da pressão intracraniana. Ao nível do tubo digestivo: dor abdominal, alterações do gosto, boca seca, anorexia e obstipação. Do aparelho cardiovascular: afrontamentos, calafrios, colapso da circulação periférica, taquicárdia, bradicárdia, arritmias, hipertensão. No aparelho génito-urinário: espasmos dos esfíncteres, retenção urinária, oligúria, efeito antidiurético, redução da libido e impotência. Há ainda a possibilidade de ocorrência de reacções de hipersensibilidade, prurido, urticária, diaforese, laringospasmo, broncospasmo,

redução do reflexo da tosse, alterações da regulação térmica, rigidez muscular e parestesias [123].

Entre as reacções adversas salienta-se o potencial para indução da dependência física e psíquica, o qual é elevado para a HERO, MOR e ópio e, moderado para a COD [123].

3.3.4 - Indicações clínicas

Heroína

Devido à elevada capacidade de gerar dependência, apesar da sua grande capacidade analgésica, não é útil na terapêutica, tendo já sido retirada da maioria das farmacopeias do mundo [294].

Morfina

É um analgésico prescrito em caso de dores crónicas e intensas de tipo canceroso ou de dor associada ao enfarte do miocárdio [294]. Pode ser, igualmente, usada na sedação pré-operatória e como adjuvante de anestesia bem como, no tratamento adjuvante do edema pulmonar agudo [250] ou no de substituição de grandes farmacodependentes de opiáceos [250]. Apesar da possibilidade de uso ilícito (tráfico de drogas), os toxicómanos de MOR são raros [250].

Codeína

É um hipnótico fraco e com propriedades antitússicas (tosse seca persistente) pouco toxicomanógeno, sendo menos activo que a MOR [250]. Existe actualmente, em várias especialidades farmacêuticas [250].

3.3.5 - Situação Portuguesa

Em termos de prevalência de consumo, os estudos epidemiológicos nacionais posicionam a HERO/opiáceos num lugar secundário [125]. Entre os opiáceos do nosso estudo são comercializados legalmente, em Portugal, a MOR e a COD [123].

3.3.6 - Farmacocinética

Administração, metabolismo e eliminação

Na tabela 3.13 apresentam-se as diversas vias de administração dos opiáceos.

Tabela 3.13 – Formas de consumo de opiáceos (adaptado de [91, 250, 356]).

Tipo de substância	Forma de consumo	
HERO	Mais comuns	Injectada (intravenosa ou intramuscular) Inalada (fumada, <i>snifada</i>)
	Menos comuns	Oral Subcutânea Rectal
MOR		Injectada (Intravenosa, subcutânea) Inalada Oral (ingestão)
COD		Oral (ingestão) Injectada (intramuscular) Rectal
Ópio		Oral Inalado

No metabolismo da HERO (Figura 3.8) identificam-se quatro vias principais: N-desalquilação, O-desalquilação, hidrólise e conjugação [61, 202].

Após administração, a HERO é rapidamente metabolizada por desacetilação em 6-MAM (principal metabolito). Os dois compostos atingem o pico plasmático em simultâneo, em cerca de 5 minutos, apresentando a HERO uma meia-vida plasmática de 4 - 6 minutos e a 6-MAM de 15 - 30 minutos (Tabela 3.14). A sua metabolização prossegue por uma desacetilação da 6-MAM formando-se MOR que atinge o pico plasmático em 1 - 1,5 h, apresentando uma meia-vida de 1,5 - 3 h (Tabela 3.14).

Tabela 3.14 - Características dos opiáceos e metabolitos incluídos no nosso estudo (adaptado de [250, 251]).

Compostos	Pico plasmático	Tempos de meia-vida plasmática	Janela da detecção sanguínea	Janela da detecção urinária
HERO	5 min	4 - 6 min	< 5- 10 min	metabolizada
6-MAM	5 min	15- 30 min	1-2 h	7 h
MOR	1 - 1,5 h	1,5- 3 h	6- 12 h	12- 48 h
COD	1 - 2 h	2- 4 h	8 h	24- 48 h

A menor lipossolubilidade da MOR comparativamente à da HERO confere-lhe uma actividade menos rápida, menos poderosa e um menor volume de distribuição (2 a 5 L/Kg e

25 L/Kg, respectivamente). A MOR penetra em todos os órgãos (rins, fígado e pulmões) sem se acumular e atravessa com dificuldade, devido à sua fraca solubilidade, a barreira hemato-encefálica. É metabolizada principalmente no fígado: por conjugação com o ácido glucurónico (54 a 74%), principalmente em MOR-3- glucuronconjugado (M-3-G) e, em menor quantidade, em morfina-6-glucuronido (M-6-G) e 3,6 diglucuronido; por sulfoconjugação em morfina-3-sulfato (5 a 10%); por N-desmetilação em NORMOR [251, 301, 361].

A COD é principalmente metabolizada em norcodeína (NORCOD) por N-desmetilação, por conjugação a COD glucuronido e, cerca de 10%, em MOR por O-desmetilação [166].

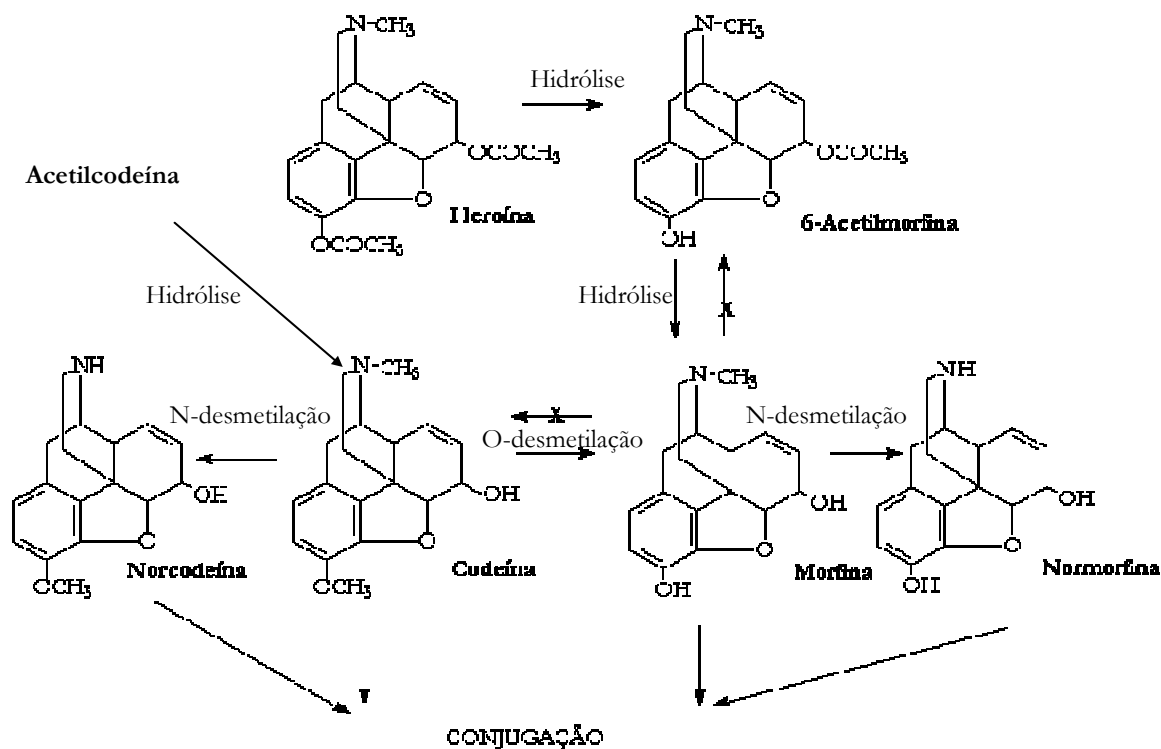


Figura 3.8 - Principais vias metabólicas da HERO, COD e MOR, no Homem (adaptado de [202, 250]).

Habitualmente consumida por via intravenosa (Tabela 3.13), a eliminação da HERO faz-se essencialmente por via urinária (70 a 90%), em média, em 24 h [250]. A 6-MAM detecta-se na urina durante 7 h após o consumo. A MOR livre é eliminada nas primeiras horas, mas os derivados conjugados permanecem detectáveis na urina cerca de 2 dias [250].

A eliminação da MOR ocorre preferencialmente por via urinária (70-90%) em 24-72 h, sendo cerca de 10% em MOR livre, vestígios de NORMOR e a maior percentagem conjugada [250].

Independentemente da forma de consumo da COD, a eliminação é principalmente urinária. A maior parte da dose (40-70%) é excretada na urina conjugada (glucuronoconjugados de COD), 5-17% em COD livre, 10-20% em NORCOD conjugada e 10-20% em MOR conjugada. São excretados vestígios de NORCOD e MOR livres. A COD aparece primeiramente (10-20 h) em doses mais elevadas do que a MOR, invertendo-se a situação (passadas 20-40 h), a MOR passa a predominar e a COD torna-se indetectável [250].

Na figura 3.9 apresenta-se a percentagem de opiáceos em diversas amostras biológicas, após consumo de HERO. A MOR livre e conjugada constituem os principais metabolitos encontrados na urina [91]. Uma vez que as preparações ilícitas de HERO contêm acetilcodeína, o seu metabolito COD pode ser detectadas na urina após consumo de HERO [202]. No cabelo a 6-MAM predomina relativamente à HERO e à MOR (Figura 3.9).

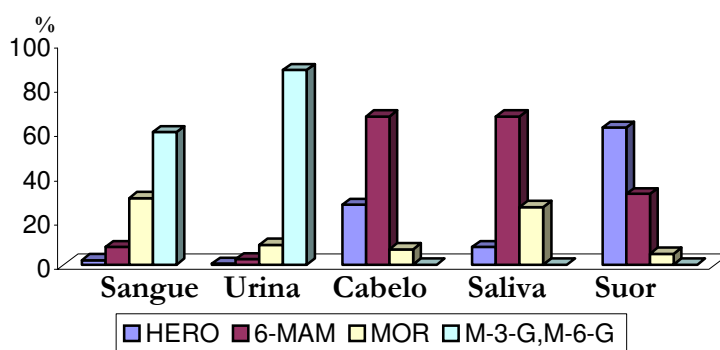


Figura 3.9 - Percentagem de metabolitos excretados em diversas matrizes após consumo de HERO (adaptado de [314]).

3.3.7 - Opiáceos na toxicologia

Os opiáceos assumem papel de droga principal relativamente à procura de tratamento e às mortes relacionadas com o consumo de drogas em Portugal. Em 2003 as mortes relacionadas com consumo de opiáceos corresponderam a 64% (98 casos), quer de forma isolada (25%) quer associados a outras substâncias (39%), nomeadamente à COC e/ou ao álcool (38%) [125].

Heroína

Em caso de intoxicação crônica, o uso regular de HERO favorece a perda de apetite e a subnutrição. O estado de saúde em geral deteriora-se com a diminuição das defesas naturais do organismo. Os problemas são de ordem respiratória, psicossomática, cardíaca e, especificamente no caso da mulher, relacionados com o ciclo menstrual (desaparecimento da fase menstrual) uterino e com as trompas de falópio, conduzindo à esterilidade.

Após intoxicação aguda verifica-se uma fase de breve excitação seguida de uma fase de depressão respiratória, apresentando os sintomas já referidos anteriormente no ponto 3.3.3. A depressão respiratória induzida pela HERO está frequentemente na origem das mortes [250]. Salienta-se que o edema agudo do pulmão é usual, por vezes dramático e mortal [250].

A dose mínima letal estimada para um adulto é de 200 mg podendo um toxicodpendente suportar dez vezes mais [250] essa quantidade.

Morfina

Em caso de administrações repetidas, ainda que em doses terapêuticas, pode desenvolver-se uma intoxicação crônica que se manifesta por uma tolerância e dependência psíquica e física entre outros efeitos tais como: náuseas, sedação, anorexia, hipotensão, hipotermia, depressão respiratória etc. [250]. Em caso de interrupção abrupta de consumo é visível o síndrome de abstinência.

Em caso de intoxicação aguda, os sintomas são os mesmos provocados pelo consumo de HERO: depressão respiratória que pode conduzir a edema pulmonar, miose extrema, bradicardia, hipotensão, hipotermia, coma e crises convulsivas.

Doses superiores a 30 mg por via parenteral ou 100 mg por via oral são tóxicas para indivíduos não tolerantes; doses de 120 g ou superiores podem ser mortais [250]. A dose mínima letal estimada para um adulto é de 200 mg podendo um toxicodpendente suportar dez vezes mais [250] essa quantidade.

Codeína

Os casos letais são raros implicando uma associação com outros medicamentos depressores e/ou o álcool. Estima-se que a dose mínima letal seja de 800 mg. [250].

3.3.8 - Métodos de pesquisa e dosagem em cabelo

A detecção de HERO e 6-MAM em fluidos biológicos (sangue e na urina) não é uma tarefa fácil [328] porque, como já foi referido, possuem uma meia-vida muito curta. Assim, nestas matrizes, os analitos alvos são frequentemente a MOR livre e a conjugada os quais são abundantes e estáveis. Mas, a MOR pode ser detectada em resultado da absorção de HERO, MOR, 6-MAM e COD. Além disso, todas as especialidades farmacêuticas contendo COD, etilmorfina, codetilina e folcodina positivam a pesquisa de opiáceos urinários [1]. É também possível detectar-se na urina MOR proveniente do consumo de alimentos em que são usadas sementes da papoila [91, 213].

A 6-MAM constitui um marcador do consumo de HERO sendo, por isso, necessária a sua determinação nas amostras. Os níveis de 6-MAM no sangue são, regra geral, baixos ou então o metabolito não é detectável [215, 216, 301]. A detecção de HERO ou de 6-MAM no sangue, ou na urina, significa uma exposição muito recente [96]. A sua ausência não exclui um consumo de HERO, uma vez que pode já ter ocorrido metabolização [177, 301]. A razão 6-MAM/MOR é, em regra, < 1 [19, 328].

Se a MOR aparecer isolada na urina será, em princípio, sinal do seu uso. A HERO de “rua” contém acetilcodeína, que se metaboliza em COD [301]. A MOR de “rua” também ela é adulterada. Assim, numa situação em que se determinam, na urina, baixas concentrações de MOR e COD não é possível determinar qual ou quais as drogas envolvidas se a HERO, a MOR ou a COD, tornando-se obrigatórias investigações clínicas e/ou circunstanciais como por exemplo, a proveniência dos compostos [307]. Caso a concentração de COD exceda a de MOR, o cenário é compatível com o consumo de COD ou de HERO (dependendo do tempo decorrido entre o consumo e a colheita porque, como já se referiu, nas primeiras horas predomina a COD e só mais tarde a MOR).

Os problemas de interpretação dos resultados associados à análise de opiáceos no sangue e na urina poderão ser solucionados caso se utilize a matriz cabelo. Ao contrário do que se verifica naquelas matrizes, após um consumo de HERO prevalece no cabelo, regra geral, a 6-MAM (Figura 3.9) e não a MOR ou a COD [19, 328]. A 6-MAM é o principal metabolito determinado no cabelo de consumidores de HERO [166, 359]. Analisando amostras de cabelo e urina pertencentes aos mesmos indivíduos é possível detectar-se 6-MAM em amostras de cabelo, sendo negativas para este metabolito na urina [19].

A diferenciação entre o uso de COD ou o abuso de HERO (sendo a COD um adulterante) pode também efectuar-se no cabelo quantificando a MOR e a COD detectadas [208, 210]. Caso a MOR exceda claramente a COD, é provável um consumo de HERO ou de MOR [17]. Nos casos de uso de COD a sua concentração excede a da MOR [166] uma vez que apenas uma pequena percentagem se metaboliza em MOR.

A análise de opiáceos em cabelo pode, desta forma, complementar as análises ao sangue e à urina [307].

A 6-MAM é o único metabolito específico da HERO [357] sendo, por isso, considerada um marcador do consumo de HERO, permitindo distingui-lo do consumo de outros opiáceos tais como a MOR e a COD [297]. Em adição a este metabolito e à MOR, a acetilcodeína pode também ser usada como um marcador do uso ilícito de HERO [161].

De acordo com as recomendações da *Society of hair Testing (SoHT)* numa análise ao cabelo destinada à determinação de um consumo de HERO devem ser pesquisados a 6-MAM e a MOR [365]. Além disso, a razão 6-MAM/MOR deverá ser $>1,3$ [167, 365]. Segundo Romano *et al.* [280] este critério não é suficiente para estabelecer um resultado positivo porque estas condições são verificáveis em situação de contaminação externa com HERO, mesmo após aplicação do procedimento de descontaminação.

Para análise de opiáceos em cabelo têm sido utilizados vários métodos analíticos. Entre os métodos não cromatográficos destaca-se como técnica de triagem os imunoensaios [314, 335, 341], nomeadamente: EMIT [43], FPIA [43, 209], ELISA [300] e RIA [43, 209, 214, 314, 325, 328, 329, 330, 335]. Os EMIT geram com frequência falsos negativos sendo mais apropriados os RIA e os FPIA [91]. Como existe necessidade de confirmação destes resultados por métodos cromatográficos (ex. GC/MS, HPLC/ECD, HPLC/FD (detecção por fluorescência)) [209, 330, 335] ou por outra técnica com sensibilidade igual ou superior à da técnica de triagem (ex. CE, MS/MS) [330, 335], em caso de limitações no tamanho da amostra, é razoável optar-se por uma triagem por GC/MS com subsequente quantificação [209]. Esta técnica é, aliás, a mais utilizada na confirmação de resultados [209, 320].

Na análise de MOR tem sido referenciada a CE [331, 332, 335].

Entre os métodos cromatográficos tem sido aplicada a LC [43, 209, 297, 332, 335, 341] e mais frequentemente a GC [43, 93, 117, 209, 253, 258, 284, 320, 347] com detecção: por ECD [209] (análise de MOR); por MS [43, 209, 219, 284, 320] (análise de HERO, 6-MAM, MOR, NORMOR, COD, NORCOD, acetilcodeína, etilmorfina, folcodina, di-hidrocodeína);

por MS/MS [253, 258, 297, 347] (análise de HERO, 6-MAM, COD, MOR, NORCOD e acetilcodeína).

Embora o cabelo seja a matriz mais utilizada, encontram-se descritos procedimentos de análise de opiáceos e metabolitos em pêlos púbicos, axilares [187, 330, 341] dos membros superiores [62] e da face (barba) [59].

3.3.8.1 - Metodologia analítica por GC/MS

A GC/MS é uma boa técnica para detecção e quantificação de opiáceos no cabelo devido à sua elevada especificidade e sensibilidade [320]. O uso da GC/MS/MS permitir obter elevada sensibilidade e especificidade na análise quantitativa de HERO, 6-MAM, COD, MOR [253, 258] e acetilcodeína [258].

Tamanho da amostra e descontaminação

Tal como já referimos uma análise ao cabelo só terá validade se permitir distinguir os resultados falsos positivos, decorrentes de uma contaminação externa, dos que são consequência de um uso activo da droga, neste caso de HERO. A opinião acerca da eficácia dos procedimentos de descontaminação do cabelo não é consensual, acusando-se de pouco realísticos [280] os modelos de contaminação que têm servido de bases aos diversos estudos.

Romano *et al.* [280] utilizaram em 6 indivíduos voluntários um modelo de contaminação consistindo na aplicação, com as mãos, em todo o cabelo, de 5 mg da mistura em pó, de HERO e acetilcodeína, durante 5 minutos e em 5 dias consecutivos. Estes investigadores defendem que os procedimentos de descontaminação não são suficientes para remover as drogas que penetram no cabelo a partir de uma fonte externa porque apesar de os terem aplicado (Tabela 3.15), determinaram concentrações de 6-MAM superiores a 5 ng/mg e uma razão 6-MAM/MOR acima de 1,3, até à 6ª semana, após ter cessado o procedimento de contaminação. Nem a higiene normal nem os tratamentos cosméticos são suficientes para remover a contaminação ocasionada pela droga [280]. Outros investigadores [91] defendem que os procedimentos de lavagem variam entre muito efectivos a não efectivos, dependendo os resultados do modo de contaminação das amostras.

Na tabela 3.15, entre outros aspectos, apresentam-se diversos procedimentos de descontaminação aplicados em amostras de cabelo destinadas à análise de opiáceos.

Tabela 3.15 - Tamanho, procedimento de descontaminação e preparação das amostras de cabelo.

Composto	Tamanho da amostra (mg)	Descontaminação	Preparação da amostra	Ref
6-MAM MOR NORMOR COD	10	1 mL MeOH, 1 min à temperatura ambiente; enxaguar 2 X (1 mL MeOH)	Pequenos fragmentos	[359]
6-MAM MOR COD	50	2 X (5 mL CH ₂ Cl ₂ , 2 min à temperatura ambiente)	Pulverizada	[166]
6-MAM MOR COD	20-50	10 mL EtOH/ MeOH (9:1, <i>v/v</i>)	Pulverizada Pequenos fragmentos	} a) [81]
MOR	30	2 X (1 mL MeOH)	Pulverizada	
6-MAM MOR COD	20-30	2 mL isopropanol; 3 X (2mL H ₂ O desionizada); 2 mL isopropanol; secar ao ar	Pequenos fragmentos	[177]
6-MAM MOR	50-60	3 X <i>Tween 80</i> 0,1%; 3 X H ₂ O destilada; 1 X acetona	Pequenos fragmentos	[283]
6-MAM MOR COD	50	Detergente líquido neutro e H ₂ O destilada; remoção da solução de lavagem e enxaguamento com H ₂ O destilada várias vezes; secar com acetona deixando as amostras durante 24 h a 40°C	Pequenos fragmentos	[328]
6-MAM MOR COD	50	1 mL MeOH, agitar 30 segundos no vórtex	Pequenos fragmentos	[218]
6-MAM MORF COD	10-50	Solução aquosa de SDS e acetona, 5 min em ultrassons	Pequenos fragmentos	[315]
6-MAM MORF COD	50	5 mL CH ₂ Cl ₂ ; 5 mL H ₂ O; 5 mL MeOH; secar a 60°C, 30 min	Pulverizada	[93, 323]
6-MAM MOR COD	50	10 mL MeOH, agitar 10 segundos no vórtex, centrifugar 5 min a 3500 rpm	Pequenos fragmentos	[346]
6-MAM MOR COD	Variável (35-285)	5 mL H ₂ O, 5 mL acetona, 5 mL hexano	Pequenos fragmentos	[276]
6-MAM MOR COD	30	H ₂ O morna; 2 X acetona	Pulverizada	[371]
6-MAM MOR	Variável (9,7- 99,1)	5 mL CH ₂ Cl ₂	Pequenos fragmentos	[248]
6-MAM MOR COD	50	1 mL MeOH, 1 min no vórtex e 5 min numa centrífuga a 4500 rpm.	Pequenos fragmentos	[217]
6-MAM MOR COD	50	2 X CH ₂ Cl ₂	Pequenos fragmentos	[308]
6-MAM MOR COD	20	2 X (1 mL MeOH)	Pulverizada	[281]
6-MAM MOR COD	50	A) 20 mL CH ₂ Cl ₂ , 15 mL acetona, 15 mL MeOH, 10 mL MeOH (Metodologia selecionada por ser a mais apropriada) B) 20 mL isopropanol, 15 mL acetona, 15 mL MeOH, 10 mL MeOH C) 20 mL CH ₂ Cl ₂ , 15 mL isopropanol, 15 mL MeOH, 10 mL MeOH D) 20 mL <i>n</i> -hexano, 15 mL acetona, 15 mL MeOH, 10 mL MeOH	Pequenos fragmentos	[9]
6-MAM MOR COD	100	3 X (5 mL CH ₂ Cl ₂ , 5 min à temperatura ambiente)	Pequenos fragmentos	[280]

SDS- Dodecil sulfato de sódio; a) comparação dos procedimentos; A), B), C), D)- comparação dos procedimentos.

Quanto ao tamanho das amostras (geralmente reduzidas a pequenos fragmentos de 1 mm) é variável (9,7-285 mg), sendo 50 mg o valor mais frequente (Tabela 3.15). Os solventes predominantemente utilizados na descontaminação das mesmas são o metanol e o

diclorometano (Tabela 3.15) [253]. Balíková & Habrdová [9] compararam a eficácia de vários procedimentos de descontaminação, concluindo que o mais eficaz seria uma lavagem sequencial empregando diclorometano, acetona e metanol.

Libertação e Extracção

A determinação quantitativa de opiáceos e metabolitos no cabelo depende do método aplicado na libertação/extracção da amostra [259].

Na tabela 3.16 resumem-se os procedimentos de libertação e extracção aplicados às amostras de cabelo, usadas para determinar opiáceos, antes da análise por GC/MS.

Tabela 3.16 - Padrões internos, métodos de libertação e extracção de opiáceos em cabelo.

Composto	Padrão interno (I.S.)	Libertação	Extracção	Ref
6-MAM MOR NORMOR COD	6-MAM-d ₃ MOR-d ₃ COD-d ₃	3 mL tampão acetato 0,5M pH 6, contendo 0,5% (w/v) de fluoreto de sódio	(SPE) (Colunas <i>Clean Screen</i> DAU). Acondicionamento: 6 mL MeOH, 3 mL de água. Lavagem: 3 mL de água, 3 mL de ácido acético 0,25N, 3 mL de água, secar sob vácuo 10 min e centrifugar 15 min a 4000 rpm. Eluição: 3X (2 mL diclorometano/isopropanol/hidróxido de amónia (80:20:2, v/v)).	[359]
6-MAM MOR COD	6-MAM-d ₃ MOR-d ₃ COD-d ₃	Incubação em 1 mL HCl 0,1M, toda a noite, a 56°C.	(LLE) Neutralizar com 1 mL de NaOH 0,1M; 10 mL clorofórmio/isopropanol/n-heptano (50:17:33, v/v), sob condições alcalinas (2 mL tampão fosfato 1M a pH 8,4); purificação da fracção orgânica com 5 mL HCl 0,2M; reextracção da fracção aquosa com 2 mL de tampão fosfato, 1 mL NaOH 1M e 5 mL de clorofórmio; remover a fracção orgânica e evaporar a secura a 45°C.	[166]
6-MAM MOR COD	SKF-525A	Digestão enzimática: 1 mL de solução de pronase (1 mg/mL) e DTT (6 mg/mL) em tampão Tris pH 7,1, toda a noite, a 37°C; Filtrar a solução de digestão.	(LLE) em <i>Toxytubes A</i>	[19]
6-MAM MOR COD	6-MAM-d ₃ MOR-d ₃ COD-d ₃	A- 5 mL MeOH, 5 h, a 40°C em ultrassons B- 2 mL tampão acetato (pH 4); 60 µL β-glucuronidase/arylsulfatase, 1,5 h, 42°C; neutralizar com bicarbonato de sódio	(SPE) (Colunas <i>Chromabond</i> ®C ₁₈). Acondicionamento: NR Lavagem: 3 mL de H ₂ O destilada, 3 mL de hidrogenocarbonato de sódio a 5%, 3 mL de H ₂ O destilada Eluição: acetona/diclorometano (3:1, v/v) contendo 2% de hidróxido de amónia.	[81]
MOR	MOR-d ₃	C- Incubação toda a noite em 2 mL de solução de ureia 8M D- 5 mL de acetona, 5 h a 40°C, em ultrassons E- 5 mL de isopropanol, 5 h a 40°C, em ultrassons	(SPE) (Colunas <i>Clean Screen</i>). Eluição: 2X (4 mL diclorometano/isopropanol/hidróxido de amónia (80:20:2, v/v)).	[341]
6-MAM MOR COD	6-MAM -d ₃ MOR -d ₃ COD -d ₃	Incubação em 1 mL de MeOH, 18 h, a 40°C; centrifugar 5 min; evaporar à secura sob corrente de N ₂ a fracção metanólica; adicionar 3 mL de tampão acetato 0,1M, pH 6,0	(SPE) (Colunas <i>Clean Screen</i> ® ZSDAU020) Acondicionamento: 2mL MeOH, 2 mL de água, 1 mL tampão acetato, pH 6,0. Verter amostra. Lavagem: 1 mL de água, 1 mL tampão acetato pH 4,0, secar com 2 mL de acetonitrilo, secar 5 min. Eluição: 2 X (3 mL diclorometano/isopropanol (80:20, v/v) contendo 2% de amónia).	[177]
6-MAM MOR COD NORCOD NORMOR	6-MAM -d ₃ MOR -d ₃ COD -d ₃ 6-MAM -d ₃ 6-MAM -d ₃	Digestão enzimática, toda a noite a 37°C, em 5,2 mL tampão Tris 0,01M+ 0,8 mL de DTT 0,4M em tampão de acetato de sódio 10mM + 110 µL de Protease <i>Type VIII</i> 10 mg/mL, em tampão Tris 1M. Ajustar pH para 5,5 com HCl 0,1M.	(SPE) (Colunas <i>Bond Elut Certify</i> ™) Acondicionamento: 3 mL MeOH; 3 mL H ₂ O destilada; 1 mL tampão fosfato, pH 6,0. Transferir a amostra para a coluna. Lavagem: 2 mL H ₂ O desionizada, 2 mL HCl 0,1M, 3 mL MeOH, secar sob vácuo 10 min. Eluição: 3 mL diclorometano/isopropanol/hidróxido de amónia (78:20:2, v/v). Recolher extractos em tubos silanizados; secar extractos sob corrente de N ₂ , a 40°C.	[117]
6-MAM MOR	NAL	Digestão enzimática 500 µL DTT 6 mg/mL em tampão Tris (pH 7,1), 2 h a 40°C; adicionar 500 µL de pronase 1 mg/mL em tampão Tris, incubar toda a noite a 39°C.	(SPE) (Colunas <i>Bakerbond</i> C ₁₈). Acondicionamento: 3 mL MeOH; 3 mL tampão fosfato, pH 7,5. Transferir a amostra para a coluna. Eluição: 2 mL clorofórmio/isopropanol (8:1, v/v); secar extractos sob corrente de N ₂	[283]

6-MAM MOR COD	Proadifeno	Digestão enzimática 500 µL DTT, 2 h a 40°C, 500 µL de pronase, 12 h a 40°C.	(LLE) Evaporar o sobrenadante, após extração em <i>Toxystubes A</i> sob corrente de N ₂ , a 60°C	[328]
6-MAM MOR COD	NAL	Incubação em 1 mL de HCl 0,1M, toda a noite, a 45°C; ajustar para pH 7 com NaOH 1M e 1 mL tampão fosfato 0,1M, pH 7; centrifugar 5 min a 4500 rpm e submeter a fração aquosa a SPE	(SPE) (Colunas <i>Bond Elut Certify™</i>) Acondicionamento: 2 mL MeOH; 2 mL tampão fosfato 0,1M, pH 7. Transferir a amostra para a coluna. Lavagem: 2 mL H ₂ O bidestilada, 3 mL HCl 0,1M, 5 mL MeOH, secar sob vácuo 5 min. Eluição: 1+1 mL diclorometano/isopropanol (8:2, v/v) contendo 2% de hidróxido de amônia; secar extractos sob corrente de N ₂	[218]
6-MAM MOR COD	6-MAM -d ₃ MOR -d ₃ COD -d ₃	2 mL tampão fosfato pH 6,0, 12 h em ultrassons.	(SPE) (Colunas <i>Chromabond™C18</i>). Acondicionamento: 3 mL MeOH, 3 mL de água, 1 mL tampão fosfato 0,1M, pH 6,0. Verter a amostra na coluna. Lavagem: 1 mL ácido acético 1M; secar 10 min por sucção; 3 mL MeOH; secar 5 min por sucção. Eluição: 2X (1 mL diclorometano/isopropanol/amônia a 33% (80:22:2, v/v/v)).	[315]
6-MAM MOR COD	NAL	Incubação em 1 mL HCl 0,01M, 12 h, a 60°C; Neutralizar com 1 mL NaOH 0,01M e 1 mL tampão fosfato pH 7,0; centrifugar 5 min a 4000 rpm.	SPE (Colunas <i>Isolute HCX</i> ou <i>Bond Elut Certify™</i>) Acondicionamento: 2 mL MeOH; 2 mL H ₂ O. Verter amostra na coluna. Lavagem: 2 mL H ₂ O; 1 mL tampão acetato pH 4; 2 mL MeOH; secar com ar. Eluição: 2 mL diclorometano/isopropanol/hidróxido de amônia.	[93, 323]
6-MAM MOR COD	NAL	Incubação em 1 mL HCl 0,1M, toda a noite, a 45°C; tampão fosfato 0,1M, pH 6; neutralizar com 2 gotas de NaOH 2N; centrifugar 5 min a 3500 rpm. Submeter a fase aquosa a SPE	SPE (Colunas <i>Bond Elut Certify™</i>) Acondicionamento: 2 mL MeOH; 2 mL tampão fosfato 0,1M, pH 6. Transferir a amostra para a coluna. Lavagem: 2 mL H ₂ O destilada, 3 mL HCl 0,1M, 5 mL MeOH, secar sob vácuo 5 min. Eluição: 1+1 mL diclorometano/isopropanol (8:2, v/v) contendo 2% de hidróxido de amônia. Secar extractos sob corrente de N ₂ .	[346]
6-MAM MOR COD	MOR -d ₃ COD -d ₃	4 mL MeOH em ultrassons a 50°C, 4 h; evaporar, reconstituir o resíduo em 7 mL de tampão fosfato 0,1M, pH 6,0, contendo 400 mg de albumina de soro de bovino	SPE (Colunas <i>Bakerbond C18</i>) Acondicionamento: 2 mL MeOH, 2 mL tampão fosfato 0,1M, pH 6,0. Lavagem: 1 mL de ácido acético 0,1M, secar 10 min sob vácuo. Eluição: 3 mL diclorometano/isopropanol/amônia (40:10:1, v/v/v).	[276]
6-MAM MOR COD	6-MAM -d ₃ MOR -d ₃ COD -d ₃	Solução de ureia 8M-tioglicolato 0,2M, a pH 3, durante 2 h, a 60°C; ajustar para pH 8.	SPE (Colunas <i>Chromabond C18</i>) Acondicionamento: 6 mL MeOH, 3 mL H ₂ O destilada. Verter amostra. Lavagem: 3 mL H ₂ O; 3 mL NaHCO ₃ 0,6M; 3 mL H ₂ O destilada. Eluição: 2 mL acetona/diclorometano (3:1, v/v).	[371]
6-MAM MOR	PCP-d ₅	2 mL MeOH, a 45°C, 18 h		[248]
6-MAM MOR COD	NAL	Incubação em HCl 0,1 M toda a noite, a 45°C; ajustar para pH 6 com KOH 2M e tampão fosfato 0,1M, pH 6.	SPE (Colunas <i>Bond Elut Certify™</i>) Acondicionamento: 2 mL MeOH; 2 mL tampão fosfato 0,1M, pH 6. Verter amostra. Lavagem: 2 mL H ₂ O 3 mL HCl 0,1M, 5 mL MeOH. Eluição: 1+1 mL diclorometano/isopropanol (8:2, v/v) contendo 2% de hidróxido de amônia. Secar extractos sob corrente de N ₂	[217]
6-MAM MOR COD	Metaqualona	Incubação em 2 mL MeOH, 18 h a 40°C; enxaguar o cabelo com 0,5 mL de MeOH; misturar as duas frações e evaporar à secura sob corrente de N ₂ , a 40°C; adicionar 2 mL tampão fosfato 0,1M, pH 6.	SPE (Colunas <i>Bond Elut Certify™</i>) Acondicionamento: 2mL MeOH; 2 mL tampão fosfato 0,1M, pH 6. Verter a amostra. Lavagem: 2 mL H ₂ O desionizada, 1 mL ácido acético 0,1M, 2 mL MeOH; secar sob vácuo durante 5 min. Eluição: 3X [1 mL diclorometano/isopropanol/hidróxido de amônia (80:20:2, v/v/v)]. Secar extractos sob corrente de N ₂ .	[308]
6-MAM MOR COD	MOR-d ₃	Incubação 18 h, a 45°C em 3 mL tampão fosfato 0,1M, pH 5; OU 3 mL tampão fosfato 0,1M, pH 6 OU 3 mL tampão fosfato 0,1M, pH 7 OU 3 mL tampão fosfato 0,1M, pH 8 OU 3 mL tampão carbonato/bicarbonato, pH 9 3 mL MeOH; OU 3 mL HCl 0,1N; OU 3 mL HCl 0,01N; OU 3 mL tampão fosfato 0,1M, pH 5; OU 3 mL tampão fosfato 0,1M, pH 6 OU 3 mL tampão fosfato 0,1M, pH 7 OU 3 mL tampão fosfato 0,1M, pH 8 OU 3 mL tampão carbonato/bicarbonato, pH 9; 3 mL MeOH/ácido trifluoroacético 3 mL (9:1) e Ajustar para pH 5 usando HCl 1N ou NaOH 1N e 1 mL de tampão fosfato 0,1N, pH 5.	SPE (Colunas <i>Bond Elut Certify™</i>) Acondicionamento: 2 mL MeOH; 3 mL tampão fosfato 0,1M, pH 6. Verter a amostra através da coluna. Lavagem: 3 mL H ₂ O, 1,5 mL HCl 0,1M, secar sob vácuo durante 5 min, 2 mL MeOH. Eluição: 3 mL diclorometano/isopropanol (8:2, v/v) contendo 2% de hidróxido de amônia. Secar extractos sob corrente de N ₂ , a 50°C.	[281]

		Nas soluções metanólicas, evaporar à secura e redissolver em 3 mL de tampão fosfato 0,1N, pH 5; centrifugar 3 min a 4000 rpm	
6-MAM MOR COD	6-MAM -d ₃ MOR -d ₃ COD -d ₃	F- 4 mL tampão Sørensen, pH 7,4, 5 h em ultrassons a 50°C. (Método seleccionado para validação) G- 1 mL HCl 0,1M, 16 h sob agitação magnética, a 55°C. Ajustar o pH a 7,0 H- 1 mL NaOH, 1 h a 80°C. Ajustar o pH a 7,0	(SPE) (Colunas <i>Spec Plus 3mL, D.AU</i>) Acondicionamento: 0,2 mL MeOH, 0,2 mL tampão fosfato, pH 6. Verter amostra. Lavagem: 0,5 mL H ₂ O destilada; 0,5 mL ácido acético 0,1M; 0,5 mL MeOH; secar sob vácuo, 5 min. Eluição: 1,5 mL diclorometano/isopropanol/hidróxido de amónia (80:20:2, v/v/v). (LLE) 2 mL clorofórmio/isopropanol (8:2, v/v)
6-MAM MOR COD	Escopolamina NAL	Incubação em 1 mL HCl 0,1M, 24 h, a 45°C; ajustar pH 7,5-8 com tampão fosfato 1M, pH 7 e algumas gotas de tampão fosfato 1M, pH 8,5.	[280]

NAL- Nalorfina; a) estudo da influencia do pH no isolamento dos analitos por colunas *Bond Elut Certify*; b) estudo da estabilidade da 6-MAM nas diversas condições; c) condição submetida a duas temperaturas (45°C e ambiente); A, B, C, D, E- comparação dos métodos; F, G, H- comparação dos métodos.

Estudos de estabilidade em várias condições mostram-nos que os opiáceos acetilados (diacetilmorfina, 6-MAM, acetilcodeína) se decompõem completamente em meios alcalinos (NaOH 1M ou 2M) sendo, apenas, possível medir os correspondentes não acetilados- MOR e COD [9, 259]. Usando uma hidrólise alcalina torna-se impossível identificar a 6-MAM [166] porque um tratamento alcalino converte a HERO e a 6-MAM em MOR [328].

Empregando a hidrólise ácida a matriz cabelo não se destrói completamente, mas os opiáceos acetilados decompõem-se significativamente (70-86% [9]; 46,6% e 36,7% de 6-MAM e de acetilcodeína, respectivamente [259]) e a reprodutibilidade desta hidrólise é má [9]. A utilização, no processo de isolamento das drogas do cabelo, de HCl 0,1M, durante 18 h, a 65°C, hidrolisa 46,4% da 6-MAM em MOR [281].

O uso de metanol evita essa situação (hidrólise apenas de 3,3% para a 6-MAM e de 5,6% para a acetilcodeína) [259], mas a recuperação de extracção é relativamente baixa [253] para a 6-MAM, MOR, COD [259]. Desta forma, as concentrações determinadas nas amostras são inferiores às obtidas quando se usa uma hidrólise ácida [177, 259] o que leva os investigadores a optarem por este procedimento.

Höld *et al.* [117] sugerem a utilização da digestão enzimática, empregando protease VIII, no isolamento simultâneo de 6-MAM, MOR, NORMOR, COD e NORCOD de cabelo.

A digestão enzimática com β -glucuronidase mostrou ser a melhor solução, quando comparada com a digestão com proteinase K, a hidrólise ácida e a extracção com metanol, para libertação, em simultâneo, de COC, BE, EME, 6-MAM, MOR e COD do cabelo. O STF do INML-DC segue aquele procedimento enzimático [190].

A comparação de cinco procedimentos para isolamento de 6-MAM, MOR e COD [81] de amostras de cabelo revelou melhores resultados empregando a mistura β -glucuronidase/arylsulfatase ou o metanol.

Após a libertação, a extracção é geralmente realizada por LLE ou uma SPE (Tabela 3.16). A SPE é particularmente apropriada para os opiáceos pela rapidez, eficiência e reprodutibilidade [79, 321]. Regra geral, o uso da LLE requer uma modificação da polaridade dos solventes orgânicos com um álcool e o ajustamento da fase aquosa a pH básico [61]. No processo de LLE de opiáceos e metabolitos (HERO, 6-MAM, MOR, COD...) é utilizada frequentemente a mistura clorofórmio/isopropanol/*n*-heptano (50:17:33, *v/v*) [99, 165, 187] a pH básico. Embora o clorofórmio sem o isopropanol possibilite elevadas recuperações para a COD, a extracção da MOR é otimizada com a mistura clorofórmio/isopropanol variando a proporção de 95:5 a 40:10 [61]. A SPE tem vindo a predominar na extracção de opiáceos (Tabela 3.16) pelas várias vantagens, nomeadamente a produção de extractos mais limpos, a maior reprodutibilidade dos resultados e um menor gasto de volume de solventes [91]. Independentemente das colunas empregues no processo extractivo, na eluição utiliza-se a mistura diclorometano/isopropanol/hidróxido de amónia (Tabela 3.16).

O uso de padrões internos deuterados análogos aos analitos alvo corresponde à situação ideal na obtenção de maior sensibilidade e especificidade [359], como já foi referido para os compostos anteriores. Em alguns casos não são utilizados sendo substituídos pela NAL [93, 218, 253, 280, 283, 323, 346]. Na quantificação de NORCOD e NORMOR há referência ao uso de 6-MAM-d₃ [117].

Análise

Derivatização e métodos de detecção

Entre os opiáceos e metabolitos passíveis de detecção no cabelo, os mais pesquisados são a 6-MAM, a MOR e a COD (Tabela 3.17).

A análise por GC/MS da HERO não requer derivatização ao contrário dos outros opiáceos [91]. Os agentes mais usados no processo são o BSTFA com TMCS a 1%, MSTFA, anidrido acético, PFPA, TFA, *N*-metil-bis-trifluoroacetamida (MBTFA), PA, HFBA (Tabela 3.17) [91, 301].

Por uma questão de facilidade de análise e estabilidade dos derivados alguns investigadores preferem o BSTFA com TMCS a 1% ou o MBTFA. O uso de MTBSTFA em vez da mistura mais usual de BSTFA +TMCS a 1%, permite obter derivados ainda mais estáveis à hidrólise [248].

Nos métodos de derivatização de opiáceos empregam-se predominantemente o BSTFA, HFBA, PFPA e a mistura HFBA/HFIP [301].

A GC/MS é a técnica universalmente aceite como a mais eficaz. A CI permite aumentar a sensibilidade [117] por comparação com a EI, o que poderá ser vantajoso na análise de compostos como a NORMOR, e a NORCOD.

Limite de detecção e concentrações determinadas em amostras

Na tabela 3.17 são apresentadas as técnicas de análise e os seus resultados.

Tabela 3.17 - Técnicas de análise de opiáceos em cabelo e resultados.

Composto	Derivatização	Reconstituição	Análise (cromatógrafo) (detector)	LOD (ng/mg)	Nº de casos analisados	Nº de casos positivos			Intervalo (média) (ng/mg)	Ref	
6-MAM MOR NORMOR COD	(efectuada após reconstituição) 20 µL de BSTFA com TMCS 1% (60°C, 30 min)	20 µL de acetoneitrilo	GC/MS-EI (HP 5890A) (MSD HP 5970B)	0,1 0,1 0,5 0,1	19	14 8 0 5	0,1- 1,6 (0,43) 0,2- 1,3 (0,45) --- 0,2- 0,6 (0,34)			[359]	
6-MAM MOR COD	30 µL de BSTFA com TMCS 1% (70°C, 20 min)	---	GC/MS-EI (Perkin Elmer 8500) (Ion Trap)	0,25 0,10 0,10	300	57 68 68	0,0-84,3 (11,3) 0,2-27,1 (4,1) 0,1-19,6 (2,8)			[166]	
6-MAM MOR COD	40 µL de BSTFA (100°C, 20 min)	---	GC/MS-EI (HP 5898 A) (MSD HP 5971 A)	1,0 1,0 1,0	30	24 19 NR	NR NR NR			[19]	
6-MAM MOR COD	100 µL PFPA/ 75 µL PFPOH, (80°C, 30 min)	Método A, D e E: 100 µL acetato de etilo Método B e C: 30 µL acetato de etilo	GC/MS-EI (HP 5890 Series II) (MSD HP5971 A)	NR	5	Métodos A B C D E	F 19 22 25 13 13	P 22 23 25 18 14	---	[81]	
MOR	HFIP/PFPA (90°C, 30 min)	NR	GC/MS (NR) (Finigan 4500)	NR		31	9	Cabelo 0,1 – 38,2 (NR) Pêlos axilares 0,1- 53,1 (NR) Pêlos púbicos 0,8 – 67,8 (NR)			[341]
6-MAM MOR COD	20 µL acetoneitrilo + 20 µL BSTFA com TMCS 1% (60°C, 30 min)	---	GC/MS-EI (HP 5890 II) (MSD HP 5972 A)	NR		19	13 7 4	0,3- 7,4 (1,85) 0,3- 1,3 (0,72) 0,3- 2,8 (1,05)			[177]
6-MAM MOR COD NORCOD NORMOR	30 µL MSHFBA-TMSIM (1000:40, v/v) (80°C, 2 min) Adicionar 5 µL MBHFBA (80°C, 25 min)	Antes da derivatização: 20 µL acetato de etilo. Depois da derivatização: ---	GC/MS-PCI (NR) (Finnigan-MAT 4500)	NR		10	5 2 0 0 0	0,5- 1,6 (1,16) 0,9- 1,4 (1,15) --- --- ---			[117]
6-MAM MOR	PFPA/PFPOH	NR	GC/MS-EI (HP 5890 A) (MSD HP 5971)	0,2 0,1		1 a)	1 caso (3 segmentos)	0,2-0,6 (---) 0,1-0,3 (---)			[283]
6-MAM MOR COD	40 µL BSTFA/TMCS (99:1, v/v) (100°C, 20 min)	---	GC/MS-EI (HP 5890 series II) (MSD HP 5971)	0,07 0,1 0,11	200	182	Análise qualitativa			[328]	
6-MAM MOR COD	50 µL MSTFA (75°C, 15 min)	---	GC/MS-EI (HP 6890) (MSD HP 5973)	NR	214	8 14 7	≤0,1- 3,60 (NR) ≤0,1- 7,00 (NR) ≤0,1- 3,20 (NR)			[218]	
6-MAM MOR COD	10 µL HFIP/ 50 µL TFA (aquecendo durante 30 min)	50 µL acetato de etilo	GC/MS-EI (HP 6890) (MSD HP 5973)	NR	49	41 41 38	0,03- 36 (4,96) 0,01- 8,0 (1,33) 0,02- 16,3 (1,28)			[315]	
6-MAM MOR COD	100 µL piridina/ 100 µL PA (60°C, 30 min)	50 µL acetato de etilo	GC/MS-EI (HP 5890) (MSD HP 5988)	0,05 0,05 0,05	3	1 a)	1,7-7,2 (---) 0,4-2,1 (---) 0-1,4 (---)			[93]	

6-MAM	100 µL piridina/ 100 µL PA	50 µL acetato de etilo	GC/MS-EI (HP 5890)	0,05	Em dois anos	39	0,1- 45 (4,0)	[323]
MOR			(MSD HP 5988)	0,05		36	0,1- 6,0 (1,1)	
COD	(60°C, 30 min)			0,05		32	0,1-5,6 (0,9)	
6-MAM	50 µL MSTFA	---	GC/MS-EI (HP 6890)	NR	697	48	NR	[346]
MOR	(75°C, 15 min)		(MSD HP 5972 A)				NR	
COD							NR	
6-MAM	PFPA	50 µL de acetato de etilo	GC/MS-EI (HP 6890)	NR	11	0	NR	[276]
MOR			(MSD HP5973)			1		
COD						0		
6-MAM	100µL PFPA/ 70 µL PFPOH	40 µL acetato de etilo	GC/MS-EI (HP6890 series II)	0,04	1	1	0,19	[371]
MOR	(60°C, 30 min)		(MSD HP 5973)	0,04		1	0,16	
COD				0,02		1	0,02	
6-MAM	25 µL MTBSTFA, (90°C, 1 h)	---	GC/MS-EI (HP6890)	0,06	20	1	Análise qualitativa	[248]
MOR			(MSD HP 5973)	0,40		1		
COD								
6-MAM	50 µL MSTFA	---	GC/MS-EI (HP 6890)	0,01- 0,03	---	---	---	[217]
MOR	(75°C, 15 min)		(MSD HP5973)	b)				
COD								
6-MAM	100 µL piridina+ 30 µL PA	100 µL acetato de etilo	GC/MS-EI (Varian 3400 CX)	0,05	36	18	0,60- 33,21 (4,29)	[308]
MOR	(60°C, 30 min)		(MSD Saturn <i>ion trap</i>)	0,10		16	0,42- 4,02 (1,39)	
COD				0,10		5	0,52- 1,89 (0,95)	
6-MAM	50 µL de MSTFA/TMCS	---	GC/MS-EI (HP 5890 II)	0,08	40	18	0,5- 38,9 (NR)	[281]
MOR	(100:2)		(MSD HP5970)	0,05		18	0,5- 20,1(NR)	
COD	(60°C, 30 min)			NR				
6-MAM	100 µL MSTFA	---	GC/MS-EI (HP 6890)	0,1	7	7	0,5- 21,3 (6,44)	[9]
MOR	(80°C, 20 min)		(MSD HP 5973)	0,1		7	0,3- 1,8 (1,23)	
COD				0,1		7	0,1- 0,6 (0,37)	
6-MAM	50 µL de BSTFA	---	GC/MS-EI (HP 5890)	NR	7	7	0,15- 3,58 (NR) c)	[280]
MOR	comTMCS 1% (70°C,		(MSD 5989B)			7	0,05- 1,32 (NR) c)	
COD	30 min)					7	0,01- 0,18 (NR) c)	

PA- Anidrido propiônico; MSHFBA- N-metil-N- trimetilsililheptafluorobutiramida; TMSIM- N-trimetilsililimidazole;

MBHFBA- N-metil-bis-heptafluorobutiramida; F- Amostra reduzida a pequenos fragmentos; P- Amostra pulverizada; a) Amostra constituída por 4 segmentos;

b) Não é especificado o valor correspondente a cada composto; c) Valores determinados correspondentes a contaminação externa das amostras.

Os metabolitos detectados com maior frequência, a seguir à 6-MAM, são a MOR e a COD [19, 117, 308, 315, 359]. Alguns autores [281, 315] referem, no entanto, o mesmo número de casos positivos para 6-MAM e MOR, ou mesmo menor número de casos positivos para 6-MAM, comparativamente à MOR [218].

A HERO pode não ser detectada em amostras positivas para a 6-MAM e MOR [283].

A COD e a NORCOD são menos frequentes, i.e. nem sempre são detectadas nas amostras positivas para os dois principais metabolitos [117, 218, 359]. Há igualmente referência a casos em que a COD é detectada, sem que a 6-MAM e a MOR o sejam [315] o que indica a absorção de COD.

Os metabolitos menos frequentes são a NORCOD e a NORMOR [117, 359]. A NORCOD pode estar presente em amostras negativas para COD [359].

Um dos problemas na detecção de opiáceos é distinguir a MOR que resulta do consumo de HERO da que resulta do consumo de medicação contendo COD [166]. A identificação da 6-MAM permite distinguir os consumidores de HERO dos consumidores de outros alcalóides opiáceos. Nos casos em que a 6-MAM não é detectada e os valores de concentração da COD são superiores aos de MOR, presume-se ter ocorrido um consumo de COD [166].

Möeller *et al.* [210] propuseram que para baixas concentrações de MOR (< 1 ng/mg) se exija um *razão* MOR/COD de 5:1 para determinar o consumo de HERO/MOR, devendo interpretar-se cautelosamente os resultados sobretudo na ausência de 6-MAM. Para concentrações > 1 ng/mg propuseram uma razão de 2:1 para afirmar aquele diagnóstico.

Pépin *et al.* [252] investigaram a frequência de consumo de opiáceos tendo proposto níveis de positividade. Assim, as concentrações > 10 ng/mg e < 2 ng/mg de 6-MAM correspondem, respectivamente, a uma elevada e baixa frequência de consumo de HERO. Entre 2 e 10 ng/mg corresponde a uma frequência de consumo média. Estes autores consideraram 0,5 ng/mg o limite de positividade para a 6-MAM.

Na opinião de Puschel *et al.* [266] não existe uma correlação entre a dose administrada de HERO, MOR e COD e a concentração determinada no cabelo. Nem sempre uma maior concentração de 6-MAM corresponde a uma maior concentração de MOR [9, 177, 281, 308, 315, 359].

Quanto a resultados quantitativos, os valores de concentração de 6-MAM, MOR e COD determinados em amostras de cabelo são variáveis (Tabela 3.17). Entre os artigos desta revisão os valores variaram entre: 0,03-84,3 ng/mg para a 6-MAM; 0,01-38,2 ng/mg para a MOR; 0,01-19,6 ng/mg para a COD. Apesar da NORMOR ser pesquisada em alguns trabalhos não há referência a valores determinados.

Geralmente a concentração de 6-MAM excede a determinada para a HERO, MOR e COD [95, 96]. Na literatura encontram-se descritos alguns casos que contrariam esta tendência, apresentando a MOR concentração igual [315] ou superior à 6-MAM [19, 93, 177, 218, 281, 308, 359]. Relativamente a estes resultados, aparentemente anormais, Romolo *et al.* [281] ao analisarem amostras pertencentes a 12 casos (4 segmentos por caso) constataram, em 6 casos positivos para 6-MAM e MOR, que era nos dois, ou três, segmentos mais distais, onde a concentração de MOR excedia a de 6-MAM.

Romano *et al.* [280] verificaram que a HERO e a acetilcodeína incorporadas no cabelo por uma fonte externa não são estáveis nessa matriz. As elevadas concentrações determinadas de 6-MAM e COD sugerem que a HERO e a acetilcodeína se podem transformar nos seus metabolitos [280]. A coloração, descoloração e a ondulação podem afectar a estabilidade das drogas incorporadas no cabelo sendo as responsáveis pelos resultados menos comuns [308]. Estudos de descoloração de amostras realizados *in vitro* demonstraram que ocorre uma diminuição na concentração determinada de 6-MAM, MOR, COD, sendo o decréscimo de

88,0%, 84,1% e 63,6%, respectivamente, devida à alteração dos compostos e não a uma remoção dos mesmos da matriz [371].

A razão 6-MAM/MOR pode reflectir a hidrólise dos analitos durante a etapa de preparação da amostra em vez de reflectir o tipo de exposição a opiáceos [259].

É frequente as concentrações de MOR excederem as de COD [9, 19, 177, 308, 315]. A COD pode resultar do metabolismo do sub-produto da acetilcodeína originada durante a preparação da HERO de “rua” [308]. Doses de COD entre 0,5 e 1 g/dia, podem determinar concentrações de MOR comparáveis às determinadas num cabelo de um heroinómano [292]. Kronstrand *et al.* [176] concluíram que a COD é detectável, pelo menos durante 4 semanas, após uma única dose de 100 mg quer em cabelo mais claro ou mais escuro, verificando uma elevada correlação entre a concentração determinada e o teor em melanina [176].

As especialidades farmacêuticas contendo opiáceos semi-sintéticos (ex. di-hidrocodeína, folcodina) têm ocasionado alguns problemas de interpretação dos resultados obtidos no cabelo.

Uhl [347] considera uma amostra positiva para HERO quando a concentração de 6-MAM é $> 0,5$ ng/mg e, em simultâneo, seja detectada MOR e/ou HERO e/ou acetilcodeína.

A concentração de 6-MAM e MOR determinada em pêlos púbicos tem sido superior à determinada no cabelo e nos pêlos axilares [187, 246].

Sete dias após administração de MOR e COD, as drogas são detectáveis nos pêlos da barba, altura em que já não são detectáveis na urina e na saliva e os efeitos das drogas desapareceram [59].

Assim, de acordo com a informação disponível na literatura podemos inferir relativamente aos resultados de opiáceos em cabelo [91]:

- A HERO, 6-MAM e MOR estão usualmente presentes no cabelo, após uso de HERO. As concentrações de 6-MAM predominam sobre as de HERO, MOR e COD;
- A detecção de MOR e COD no cabelo indicam ter ocorrido uso de COD ou de MOR e COD;
- A detecção exclusiva de MOR indica uso de MOR;
- A detecção exclusiva de COD indica uso de COD.

Os LOD's para a 6-MAM, MOR, COD e NORMOR referidos na literatura são variáveis (Tabela 3.17). Yegles *et al.* [371] obtiveram LOD's de 0,04 ng/mg para a 6-MAM e MOR e de 0,02 ng/mg para a COD, analisando as amostras (30 mg) por GC/MS-EI, após

derivatização com PFPA/PFPOH. No entanto, os LOD's para opiáceos analisados por GC/MS são usualmente superiores a estes (Tabela 3.17).

Para a 6-MAM, COD, NORCOD e MOR foi obtido um LOD de 41,5 pg/mg, efectuando a análise por LC-MS/MS [297].

Para a NORMOR, encontra-se referido um LOD de 0,5 ng/mg [359] analisando amostras por GC/MS-EI, após derivatização com BSTFA/TMCS 1%.

Na tabela seguinte apresentam-se as colunas usadas e os iões m/z seleccionados para identificação e/ou quantificação das drogas.

Tabela 3.18 – Colunas e iões usados na identificação e quantificação de opiáceos.

Totalidade de Compostos	Coluna	Iões (m/z) ^{a)}	Ref
6-MAM MOR NORMOR COD	Capilar HP-1 (12 m X 0,20 mm i.d. X 0,33 µm de película de revestimento)	6-MAM (m/z =287, 340, 399) MOR (m/z =236, 414, 429) NORMOR (m/z =254, 308, 487) COD (m/z =178, 234, 371)	[359]
6-MAM MOR COD	Capilar BP-5 (12 m X 0,22 mm i.d.)	6-MAM (m/z =340, 399) MOR (m/z =401, 429) COD (m/z =178, 196, 234, 371)	[166]
6-MAM MOR COD	Capilar HP-5 MS (12 m X 0,32 mm i.d.)	6-MAM (m/z =204, 287, 340, 399) MOR (m/z =196, 236, 356, 401, 429) COD (m/z =282, 371)	[19]
6-MAM MOR COD	Capilar HP-5 MS (30 m X 0,25 mm i.d. X 0,25 µm de película de revestimento)	6-MAM (m/z = 287, 340, 399) MOR (m/z =401,414, 429) COD (m/z =234, 343, 371)	[177]
6-MAM MOR COD NORCOD NORMOR	Capilar DB-1 (30 m X 0,32 mm i.d. X 1,0 µm de película de revestimento)	6-MAM (m/z =400) MOR (m/z =430) COD (m/z =375) NORCOD (m/z =571) NORMOR (m/z =629)	[117]
6-MAM MOR	Capilar HP-5 MS (12 m X 0,32 mm i.d. X 0,33 µm de película de revestimento)	6-MAM (m/z =361, 414, 473) MOR (m/z =414, 558, 577)	[283]
6-MAM MOR COD	Capilar HP-5 MS (12 m X 0,20 mm i.d. X 0,33 µm de película de revestimento)	6-MAM (m/z =204, 287, 340, 399) MOR (m/z =196, 236,401, 429) COD (m/z =178, 196, 234, 371)	[328]
6-MAM MOR COD	Capilar HP- Ultra 2 (12 m X 0,20 mm i.d. X 0,33 µm de película de revestimento)	6-MAM (m/z = 287, 324, 340, 399) MOR (m/z =324, 401, 414, 429) COD (m/z =313, 324, 343, 371)	[218]
6-MAM MOR COD	Capilar Supelcowax 10 (30 m X 0,25 mm i.d. X 0,25 µm de película de revestimento)	6-MAM (m/z =364, 423) MOR (m/z =364, 477) COD (m/z =282, 395)	[315]
6-MAM MOR COD	Capilar DB5.MS (15 m X 0,25 mm i.d. X 0,25 µm de película de revestimento)	6-MAM (m/z =327, 383) MOR (m/z =341, 397) COD (m/z =282, 355)	[85]
6-MAM MOR COD	Capilar HP-5 MS (12 m X 0,2 mm i.d. X 0,33 µm de película de revestimento)	6-MAM (m/z = 204, 287, 340, 399) MOR (m/z =146, 196, 236, 429) COD (m/z =178, 196, 234, 371)	[346]
6-MAM MOR COD	Capilar HP- 5 MS (30 m X 0,25 mm i.d. X 0,25 µm de película de revestimento)	6-MAM (m/z = 204, 361, 414, 473) MOR (m/z =414, 415, 577) COD (m/z =284, 300, 447)	[276]
6-MAM MOR COD	Capilar HP-Ultra 2 (12 m X 0,2 mm i.d. X 0,33 µm de película de revestimento)	6-MAM (m/z = 414, 473) MOR (m/z =414, 577) COD (m/z =282, 445)	[371]
6-MAM MOR	Capilar HP-5 MS (30 m X 0,25 mm i.d. X 0,25 µm de película de revestimento)	6-MAM (m/z =342, 382, 384, 441) MOR (m/z =229, 285, 342, 399)	[248]
6-MAM MOR COD	Capilar HP- Ultra 2 (12 m X 0,20 mm i.d. X 0,33 µm de película de revestimento)	6-MAM (m/z = 399) MOR (m/z =429) COD (m/z = 371)	[217]
6-MAM MOR COD	Capilar RTX-5 (30 m X 0,25 mm i.d.)	6-MAM (m/z =268, 327, 383) MOR (m/z =268 341, 397) COD (m/z =282, 341, 355)	[308]

6-MAM MOR COD	Capilar HP-5 MS (25 m X 0,20 mm i.d. X 0,33 μ m de película de revestimento)	6-MAM ($m/\bar{\nu}$ =204, 287, 340, <u>396</u>) MOR ($m/\bar{\nu}$ =236, 401, <u>429</u>) COD ($m/\bar{\nu}$ =234, <u>371</u>)	[281]
6-MAM MOR COD	Capilar HP-5 MS (30 m X 0,25 mm i.d. X 0,25 μ m de película de revestimento)	6-MAM ($m/\bar{\nu}$ =204, 287, 324, <u>399</u>) MOR ($m/\bar{\nu}$ =236, 324, 401, 414, <u>429</u>) COD ($m/\bar{\nu}$ =196, 343, 356, <u>371</u>)	[9]
6-MAM MOR COD	Capilar HP-Ultra 2 (12 m X 0,20 mm i.d. X 0,33 μ m de película de revestimento)	6-MAM ($m/\bar{\nu}$ =287,2, 340,3, 399,3) MOR ($m/\bar{\nu}$ =324,2, 414,3, 429,3) COD ($m/\bar{\nu}$ =234,3, 313, 343,3, 371,3)	[280]

a) Os iões sublinhados foram os usados na quantificação; AEME- Éster metílico de anidroecgonina; EEE- Éster etílico de ecgonina
NORCE- Norcoacetileno.

Na separação cromatográfica gasosa de opiáceos são usadas, sobretudo, colunas capilares apolares (Tabela 3.18).

Limites de positividade

De acordo com a opinião de Romano *et al.* [280] os valores de *cut-off* e as razões metabolito/droga mãe não são infalíveis na avaliação de uma contaminação passiva do cabelo por HERO e acetilcodeína.

Pépin *et al.* [252] e Montagna *et al.* [217] estabeleceram um limite de positividade para a 6-MAM de 0,5 ng/mg. Uhl [346] e Montagna *et al.* [218] adoptaram um valor inferior, 0,1 ng/mg.

Resultante de um consenso entre um grupo de trabalho em análise de drogas em cabelo [346] foi recomendado que na confirmação de absorção de HERO, fosse determinada 6-MAM com um limite de positividade de 0,2 ng/mg e, em simultâneo, outro analito da classe dos opiáceos (MOR ou COD) com uma concentração superior a 0,2 ng/mg (valor este considerado o limite de positividade da MOR e da COD).

3.4– COCAÍNA E METABOLITOS

3.4.1 - Introdução

A Benzoilmetilecgonina, vulgarmente designada por cocaína (devido à sua principal origem - folhas do arbusto de *Erythroxylum coca*) é um derivado da ornitina, aminoácido da

planta do género *Erythroxylum* e que por degradação origina diversos alcalóides como metabolitos secundários [40].

A *Erythroxylum coca* é principalmente cultivada na América do Sul, sendo composta por folhas pequenas (4 - 8 cm de comprimento e 2 - 4 cm de largura) e ligeiramente ovaladas. A COC destaca-se como o principal alcalóide psicoactivo [10] e, localiza-se apenas nas folhas da planta (0,5 - 2,0% de COC) [40].

As várias técnicas empregues na preparação das folhas conduzem à obtenção de diversos produtos cujas propriedades condicionam, a via de administração, farmacocinética, actividade farmacológica, toxicidade e a progressão de consumo.

Da maceração das folhas obtém-se, pelo emprego de substâncias químicas, uma pasta grossa marrom – pasta de coca [40]. Esta constitui a forma de tráfico para os laboratórios clandestinos. A pasta é purificada com HCl, fornecendo um sólido cristalino fragmentado transparente, geralmente na forma de cloridrato de cocaína (COC.HCl) que é diluído com vários adulterantes, compondo-se a “droga de rua”. Os adulterantes mais comuns são açúcares, talco, anestésicos locais e sais de baixo custo tais como o bicarbonato de sódio e o sulfato de magnésio variando, desta forma, os teores de COC. O COC.HCl constitui a formulação da COC legal e, geralmente, da ilícita [40]. É uma forma termolábil, que não volatiliza e que se decompõe rapidamente quando fumada [40].

A forma básica da COC, chamada base livre (COC-base) ou COC alcaloidal, é uma substância cristalina, branca ou transparente, inodora, levemente volátil (volatiliza-se aproximadamente a 90°C) [40]. Não se decompõe às temperaturas requeridas para a sua vaporização. É solúvel em etanol, acetona, éter etílico, e praticamente insolúvel em água. Estas propriedades conferem, ao contrário do que acontece com o COC.HCl, capacidade para ser fumada. Actualmente é comercializada ilicitamente na forma de massa sólida, em pequenos pedaços cristalinos que recebem o nome genérico de *crack* [40].

A COC-base é mais lipossolúvel do que o COC.HCl [14].

A COC pode ser produzida sinteticamente em laboratórios clandestinos reconhecendo-se, quimicamente, pela presença do dextroenantiómero, uma vez que a planta biossintetiza apenas o isómero levógiro.

Face ao aumento da prevalência do abuso de COC verificou-se, nas últimas décadas, um crescente número de hospitalizações e mortes relacionadas com o seu consumo considerando-se, assim, um problema de saúde pública. O consumo de COC associado ao de

etanol é frequente formando-se, conseqüentemente, o COCE - forma etilbenzoilecgonina de COC, resultante da transesterificação pelas enzimas hepáticas [256].

Contrariamente às matrizes usadas tradicionalmente na determinação do consumo de drogas (sangue e urina) o cabelo permite detectar a presença de COC, mesmo que o seu consumo tenha ocorrido no passado, e estabelecer o perfil de consumo do indivíduo, dependendo do comprimento do cabelo usado como amostra [336].

3.4.2 - História

Os efeitos estimulantes resultantes do mascar das folhas de coca foram descobertos por farmacologistas dos Andes, séculos atrás. O componente activo COC foi pela primeira vez isolado na Alemanha em 1857 e as suas propriedades de anestésico local foram aplicadas em oftalmologia na década de 80 do último século.

3.4.3 - Efeitos

Trata-se de um psicoestimulante cujos efeitos estão dependentes da dose e da via de administração [356]. Após um período de euforia e de confiança, o qual pode durar até 2 h, o cocaínomano retoma uma actividade física relativamente normal. De modo geral, o consumo de COC traduz-se numa taquicardia, dilatação pupilar, hipertensão arterial, suores, náuseas e, por vezes, vômitos, tudo isto tendo como fundo uma agitação psicomotora [356]. A tolerância e a dependência psíquica instalam-se rapidamente.

Ações farmacológicas e reacções adversas

A COC é uma substância perigosa que pode causar graves complicações ou mesmo a morte ainda que seja consumida de forma ocasional (Tabela 3.19).

Tabela 3.19 - Complicações decorrentes do consumo de COC (adaptado de [45, 267, 356]).

Orgânicas	Cardiovasculares	Arritmias cardíacas; Isquémia miocárdica (angina e enfarte); Miocardites e miocardiopatia; Rotura aórtica.
	Respiratórias	Das vias respiratórias altas (perfuração do tabique nasal, sinusite); Pulmonares (respiração irregular; paragem respiratória).
	Neurológicas	Vasculares; Crises convulsivas; Síndrome de hipertermia maligna; Alterações psiquiátricas.
	Gastrointestinais	Náuseas e vômitos; Ulcerações gástricas (com risco de hemorragia e perfuração); Isquémia intestinal (aguda e crónica).
	Hepáticas	Isquémia hepática; Hepatite tóxica.
	Pele e fâneros	
	Sistema endócrino e gónadas	Hiperprolactinemia; Disfunção sexual.
	Na gravidez, no feto e recém-nascido	Morte intra-uterina; Aborto, prematuridade e complicações obstétricas; Baixo peso à nascença e complicações perinatais; Malformações congénitas.
Psiquiátricas	Efeitos psicopatológicos imediatos	
	Efeitos psicopatológicos por intoxicação de COC	
	Efeitos psicopatológicos do consumo crónico de COC	

Os efeitos tóxicos, frequentemente ignorados pela população, estão relacionados com a actividade farmacológica da COC: vasoconstrição geral, hipertensão e taquicardia. Estes efeitos têm consequências mais marcadas durante a gravidez, dado que os vasos sanguíneos uterinos se encontram geralmente dilatados [45].

3.4.4 - Indicações clínicas

Em Portugal não há qualquer utilização clínica da COC.

3.4.5 - Situação Portuguesa

Tendo por base estudos epidemiológicos [20], a COC surge com prevalências de consumo superiores às de HERO, nomeadamente ao nível da população escolar. Em termos de consequências de consumo no domínio da saúde, a COC aparece como a segunda droga mais problemática, adquirindo maior relevância quando associada a outras drogas, nomeadamente HERO [20].

3.4.6 - Farmacocinética

Administração, metabolismo e eliminação

A farmacocinética da COC está dependente da via de administração [304, 356].

Na tabela 3.20 evidenciam-se as possíveis formas de consumo em função do tipo de substâncias.

Tabela 3.20 - Formas de consumo em função do tipo de substância (adaptado de [40, 113]).

Tipo de substância	Concentração de COC	Forma de consumo
Folhas de Coca	0,5 – 1%	Mascadas, infusão oral
Pasta de Coca	40 – 85% (sulfato de COC)	Fumada
COC.HCl	12 - 75%	Tópica: ocular, genital, intranasal Parenteral: endovenosa, subcutânea, intramuscular.
COC base	$\frac{\text{Free base}}{\text{crack}}$ 30 – 80% (alcalóide COC)	Inalada Fumada

Em caso de consumo por via oral (mascar as folhas) as taxas plasmáticas são inferiores comparativamente às outras formas de consumo [304]. A concentração plasmática máxima ocorre aos 60 min, durando os efeitos cerca de 30 - 60 min [113].

A absorção através da mucosa nasal (consumo intranasal) é regulada pelas propriedades vasoconstritoras da COC, pelo que a dose condiciona a biodisponibilidade do produto [304]. A concentração plasmática máxima é medida entre 5–10 min, durando os efeitos 30– 60 min [113]. A BE, metabolito principal, surge no sangue cerca de 30 min após o consumo da droga mãe [304]. A sua concentração aumenta lentamente registando-se o pico plasmático entre 3–4 h. A concentração de EME é muito baixa comparativamente à de BE [304].

Os efeitos obtidos através do consumo intravenoso de COC.HCl ou COC base são dependentes da dose. A meia-vida da COC varia entre 88-96 min [304]. O pico plasmático, medido 5 min após a injeção, é proporcional à dose e mais elevado do que o obtido por consumo da mesma dose via intranasal ou oral [304]. Os efeitos têm uma duração de 10–20 min [113]. A BE surge no plasma 15–30 min após a administração da COC, em concentrações proporcionais à dose [304]. O pico plasmático ocorre entre 1–4 h e a detecção do metabolito no plasma é possível durante mais de 24 h. A concentração plasmática do EME é geralmente baixa.

A meia-vida da COC, fumada, varia entre 88-96 min (o mesmo que por via intravenosa) os efeitos duram 10-15 min [113, 304]. A BE surge no plasma 15-30 min após o consumo, apresentando o pico plasmático entre 1,30 a 3 h. A BE possui uma meia-vida de 6,8 h, desaparecendo entre 35-42 h. Em caso de intoxicação crónica a eliminação é mais prolongada. O EME encontra-se nos líquidos biológicos na mesma proporção de um consumo intravenoso.

A absorção cutânea ocorre particularmente com a COC base por ser a mais lipofílica [304]. É possível obterem-se testes urinários positivos, para metabolitos da COC, de indivíduos que apenas a manipulam [304]. A absorção gastrointestinal é reduzida ou nula. A administração por via oral é geralmente acidental (ex. traficantes que ingerem pacotes da droga como forma de transporte da mercadoria) [304].

Apesar das diversas formas de consumo possíveis, nos países ocidentais a COC é utilizada essencialmente por duas vias a parenteral e a pulmonar [304, 356].

O metabolismo da COC é independente da via de administração da droga [304].

A COC é rapidamente metabolizada [304] no organismo (Figura 3.10). Os principais metabolitos (90%) [113] são a BE (30–50% da dose), após hidrólise química (ocorre espontaneamente em solução, particularmente a $\text{pH} \geq 7$), e o EME (20–40% da dose), após hidrólise enzimática (ocorre por acção das esterases hepáticas e colinesterases plasmáticas) [304]. Estes metabolitos não possuem propriedades farmacológicas [20, 58, 304], não obstante a BE possuir actividade citotóxica [40]. Por hidrólise, ambos originam a ecgonina (ECG)[61]

Uma via metabólica considerada acessória, é a que conduz à formação de NORCOC, o que ocorre por desmetilação [113, 304, 356]. No entanto, a NORCOC é um metabolito activo [158] precursor de moléculas potencialmente mais hepatotóxicas do que a COC [20].

O consumo simultâneo de COC e etanol origina a formação de COCE por transesterificação da COC a nível hepático [20, 61], como já se referiu. Este metabolito possui elevada actividade farmacológica sendo considerado, em algumas circunstâncias, equipotente à COC [73, 158, 256] ou até mais letal [41]. O COCE é metabolizado, por hidrólise enzimática em éster etílico da ecgonina (EEE), por hidrólise não enzimática em BE e, por desmetilação oxidativa em norcocaetilen (NORCE).

No caso particular de consumo de *crack* forma-se éster metílico de anidroecgonina (AEME) [61]. Este composto detectado nos fluidos biológicos é considerado um marcador do consumo de COC fumada [158], uma vez que se forma devido à degradação térmica da COC.

Apesar de se formarem outros metabolitos, decorrentes do consumo de COC, são os mesmos considerados menores [304, 356].

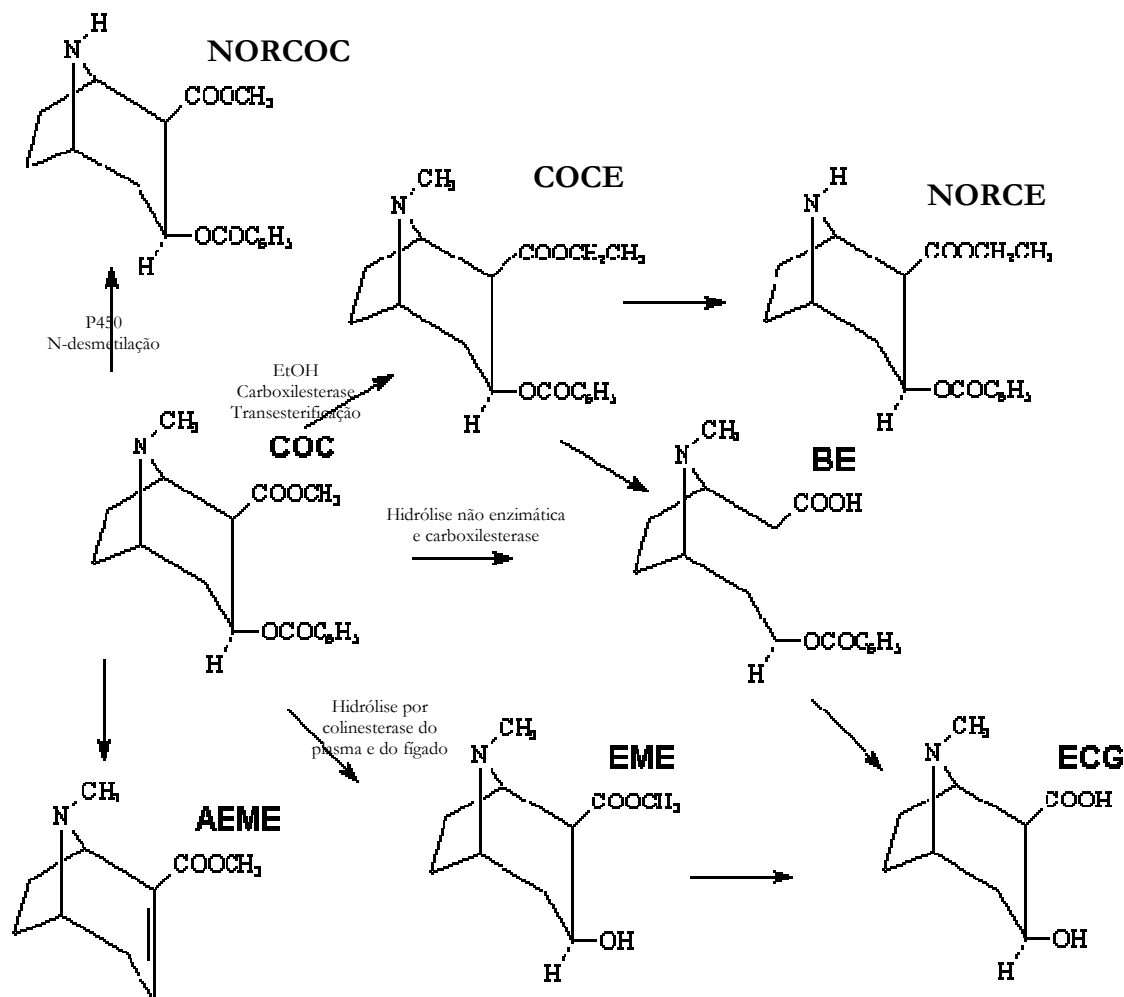


Figura 3.10 - Principais vias metabólicas da COC no Homem (adaptado de [20, 25, 61]).

A eliminação urinária (Tabela 3.21) reflecte as concentrações sanguíneas. Dado que a COC apresenta uma meia-vida relativamente baixa, são comuns os casos em que a intoxicação é evidenciada apenas pela presença dos produtos de biotransformação [40]. Por ser excretada mais lentamente do que o EME, a BE apresenta, regra geral, concentrações sanguíneas que excedem esse produto e a droga mãe [14, 40, 61, 109, 301]. Além disso, há referências de que após uso crónico, a BE pode ser encontrada no cérebro até 22 dias depois [40]. A COC após

atravessar a barreira hemato-encefálica sofre biotransformação a BE ficando armazenada, dada a sua polaridade [40]. Em estudos realizados com animais verifica-se que excreção urinária de BE é afectada pelo volume e pH da urina [14].

O EME é o segundo metabolito mais abundante na urina enquanto que a NORCOC é excretada em quantidades vestigiais [61, 158].

Tabela 3.21 - Eliminação urinária da COC (adaptado de [40, 158]).

	Eliminação urinária	Percentagem da excreção urinária da COC
COC	COC	1-9% (dependendo do pH da urina)
	BE	29-54%
	EME	32-49%
	NORCOC	2-6%

Apesar da eliminação ser principalmente via urinária, no que concerne à excreção noutras matrizes verifica-se que a COC apresenta uma concentração superior à BE e ao EME, não só no cabelo mas também na saliva e no suor [301]. A BE, regra geral, ocupa o segundo lugar em termos de abundância no cabelo. O EME e a NORCOC estão presentes em concentrações reduzidas [117, 158].

Na tabela 3.22 referem-se alguns analitos passíveis de pesquisa no sangue, urina e cabelo após o consumo de COC e de álcool.

Tabela 3.22 - Exemplos de analitos passíveis de pesquisa no sangue, urina e cabelo, após consumo simultâneo de COC e EtOH. Janelas de detecção para alguns compostos (adaptado de [158, 194, 215, 216, 263, 301, 304, 359]).

Matriz	Druga e metabolitos detectáveis	Janela de detecção
Plasma, sangue total	COC	Rapidamente transformada em BE, ao fim de 8 h não é detectável 12 h
	BE	
	EME	
	COCE	
	NORCOC	
Urina	COC	24 h
	BE	48 h
	EME	72 h
	COCE	
	NORCOC	
	AEME ^{a)}	
Cabelo	COC	Meses a anos dependendo do comprimento do cabelo
	BE	
	EME	
	COCE	
	NORCOC	
	AEME ^{a)}	
	EEE	
	NORCE	
	Benzoilnorecgonina	

a) Não é possível a dosagem no sangue e no plasma devido à sua hidrólise *in vitro* [304]

3.4.7 - Cocaína na toxicologia

No âmbito das mortes relacionadas com o consumo de drogas foram detectados, em 2003, 57 casos num total de 152, com presença de COC [125]. Estes resultados demonstram que a COC ocupa a segunda posição (36%) entre as drogas detectadas no contexto dessas mortes, isoladamente (11%) ou em associação com outras substâncias (26%) [125].

A COC apresenta toxicidade sobre um conjunto de órgãos nomeadamente, o coração, cérebro, pulmões, fígado, rins, músculos, estômago e intestino [356]. Os efeitos tóxicos estão elencados na tabela 3.19. Um cocainómano pode sofrer reacções adversas acrescidas decorrentes do consumo concomitante de outras drogas- HERO, BZD e/ou álcool [113]. O álcool induz a activação da enzima carboxilesterase, que converte a COC em COCE, um metabolito activo que pode aumentar a cardiotoxicidade e a frequência de morte súbita [113].

A dose letal de COC é de 1 g, administrada por via endovenosa, numa única injeção [113].

O diagnóstico eficiente e precoce do abuso de COC durante a gravidez e a consequente exposição intra-uterina reveste-se da maior importância para os cuidados especializados que a criança irá necessitar [45].

3.4.8 – Métodos de pesquisa e dosagem em cabelo

A seguir à urina e ao sangue, o cabelo é a matriz alternativa mais utilizada nas análises à COC *in vivo* [190]. A análise ao cabelo destinada à identificação de consumidores de COC tem vantagens relativamente à análise à urina, sobretudo se o consumo ocorreu há mais de 72 h [328], uma vez que a janela de detecção é superior [63, 363]. Além disso, a COC é mais estável no cabelo, contrariamente ao que acontece tanto no sangue como na urina, onde os metabolitos BE e EME são mais estáveis do que a droga mãe [304].

Henderson *et al.* [219] demonstraram, pela administração intravenosa (0,3, 0,6 e 1,2 mg/Kg) e intranasal (0,6 e 1,2 mg/Kg) de COC, que existe uma variabilidade interindividual, dependendo os resultados do tipo de cabelo, raça e regime de dose. Nalguns indivíduos pode ser detectada uma única dose de COC (22-35 mg), 8 h após administração, noutros só após 1-3 dias. Além disso, é possível a obtenção de resultados positivos durante 2 – 6 meses, decorrentes de uma única dose ou de doses múltiplas [109].

A COC pôde ser detectada 24 h após a administração intranasal, na maioria dos casos dos indivíduos não caucasianos [106].

De todos os artigos cujo tema é a análise de drogas em cabelo destacam-se, em número, os que se referem à COC e metabolitos [190].

Contrariamente ao que acontece na urina, o principal analito presente no cabelo é a COC e não a BE [19, 61, 75, 108, 278, 321, 325]. Este metabolito e particularmente o EME existem em concentrações tão baixas e variáveis que podem resultar da degradação ambiental da COC já presente no cabelo [108].

A COC é uma droga básica facilmente incorporada no cabelo, independentemente das possíveis vias de administração, onde permanece estável durante longos períodos de tempo [84]. Assim sendo, além de ser incorporada no cabelo como droga mãe pode ser detectada meses depois após o consumo [108]. Verifica-se que após a interrupção de um consumo crónico de COC é possível a sua detecção, em segmentos próximos da raiz, durante três meses e, em segmentos distais, pelo menos nove meses [84]. A BE é detectada durante mais tempo do que a COC, a qual é eliminada mais rapidamente do que a BE, em situações de lavagens regulares ao cabelo [315].

A COC é uma droga com metabolitos não específicos contrariamente ao Δ^9 -THC cujo metabolito específico é o Δ^9 -THC-COOH [346]. Assim, a alternativa de pesquisar metabolitos que apenas se formem no organismo resultantes dum consumo activo da droga [25], os chamados marcadores biológicos, deve ser efectuada com algum cuidado.

Segundo Cone *et al.* [63] numa análise ao cabelo com vista à identificação de um consumo de COC não se deverá pesquisar apenas um metabolito da COC (ex. BE), mas outros que também não surjam por hidrólise da droga mãe ou por exposição ambiental. Têm sido sugeridos, além da BE, o COCE [63, 363], identificado como um produto de conversão metabólica da co-administração de COC e etanol, e a NORCOC [63, 104, 117], um produto de oxidação metabólica da COC (Figura 3.10) que não se forma durante a pirólise da droga mãe [63].

O COCE, NORCOC e a BE são potenciais marcadores do consumo de COC [359]. O COCE e a NORCOC nunca foram identificados em cabelo submetido a experiências de contaminação com COC [358]. No entanto, o COCE pode ser formado pela exposição da COC ao álcool (ex. armazenamento de COC.HCl numa solução alcoólica) [61]. Janzen [128] referiu a detecção de COCE em amostras de COC ilícita a qual tinha sido transportada dissolvida em licor.

Apesar da possibilidade da COC ilícita conter COCE [63] e NORCOC [63], estes metabolitos não se detectam em quantidades apreciáveis [63]. Caso ultrapassem as quantidades vestigiais, então não poderão servir como marcadores do uso activo de COC [128]. A presença de COCE na COC ilícita em quantidades sem ser vestigiais é relativamente raro [128]. Além disso, a presença de NORCOC em quantidades vestigiais, na COC ilícita, não possibilita a sua detecção em amostras biológicas, exceptuando os casos de overdose [128]. A NORCOC e o COCE são menos prevalentes no ambiente relativamente aos analitos utilizados vulgarmente para interpretar o uso activo de COC (BE e/ou a COC) e, por isso, são marcadores mais específicos do uso da COC que a própria COC e a BE.

Relativamente à BE são necessários alguns cuidados uma vez que pode ser gerada, por hidrólise da COC, durante o processo de extracção particularmente em condições de elevado pH, gerando falsos positivos. No entanto, não há evidências de que a COC, sequestrada no cabelo se converta a BE ou a EME quando se sujeita o mesmo a tratamentos alcalinos (ex. ondulação do cabelo) [358]. É aceite que a BE pode ser produzida por processos não metabólicos após a deposição de COC no cabelo [311]. Expondo deliberadamente o cabelo à mistura de solução aquosa de COC e BE, verifica-se que ele adsorve concentrações substanciais de BE [358]. Consequentemente, a utilidade deste analito como marcador de uso activo de COC está de certa forma limitada à possibilidade de contaminação ambiental [358]. A AEME não é considerada um marcador biológico válido porque se deposita no cabelo, caso haja produção de vapor de COC num determinado ambiente [358]. Outros autores [359] consideram que a sua detecção indica consumo de COC fumada. Quanto à possibilidade de utilizar o EME como marcador biológico, salienta-se que o armazenamento de COC em MeOH dá lugar à formação de EME por metanólise [25].

De acordo com as recomendações da *SoHT*, numa análise ao cabelo destinada à determinação de um consumo de COC, devem ser pesquisados, além da droga mãe, a BE e o COCE [365]. Além disso, a razão BE/COC deverá ser $> 0,05$ [365].

Sendo frequente o consumo concomitante de COC e HERO [359] justifica-se a existência de vários trabalhos que se referem à sua análise em simultâneo [19, 32, 61, 81, 93, 117, 166, 217, 218, 245, 248, 253, 276, 281, 297, 300, 315, 323, 325, 328, 331, 332, 346, 347, 359, 371], além dos que apenas visam a COC e/ou metabolitos [25, 45, 58, 63, 73, 84, 85, 101, 109, 116, 158, 182, 194, 195, 211, 220, 249, 268, 311, 336, 358, 363].

A utilização do cabelo como espécime para detectar o uso de COC foi pela primeira vez referida, em 1981, por Arnold & Püschel [4] e por Valente *et al.* [302, 352]. As amostras de

cabelo foram analisadas para a BE, aplicando um método imunológico- o RIA, na tentativa de verificar em indivíduos consumidores, a história do uso da COC. Seguiram-se, rapidamente outros estudos, utilizando a mesma metodologia analítica [32, 45, 85, 174, 194, 245, 268, 302, 314, 325, 328, 335], cujas principais vantagens são o baixo custo e a rapidez na obtenção de resultados [85, 194, 300] apresentando, no entanto, falta de especificidade [61, 256] e de sensibilidade [328]. Moore *et al.* [220] demonstraram que o uso de *STC Micro.Plate* EIA é uma alternativa válida a outra técnica de imunoensaio aplicada em análises de triagem, destinada à detecção de COC no cabelo. Kintz *et al.* [162] utilizaram na triagem de uma variedade de drogas, incluindo a COC, em amostras de cabelo a técnica FPIA. Esta foi concebida para a análise à urina sendo, por isso, a BE o analito alvo. A *STC Micro.Plate* EIA apresenta, comparativamente à FPIA, uma reacção cruzada superior com a COC e o EME e, igual com a BE [220]. A ELISA é referida como uma alternativa aos RIA [300] devido à segurança, sensibilidade e baixo custo. A EMIT pode ser igualmente usada na análise simultânea de opiáceos, COC e metabolitos em cabelo, com confirmação por GC/MS [328].

Em 1987 Balanova & Homoki [8] referiram, pela primeira vez o uso da CG/MS para a detecção de COC no cabelo. Esta técnica é essencial na análise de COC e metabolitos nessa matriz, devido às baixas concentrações aí presentes [61] e, como tal, tem sido a mais utilizada quer com EI [19, 45, 63, 73, 81, 84, 85, 93, 158, 166, 177, 194, 211, 217, 218, 248, 268, 276, 281, 300, 302, 308, 315, 323, 328, 336, 346, 358, 359, 363, 371] ou com CI (NCI ou PCI) [20, 93, 101, 109, 116, 117, 302, 311, 363]. A CI é particularmente útil quando a concentração de COC e metabolitos é baixa, porque tem maior sensibilidade [117]. Encontram-se descritos, em menor número, métodos cromatográficos com outros detectores, nomeadamente a GC/MS/MS [25, 195, 253, 302, 347, 363], a HPLC [31, 32, 58, 249, 332, 335] com detecção por UV [332], fluorescência [58, 335] por MS [249] e, mais recentemente, por MS/MS [31, 32, 297]. O uso da GC/MS/MS permite obter maior sensibilidade, comparativamente ao uso da GC/MS, na análise de COC, BE, EME, COCE [253] e NORCOC [25]. Torna-se particularmente útil quando são esperadas baixas concentrações [25] (ex. sendo alvos os metabolitos EME e NORCOC), ou quando a disponibilidade da amostra é reduzida (ex. em casos neonatais) [253]. Os elevados custos limitam a sua utilização.

Tem sido igualmente referido o emprego de métodos electroforéticos, nomeadamente a CE, na análise de COC e metabolitos em cabelo [331, 332, 335].

As grandes diferenças, na diversidade de métodos analíticos usados para detecção e quantificação da COC e dos seus metabolitos no cabelo, encontram-se nas etapas de preparação da amostra de cabelo, ou seja, na lavagem, libertação e extracção.

Embora o cabelo seja a matriz mais utilizada, encontram-se descritos procedimentos de análise em que são usados pêlos púbicos [45].

3.4.8.1- Metodologia analítica por GC/MS

Devido ao elevado número de trabalhos publicados referente à análise de COC e metabolitos no cabelo seleccionaram-se para uma revisão mais aprofundada, sobretudo, as publicações mais recentes que se referem à análise da COC e dos metabolitos alvo do nosso trabalho, por GC/MS-EI. Os dados apresentados desde 1980 até 1994 foram principalmente obtidos nos artigos de revisão de Cone *et al.* [61] e de Selava *et al.* [302].

A preparação das amostras de cabelo para análise por GC/MS de COC e metabolitos envolvem, geralmente, descontaminação, libertação e extracção dos analitos e derivatização dos seus metabolitos polares (Tabelas 3.23, 3.24, 3.25).

As dificuldades analíticas são devidas às diferentes propriedades físico-químicas da BE e do EME em relação à molécula precursora [41]. O COCE apresenta semelhança analítica com a COC [41].

Tamanho da amostra e descontaminação

A validade de uma análise ao cabelo está relacionada, como tem vindo a ser referido, com a capacidade de identificar a droga mãe ou metabolitos resultantes dum consumo efectivo e não de uma contaminação ambiental.

Usualmente, antes da libertação das drogas e metabolitos as amostras são descontaminadas. Alguns autores [268] aplicam este procedimento apenas em caso de suspeição de contaminação da amostra.

Na tabela 3.23 resumem-se os procedimentos usados nesta etapa, o tamanho da amostra usada e a preparação antes da libertação da COC e metabolitos.

Tabela 3.23 - Tamanho, procedimento de descontaminação e preparação das amostras de cabelo.

Composto	Tamanho da amostra (mg)	Descontaminação	Preparação da amostra	Ref
COC BE EME NORCOC COCE NORCE	10-100	3X (1 mL MeOH, 15 min, a 37°C) 1 mL EtOH, 15 min, a 37°C; 3X (1 mL tampão fosfato pH 6, 30 min, a 37°C)	Pequenos fragmentos	[63]
COC BE EME	10	50 mL SDS a 1%, 5 min com agitação magnética; 3X (50 mL de H ₂ O desionizada); 3X (30 mL de MeOH)	Pequenos fragmentos	[101]
COC BE EME	10-30	Água; acetona	Pulverizada	[211]
COC BE EME COCE	10	1 mL MeOH, 1 min à temperatura ambiente; enxaguar 2X (1mL MeOH)	Pequenos fragmentos	[359]
COC BE EME	30	5 mL CH ₂ Cl ₂ , 2 min; enxaguar 5 mL H ₂ O, 2 min; enxaguar 5 mL CH ₂ Cl ₂ , 2 min	Pulverizada	[158]
COC BE EME COCE	50	2X (5 mL CH ₂ Cl ₂ , 2 min à temperatura ambiente)	Pulverizada	[166]
COC BE	50	2X (5 mL Tween 80 0,1%); 2X (1 mL H ₂ O destilada); 1 mL acetona	Pequenos fragmentos	[45]
COC BE	20	EtOH, 15 min; 3X (1 mL tampão fosfato 0,01 M, pH 5,6, 30 min, a 37°C)	Pulverizada	[311]
COC BE	20- 50	10 mL EtOH/ MeOH (9:1, v/v)	Pulverizada Pequenos fragmentos	[81]
COC BE COCE	50	H ₂ O; 3 mL MeOH; 3 mL Acetona	NR	[182]
COC BE	20- 30	2 mL isopropanol; 3X (2mL desionizada); 2 mL isopropanol; secar ao ar	Pequenos fragmentos	[177]
COC BE EME COCE	10	2X (2 mL CH ₂ Cl ₂ , 2 min à temperatura ambiente)	Pequenos fragmentos	[300]
COC BE EME	50	Detergente líquido neutro e H ₂ O destilada; remoção da solução de lavagem e enxaguamento com H ₂ O destilada várias vezes; secar com acetona deixando as amostras durante 24 h a 40°C	Pequenos fragmentos	[328]
COC BE EME	50	1 mL MeOH, agitar 30 segundos no vórtex	Pequenos fragmentos	[218]
COC BE	10-50	Solução aquosa de SDS e acetona, 5 min em ultrassons	Pequenos fragmentos	[315]
COC	50	5 mL CH ₂ Cl ₂ ; 5 mL H ₂ O; 5 mL MeOH; secar a 60°C, 30 min	Pulverizada	[93, 323]
COC BE EME	50	2X (5 mL Tween 80 0,1%); 2X (1 mL H ₂ O destilada); 1 mL acetona	Pequenos fragmentos	[268]
COC BE	50	10 mL MeOH, agitar 10 segundos no vórtex, centrifugar 5 min a 3500 rpm	Pequenos fragmentos	[346]
COC BE COCE	30	H ₂ O morna; 2X acetona	Pulverizada	[371]
COC	Variável (35-285)	5 mL H ₂ O, 5 mL acetona, 5 mL hexano	Pequenos fragmentos	[276]
COC BE EME COCE	Variável (9,7- 99,1)	5 mL CH ₂ Cl ₂	Pequenos fragmentos	[248]
COC BE	50	1 mL MeOH, 1 min no vórtex e 5 min numa centrífuga a 4500 rpm.	Pequenos fragmentos	[217]
COC	50	2X CH ₂ Cl ₂ ;	Pequenos fragmentos	[308]
COC BE COCE	50	2 mL CH ₂ Cl ₂ , 15 min a 37°C	Pequenos fragmentos	[336]
COC BE	20	2X (1 mL MeOH)	Pulverizada	[281]
COC	50	MeOH	Segmentos	[84]

a) Comparação dos procedimentos.

As amostras usadas na análise de COC e metabolitos por GC/MS apresentam tamanho variável entre 9,7–100 mg (Tabela 3.23).

As soluções empregues nesta etapa variam de acordo com os autores e são fundamentalmente o metanol, etanol, água, surfactante, tampões, acetona, diclorometano e éter de petróleo [302] (Tabela 3.23).

A eficácia dos procedimentos de remoção da COC, presente no cabelo proveniente de contaminação ambiental, é controversa. A possibilidade da completa descontaminação das amostras defendida por alguns investigadores [17, 166, 174] é contrariada por outros [21, 63, 279, 358, 363]. Romano *et al.* [279] concluíram que os métodos de descontaminação sugeridos na literatura não são eficazes uma vez que concentrações significativas de COC (>1 ng/mg) e moderadas de BE (geralmente <0,5 ng/mg) permanecem detectáveis mais de dez semanas, em cabelo contaminado.

Além disso, alguns autores [110, 249] defendem que os procedimentos de descontaminação podem remover, das amostras, parte da droga e metabolitos resultantes dum consumo efectivo. Os resultados obtidos por Paulsen *et al.* [249] demonstraram que na etapa de descontaminação se remove significativamente da amostra COC e metabolitos (BE, EME, COCE, NORCOC), facto que terá de ser considerado na interpretação dos resultados quantitativos. A determinação de uma concentração igual ou superior, de COC e metabolitos, na solução de lavagem (metanol) relativamente à determinada nos extractos [63] permite concluir que houve remoção não só dos compostos que podem estar presentes nas amostras resultantes de contaminação ambiental como também dos metabolitos (BE, EME, COCE, MOR). A profundidade de penetração da solução de lavagem no cabelo, e a conseqüente remoção de mais analitos do que os que correspondem a uma contaminação ambiental, depende das condições em que o cabelo em análise se encontra, pelo que não se devem atribuir exclusivamente os resultados ao tipo de solução empregue [63].

O diclorometano, frequentemente utilizado (Tabela 3.23), deve ser empregue com algum cuidado para que não haja extracção das drogas presentes no interior da matriz [300]. De acordo com a opinião de Kintz *et al.* [166] a lavagem duas vezes com diclorometano é eficiente. O metanol, um dos solventes mais empregues na descontaminação das amostras [302] e (Tabela 3.23), é usado igualmente no processo de extracção (Tabela 3.24). Desta forma, para que a descontaminação não se transforme num processo extractivo, Blank *et al.* [21] sugerem a utilização de pentano, em alternativa ao metanol, o qual não extrai drogas do cabelo, sendo eficiente na remoção de gorduras existentes na superfície da matriz.

A maior ou menor dificuldade na obtenção de amostras descontaminadas deve-se não só à eficiência das soluções utilizadas, mas também à forma de contaminação. Os resultados apresentados por Cone *et al.* [63] evidenciam que a lavagem com metanol é mais efectiva na remoção da COC presente no cabelo por exposição ambiental do que o método em que se utiliza etanol não havendo, no entanto, uma total descontaminação com nenhuma das soluções usadas o que poderá originar falsos positivos [63].

Wang *et al.* [358], usando metanol, demonstraram uma maior resistência à descontaminação do cabelo contaminado por uma solução aquosa de COC (COC.HCl), comparativamente à ocasionada por vapor de COC (*crack*).

Na preparação da amostra é recomendável a sua pulverização, comparativamente à redução a pequenos fragmentos, por se obter uma maior recuperação das drogas [81, 281].

Libertação e Extracção

No processo de libertação e extracção de COC e metabolitos não é frequente o uso de material silanizado, no entanto Harkey *et al.* [101] e Toledo *et al.* [336] adoptaram este procedimento na extracção de COC, BE, EME e COCE em amostras de cabelo.

Têm sido referidos vários procedimentos de libertação e extracção de COC e metabolitos do cabelo, conforme se apresenta na tabela 3.24. Apesar da completa solubilização do cabelo ser a situação ideal, a instabilidade química da COC leva à opção frequente da destruição da estrutura do cabelo através da pulverização da matriz [81].

Tabela 3.24 - Padrões internos, métodos de libertação e extracção de COC e metabolitos em cabelo.

Composto	Padrão Interno (I.S.)	Libertação	Extracção	Ref
COC BE EME NORCOC COCE NORCE	COC-d ₃ BE-d ₃ EME-d ₃	1 mL H ₂ SO ₄ 0,05M, a 37°C, durante toda a noite e com agitação magnética; neutralizar com NaOH 1M; ajustar a pH 4 com 1 mL de tampão de acetato de sódio 2M.	(SPE) (Colunas <i>Clean Screen®DAU</i>). Acondicionamento: 2X (1 mL MeOH), 2X (1 mL de H ₂ O desionizada), 0,2 mL de tampão de acetato de sódio. Lavagem: 0,5 mL de H ₂ O desionizada, 1 mL de HCl, 2X (1 mL de MeOH), secar sob vácuo. Eluição: 3X [1 mL (diclorometano/isopropanol (8:2, v/v) contendo 2% de hidróxido de amónia)]. Secar os eluatos sob corrente de N ₂ .	[63]
COC BE EME	COC-d ₃ BE-d ₃ EME-d ₃	Incubação 2 h a 40°C na solução de 2,6 mL tampão de digestão e 0,4 mL DTT 0,4M em tampão de acetato de sódio 10mM; 55 µL proteinase K e incubar toda a noite a 40°C	(SPE) (Colunas <i>Bond Elut Certify™</i>) Acondicionamento: 2mL MeOH; 2 mL tampão fosfato 0,1M. Verter amostra. Lavagem: 3 mL H ₂ O desionizada 3 mL HCl 0,1M, 8 mL MeOH; Eluição: 2 mL diclorometano/isopropanol (8:2, v/v) contendo 2% de hidróxido de amónia. Secar extractos sob corrente de ar a 40°C.	[101]
COC BE EME	COC-d ₃ BE-d ₃ EME-d ₃	2 mL tampão fosfato; 75 µL β-Glucuronidase/arylsulfatase, 2 h, 45°C; centrifugar; remover o sobrenadante e adicionar 2 mL tampão fosfato; 1 mL K ₂ HPO ₄ ajustando o pH a 8	(SPE) (Colunas <i>Chromabond®C18</i>). Acondicionamento: 2X (2 mL MeOH), 2X (2 mL de H ₂ O), 1 mL tampão acetato, pH 6,0. Verter amostra. Lavagem: 2X (1 mL de H ₂ O), 1 mL tampão acetato pH 4,0, aspirar 5 min, 2X (1 mL de acetoneitrilo), secar 5 min. Eluição: 3X [2 mL diclorometano/isopropanol (8:2, v/v) contendo 2% de hidróxido de amónia].	[211]

COC BE EME COCE	COC-d ₃ BE-d ₃ EME-d ₃ COCE-d ₃	3 mL tampão acetato 0,5M, pH 6 contendo 0,5% (w/v) de fluoreto de sódio	(SPE) (Colunas <i>Clean Screen DAU</i>). Acondicionamento: 6 mL MeOH, 3 mL de H ₂ O. Lavagem: 3 mL de H ₂ O, 3 mL de ácido acético 0,25N, 3 mL de H ₂ O, secar sob vácuo 10 min e centrifugar 15 min a 4000 rpm. Eluição: 3X [2 mL (diclorometano/isopropanol/hidróxido de amónia (80:20:2, v/v))].	[359]
COC BE EME COCE	COC-d ₃ BE-d ₃ EME-d ₃ COCE-d ₃	Incubação em 1 mL HCl 0,1M, toda a noite, a 56°C.	(LLE) 10 mL clorofórmio/isopropanol/ <i>n</i> -heptano (50:17:33, v/v), sob condições alcalinas (2 mL tampão fosfato 1M a pH 8,4); purificação da fracção orgânica com 5 mL HCl 0,2M; reextração da fracção aquosa com 2 mL de tampão fosfato, 1 mL NaOH 1M e 5 mL de clorofórmio; remover a fracção orgânica e evaporar à secura a 45°C.	[158]
COC BE EME COCE	COC-d ₃ BE-d ₃ EME-d ₃ COCE-d ₃	Incubação em 1 mL HCl 0,1M, toda a noite, a 56°C	(LLE) Neutralizar com 1 mL de NaOH 0,1M; 10 mL clorofórmio/isopropanol/ <i>n</i> -heptano (50:17:33, v/v), sob condições alcalinas (2 mL tampão fosfato 1M a pH 8,4); purificação da fracção orgânica com 5 mL HCl 0,2M; reextração da fracção aquosa com 2 mL de tampão fosfato, 1 mL NaOH 1M e 5 mL de clorofórmio; remover a fracção orgânica e evaporar à secura a 45°C.	[166]
COC BE	COC-d ₃ BE-d ₃	Incubação em 1 mL de solução enzimática de pronase (1 mg/mL) e DTT (6 mg/mL) em tampão fosfato (pH 7,1), toda a noite, a 39°C	(Só para análise por GC/MS) (SPE) (Colunas <i>Bakerbond C₁₈ LD</i>) Acondicionamento: 3 mL MeOH, 3 mL de tampão fosfato pH 7,5. Eluição: 2 mL clorofórmio/isopropanol (9:1, v/v).	[45]
COC BE	COC-d ₃ BE-d ₃	2X (500 µL dimetilformamida contendo HCl a 0,1%, 1 h, a 37°C)	(LLE) 200 µL PA, 20 µL trietilamina, 200 µL <i>n</i> -propanol, aquecer a 60°C, 30 min; 1 mL HCl 0,1M e 1 mL dietil éter, agitar e centrifugar; rejeitar a fracção de éter; adicionar 1 mL de acetato de etilo, 1 mL de tampão carbonato 1M pH 10.	[311]
COC BE	COC-d ₃ BE-d ₃	A- 5 mL MeOH, 5 h em ultrassons, a 40°C. B- 2 mL tampão acetato pH 4; 60 µL β-Glucuronidase/arylsulfatase, 1,5 h a 42°C; neutralizar com bicarbonato de sódio. C- Incubação em 2 mL de solução de ureia 8M, toda a noite. D- 5 mL de acetona 5 h em ultrassons, a 40°C. E- 5mL de isopropanol 5 h em ultrassons a 40°C.	(SPE) (Colunas <i>Chromabond[®] C₁₈</i> , 200 mg-3 mL) Acondicionamento: NR. Lavagem: 3 mL de H ₂ O destilada, 3 mL de hidrogenocarbonato de sódio a 5%, 3 mL de H ₂ O destilada. Eluição: acetona/diclorometano (3:1, v/v) contendo 2% de hidróxido de amónia.	[81]
COC BE COCE	COC-d ₃ BE-d ₃ COCE-d ₃	3 mL HCl 0,1N, toda a noite a 55°C. Decantar o ácido; adicionar 200 µL EtOH, 2 mL H ₂ O desionizada e 200 µL NaOH 12M; incubar 30 min a 80°C; adicionar 1 mL de ácido acético Centrifugar e adicionar ao sobrenadante 9 mL H ₂ O desionizada.	(SPE) (Colunas <i>Isolute HXC</i>) Acondicionamento: 3 mL MeOH, 1 mL de água, 1 mL ácido acético 1,93M. Verter amostra. Lavagem: 3 mL de H ₂ O, 1 mL HCl 0,1M, acetonitrilo/H ₂ O desionizada (20:80, v/v); Eluição para teste de triagem: Drogas ácidas - 3 mL hexano/acetato de etilo (50:50, v/v); lavar coluna com 3 mL MeOH e secar; eluição das drogas básicas - 3 mL diclorometano/isopropanol/hidróxido de amónia (78:20:2, v/v); adicionar 1 gota de H ₂ SO ₄ 0,1% e evaporar à secura os extractos. Eluição para teste de confirmação: a mesma do teste de triagem suprimindo o passo referente às drogas ácidas.	[182]
COC BE	COC-d ₃ BE-d ₃	Incubação em 1 mL de MeOH, 18 h a 40°C; centrifugar 5 min; evaporar a fracção metanólica à secura sob corrente de N ₂ ; adicionar 3 mL de tampão acetato 0,1M pH 6,0.	(SPE) (Colunas <i>Clean Screen[®] ZSDAU020</i>) Acondicionamento: 2 mL MeOH, 2 mL de H ₂ O, 1 mL tampão acetato pH 6,0. Verter amostra. Lavagem: 1 mL de H ₂ O, 1 mL tampão acetato pH 4,0, secar com 2 mL de acetonitrilo, secar 5 min. Eluição: 2 X [3 mL diclorometano/isopropanol (80:20, v/v) contendo 2% de amónia].	[177]
COC BE EME COCE	COC-d ₃ BE-d ₃ EME-d ₃ COCE-d ₃	Incubação em 2 mL MeOH-TFA, toda a noite, a 37°C, com agitação.	(SPE) (Colunas <i>Bond Elut CertifyTM</i>) Evaporar à secura; redissolver em 2 mL de tampão fosfato 0,1M pH 6,0; Acondicionamento: 2 mL MeOH; 2 mL H ₂ O, 2 mL tampão fosfato 0,1M pH 6. Verter amostra. Lavagem: 2 mL H ₂ O, 1 mL tampão acetato 0,1M pH 4, 2 mL MeOH. Eluição: 2 mL diclorometano/isopropanol (4:1, v/v) contendo 2% de hidróxido de amónia. Secar extractos sob corrente de N ₂ .	[300]
COC BE EME	SKF-525A	Digestão enzimática 500 µL DTT, 2 h a 40°C; 500 µL de pronase, 12 h, a 40°C.	(LLE) Após extração em <i>Toxytubes A</i> , evaporar o sobrenadante sob corrente de N ₂ , a 60°C.	[328]
COC BE EME	Escopolamina	Incubação em 1 mL de HCl 0,1M, toda a noite a 45°C; ajustar para pH 7 com NaOH 1M e 1 mL tampão fosfato 0,1M pH 7; centrifugar 5 min a 4500 rpm e submeter a fracção aquosa a SPE.	(SPE) (Colunas <i>Bond Elut CertifyTM</i>) Acondicionamento: 2 mL MeOH; 2 mL tampão fosfato 0,1M pH 7. Verter a amostra na coluna. Lavagem: 2 mL H ₂ O bidestilada, 3 mL HCl 0,1M, 5 mL MeOH, secar sob vácuo 5 min. Eluição: 2X [1 mL diclorometano/isopropanol (8:2, v/v) contendo 2% de hidróxido de amónia]. Secar extractos sob corrente de N ₂ .	[218]
COC BE	COC-d ₃ BE-d ₃	2 mL tampão fosfato pH 6,0, 12 h em ultrassons.	(SPE) (Colunas <i>Chromabond[®] C₁₈</i>) Acondicionamento: 3 mL MeOH, 3 mL de H ₂ O, 1 mL tampão fosfato 0,1M pH 6,0. Verter a amostra na coluna. Lavagem: 1 mL ácido acético 1M; secar 10 min por sucção; 3 mL MeOH; secar 5 min por sucção; Eluição: 2X [1 mL diclorometano/isopropanol/33% amónia (80:22:2, v/v/v)].	[315]

COC	NAL	Incubação em 1 mL HCl 0,01M, 12 h, a 60°C; Neutralizar com 1 mL NaOH 0,01M e 1 mL tampão fosfato pH 7,0; centrifugar 5 min a 4000 rpm.	(SPE) (Colunas <i>Isolute HCX</i> ou <i>Bond Elut Certify™</i>) Acondicionamento: 2 mL MeOH; 2 mL H ₂ O. Verter amostra na coluna. Lavagem: 2 mL H ₂ O; 1 mL tampão acetato pH 4; 2 mL MeOH; secar com ar Eluição: 2 mL diclorometano/isopropanol/hidróxido de amônia.	[93, 323]
COC BE EME	SKF-525A	Digestão: 1 mL de solução de pronase (1 mg/mL) e DTT (6 mg/mL) em tampão Tris pH 7,1, toda a noite, a 37°C; Filtrar a solução de digestão.	(LLE) em <i>Toxotubes A</i>	[268, 19]
COC BE	Escopolamina	Incubação em 1 mL HCl 0,1M; tampão fosfato 0,1M pH 6, toda a noite, a 45°C; neutralizar com 2 gotas de NaOH 2N; centrifugar 5 min a 3500 rpm., Submeter a fase aquosa a SPE	(SPE) (Colunas <i>Bond Elut Certify™</i>) Acondicionamento: 2 mL MeOH; 2 mL tampão fosfato 0,1M pH 6. Verter a amostra na coluna. Lavagem: 2 mL H ₂ O destilada, 3 mL HCl 0,1M, 5 mL MeOH, secar sob vácuo, 5 min. Eluição: 2X [1 mL diclorometano/isopropanol (8:2, v/v) contendo 2% de hidróxido de amônia]. Secar extractos sob corrente de N ₂ .	[346]
COC BE COCE	COC-d ₃ BE-d ₃ COCE-d ₃	Solução de ureia 8M/tioglicolato 0,2M pH 3, 2 h a 60°C; ajustar para pH 8.	(SPE) (Colunas <i>Chromabond C18</i>) Acondicionamento: 6 mL MeOH, 3 mL H ₂ O destilada. Verter amostra. Lavagem: 3 mL H ₂ O; 3 mL NaHCO ₃ 0,6M; 3 mL H ₂ O destilada Eluição: 2 mL acetona/diclorometano (3:1, v/v).	[371]
COC	COC-d ₃	4 mL MeOH em ultrassons, 4 h a 50°C; evaporar, reconstituir o resíduo em 7 mL de tampão fosfato 0,1M pH 6,0 contendo 400 mg de albumina de soro de bovino.	(SPE) (Colunas <i>Bakerbond C18</i>) Acondicionamento: 2 mL MeOH, 2 mL tampão fosfato 0,1M pH 6,0. Lavagem: 1 mL de ácido acético 0,1M, secar 10 min sob vácuo. Eluição: 3 mL diclorometano/isopropanol/amônia (40:10:1, v/v/v).	[276]
COC e Metabolitos	PCP-d ₃	2 mL MeOH, 18 h, a 45°C.		[248]
COC BE	Escopolamina	Incubação toda a noite, a 45°C, em HCl 0,1M; ajustar para pH 6 com KOH 2M e tampão fosfato 0,1M, pH 6.	(SPE) (Colunas <i>Bond Elut Certify™</i>) Acondicionamento: 2 mL MeOH; 2 mL tampão fosfato 0,1M, pH 6. Verter amostra. Lavagem: 2 mL H ₂ O, 3 mL HCl 0,1M, 5 mL MeOH. Eluição: 2X [1 mL diclorometano/isopropanol (8:2, v/v) contendo 2% de hidróxido de amônia]. Secar extractos sob corrente de N ₂ .	[217]
COC	Metaqualona	Incubação em 2 mL MeOH, 18 h a 40°C; Enxaguar o cabelo com 0,5 mL de MeOH; misturar as duas frações e evaporar à secura sob corrente de N ₂ a 40°C; adicionar 2 mL tampão fosfato 0,1M pH 6.	(SPE) (Colunas <i>Bond Elut Certify™</i>) Acondicionamento: 2 mL MeOH; 2 mL tampão fosfato 0,1M pH 6. Verter a amostra. Lavagem: 2 mL H ₂ O desionizada, 1 mL ácido acético 0,1M, 2 mL MeOH; secar sob vácuo durante 5 min. Eluição: 3X [1 mL diclorometano/isopropanol/hidróxido de amônia (80:20:2, v/v/v)]. Secar extractos sob corrente de N ₂ .	[308]
COC BE EME	COC-d ₃ BE-d ₃ EME-d ₃	2 mL MeOH, 18 h a 50°C; transferir para tubo silanizado e evaporar a 50°C sob corrente de N ₂ .	(SPME) (Após derivatização) Mergulhar fibra de PDMS na solução de derivatização durante 20 minutos, sob agitação magnética. Injectar directamente no GC.	[336]
COC BE	COC-d ₃ BE-d ₃	Incubação 18 h, a 45°C em 3 mL tampão fosfato 0,1M pH 5; ou 3 mL tampão fosfato 0,1M pH 6 ou 3 mL tampão fosfato 0,1M pH 7 ou 3 mL tampão fosfato 0,1M pH 8 ou 3 mL tampão carbonato/bicarbonato pH 9 a)	(SPE) (Colunas <i>Bond Elut Certify™</i>) Acondicionamento: 2 mL MeOH; 3 mL tampão fosfato 0,1M pH 6. Verter a amostra na coluna. Lavagem: 3 mL H ₂ O, 1,5 mL HCl 0,1M, secar sob vácuo durante 5 min, 2 mL MeOH. Eluição: 3 mL diclorometano/isopropanol (8:2, v/v) contendo 2% de hidróxido de amônia. Secar extractos sob corrente de N ₂ , a 50°C.	[281]
COC BE	COC-d ₃ BE-d ₃	3 mL MeOH; ou 3 mL HCl 0,1N; ou 3 mL HCl 0,01N; ou 3 mL tampão fosfato 0,1M pH 5; ou 3 mL tampão fosfato 0,1M pH 6 ou 3 mL tampão fosfato 0,1M pH 7 ou 3 mL tampão fosfato 0,1M pH 8 ou 3 mL tampão carbonato/bicarbonato pH 9; b)		[281]
COC	COC-d ₃	3 mL MeOH/ácido trifluoroacético (9:1) c) Ajustar para pH 5 usando HCl 1N ou NaOH 1N e 1 mL de tampão fosfato 0,1N pH 5. Nas soluções metanólicas, evaporar à secura e redissolver em 3 mL de tampão fosfato 0,1N pH 5; centrifugar 3 min a 4000 rpm		
COC	COC-d ₃	2 mL HCl 0,1M, toda a noite a 40°C; ajustar o pH com KOH pH 8,2	(LLE) 4 mL clorofórmio/isopropanol (90:10, v/v)	[84]

a) estudo da influencia do pH no isolamento dos analitos por colunas *Bond Elut Certify*; b) estudo da estabilidade dos analitos nas diversas condições; c) condição submetida a duas temperaturas (45°C e ambiente); A,B,C,D,E- comparação dos métodos; NaHCO₃- Bicarbonato de sódio; K₂HPO₄- Hidrogenofosfato de potássio; H₂SO₄- Ácido sulfúrico;

Quanto mais grupos polares contiver uma molécula mais difícil se torna o seu isolamento da matriz biológica e/ou ela poderá exibir pobres propriedades cromatográficas [61]. Desta forma, é mais fácil o isolamento da COC do que o dos seus metabolitos.

Para libertação/extracção de COC e/ou metabolitos das amostras de cabelo têm sido empregues principalmente [302] (Tabela 3.24):

- solventes orgânicos – etanol, metanol, acetona e pentano (sendo alvos a COC, BE e EME)
- digestões enzimáticas – aplicando a mistura β -glucuronidase/arylsulfatase, a proteinase K, pronase ou proteinase VIII (sendo alvos a COC, BE, EME e COCE);
- soluções ácidas (sendo alvos a COC, BE, EME, NORCOC, COCE e NORCE);

As soluções básicas, embora sejam referidas para a libertação da BE (a BE permanece estável durante a fervura em NaOH [168]), raramente são usadas uma vez que as condições químicas alcalinas fortes hidrolisam os compostos éster como a COC e metabolitos [336]. Assim, os métodos que empregam bases fortes [24, 352] ou, mesmo, ácidos fortes [352] fazem com que haja conversão de COC em BE, sob pena dos resultados finais não reflectirem correctamente a concentração relativa de cada um dos analitos na amostra inicial. Usando uma hidrólise alcalina não é possível identificar a COC [166].

A eficiência na libertação de analitos das matrizes biológicas, a grande facilidade de evaporação, antes da derivatização da BE, e a baixa hidrólise dos analitos (preservação de compostos quimicamente instáveis) [253], mesmo quando usado em hidrólises longas (18 h) e a temperaturas elevadas (50°C) [336], constituem vantagens da utilização do metanol no processo extractivo, sendo este solvente orgânico o mais utilizado na libertação/ extracção de COC e metabolitos em cabelo (Tabela 3.24). Como desvantagens são referidos a necessidade de se proceder, antes da análise, a uma “limpeza” dos extractos através de uma SPE [81] e o facto de não se obterem boas recuperações dos compostos [253]. A adição de TFA ao metanol faz aumentar a recuperação na extracção de COC e metabolitos [300], não obstante haver alguma conversão da COC a EME (3%) [300].

Eser *et al.* [81] obtiveram melhores resultados analíticos e pureza de extractos aplicando na libertação a mistura β -glucuronidase/arylsulfatase durante 1,5 h, a 42°C. O tratamento enzimático empregando a mistura β -glucuronidase/arylsulfatase não interfere com a recuperação da COC, BE e EME, podendo ser usado na detecção de opiáceos e AP [211].

A utilização de HCl 0,01M [8, 194, 352] e H₂SO₄ 0,05M tem-se revelado eficaz na extração de COC e metabolitos do cabelo havendo apenas uma pequena fracção (10%) de COC que é convertida a BE [63]. A incubação do cabelo em HCl 0,1N toda a noite produz recuperações idênticas ao uso da digestão enzimática [25].

Cirimele *et al.* [52] concluíram que a extração ácida ou a usando β -glucuronidase/arylsulfatase permitem obter melhores recuperações comparativamente ao uso do metanol.

A LLE [84, 166, 256, 268, 311, 328] e a SPE [20, 109, 281, 359] têm sido as técnicas mais usadas na purificação dos extractos antes da análise [61, 302] (Tabela 3.24). A técnica de extração mais popular é a LLE no entanto, a SPE tem-se tornado cada vez mais importante (Tabela 3.24).

Em caso de emprego da LLE, a exposição da COC a pH>8 deverá ser breve devido à sua rápida hidrólise [61]. Os solventes mais usados para extração de COC e metabolitos são o clorofórmio, o isopropanol e o *n*-heptano (Tabela 3.24).

A SPE melhora a recuperação da COC e dos seus metabolitos mais polares [101]. Contudo, há algumas limitações nomeadamente grande número de etapas e a necessidade de elevado volume de solventes [336]. As Colunas *Bond Elut Certify*, as mais utilizadas na SPE de COC e metabolitos, permitem que os analitos possam ficar retidos por interações hidrofóbicas ou por troca catiónica a valores de pH apropriados. Desta forma, o pH de eluição das amostras é de grande importância, dependendo a recuperação da forma ionizada ou não ionizada dos analitos [281]. Na eluição emprega-se sobretudo a mistura diclorometano/isopropanol/hidróxido de amónia (Tabela 3.24).

A SPME representa uma economia de tempo, de gasto de solventes e consequentemente uma menor produção de resíduos [336].

A recuperação de extração tem-se revelado variável havendo uma tendência para que a da COC seja superior. Cone *et al.* [61] apresentaram a seguinte relação de recuperação: COC>NORCOC≈BE>EME. Höld *et al.* [117] e Bourland *et al.* [25] obtiveram uma recuperação semelhante para COCE e COC e uma recuperação de BE inferior à da droga mãe e à dos outros metabolitos.

Os padrões internos são preferencialmente deuterados análogos da COC e metabolitos (Tabela 3.24). No entanto, a referência ao uso da NAL verifica-se quer em trabalhos mais antigos quer nos mais recente [93, 253, 254, 323, 346].

Análise

Não são frequentes métodos de análise simultânea de mais de uma família de compostos, usando o mesmo procedimento de libertação, extracção e derivatização da amostra [177]. Skender *et al.* [308] desenvolverem um método de análise de COC, 6-MAM, MOR, COD, HERO, metadona, AP, MA, MDA, MDMA e MDEA mas referem não ser possível a análise de todas as drogas em simultâneo, pelo que adoptam diferentes métodos de extracção e derivatização de acordo com o tipo de drogas a analisar.

Derivatização e métodos de detecção

A COC, devido à sua estrutura não polar apresenta excelentes características cromatográficas [61]. As propriedades anfotérica e hidrofílica da BE tornam a sua análise por GC/MS difícil [373]. Desta forma, após a extracção, os analitos polares são derivatizados por forma a melhorar as suas propriedades cromatográficas [61]. Apesar da COC e o COCE não necessitarem de derivatização podem ser analisados na mesma corrida cromatográfica, em simultâneo com os compostos polares derivatizados (BE e EME) [300].

Na análise por GC/MS têm sido empregues, nos procedimentos de derivatização dos analitos polares- BE e EME, os seguintes compostos ou misturas: BSTFA+TMCS a 1% [63, 132, 166, 177, 268, 282, 328, 359], MTBSTFA [101, 248], MSTFA/TMCS [281], MSTFA [217, 218, 346], BSTFA [19], PFPA/PFPOH [45, 211], PFPA/HFIP [211], HFBA/HFIP [300], HFIP/TFA [315], piridina e PA [93, 323], butilcloroformato [336].

Para derivatização da BE, as técnicas mais usadas são a sililação, perfluoralquilação e a alquilação [373].

O método mais frequente é a sililação empregando usualmente a mistura BSTFA/TMCS (Tabela 3.25). O MTBSTFA derivatiza o grupo carboxilo da BE e o grupo hidroxilo do EME e, comparativamente ao emprego de BSTFA, produz compostos derivatizados igualmente voláteis e mais estáveis [41]. A derivatização com MTBSTFA melhora a cromatografia e possibilita a formação de fragmentos com elevado peso molecular [41, 101]. Além de ser um forte reagente de sililação origina derivados TBDMS muito mais estáveis à hidrólise do que os correspondentes TMS (obtidos pelo emprego de MSTFA + TMCS a 1%) [248].

A GC/MS é a técnica de eleição para análise da COC e metabolitos em cabelo, por proporcionar elevada sensibilidade e especificidade [61, 211]. A GC/MS-CI,

comparativamente à GC/MS-EI, permite aumentar a sensibilidade [101, 282] sendo normalmente usada não só na análise de COC e BE [101, 282, 311] mas também dos metabolitos EME [101, 282], COCE, NORCOC, norbenzoilecgonina (NORBE), EEE, AEME [282].

Com base na Tabela 3.25 verificamos que a COC e a BE são os compostos mais frequentemente analisados por GC/MS-EI. O EME e, em particular, a NORCOC, considerados marcadores do consumo de COC, são os menos pesquisados. A principal razão deste facto talvez seja por estarem presentes no cabelo humano em concentrações muito mais baixas relativamente às determinadas para a COC, BE e COCE [25, 117, 219] e, por conseguinte, a sensibilidade obtida por GC/MS-EI não seja a ideal. Desta forma, Bourland *et al.* [25] sugerem o uso de GC/MS/MS-PCI na análise quantitativa de NORCOC e EME.

Por ser frequente o consumo de COC associado ao álcool justifica-se a pesquisa de COCE e NORCE [63, 359], em amostras de cabelo.

A GC/MS é, igualmente, a técnica preferida na confirmação de resultados positivos, em exames de triagem (ex. por RIA, ELISA), para a COC [75, 166, 268] pesquisando-se, por rotina, a própria COC e/ou BE e/ou COCE [25, 171, 218, 268, 300, 328, 341].

Limite de detecção e concentrações determinadas em amostras

Na tabela 3.25 apresentam-se os LOD's e as concentrações de COC e metabolitos determinados em amostras de cabelo.

Tabela 3.25 - Técnicas de análise da COC e metabolitos em cabelo e resultados.

Composto	Derivatização	Reconstituição	Análise (cromatógrafo) (detector)	LOD (ng/mg)	Nº de casos analisados	Nº de casos positivos	Intervalo (média) (ng/mg)	Ref
COC						10	6,4-19,2 (10,8)	
BE	(Efectuada após reconstituição)			0,1		10	0,3-2,5 (1,2)	
EME	20 µL de BSTFA + TMCS 1%	20 µL	GC/MS-EI	para	10	6	0,6-1,9 (0,8)	[63]
NORCOC	(60°C, 30 min)	acetoneitrilo	(HP 5890A)	50 mg de		4	0,5-0,7 (0,2)	
COCE			(MSD HP 5970B)	amostra		6	0,4-2,6 (0,7)	
COC	(Efectuada após reconstituição e			0,1		5	0,16-5,7 (NR)	
BE	secagem da mesma sob corrente			0,1		1	1,1	[101]
EME	de N ₂ a 40°C)	0,25 µL	GC/MS-NCI	0,5	6	5		
	10 µL de MTBSTFA	CH ₂ Cl ₂	(Varian 3400)					
	(40°C, 10 min)		(Finnigan ITS-40)					
COC	100 µL PFPA + 70 µL PFPOH	30 µL	GC/MS-EI	0,1		56	1,4-50,6 (18,2)	
BE	(60°C, 30 min)	acetato de etilo	(HP 5890 series II)	0,1	56	56	0,4- 4,9 (6,6)	[211]
EME			(MSD HP 5971A)	1		< 56	vestigios-12,9 (4,0)	
COC				0,1		19	0,4-172,7 (22,3)	
BE	(Efectuada após reconstituição)			0,1		19	0,1-24,4 (3,0)	
EME	20 µL de BSTFA + TMCS 1%	20 µL	GC/MS-EI	0,1	19	6	0,2-2,4 (0,9)	[359]
NORCOC	(60°C, 30 min)	acetoneitrilo	(HP 5890A)	0,1		2	1,2-3,3 (2,25)	
COCE			(MSD HP 5970B)	0,1		12	0,2-7,6 (1,36)	
COC				0,05		67	0,5-216,5 (12,9)	
BE	30 µL de BSTFA + TMCS 1%	---	GC/MS-EI	0,15	600	48	0,1-33,7 (3,7)	[158]
EME	(70°C, 20 min)		(HP 5890)	0,50		33	0,1-12,8 (1,8)	
COCE			(MSD HP 5989B)	0,05		26	0,1-10,3 (1,6)	

COC	30 µL de BSTFA + TMCS 1% (70°C, 20 min)	---	GC/MS-EI	0,05	300	14	0,4-78,4 (8,3)	[166]			
BE			(Perkin Elmer 8500)	0,20			10		0,0-36,3 (2,9)		
EME			(Detector Ion Trap)	0,80			6		0,0-1,6 (0,4)		
COCE				0,10			4		0,0-2,1 (0,3)		
COC	40 µL de BSTFA (100°C, 20 min)	---	GC/MS-EI	1,0	30	24	NR	[19]			
BE			(HP 5898 A)	1,0			17		NR		
EME			(MSD HP 5971 A)	1,0			3		NR		
COC	50 µL PFPA+ 25 µL PFPOH (80°C, 30 min)	50 µL acetato de etilo	GC/MS-EI	NR	615	12	NR	[45]			
BE			(MSD HP 5971)							(públicos)	
COC	(Antes da extração) 200 µL PA, 20µL trietilamina, 200 µL n-propanol (60°C, 30 min.)	20 µL isopropanol	GC/MS-CI	0,05	16	16	40a)	[311]			
BE			(NR)				40a)		37a)	0,0-12,2 (2,4)b)	
			(Ion Trap)						20a)	0,0-1,9 (0,39)b)	
										0,0-14,4 (2,4)c)	
							0,0-5,4 (0,74)c)				
COC	100 µL PFPA+ 75 µL PFPOH (80°C, 30 min)	Método A, D e E: 100 µL acetato de etilo Método B e C: 30 µL acetato de etilo	NR	NR	53	F	P	[81]			
BE			(HP 5890 Series II)				A		19	22	---
			(MSD HP5971 A)				B		22	23	---
							C		25	25	
							D		13	18	
		E	13	14							
COC	30 µL de MTBSTFA (80°C, 20 min)	40 µL butironitrilo	GC/MS-EI	NR	37	15	NR	[182]			
BE			(HP 5890)				8		NR		
COCE			(MSD HP5971 A)				0		---		
COC	20 µL acetoneitrilo + 20 µL BSTFA /TMCS 1% (30 min, a 60°C)	---	GC/MS-EI	NR	19	2	0,7-6,5	[177]			
BE			(HP 5890 II)				0				
COC	50µL HFBA+35µL HFIP (80°C, 1 h)	50 µL acetato de etilo	GC/MS-EI	NR	NR	NR	NR	[300]			
BE			(HP 5890 series II)								
EME			(MSD HP 5989)								
COCE											
COC	40 µL de BSTFA+TMCS (99:1, v/v) (100°C, 20 min)	---	GC/MS-EI	0,22	200	173	Análise qualitativa	[328]			
BE			(HP 5890 series II)	0,26							
EME			(MSD HP 5971)	0,10							
COC	50 µL MSTFA (75°C, 15 min)	---	GC/MS-EI	NR	214	26	0,18-15,40 (NR)	[218]			
BE			(HP 6890)				14		≤0,1-2,5 (NR)		
EME			(MSD HP 5973)				3		≤0,1-0,37 (NR)		
COC	10 µL HFIP+ 50 µL TFA (aquecendo durante 30 min)	50 µL acetato de etilo	GC/MS-EI	NR	49	31	0,29-226 (21,96)	[315]			
BE			(HP 6890)				32		0,04-63 (7,39)		
			(MSD HP 5973)								
COC	100 µL piridina+ 100 µL PA d) (60°C, 30 min)	50 µL acetato de etilo	GC/MS-EI (HP 5890)	0,15	3	2	11- 246 (128,5)	[93]			
			(MSD HP 5988)								
COC	100 µL piridina+ 100 µL PA d) (60°C, 30 min)	50 µL acetato de etilo	GC/MS-EI (HP 5890)	0,15	Em dois anos	101	0,2- 370 (35,5)	[323]			
			(MSD HP 5988)								
COC	50 µL de BSTFA + TMCS 1% (80°C, 30 min)	---	GC/MS-EI	0,5	45	39	3,3- 170 (NR)	[268]			
BE			(HP 6890 A)	1,0			NR				
EME			(MSD HP 5973)	1,0			NR				
COC	50 µL MSTFA (75°C, 15 min)	---	GC/MS-EI	NR	697	162	NR	[346]			
BE			(HP 6890)				NR		NR		
			(MSD HP 5972 A)								
COC	100µL PFPA+ 70 µL PFPOH (60°C, 30 min)	40 µL acetato de etilo	GC/MS-EI	0,07	1	1	0,30	[371]			
BE			(HP6890 series II)	0,15			1		0,28		
COCE			(MSD HP 5973)	0,10			1		0,02		
COC				NR			11		NR		
		50 µL acetato de etilo	GC/MS-EI (HP 6890)								
			(MSD HP5973)								
COC	25 µL MTBSTFA (90°C, 1 h)	---	GC/MS-EI	0,12	20	4	---	[248]			
BE			(HP6890)	0,09			6		---		
EME			(MSD HP 5973)	0,07			0		---		
COCE				0,16			0		---		
COC	50 µL MSTFA (75°C, 15 min)	---	GC/MS-EI	NR	---	---	---	[217]			
BE			(HP 6890)								
			(MSD HP 5973)								
COC	---	100 µL acetato de etilo	GC/MS (Varian 3400 CX)	0,20	36	4	1,42- 3,29 (2,32)	[308]			
			(MSD Saturn)								
COC	(Antes da extração) 100 µL de acetoneitrilo, 2 µL de piridina, 2 µL de butilcloroformato, em ultrassons, 6 min à temperatura ambiente	---	GC/MS-EI	0,1	1	1	47,4	[336]			
BE			(HP6890)	0,5			1		4,1		
COCE			(MSD HP 5972)	0,1			1		1,3		
COC	50 µL de MSTFA/TMCS (100:2) (60°C, 30 min)	NR	GC/MS-EI	0,05	40	19	0,7 - >100 (NR)	[281]			
BE			(HP 5890 II)	0,2			15		0,7 - >100 (NR)		
			(MSD HP5970)								
COC	----	25 µL acetato de etilo	GC/MS-EI (HP 5890)	NR	1 e)	8	0,3- 11,5 (6,46)	[84]			
			(MSD HP5989 B)								

a) total de segmentos; b) segmentos de cabelo de indivíduos adultos; c) segmentos de cabelo de crianças; d) derivatização aplicada a para os outros compostos em análise, que não a COC; e) caso constituído por 10 amostras; F- Amostra reduzida a pequenos fragmentos; P- Amostra pulverizada

Pelo exposto, a detecção de metabolitos da COC no cabelo, não é tarefa fácil [158]. As situações referidas na literatura e que passaremos a apresentar são disso uma prova.

A droga mãe é a mais frequente nos resultados positivos para COC e metabolitos (Tabela 3.25). Kintz *et al.* [158] constataram que só é possível a detecção de BE e/ou COCE quando a concentração de COC excede um determinado valor (2 ng/mg) [158]. Desta forma, podemos ter amostras positivas para COC e negativas para BE e COCE. Esta situação pode também ocorrer em relação ao EME e à NORCOC [63, 359], ou seja, amostras positivas para COC, podem não o ser para aqueles metabolitos.

A ausência de BE em amostras positivas para COC pode explicar-se pela baixa afinidade do metabolito para o cabelo, quando comparada com a da droga mãe [177]. Por outro lado, Sporkert *et al.* [315] e Paterson *et al.* [248] obtiveram amostras positivas para BE e negativas para COC, o que contraria os resultados de Kintz *et al.* [158].

Amostras positivas para COCE podem não sê-lo para NORCE [63] no entanto, o NORCE só é detectado em amostras positivas para COCE [63].

Em termos de percentagem em que são detectados os compostos Moore [219] obteve a relação COC>BE>COCE>NORCOC>EME>NORCE. Wang *et al.* [359] obtiveram uma relação diferente COC=BE>COCE>EME>AEME>NORCOC.

Relativamente aos resultados quantitativos, apesar da COC possuir uma meia-vida muito curta, a menor polaridade (mais hidrofóbica) relativamente à BE [87] e à EME [219] facilita a sua incorporação no cabelo pelo que a concentração da droga mãe é, regra geral, superior à dos respectivos metabolitos [25, 63, 75, 158, 166, 177, 219, 281, 359] (Tabela 3.25). Normalmente a concentração determinada é superior a 10 ng/mg [75, 359] podendo atingir valores superiores a 300 ng/mg (Tabela 3.25). Cone *et al.* [63] obtiveram a relação COC>BE>EME>COCE>NORCOC>NORCE em termos de concentração média determinada [63]. Bourland *et al.* [25] obtiveram a relação COC>COCE>BE>NORCOC>EME, tendo por base as concentrações médias determinadas em 30 amostras analisadas por GC/MS/MS-PCI. De igual forma, Spiehler [314] verificou que os principais analitos encontrados no cabelo após consumo de COC são a própria droga mãe e o COCE [314]. Wang *et al.* [359] e Cone *et al.* [63] ao analisarem segmentos distais confirmaram este resultado apenas para a COC.

Contrariando esta tendência são referidos na literatura casos designadas “não usuais” [346] em que a concentração da BE excede a determinada para a COC [58, 85, 220, 300, 317, 346, 347]. Estes resultados são obtidos em amostras constituídas por segmentos distais [346,

347], ou provenientes de cabelo de peruanos idosos que mascavam folhas de coca [317] ou, ainda, em amostras de cabelo de cadáveres [58]. Um procedimento de descontaminação desadequado ou a degradação da COC a BE depois da deposição no cabelo [58], situação referida por vários autores [62, 63, 317, 358], poderão estar na origem destes resultados. Verifica-se, nas análises segmentares, que a razão de concentração metabolito polar/droga mãe aumenta com a distância à raiz [346].

Há, igualmente, referência a situações, correspondentes a alguns segmentos distais de indivíduos consumidores de drogas, em que a concentração de EME excede a de BE, e a de NORCOC é superior à de BE [63], à de EME [359] e à de COCE [359].

Moller *et al.* [211] obtiveram uma razão COC/BE de 3, à excepção de um caso que foi de 0,7. Na tentativa de explicar esta ocorrência foram propostas várias hipóteses: menor consumo de COC por parte do indivíduo, variações interindividuais (metabolismo diferente) genéticas, tratamento dado ao cabelo, doença, diferentes hábitos de vida e exposição a diferentes condições ambientais [211].

As diferentes razões, COC/BE, obtidas pelos diversos investigadores podem, também, dever-se ao diferente grau de pureza do produto que é consumido e à via de administração utilizada, a qual condiciona a biodisponibilidade [211].

A incorporação da COC no cabelo (e por consequência a concentração determinada) é afectada pelo teor de melanina. A elevada afinidade por estes pigmentos [121, 219] fazem com que este seja o local primordial de fixação [106, 131, 133]. Após a digestão da matriz, a COC não permanece ligada à melanina existente no *pellet* pelo que a centrifugação, após a digestão, não altera substancialmente a concentração de COC nas amostras do cabelo [116].

A incorporação da BE no cabelo também depende da cor verificando-se, quanto à concentração determinada, a relação: negro>castanho>loiro [219]. Hubbard *et al.* [121] evidenciaram que a COC, EME e NORCOC são preferencialmente incorporadas em pêlos pigmentados.

Em estudos realizados *in vitro*, Joseph *et al.* [133] constataram uma maior incorporação da COC em cabelo pertencente a machos africanos, comparativamente a machos ou fêmeas caucasianas. A menor incorporação verificou-se em cabelo de fêmeas loiras caucasianas. Os resultados evidenciaram que diferenças naturais (raça) ou artificiais (tratamento de descoloração), relativamente ao conteúdo em melanina, constituem o principal factor condicionante da extensão de incorporação da droga mãe no cabelo exposto à droga [133].

Henderson *et al.* [106, 109] no sentido de avaliarem a raça como factor condicionante da incorporação de drogas em cabelo, compararam a concentração de COC, administrada de forma intranasal, determinada em cabelo de caucasianos com a de não caucasianos. Apesar de não poderem generalizar, devido ao número reduzido de amostras analisadas, determinaram uma maior concentração em cabelo de não caucasianos [106, 109]. Estudos de descoloração de amostras realizados *in vitro* demonstraram que ocorre uma diminuição na concentração determinada de COC, BE e COCE, sendo o decréscimo de 34,2%, 60,4% e 38,4%, respectivamente, devido à alteração dos compostos [371].

A incorporação (velocidade e quantidade) de COC e metabolitos no cabelo é dependente não só da dose e forma de consumo mas também das características individuais, desempenhando o suor e as secreções sebáceas um papel importante [108].

As amostras onde se determina maior concentração de COC nem sempre correspondem às de maior concentração de BE [281], EME, NORCOC e COCE [63].

Nakahara *et al.* [232] verificaram, ao administrarem a ratinhos apenas BE e EME, que a concentração destes compostos no pêlo era muito baixa, comparativamente à observada quando ocorria consumo de COC. Desta forma, sugerem que a BE seja principalmente um produto hidrolítico da COC já incorporada no cabelo. Durante o processo de preparação da amostra há conversão de COC a BE [63]. Desta forma, parte da BE determinada nas amostras pode ser um artefacto resultante do tratamento e extracção da amostra, dado que a COC sofre hidrólise espontânea em BE nas soluções aquosas alcalinas [314].

Quanto às diferenças de concentração entre a COC e os seus metabolitos verificam-se diferentes proporções. Felli *et al.* [84] obtiveram entre COC:BE:EME a proporção de 20:2:1. Kintz *et al.* [158] determinaram uma concentração de COC superior 3-6 vezes à BE e ao COCE e, 10-50 vezes relativamente à EME [158]. Cone *et al.* [63] obtiveram uma razão média COC/BE de 10,5.

Atendendo à multiplicidade de factores que condicionam a incorporação e a estabilidade das drogas no cabelo parecem aceitáveis as diferenças de resultados qualitativos e quantitativos.

Não é fácil estimar com precisão, através da determinação da posição nos diversos segmentos de cabelo, a altura do consumo da COC devido às diferenças individuais na taxa de crescimento e às diferentes fases do ciclo de crescimento em que se pode encontrar o cabelo [108].

Pépin *et al.* [252] investigaram a frequência de consumo de COC, tendo proposto níveis de positividade. Assim, as concentrações >20 ng/mg e <4 ng/mg de COC correspondem, respectivamente, a uma elevada e baixa frequência de consumo.

Não é evidente a relação entre a concentração de COC determinada e a severidade de consumo [256]. A relação quantitativa entre dose consumida e a concentração determinada no cabelo não é a mesma em todos os indivíduos devido a variações no ciclo de crescimento, tratamento cosmético e práticas higiénicas, incerteza das doses consumidas e desconhecimento da pureza dos compostos [84]. Não há nenhuma via de administração que condicione uma melhor relação entre a quantidade de droga consumida e a concentração determinada no cabelo [109].

É frequente o consumo concomitante de opiáceos e COC [19, 177, 281, 308, 359]. Regra geral, as concentrações de COC, determinadas nas amostras de cabelo, excedem as de 6-MAM [19, 218, 315, 359] e HERO [62]. As explicações possíveis são o maior consumo de COC relativamente ao de HERO ou a existência de maior número de locais para a ligação da COC no cabelo ou, ainda, admitindo o mesmo número de locais de fixação no cabelo, a COC ter maior afinidade para eles do que a HERO [62].

De acordo com os trabalhos que se referem à análise de COC e metabolitos por GC/MS-EI, os LOD's obtidos são variáveis em função do composto e, sobretudo, com o procedimento de isolamento, extracção e o agente de derivatização empregue [301] (Tabela 3.24).

O menor LOD obtido para a COC e para a BE, analisadas por GC/MS-EI, foi de 0,03 ng/mg. No processo de derivatização da BE foi usada a mistura HFBA/HFPOH [135]. Para o EME, o menor LOD foi de 0,07 ng/mg [248] tendo ocorrido derivatização por MTBSTFA. Para o COCE e/ou a NORCOC vários autores obtiveram LOD igual a 0,1 ng/mg [63, 166, 359, 371].

Em alguns trabalhos, verifica-se que o LOD obtido para o EME é superior ao da BE e/ou ao da COC [101, 158, 166, 211, 268].

Na literatura encontram-se referidos LOD's para COC, BE, EME, COCE e NORCOC, analisados por GC/MS/MS-PCI e por LC/MS/MS-APCI de 0,01 ng/mg [25] e 8,5 pg/mg [297], respectivamente.

Na tabela 3.26 apresentam-se as colunas usadas na técnica separativa, a relação m/z dos fragmentos iónicos formados no espectrómetro de massa usados na identificação e/ou quantificação de COC e metabolitos.

As colunas usadas na separação cromatográfica gasosa da COC e metabolitos são, principalmente, colunas capilares apolares (Tabela 3.26) [301]

Tabela 3.26 – Colunas e iões usados na identificação e quantificação de COC e metabolitos.

Compostos	Coluna	Iões (m/z) ^a	Ref
COC BE EME NORCOC COCE	Capilar HP-1 (12 m X 0,20 mm i.d. X 0,33 µm de película de revestimento)	COC ($m/z=82, 182, 303$) BE ($m/z=82, 240, 361$) EME ($m/z=82, 96, 271$) NORCOC ($m/z=140, 240$) COCE ($m/z=82, 196$)	[63]
COC BE EME	Capilar J&W DB-5 (15 m X 0,25 mm i.d. X 0,1 µm de película de revestimento)	COC ($m/z=304$) BE ($m/z=404$) EME ($m/z=314$)	[101]
COC BE EME	Capilar HP- Ultra 2 (12 m X 0,20 mm i.d. X 0,33 µm de película de revestimento)	COC ($m/z=182, 303$) BE ($m/z=300, 421$) EME ($m/z=314, 348$)	[211]
COC BE EME NORCOC COCE	Capilar HP-1 (12 m X 0,20 mm i.d. X 0,33 µm de película de revestimento)	COC ($m/z=82, 182, 303$) BE ($m/z=82, 240, 361$) EME ($m/z=82, 96, 271$) NORCOC ($m/z=140, 240, 346$) COCE ($m/z=82, 196, 317$)	[359]
COC BE EME COCE	Capilar HP-5 (30 m X 0,25 mm i.d.)	COC ($m/z=82, 182, 303$) BE ($m/z=82, 240, 361$) EME ($m/z=82, 96, 271$) COCE ($m/z=82, 196, 317$)	[158]
COC BE EME COCE	Capilar BP-5 (12 m X 0,22 mm i.d.)	COC ($m/z=182, 303$) BE ($m/z=240, 361$) EME ($m/z=82, 96$) COCE ($m/z=82, 196$)	[166]
COC BE EME	Capilar HP-5 MS (12 m X 0,32 mm i.d.)	COC ($m/z=82, 182, 303$) BE ($m/z=82, 240, 361$) EME ($m/z=82, 96, 271$)	[19]
COC BE	Capilar HP-5 MS (12 m X 0,32 mm i.d.)	COC ($m/z=182, 198, 303$) BE ($m/z=300, 316, 421$)	[45]
COC BE	Capilar DB-5MS (30 m X 0,25 mm i.d.)	COC ($m/z=304$)	[311]
COC BE COCE	Capilar DB-5MS (25 m X 0,20 mm i.d. X 0,33 µm de película de revestimento)	COC ($m/z=182, 198, 303$) BE ($m/z=282, 346, 403$) COCE ($m/z=196, 212, 317$)	[182]
COC BE	Capilar HP-5MS (30 m X 0,25 mm i.d. X 0,25 µm de película de revestimento)	COC ($m/z=182, 303, 346$) BE ($m/z=240, 272, 361$)	[177]
COC BE EME COCE	Capilar HP-1 (25 m X 0,20 mm i.d. X 0,11 µm de película de revestimento)	COC ($m/z=182, 303$) BE ($m/z=318, 439$) EME ($m/z=182, 395$) COCE ($m/z=82, 196$)	[300]
COC BE EME	Capilar HP-5MS (12 m X 0,20 mm i.d. X 0,33 µm de película de revestimento)	COC ($m/z=82, 182, 303$) BE ($m/z=82, 240, 361$) EME ($m/z=82, 96, 271$)	[328]
COC BE EME	Capilar HP- Ultra 2 (12 m X 0,20 mm i.d. X 0,33 µm de película de revestimento)	COC ($m/z=82, 182, 272, 303$) BE ($m/z=82, 240, 346, 361$)	[218]
COC BE	Capilar Supelcowax 10 (30 m X 0,25 mm i.d. X 0,25 µm de película de revestimento)	COC ($m/z=182, 303$) BE ($m/z=318, 439$)	[315]
COC	Capilar DB-5MS (15 m X 0,25 mm i.d. X 0,25 µm de película de revestimento)	COC ($m/z=182, 303$)	[93, 323]
COC BE EME	Capilar HP-5MS (12 m X 0,2 mm i.d. X 0,33 µm de película de revestimento)	COC ($m/z=182, 198, 303$) BE ($m/z=82, 240, 361$) EME ($m/z=96, 22, 271$)	[268]
COC BE	Capilar HP-5MS (12 m X 0,2 mm i.d. X 0,33 µm de película de revestimento)	COC ($m/z=82, 182, 272, 303$) BE ($m/z=82, 240, 346, 361$)	[346]
COC BE COCE	Capilar HP-Ultra 2 (12 m X 0,2 mm X 0,33 µm de película de revestimento)	COC ($m/z=182, 303$) BE ($m/z=300, 421$) COCE ($m/z=196, 371$)	[371]
COC	Capilar HP-5MS (30 m X 0,25 mm i.d. X 0,25 µm de película de revestimento)	COC ($m/z=82, 182, 303$)	[276]

COC		COC ($m/\xi=182, 198, 272, 303$)	
BE	Capilar HP-5MS	BE ($m/\xi=282, 346, 403$)	[248]
EME	(30 m X 0,25 mm i.d. X 0,25 μ m de película de revestimento)	EME ($m/\xi=182, 256, 298, 313$)	
COCE		COCE ($m/\xi=82, 196, 272, 317$)	
COC	Capilar HP- Ultra 2	COC ($m/\xi=182$)	[217]
BE	(12 m X 0,20 mm i.d. X 0,33 μ m de película de revestimento)	BE ($m/\xi=82$)	
COC	RTX-5	COC ($m/\xi=82, 182, 303$)	[308]
	(30 m X 0,25 mm i.d.)		
COC	Capilar HP-5MS	COC ($m/\xi=182, 272, 303$)	
BE	(30 m X 0,25 mm i.d X 0,25 μ m de película de revestimento)	BE ($m/\xi=224, 272, 345$)	[336]
COCE		COCE ($m/\xi=196, 272, 317$)	
COC	Capilar HP-5MS	COC ($m/\xi=82, 182, 272, 303$)	
BE	(25 m X 0,20 mm i.d X 0,33 μ m de película de revestimento)	BE ($m/\xi=82, 240, 361$)	[281]
COC	Capilar HP-5MS	COC ($m/\xi=182, 201, 303$)	[84]
	(12 m X 0,20 mm i.d X 0,33 μ m de película de revestimento)		

a) Os iões sublinhados foram os usados na quantificação

Limites de positividade

Na interpretação de resultados tem de se ter em consideração que a COC e a BE podem ser detectados no cabelo de indivíduos que nunca tenham consumido COC [219], uma vez que é possível ocorrer absorção dérmica de COC [61]. Os limites de positividade propostos têm de minimizar a possível exposição ambiental à COC. Kintz *et al.* [158, 167] e Pépin *et al.* [252] propuseram o valor de 1 ng/mg para a COC, podendo descer para 0,5 ng/mg se suportado por outra evidência. Harkey *et al.* [101] consideraram 0,1 ng/mg o limite de positividade para a COC e 0,5 ng/mg para o EME. Montagna *et al.* [217] estabeleceram como limite de positividade para a COC e BE a concentração 0,5 ng/mg. Segura *et al.* [300] adoptaram o valor sugerido pela *SoHT* (0,5 ng/mg) no primeiro teste de proficiência que organizaram. Montagna *et al.* [218] utilizaram na determinação simultânea de COC e metabolitos o valor de 0,1 ng/mg. Lewis *et al.* [182] referem o valor de 0,05 μ g/mg como limite de positividade para COC, BE e COCE. Uhl [347] considera uma amostra positiva para COC, quando a concentração deste composto for >0,5 ng/mg e for detectada BE e eventualmente COCE.

Resultante de um consenso entre um grupo de trabalho em análise de drogas em cabelo [346] foi decidido que haveria consumo de COC desde que uma das duas situações se verificasse:

- pesquisa da droga mãe com um limite de positividade de 1,0 ng/mg e da BE com um limite de positividade de 0,1 ng/mg e uma razão BE/COC de 0,1. Não deverá ser referido um resultado positivo para COC se a BE não for determinada com uma concentração $\geq 0,1$ ng/mg;
- pesquisa da droga mãe com um limite de positividade de 0,5 ng/mg e do COCE, ou da NORCOC, com um limite de positividade de 0,1 ng/mg. Não

deverá ser referido um resultado positivo para COC se não for determinado COCE ou NORCOC com uma concentração $\geq 0,1$ ng/mg.

3.5 - ANFETAMINA

3.5.1 - Introdução

A AP (β -fenilisopropilamina) é o protótipo de uma classe de compostos vulgarmente designados por anfetaminas ou estimulantes tipo-anfetamina [337]. Estes compostos incluem um conjunto de substâncias estruturalmente relacionadas que têm alguns efeitos farmacológicos e tóxicos comuns com a AP (ex. MA, fenfluramina, fentermina, análogos sintéticos da anfetamina e derivados metilenedioxi)[337].

As anfetaminas possuem actividade estimulante central e periférica sendo consideradas a principal classe de estimulantes do SNC [172, 175, 269]. Na figura 3.11 representa-se a estrutura química das moléculas consideradas mais clássicas [92, 337], a AP e a MA.

A tolerância e a dependência física relativamente aos efeitos centrais (características associadas ao consumo destes compostos) desenvolvem-se rapidamente, pelo que a utilização, durante longos períodos de tempo, pode conduzir a um aumento crescente da dose, atingindo-se vários gramas por dia [37, 112].

Além dos fins terapêuticos (ex. como anoréticos, antiparkinsonicos, vasodilatadores), as anfetaminas podem ser usadas, de maneira ilícita, por toxicómanos, desportistas, estudantes [92, 175]...

Nos últimos anos tem-se verificado um aumento no uso ilícito destas drogas. Consequentemente, a sua análise tem tido um interesse crescente em várias áreas, nomeadamente na toxicologia [269]. Tradicionalmente têm sido usados fluidos corporais, sobretudo urina. No entanto, nesta matriz pode não ser detectável o abuso de estimulantes, caso o consumo tenha ocorrido uma semana antes da colheita da amostra [172, 236]. Além disso, a existência de vários percursores metabólicos da MA e AP, cujo consumo é legal, possuem no sangue e na urina uma janela de detecção curta, dificultando a interpretação dos

resultados positivos para a AP e/ou MA [228]. A análise ao cabelo representa, assim, um complemento ou uma alternativa aos dados obtidos com o uso das matrizes mais tradicionais.

Dada a impossibilidade de inclusão de todas as anfetaminas no trabalho seleccionou-se a AP dado que o consumo das anfetaminas mais clássicas continua com elevada prevalência, apesar de na actualidade se verificar um aumento no consumo de derivados metilenedioxi (MDA, MDMA, MDE, MBDB) e metoxi (ex. DOM, DOB, PMA, 4-MTA) entre os indivíduos mais jovens [243, 285, 337]. Além disso, a AP e a MA (moléculas emblemáticas das anfetaminas) continuam sendo alvo de preocupação como drogas de abuso e agentes dopantes, no desporto [112, 175]. A AP é, também, um dos metabolitos da MA, pelo que a sua determinação poderá ser reflexo de um consumo de MA. Outra razão na selecção da AP foi o facto de associado ao seu consumo ou ao de MA se registarem inúmeros crimes, consequência das alterações de personalidade que produzem [172]. Os restantes compostos, não menos importantes, deverão ser incluídos em investigações posteriores no âmbito da análise de drogas em cabelo tornando possível, nomeadamente, a detecção das drogas mãe usadas com fins terapêuticos, precursoras da AP e MA o que constituirá uma ferramenta útil na interpretação de resultados.

3.5.2 - História

A AP foi sintetizada pela primeira vez em 1887 [112]. O uso indevido de estimulantes tipo-anfetamina durante a II Guerra Mundial alargou-se ao Japão [230] e a outros países (Europa, Canadá, EUA) no período pós guerra. Em 1970 foram incluídos na tabela II (drogas com indicações médicas mas com elevado potencial de abuso) e III das substâncias sob controlo.

Desde meados dos anos 80, um novo grupo de anfetaminas sintéticas- os derivados metilenedioxi- ganharam popularidade como drogas recreativa [275, 337].

3.5.3 - Efeitos

As anfetaminas são produtos estimulantes do SNC, manifestando-se com diminuição da sensação de fadiga, manutenção de estado de vigília, elevação do humor, aumento da

iniciativa e da autoconfiança, melhoria da capacidade de concentração, aumento da actividade motora e da loquacidade [37, 112]. Apesar dos efeitos serem semelhantes aos da COC, a fase estimulante da AP é de 10 a 12 h enquanto que a da cocaína dura 20 a 30 min [37].

Acções farmacológicas e reacções adversas

As acções farmacológicas são diversas destacando-se: vasoconstricção periférica - aumento da pressão arterial; midríase e aumento da pressão intraocular; diminuição do peristaltismo da musculatura gastrointestinal; contracção do esfíncter da bexiga, dificultando assim, a micção; aumento do metabolismo; efeitos excitatórios no SNC; efeito psíquico de bem estar, confiança; aumento da actividade psíquica; euforia; diminuição da sensação de fadiga; acção analéptica; diminuição do apetite. Em situações de doses mais elevadas podemos ter condutas estereotipadas (movimentos repetitivos), estimulação motora, alterações da percepção e outros quadros psicóticos [112].

3.5.4 - Indicações clínicas

A AP foi introduzida na terapêutica na década de 30 principalmente como descongestionante nasal [112].

Pode ser usada no tratamento da obesidade, narcolepsia e tratamento de transtornos hipercinéticos com déficit de atenção [112, 228].

3.5.5 - Situação Portuguesa

O consumo de anfetaminas encontra-se repartido por vários grupos [37]:

- consumidores com indicação clínica;
- consumidores ocasionais, normalmente jovens, que as usam de uma forma descontínua, em grupo, para se manterem despertos em manifestações festivas;
- consumidores ocasionais ligados a actividades profissionais de grande exigência física e/ou intelectual;

- consumidores pertencentes a grupos anti-sociais, normalmente ligados ao crime;
- consumidores de doses continuadas devido a toxicod dependência.

3.5.6 - Farmacocinética

Administração, metabolismo e eliminação

A AP pode ser consumida via oral, rectal e intravenosa [92]. Após consumo oral (via mais frequente) a concentração máxima no plasma atinge-se 4 h após a única toma. A AP começa a aparecer na urina 20 min após a administração [92]. A AP e os compostos relacionados são bases fracas, com baixo peso molecular, baixa ligação a proteínas e elevado a moderado volume de distribuição [337]. Estas propriedades conferem fácil difusão através das membranas celulares e camadas lipídicas para os tecidos ou para matrizes biológicas com pH mais ácido do que o do plasma (pH 7,4).

Não obstante actualmente se encontrarem no mercado mais de 14 precursores metabólicos da AP ou da MA [92, 175, 228, 337] (ex. famprofazona, benzofetamina, fenferonex, selegilina, dimetilanfetamina – precursores da MA; etilamfetamina, anfetaminilo, clobenzorex, fencamina, fenetilina, femproporex, mefenorex, mesocarbe, prenilamina – precursores da AP), apresentamos apenas as principais vias metabólicas da AP e MA (Figura 3.11), no organismo humano, por serem os compostos do âmbito do trabalho.

Uma parte da AP é desaminada em fenilacetona (0,9% da AP é excretada sob esta forma) sendo, de seguida, oxidada em ácido benzoico (4% da AP é excretada sob a forma de benzoilglucurónico) o qual se conjuga com a glicina para formar ácido hipúrico (16-27% da AP é excretada sob esta forma). Outra parte é β -hidroxilada para formar norefedrina (2% da AP é excretada sob esta forma). Uma pequena parte é hidroxilada no anel de benzeno na posição 4 para formar 4-hidroxianfetamina, um metabolito activo que é seguidamente conjugado (2-4% da AP é excretada sob esta forma) [92, 228].

A MA sofre *N*-desmetilação formando-se AP a qual, por oxidação, origina norefedrina [92, 228]. As três formas são psicoactivas [140] e prosseguem a metabolização por hidroxilação, desaminação e/ou conjugação a metabolitos não activos.

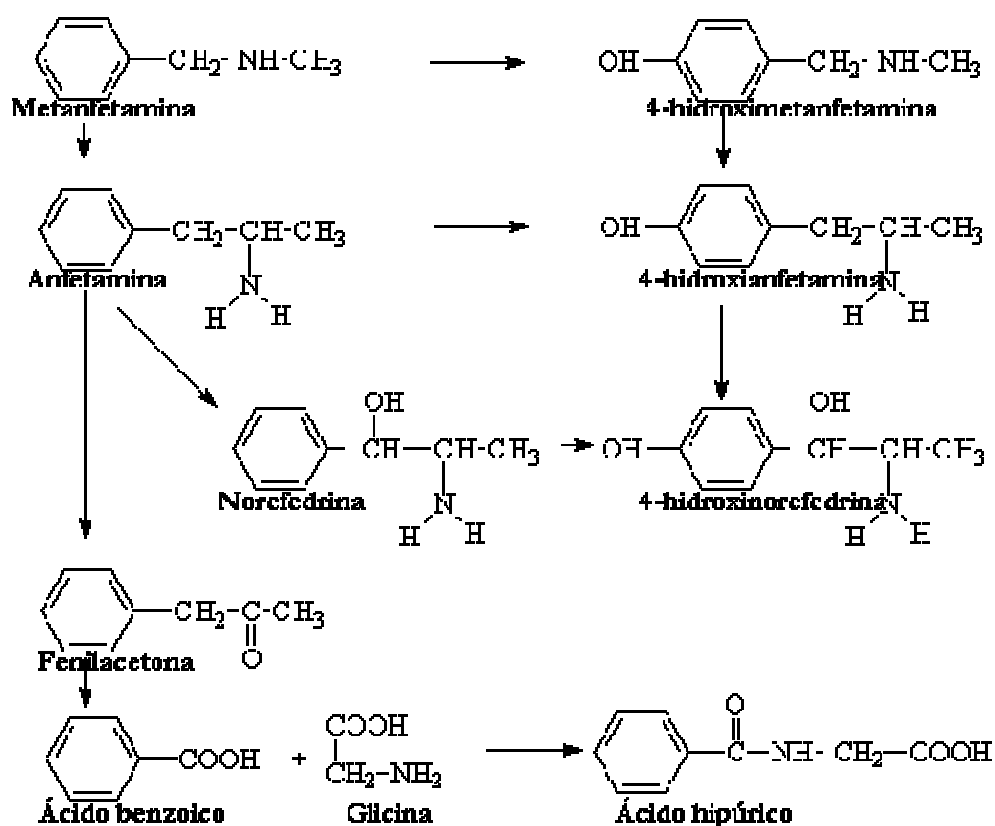


Figura 3.11 - Principais vias metabólicas da AP e MA (adaptado de [92, 228]).

Se o pH da urina for normal 20- 30% da AP é excretada inalterada; a pH 5 é eliminada cerca de 75% inalterada [92, 355].

4-7% da MA é excretada sob a forma de AP [140] e 43% sob a forma de MA inalterada, nas condições normais de pH da urina [92]. Este valor pode aumentar para 76%, em meio ácido, ou diminuir para 2% em meio alcalino e a AP para 0,2% [92].

A AP excretada na urina corresponde a 15% da dose de MA, de casos não fatais [140].

3.5.7 - Anfetamina na toxicologia

Os efeitos tóxicos são a exacerbação dos efeitos farmacológicos e resultam do consumo em quantidades excessivas de AP. É difícil determinar a dose de AP que produz os efeitos tóxicos uma vez que o consumo crónico desenvolve tolerância. Desta forma, 400 a

500 mg podem não ser mortais para alguns indivíduos e serem-no para outros [112]. As doses usuais de AP variam entre 10 a 30 mg. O valor da dose letal mínimo proposto para a AP é 200 mg [92], no entanto, indivíduos tolerantes podem consumir 2000 mg/ dia sem efeitos aparentes.

Na literatura encontram-se casos de mortes imputadas ao consumo de AP e suicídios sob influência de AP [92].

Têm sido referidas mortes por overdose após consumo de MA [243].

3.5.8 - Métodos de pesquisa e dosagem em cabelo

As janelas de detecção das matrizes mais usadas na identificação de consumidores de AP (sangue e urina) são limitadas (Tabela 3.27). Além disso, numa amostra de urina não é possível diferenciar o consumo ilícito de AP e MA do consumo de medicamentos derivados desses compostos [175].

Tabela 3.27 - Tempos de detecção típicos da AP no sangue e urina (adaptado de [355]).

Matriz	Dose/ Via de administração	Analito	Cut-off (ng/mL)	Janela de detecção
Sangue, soro ou plasma	6 mg/ oral	AP	4	12-46 h
Urina	5 mg/ oral	AP	> 1000	1-3 dias

É possível obter-se maior número de amostras de cabelo positivas para a AP do que amostras de sangue pertencentes ao mesmo indivíduo [177]. Esta constatação reforça a importância das análises usando várias matrizes por forma a que se possam complementar os dados.

O cabelo constitui uma matriz alternativa muito importante. A seguir à COC e opiáceos, as anfetaminas ocupam o terceiro lugar de prevalência nos estudos de análise ao cabelo [230].

A AP é incorporada na estrutura de cabelo permanecendo nas fracções com, e sem, melanina [230]. São necessários 3 a 5 dias [57], desde o último consumo, para que seja detectável no cabelo.

Em 1983 Ishiyama identificou pela primeira vez, no cabelo a MA seguindo-se Suzuki que, em 1984, publicou um método para detectar AP num único cabelo [288].

A maioria da literatura relacionada com a detecção de anfetaminas, no cabelo, é proveniente de investigadores japoneses [162, 172, 208, 237] sendo AP e a MA os alvos principais nas análises [172, 177, 179, 208, 230, 237].

No caso de consumo de anfetaminas, ao contrário do que acontece com a *Cannabis*, COC e HERO, a *SoHT* não recomenda a análise de qualquer metabolito, em particular, no cabelo [365].

Não é frequente o desenvolvimento de metodologias que permitam a análise simultânea de várias classes de compostos. Alguns autores referem a detecção de vários compostos no entanto, aplicam métodos de hidrólise e/ou extracção e/ou derivatização diferentes dos usados para as anfetaminas [177, 275, 308].

Em exames de triagem são usados principalmente os imunoensaios [230], nomeadamente RIA [30], ELISA [327] e FPIA [182]. Como os resultados obtidos carecem de confirmação esta é efectuada, regra geral, por GC/MS [327] havendo também referência ao uso da LC/MS/MS-APCI [236].

A GC/NPD, quando comparada com a GC/MS na análise de AP, mostra idêntica sensibilidade mas menor especificidade [257]. A GC/MS/MS revela extrema selectividade e elevada sensibilidade [344].

A cromatografia líquida, nomeadamente a HPLC [230, 237] é menos frequente sendo usada com detecção por fluorescência [237] ou mesmo por MS [369].

McAvoy *et al.* [198] compararam os dados da análise de anfetaminas, incluindo a AP e a MA, usando quatro técnicas de análise SFC-UV, HPLC-PDA, GC-FID e CZE-PDA concluindo que nenhuma pode ser usada isoladamente na identificação definitiva de anfetaminas devendo usar-se, pelo menos, a combinação de duas delas.

Koide *et al.* [172] usaram a análise por GC/NPD para determinar a AP e MA em cabelo, após HS-SPME.

Wu *et al.* [369] desenvolveram uma método para de análise de AP, MA e outras anfetaminas em amostras de cabelo usando a técnica de HPLC/MS-ES, após extracção por SPME. Acoplando a microextracção com a HPLC é mais fácil a análise de compostos, sobretudo os menos voláteis e/ou os termicamente instáveis [369].

Além do cabelo há referência ao uso de pêlos axilares e púbicos [100], na análise de AP.

3.5.8.1- Metodologia analítica por GC/MS

Para uma revisão bibliográfica mais aprofundada seleccionaram-se sobretudo trabalhos que se referem à detecção e/ou quantificação de AP no cabelo, usando como técnica de análise a GC/MS.

Tamanho da amostra e descontaminação

As metodologias de descontaminação das amostras contendo AP são diversificadas. De acordo com artigo de revisão [230] e a tabela 3.27 têm sido usados para o efeito: HCl 0,01M, metanol, etanol, surfactante, água, acetona e diclorometano, sendo este solvente o mais frequente.

O tamanho da amostra é variável (Tabela 3.28) (0,5-200 mg) podendo ser efectuada [140, 230, 235], ou não [100, 172, 177], uma análise segmentar.

A redução da amostra a pequenos fragmentos constituiu o procedimento mais usual.

Tabela 3.28 - Tamanho, procedimento de descontaminação e preparação das amostras de cabelo para análise de AP.

Tamanho da amostra (mg)	Descontaminação	Preparação da amostra	Ref
30	5 mL CH ₂ Cl ₂ ; 5 mL de H ₂ O morna; 5 mL CH ₂ Cl ₂	NR	[159]
20-50	20 mL de acetona em ultrassons; secar	Pequenos fragmentos	[285]
30-100	2X (5 mL CH ₂ Cl ₂)	Pulverizada	[153]
50-200	5 mL H ₂ O; 5 mL acetona; 5 mL éter de petróleo	Pequenos fragmentos	[275]
0,5-1	Um grupo sem lavagem 3X (2 mL SDS 0,1%; 2 mL de H ₂ O destilada)	Raiz (5 mm)	[235]
50	H ₂ O; 3 mL MeOH; 3 mL acetona	NR	[182]
5-20	3X [MeOH: H ₂ O (3:1)]	Pequenos fragmentos	[177]
20	2 mL MeOH	Segmentos de 2-5 cm	[327]
NR	5 mL CH ₂ Cl ₂ ; 5 mL de H ₂ O morna; 5 mL CH ₂ Cl ₂	Segmentos de 1 cm	[293]
50	2X (5 mL <i>Tween 80</i> 0,1%); 2X (1 mL H ₂ O destilada); 1 mL acetona	Pequenos fragmentos	[268]
Variável (35-285)	5 mL H ₂ O; 5 mL acetona; 5 mL hexano	Pequenos fragmentos	[276]
5-15	5 mL SDS; 3X (5 mL de H ₂ O destilada)	Pequenos fragmentos	[140]
NR (5 segmentos de 1 cm)	NR	Segmentos de 1 cm	[185]
Variável (9,7- 99,1)	5 mL CH ₂ Cl ₂	Pequenos fragmentos	[248]
NR	5 mL CH ₂ Cl ₂ , 2 min	Pulverizada	[303]
10	H ₂ O desionizada; petróleo <i>light</i> ; CH ₂ Cl ₂	Pequenos fragmentos	[229]
50	2X CH ₂ Cl ₂ ;	Pequenos fragmentos	[308]
10	SDS 0,1%; H ₂ O desionizada em ultrassons	NR	[243]
10	3X 3 mL CH ₂ Cl ₂ em ultrassons)	Pequenos fragmentos	[265]
10	3X H ₂ O destilada; 3X MeOH	Pequenos fragmentos	[100]

Libertação e Extração

É bastante difícil a extração de aminas livres a partir das matrizes, não sendo possível obter-se uma boa separação, devido à elevada polaridade e volatilidade que apresentam [243]. Embora não seja prática frequente, tem sido utilizado material silanizado no processo de extração da AP [265].

Têm sido referidos vários processos de libertação/extração da AP do cabelo [230], (Tabela 3.29) os quais se podem agrupar em quatro tipos principais: tratamento com substâncias alcalinas [159, 162, 168, 285], ácidas [140], enzimáticas e com solventes [153].

Na hidrólise alcalina é sobretudo empregue NaOH variando o valor da molaridade, a temperatura e a duração da incubação (Tabela 3.29 e [230]). Na extração da solução aquosa encontra-se referidas a LLE, a SPE, a HS-SPME e, a HS-SPDE (Tabela 3.29). As grandes vantagens de emprego do modo HS é a protecção do revestimento que constitui a fase estacionária e a exclusão dos efeitos que a matriz pode produzir [229]. A aplicação da HS-SPDE permite obter uma boa sensibilidade, precisão e linearidade, no entanto, a recuperação da AP é baixa (12,9%). Após destruição da matriz do cabelo por incubação em NaOH e neutralização da solução, Kintz *et al.* [162, 168] utilizam uma mistura de clorofórmio/ isopropanol/*n*-heptano (50:17:33, *v/v*) para extração simultânea de AP, barbitúricos, antidepressivos, BZD, nicotina, opiáceos, BE e metabolitos de canabinóides.

No tratamento ácido utiliza-se principalmente o HCl (Tabela 3.29) seguindo-se uma LLE e/ ou SPE. No tratamento enzimático têm sido usadas a pronase ou a mistura β -glucuronidase/arylsulfatase (75 μ L) durante 2 h a 40°C seguido de SPE com colunas *Chromabond* C₁₈, usando na eluição acetona/diclorometano (3:1) [230] ou uma LLE com acetato de etilo [153].

O metanol é o solvente mais utilizado na libertação/extração da AP.

Kintz *et al.* [153] compararam quatro metodologias de extração de AP do cabelo (Tabela 3.29). Os resultados não permitiram concluir qual a mais apropriada. A menor concentração de AP foi determinada aplicando a extração metanólica e, a maior, aplicando a hidrólise alcalina, na libertação. A extração em MeOH por ultrassons, além de ser um método simples, permite a análise simultânea de AP, MDA, MDMA, MDE [275], HERO, 6-MAM, MOR, di-hidrocodeína, COD, metadona, COC, Δ^9 -THC [142], usando PA como agente de derivatização [142, 275].

A hidrólise alcalina é mais apropriada do que a digestão enzimática ou a ácida [159]. A pH alcalino as anfetaminas não estão ionizadas [175] sendo o pH de extracção óptimo naquelas condições.

Pujadas *et al.* [265] compararam a eficiência de quatro métodos de extracção (Tabela 3.28) de anfetaminas, avaliando a sua recuperação a partir de cabelo fortificado ou pertencente a consumidores desses compostos. O tratamento ácido seguido de SPE seria o mais eficiente (maior recuperação de anfetaminas), caso não fosse necessário introduzir mais uma etapa (LLE) para tornar os extractos mais limpos e sem problemas de interferências cromatográficas nas amostras analisadas por GC/MS. Estes autores, de acordo com os resultados obtidos por Kintz *et al.* [153], verificaram que digestão alcalina usando NaOH 1N seria a melhor alternativa, caso não tivessem testado o uso de sulfureto de sódio (Na₂S) 1M. Ambas as bases solubilizam o cabelo das amostras mas a digestão com Na₂S seguida de LLE e SPE com colunas *Bond Elut Certify* mostrou ser o melhor compromisso entre recuperação, limpeza dos extractos e ausência de interferências cromatográficas.

Tabela 3.29 - Padrões internos, métodos de libertação e extracção de AP em cabelo.

Padrão interno (I.S.)	Libertação	Extracção	Ref
AP-d ₅	1 mL NaOH, 10 min a 95°C	(LLE) Agitação 10 min em 10 mL de acetato de etilo; centrifugação 10 min a 2000 g; purificação da fase orgânica com 5 mL de HCl 0,2M; reextracção da fase aquosa com 2 mL de NaOH e 5 mL de aceto de etilo; remoção da fase orgânica após agitação (10 min) e centrifugação (10 min a 2000 g); adição de 20 µL de MeOH/HCl (99:1, v/v) para as drogas não volatizarem.	[159, 293]
AP-d ₅	1 mL NaOH, 30 min a 80°C Neutralizar com 1 mL de HCl 1N; ajustar para pH 7,6 com 1 mL de tampão fosfato 0,1M	(SPE) (Colunas C18 <i>Bond Elut LCR</i>) Acondicionamento: 6 mL MeOH, 3 mL H ₂ O. Verter a amostra. Lavagem: 3 mL H ₂ O, 3 mL NaHCO ₃ , 3 mL H ₂ O. Secagem: 30 min fazendo atravessar ar na coluna. Eluição: 2 mL diclorometano/acetona (1:3).	[285]
AP-d ₅	Hidrólise alcalina- 1 mL NaOH 1M, 10 min a 95°C Digestão enzimática- 2 mL tampão Sóerensen pH 7,6 e 75 µL de β-glucuronidase/arylsulfatase, 2 h a 40°C Hidrólise ácida- 1 mL HCl 0,1M, 18 h a 50°C; alcalinizar com NaOH.	(LLE) 10 mL de acetato de etilo; adicionar à fase orgânica 50 µL isopropanol/HCl (99:1, v/v)	[153]
	MeOH em ultrassons- 5 mL MeOH, 4 h a 45°C	Decantar e evaporar.	
Metaqualona	4 mL MeOH em ultrassons, 5 h a 50°C	Transferir o extrato metanólico para tubo silanizado e acidificar a mistura com 1 gota de ácido acético.	[275]
AP-d ₄	2 mL MeOH/ HCl 5N (20:1), 14 h sob agitação no vórtex, à temperatura ambiente		[235]

AP-d ₅	3 mL HCl 0,1N, a 55°C, toda a noite. Decantar o ácido; adicionar 200 µL EtOH, 2 mL H ₂ O desionizada e 200 µL NaOH 12M; incubar a 80°C, 30 min; Adicionar 1 mL de ácido acético centrifugar e adicionar ao sobrenadante 9 mL H ₂ O desionizada.	(SPE) (Colunas <i>Isolute HClX</i>) Acondicionamento: 3mL MeOH, 1 mL de H ₂ O, 1 mL ácido acético 1,93M. Verter amostra. Lavagem: 3 mL de água, 1 mL HCl 0,1M, acetoneitrilo/H ₂ O desionizada (20:80, v/v). Eluição para teste de triagem: Drogas ácidas - 3 mL hexano/acetato de etilo (50:50, v/v); lavar a coluna com 3 mL MeOH e secar; eluição das drogas básicas - 3 mL diclorometano/isopropanol/hidróxido de amónia (78:20:2, v/v); adicionar 1 gota de H ₂ SO ₄ 0,1% e evaporar os extractos à secura. Eluição para teste de confirmação: a mesma do teste de triagem suprimindo o passo referente às drogas ácidas.	[182]
AP-d ₅	1 mL NaOH 2M, 20 min a 80°C	2 mL isoocano durante 5 min; centrifugação a 5000 rpm; transferir a fase do isoocano para outro tubo e proceder à sua evaporação até à secura.	[177]
AP-d ₅	2 mL MeOH, 2 h a 70-75°C	(SPE) (Colunas <i>Clean Screen</i> [®]) (NR o procedimento)	[327]
AP-d ₅	Digestão toda a noite, a 37°C, com 1 mL de solução de pronase (1 mg/mL) e DTT (6 mg/mL) em tampão Tris (pH 7,1); Filtrar a solução de digestão.	(LLE) Acetato de etilo/diclorometano (4:1); Adicionar à fracção orgânica 50 µL da mistura MeOH/HCl (99:1)	[268]
AP-d ₁₁	4 mL MeOH em ultrassons a 50°C, 4 h; evaporar, reconstituir o resíduo em 7 mL de tampão fosfato 0,1M, pH 6,0, contendo 400 mg de albumina de soro de bovino	(SPE) (Colunas <i>Bakerbond C₁₈</i>) Acondicionamento: 2 mL MeOH, 2 mL tampão fosfato (0,1M, pH 6,0). Lavagem: 1 mL de ácido acético 0,1M, secar 10 min sob vácuo. Eluição: 3 mL diclorometano/isopropanol/amónia (40:10:1, v/v/v).	[276]
NR	5 mL de HCl 0,1N, 48 h a 55°C	Ajustar para pH 11,0; (LLE) Cloreto de butilo	[140]
MA-d ₅	0,2 mL de NaOH 1M, a 70°C	Adição de 1,2 mL do tampão fosfato pH 6,0; adicionar 10 µL de HFB-Cl para derivatizar. (HS-SPME) - Adsorção à fibra de PDMS, durante 20 min, a 60°C.	[185]
MDA-d ₅	2 mL MeOH, a 45°C, 18 h		[248]
NR	1,0 mL NaOH 1M a 95°C, 10 min;	NR	[303]
AP-d ₅	1 mL de NaOH 10M, agitar 5 min a 50°C	(HS- SPDE) Agulha 5 cm revestida internamente com 50 µm de PDMS contendo 10% de carbono activado, movendo-se para cima e para baixo a 200 µL/s, 50 vezes; Colocar a seringa num segundo vial contendo 25 µL de MBTFA com os mesmos movimentos 6 vezes.	[229]
NR	1 mL NaOH 1M, agitar 20 min a 70°C	(LLE) 2X (1 mL de acetato de etilo); evaporação à secura na presença de 100µL da mistura MeOH: HCl (99:1, v/v).	[308]
MA-d ₅	0,5 mL de NaOH 1M, 20 min a 75°C	(SPE) Verter a mistura na coluna <i>Extrelut</i> , esperar 20 min e verter 1 mL de acetato de etilo contendo alquilclorofornato (10 µL/mL de acetato de etilo), esperar 10 min para a derivatização; eluição com 3 mL de acetato de etilo	[243]
AP-d ₅	Digestão alcalina a) 1 mL Na ₂ S 1M b) ou 1 mL NaOH 1M b)	(LLE) seguida de (SPE) (<i>Bond Elut Certify</i>) Extrair da fracção aquosa 2X (3 mL de metil tert-butil éter, 30 min); centrifugar a 3500 rpm, 5 min; separar a fracção orgânica e evaporar à secura sob corrente de N ₂ , a 23°C; reconstituir em tampão de fosfato de sódio 0,1M (pH 6); extrair em colunas <i>Bond Elut Certify</i> ; Adicionar aos eluatos 20 µL MBTFA para prevenir perdas de anfetaminas; evaporar à secura sob corrente de N ₂ , a 40°C, e derivatizar.	[265]
AP-d ₅	Digestão ácida a) 1 mL MeOH/ HCl 5N (20:1, v/v), 1 h em ultrassons b) ou 1 mL MeOH/ ácido trifluoroacético (9:1, v/v), 1 h em ultrassons b)	(LLE) seguida de (SPE) (<i>Bond Elut Certify</i>) Deixar repousar a solução durante toda a noite; separar a fracção orgânica; evaporar à secura sob corrente de N ₂ , a 23°C; reconstituir em tampão de fosfato de sódio 0,1 M (pH 6); extrair em colunas <i>Bond Elut Certify</i> ; Adicionar aos eluatos 20 µL MBTFA para prevenir perdas de anfetaminas; evaporar à secura sob corrente de N ₂ , a 40°C, e derivatizar.	[100]
AP-d ₅	Incubação em 1 mL de MeOH contendo HCl 1%, 20 h; evaporar a 45°C.		[100]

a) comparação dos dois métodos de extracção; b) foram usados tubos silanizados

Os passos de evaporação, após extracção e/ou derivatização podem originar perda de anfetaminas devido à sua elevada volatilidade. Como consequências teremos baixas recuperações de AP e coeficientes de variação elevados [175]. Desta forma, recomenda-se a

adição de HCl antes da etapa de evaporação formando-se hidrocloreto menos voláteis [175]. Este procedimento é causador de alguns problemas uma vez que vestígios de ácido no sistema GC podem impossibilitar a detecção de drogas básicas e, além disso, a evaporação de soluções aquosas de HCl são demoradas e exigem temperaturas elevadas, o que poderá incrementar a perda de anfetaminas. Sabendo que a situação ideal seria não usar o HCl, apresentam-se menos desvantajosas as soluções alcoólicas deste ácido (ex. metanólicas ou isopropanólicas) [153, 175]. Röhrich *et al.* [275] evitaram a perda de AP durante a evaporação do extracto metanólico acidificando a mistura com ácido acético.

É importante o conhecimento do padrão interno usado porque dele depende a exactidão do método [175]. Nos procedimentos MS, é mais apropriado usarem-se isótopos como padrões internos uma vez que eles possuem as mesmas propriedades analíticas do analito correspondente [175]. Os resultados de precisão e exactidão são melhores quando na análise de AP e MA se usam os respectivos deuterados análogos uma vez que são eliminados problemas originados por diferenças de solubilidade, ponto de ebulição (perdas por evaporação) e comportamento cromatográfico [257].

Análise

Derivatização e métodos de detecção

A análise de anfetaminas livres por GC ou GC/MS está associada a dificuldades de sensibilidade reprodutibilidade devido à interacção e adsorção com e na coluna do cromatógrafo [243]. Tal resulta numa pobre resolução dos picos, o que torna necessário a derivatização [175, 243, 369].

A alquilação, principalmente a acilação das aminas primárias têm sido as reacções de derivatização mais frequentemente propostas para a AP [257].

O TFA tem sido bastante utilizado como agente de derivatização da AP [230]. Mas, apesar da trifluoroacetilação ser usualmente empregue na derivatização de anfetaminas (Tabela 3.30), há alguns problemas associados nomeadamente a perda de derivados durante o processo e a instabilidade (hidrólise) dos mesmos [243, 275]. O ideal seria a injeção no sistema GC, por exemplo, de TFA puro, onde os derivados são estáveis, no entanto, este procedimento causaria estragos na coluna [275]. A instabilidade da AP pode diminuir-se na

solução de reconstituição, adicionando à mistura uma pequena percentagem do agente de derivatização (TFA) [275].

Os derivados por propionilação são mais estáveis do que os TFA, mas apresentam fragmentação menos específica quando submetidos às condições de EI [275]. Consequentemente, a derivatização com TFA é preferível relativamente à PA, desde que não se ultrapassem as 24 h após a preparação dos extractos para a análise por GC/MS [275].

Em alguns trabalhos tem sido utilizado o agente PFPA [230]. A mistura PFPA/ PFPOH não é vantajosa na derivatização de algumas anfetaminas (MDMA, MDE e MBDB) porque a reacção é incompleta para as amins secundárias [285] mas é completa para os restantes compostos [285].

A utilização de cloroformato de alquilo tem vindo a ser progressivamente difundida devido à rápida reacção com amins primárias e secundárias em amostras aquosas alcalinas [243]. Nishida *et al.* [243] utilizaram na derivatização cloroformato de alquilo efectuando a mesma durante o processo extractivo, na própria coluna de extracção. Os valores de recuperação, precisão e linearidade foram bons para a AP e MA, no entanto, a sensibilidade foi reduzida.

A utilização de reagentes de acilação perfluorados exigem condições anidras [185].

A técnica mais popular na análise de AP é sem dúvida a GC/MS [177, 185, 230, 369] sendo a mais apropriada, quando disponível [198]. Embora a EI seja mais frequente, encontra-se referido o uso da NCI (Tabela 3.30)

Limite de detecção e concentrações determinadas em amostras

Na tabela 3.30 apresentam-se os LOD's e as concentrações de AP determinadas em amostras de cabelo.

Tabela 3.30 – Técnicas de análise de AP em cabelo e resultados.

Derivatização	Reconstituição	Análise (cromatógrafo) (detector)	LOD (ng/mg)	Nº de casos analisados	Nº de casos positivos	Intervalo (média) (ng/mg)	Ref
50 µL PFPA+30 µL PFPOH (70°C, 30 min)	30 µL acetato de etilo	GC/MS-EI (HP 5890) (5989 B)	0,05	1	1	10,16 (cabelo) 2,65 (pêlos axilares) 6,35 (pêlos púbicos) 15,60 (pêlos da perna)	[159]
100 µL PFPA (80°C, 40 min)	50 µL acetato de etilo	GC/MS-EI (HP 5890) (HP 5971)	0,1	20	17	0,1-4,8	[285]

90 µL HFB/Acetato de etilo (2:1, v/v) (70°C, 20 min)	30 µL acetato de etilo	GC/MS-EI (HP 5890) (MSD HP 5989 B)	NR	1	1	7,29 (Hidrólise alcalina) 7,08 (Digestão enzimática) 6,79 (Hidrólise ácida) 6,11 (MeOH em ultrassons)	[153]
50 µL PSA (100°C, 1 h)	50 µL acetato de etilo com 1% de PSA	GC/MS-EI (HP 5890 II) (MSD HP 5972)	0,01	---	---	---	[275]
50 µL TFA (40°C, 0,5 h)	50 µL acetato de etilo com 1% de TFA			303	23	0,02-6,52 (0,84)	
100 µL PFPA (55°C, 20 min)	50 µL acetato de etilo	GC/MS-EI (HP 5890 II) (MSD HP 5971)	NR	4	4	1,2-9,0 (4,8)	[235]
10 µL de MBHFBA (80°C, 20 min)	50 µL butironitrilo	(GC/MS-EI) (HP 5890) (MSD HP5971 A)	NR	37	0	---	[182]
50 µL TFAA (60°C, 15 min)	40 µL de isooctano	GC/MS-EI (HP 5890 II) (MSD HP 5972 A)	NR	19	11	0,4-18,3 (3,8)	[177]
50µL MBTFA (90°C, 15 min)	50 µL acetato de etilo	GC/MS-EI (HP 5890) (MSD HP 5972)	NR	84	NR	NR	[327]
HFBA	30 µL acetato de etilo	GC/MS-EI (HP 5890) (5989 B)	NR	1	1	0-2,0	[293]
50 µL PFPA/ 20 µL acetato de etilo (70°C, 20 min)	50 µL acetato de etilo	GC/MS-EI (HP 6890 A) (MSD HP 5973)	2,5	10	0	0	[268]
PFPA	50 µL de acetato de etilo	GC/MS-EI (HP 6890) (MSD HP5973)	NR	11	8	NR	[276]
50 mL anidrido clorodifluoroacético + 100 mL de 0,1% de piridina em clorobutano (70°C, 20 min)	Acetato de etilo	GC/MS-EI GC/MS-NCI (HP 5890) (5989 A)	0,01	8	8	0,1-9,9	[140]
10µL HFB-Cl	--- Difusão da fibra no <i>liner</i> , a 250°C	GC/MS-EI (NR) (QP-5000)	0,1 ng por amostra	1	1	NR a)	[185]
25 µL MTBSTFA, (90°C, 1 h)	---	GC/MS-EI (HP6890) (MSD HP 5973)	0,02	20	3	---	[248]
NR	NR	GC/MS-EI (NR) (NR)	0,1	84	2	0,16-4,75	[303]
25 µL MBTFA	--- Desadsorção no injector do GC a 250°C	GC/MS-EI (Agilent 6890) (Agilent 5973 N)	0,04	---	---	---	[229]
50 µL acetato de etilo + 50 µL HFBA (60°C, 30 min)	100 µL acetato de etilo	GC/MS (Varian 3400 CX) (MSD Saturn)	0,20	36	0	0	[308]
Cloroformato de alquilo	200 µL acetato de etilo	GC/MS-EI (HP 5890) (5971 A)	0,25	1	1	2,4	[243]
50 µL MBTFA (70°C, 45 min)	NR	GC/MS-EI (HP 6890) (HP 5973)	0,08	40	1	0,74	[265]
TFAA (65°C, 15 min)	MeOH	GC/MS-EI (NR) (HP 5973)	0,125	14	7cabelo 5 pêlos axilares 3 pêlos púbicos	0,32- 1,65 (NR) 0,25- 3,44 (NR) 0,27- 3,35 (NR)	[100]

a) análise segmentar; HFB-Cl- butil cloreto de heptafluor

Em amostras de cabelo positivas para AP nem sempre se detecta MA [57, 177]. A AP é um metabolito da MA, mas a MA não é um metabolito da AP.

Os valores de MA determinados no cabelo são superiores aos de AP [30, 172, 293]. A concentração média da AP é cerca de 10% da concentração média determinada para a MA [207]. Estudos realizados por Nakahara *et al.* [233] evidenciaram que a estrutura das anfetaminas condiciona a taxa de incorporação no cabelo, sendo esta tanto maior quanto maior a cadeia de carbonos na posição R₂.

Para a AP esperam-se, no cabelo, concentrações variáveis entre 0,5 e 50,0 ng/mg [152]. Na tabela 3.30 o valor máximo referido é de 18,3 ng/mg [177]. Cairns *et al.* [30] determinaram um máximo de 4,5 ng/mg no cabelo de 40 voluntários em programa de reabilitação.

Kintz *et al.* [159] determinaram uma concentração de AP superior em pêlos dos membros inferiores comparativamente à determinada no cabelo, pêlos púbicos e axilares.

Han *et al.* [100] obtiveram concentrações superiores de MA em pêlos axilares e púbicos do que no cabelo de indivíduos suspeitos de consumir MA. A AP apresentou a mesma tendência, apesar da concentração ser inferior à de MA. Este resultado pode ser atribuído à diferente taxa de crescimento e à contaminação persistente dos pêlos púbicos, pela urina [100].

É natural que nas amostras onde a concentração determinada de MA seja baixa, não se detecte AP e que a concentração deste composto aumente com o aumento da concentração de MA nas amostras [30]. No entanto, o aumento não varia na mesma proporção relativa da concentração de MA [30]. Além disso, também se pode verificar que a uma maior concentração de MA no cabelo não corresponde uma maior concentração de AP [30, 140].

Parece existir uma boa correlação entre a razão AP/MA e o nível de dependência de MA, isto é quanto maiores os valores da razão maior o grau de dependência [230].

As amostras de cabelo correspondentes a consumidores ocasionais de AP podem não conter concentrações mesuráveis deste composto [275].

Como a AP e a MA podem ser detectadas como droga mãe ou metabolitos, após a ingestão de outras drogas [119, 140, 147, 175, 293], a *SoHT* [313] alerta os laboratórios para o facto da ingestão de drogas legais poderem produzir resultados positivos para a AP e a MA, pelo que se deverá ter o máximo cuidado na interpretação dos resultados positivos. A razão AP/MA tem sido usada tanto na análise ao cabelo como na análise à urina para confirmar o consumo de MA [57]. O valor desta razão no cabelo é comparável com o do plasma e, em média, é de 0,09 [57].

A *SoHT* [313] recomenda, para as anfetaminas, um LOQ $\leq 0,2$ ng/mg nos testes cromatográficos.

Normalmente, nos diversos trabalhos o valor do LOQ não é apresentado porque costuma corresponder ao menor valor da linearidade [175]. Sweeney *et al.* [327] referiram um LOQ de 50 pg/mg para a AP, determinada por GC/MS após SFE e derivatização com MBTFA. Pujadas *et al.* [265] referiram um LOQ de 0,25 ng/mg para a AP, determinada por GC/MS após digestão alcalina seguida de LLE e SFE usando como agente de derivatização o MBTFA.

Os LOD's conseguidos para a AP analisada por GC/MS-EI são frequentemente superiores a 0,04 ng/mg, no entanto alguns investigadores [140, 153] obtiveram um LOD de 0,01 ng/mg.

Relativamente às colunas usadas no processo separativo de AP, por GC, verifica-se a utilização de colunas capilares apolares (Tabela 3.31).

Tabela 3.31 - Colunas, iões usados na identificação e/ou quantificação da AP.

Coluna	Iões (m/z) ^{a)}	Ref
Capilar HP-5 MS (30 m X 0,5 mm i.d. X 0,25 μ m de película de revestimento)	118, 190	[159]
Capilar HP-1 (NR)	118, <u>190</u>	[285]
Capilar HP-5 MS (30 m X 0,25 mm i.d. X 0,25 μ m de película de revestimento)	<u>240</u>	[153]
Capilar HP-5 MS (30 m X 0,25 mm i.d. X 0,25 μ m de película de revestimento)	AP-PSA ($m/z=44, 91, 100, 118, 191$) AP-TFA ($m/z=135, 154, 162, 289$)	[275]
Capilar TC-1 (20 m X 0,25 mm i.d. X 0,25 μ m de película de revestimento)	<u>190</u>	[235]
Capilar DB-5 MS (25m X 0,20 mm i.d. X 0,33 μ m de película de revestimento)	91, 118, <u>240</u>	[182]
Capilar HP-5 MS (30 m X 0,25 mm i.d. X 0,25 μ m de película de revestimento)	91, <u>140</u> , 118	[177]
Capilar RTX-5 (30 m X 0,25 mm i.d. X 0,25 μ m de película de revestimento)	91, <u>140</u> , 118	[327]
Capilar HP-5 MS (30 m X 0,5 mm i.d. X 0,25 μ m de película de revestimento)	240	[293]
Capilar HP-5 MS (12 m X 0,2 mm i.d. X 0,33 μ m de película de revestimento)	91, 118, <u>190</u>	[268]
Capilar HP- 5 MS (30 m X 0,25 mm i.d. X 0,25 μ m de película de revestimento)	91, 118, 190, 281	[276]
Capilar J & W Scientific DB-5 MS (20 m X 0,18 mm i.d. X 0,18 μ m de película de revestimento)	NR	[140]
Capilar XTI [®] -5 (30 m X 0,25 mm i.d. X 0,5 μ m de película de revestimento)	<u>118</u> , 240	[185]
Capilar HP-5 MS (30 m X 0,25 mm i.d. X 0,25 μ m de película de revestimento)	65, 91, <u>118</u> , 140	[248]
Capilar J & W Scientific DB-5 MS (30 m X 0,25 mm i.d. X 0,25 μ m de película de revestimento)	91, 140, 118	[229]
Capilar RTX-5 (30 m X 0,25 mm i.d.)	91, <u>118</u> , 240,	[308]
Capilar HP-5 MS (30 m X 0,25 mm i.d. X 0,25 μ m de película de revestimento)	<u>130</u>	[243]
Capilar HP- Ultra 2 (12 m X 0,2 mm i.d. X 0,33 μ m de película de revestimento)	91, 140, <u>118</u> ,	[265]
Capilar (NR) (30 m X 0,25 mm i.d. X 0,25 μ m de película de revestimento)	91, 118, 140	[100]

a) Os iões sublinhados foram os usados na quantificação.

Limites de positividade

O valor de *cut-off* proposto para as anfetaminas, quando a análise ocorre por GC/MS é de 0,5 ng/mg [152, 365]. Kintz *et al.* [159] usaram este valor como o limite de positividade para a AP, MA, MDA e MDMA. Han *et al.* [100] consideraram uma amostra positiva adotando o limite de positividade de 0,5 ng/mg para a MA e a detecção obrigatória do metabolito AP. Lewis *et al.* [182] consideraram 0,05 µg/mg como limite de positividade para a AP.

Resultante de um consenso entre um grupo de trabalho em análise de drogas em cabelo [346], na confirmação de anfetaminas, recomenda-se a determinação da MA com um limite de positividade de 0,3 ng/mg ou da AP com um limite de positividade de 0,3 ng/mg. Não se deverá referir a presença da MA se a AP não estiver presente, pelo menos, com uma concentração de 0,05 ng/mg [346].

Salienta-se que um consumo de 0,33 g/semana de MA produz um resultado positivo, para MA, numa análise ao cabelo, adotando 0,5 ng/mg como limite de positividade [57].

3.6 - FENOTIAZINAS: CLORPROMAZINA

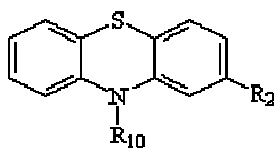
3.6.1 - Introdução

As drogas antidepressivas e antipsicóticas (novas designações de tranquilizantes minor e tranquilizantes major, respectivamente [105, 123]) situam-se entre os medicamentos mais utilizados e, à semelhança das drogas de abuso, são usualmente administradas por longos períodos de tempo.

As fenotiazinas têm interesse tanto na toxicologia forense como na clínica [201]. Possuem uma estrutura química composta por três anéis, encontrando-se os dois anéis de benzeno ligados por um átomo de azoto e de enxofre (Figura 3.12). As substituições na posição R₂ (Figura 3.32) condicionam a eficácia da fenotiazina, e a natureza do substituinte na posição R₁₀ influencia a actividade farmacológica (classificada em três grupos) [105].

A CPZ é uma droga básica [18] que pertence ao grupo neuroléptico das fenotiazinas [242], incluído nas drogas tranquilizantes major, as quais melhoram o humor e o comportamento de pacientes psicóticos sem excessiva sedação e sem causar adicção [105].

A CPZ possui uma cadeia alifática em R₁₀ e um átomo de cloro (Cl) em R₂ (Figura 3.12), o que faz com que tenha, em simultâneo, fraca potência e elevada eficiência clínica [105].



Composto	R ₁₀	R ₂
Clorpromazina	(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₂	Cl

Figura 3.12 - Estrutura química das fenotiazinas e, em particular, da CPZ (adaptado de [105]).

As dificuldades, no estudo da prevalência de intoxicações causadas por estes compostos, estão associadas à baixa toxicidade e às dificuldades analíticas inerentes aos neurolépticos: falta de testes imunoquímicos de triagem [196, 339] (a maioria das intoxicações por neurolépticos permanece “invisível” na toxicologia de urgência em meio hospitalar, onde se utiliza essencialmente este tipo de técnicas) e a necessidade do recurso a métodos analíticos mais complexos que associem separação cromatográfica e identificação espectral [339].

A CPZ foi incluída no nosso trabalho por ser a fenotiazina que mais frequentemente se detecta nas amostras de sangue e urina, analisadas no STF do INML da DC procurando, desta forma, distinguir consumo crónico de agudo e estabelecer o perfil de consumo individual, útil tanto na toxicologia forense como na clínica.

3.6.2 - História

Após a II Guerra Mundial, novos e inúmeros compostos surgiram. Os fármacos psicodpressores e antipsicóticos revolucionaram a prática da psiquiatria a partir da década de 50 [123]. A CPZ foi introduzida no mercado em 1952 [18].

3.6.3 – Efeitos

Adversos

Salientam-se a icterícia colestática, agranulocitose, íleo paralítico, síndrome maligno dos neurolépticos e morte súbita [123].

É considerada de relevância farmacológica a elevada afinidade dos neurolépticos, em particular da CPZ, para a melanina uma vez que este composto tem estado na base da indução de retinopatias [5, 192]. Além disso, em pacientes psiquiátricos aos quais são administrados, de forma crónica, fenotiazinas é frequente a degeneração de neurónios pigmentados [5].

3.6.4 - Indicações clínicas

Das possíveis aplicações terapêuticas, descritas na literatura, destacamos o tratamento: da esquizofrenia e de outras psicoses; de náuseas e vômitos graves; da ansiedade grave; de alterações do comportamento; da porfíria aguda intermitente; de soluços intratáveis; do tétano, como adjuvante [123]. Pode também ser usada, em períodos curtos (alguns dias a duas semanas), para controlo do comportamento numa síndrome psicótica grave, mas temporária, induzida por intoxicação com COC [298] ou anfetaminas [298, 319].

3.6.5 - Situação Portuguesa

Em Portugal a CPZ encontra-se disponível no mercado farmacêutico sob forma de comprimidos, solução oral e solução injectável (intramuscular e intravenosa), com o nome comercial de Largactil. De acordo com as estatísticas do medicamento 2002 [124], ocupa uma posição abaixo dos 100 medicamentos mais vendidos.

3.6.6 – Farmacocinética

Administração, metabolismo e eliminação

A CPZ pode ser administrada via oral ou injectada.

Os resultados obtidos por Boheme *et al.* [23], *in vitro*, demonstraram que a principal via metabólica é a da *N*-desmetilação- o metabolito nor-CPZ é o mais abundante- seguida da sulfoxidação- o metabolito CPZ-sulfóxido é o segundo mais abundante. No entanto, estudos anteriores realizados por Chetty *et al.* [42], medindo no plasma de pacientes esquizofrénicos crónicos os metabolitos da CPZ, após a ingestão da droga mãe, revelaram ser o *N*-óxido o principalmente formado. Shen *et al.* [306] propuseram para a CPZ, tendo por base os resultados de análises efectuadas em amostras de cabelo, duas vias metabólicas principais (Figura 3.13), as quais são concordantes com as apresentadas por Boheme *et al.* [23].

Não obstante as dúvidas existentes acerca do metabolismo da CPZ, parece claro que as principais transformações sofridas no organismo são oxidações.

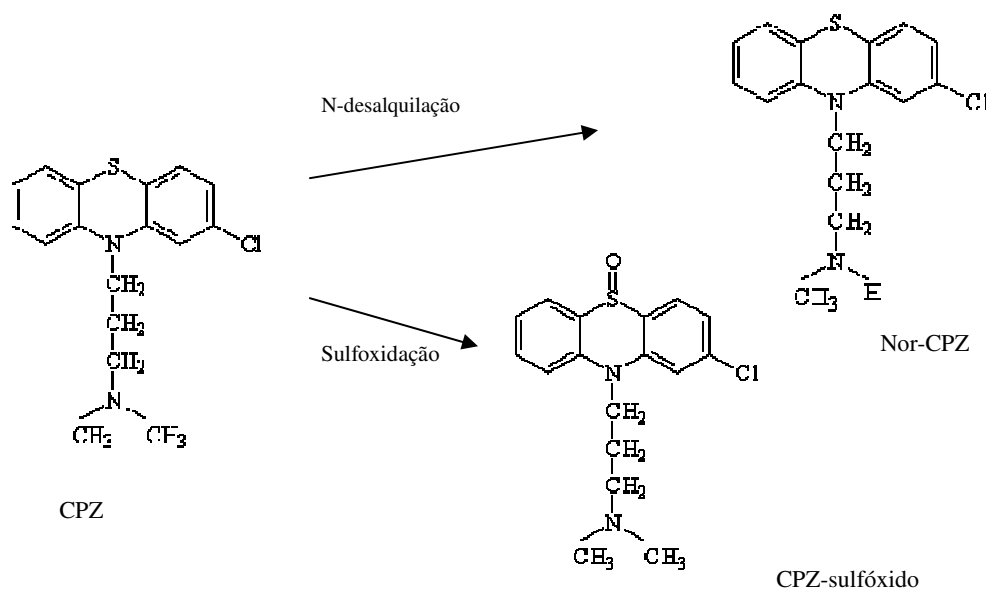


Figura 3.13 - Principais vias metabólicas da CPZ, no Homem, e metabolitos formados (adaptado de [23, 130, 306]).

Regra geral as concentrações de CPZ, determinadas no sangue, são inferiores às da urina e a presença de metabolitos é limitada [130], tal como acontece no cabelo [130, 306]. Existe uma correlação significativa entre a concentração de CPZ determinada no cabelo e a dose diária consumida [296, 306].

3.6.7 - Clorpromazina na toxicologia

Apesar das fenotiazinas serem substâncias psicotrópicas, as intoxicações mortais são raras [340]. A toxicidade intrínseca é inferior à dos outros psicotrópicos e, em caso de sobredosagem, as complicações cardiovasculares e a depressão respiratória são moderadas [340].

O uso nocivo de CPZ ocorre, sobretudo, num contexto de “querer experimentar” e “conhecer o efeito de substâncias”, uma vez que, com o consumo de antipsicóticos raramente se sente a produção de efeitos agradáveis [340].

Na literatura encontram-se referidas, em diversos casos de intoxicações mortais por neurolépticos, concentrações sanguíneas de CPZ variáveis entre 1 - 44 mg/L [340]. Para comparação com estas concentrações, resumem-se na tabela 3.32 as plasmáticas terapêuticas mencionadas em alguns trabalhos de investigação [340].

Tabela 3.32- Concentrações plasmáticas terapêuticas (adaptado de [340]).

Composto	Nº de indivíduos	Dose administrada (mg)	Concentração plasmática (µg/L)
CPZ	4	25 ^{a)}	1
	6	150 ^{a)}	10 - 26 (média =18)
	5	600 SS	20 - 80
	10	200-600 SS	2 - 122 (média=30)

a) uma única toma; SS-Tomas repetidas

3.6.8 - Métodos de pesquisa e dosagem em cabelo

A análise de fenotiazinas ocorre principalmente em fluidos biológicos, sendo o sangue e a urina as matrizes vulgarmente utilizadas para a detecção e quantificação da CPZ [105].

O cabelo, devido à possibilidade de acumulação e armazenamento de drogas, pode ser utilizado como indicador da exposição a longo termo fornecendo-nos informação útil acerca de medicamentos usados num determinado tratamento e o historial de uso. Nesta matriz podem ser detectados antidepressivos e antipsicóticos durante, pelo menos 16 meses após o consumo [306]. Os trabalhos destinados à detecção desses compostos no cabelo têm sido escassos [66, 67, 89, 201, 306, 338]. Apesar das várias publicações referentes à análise de fenotiazinas em cabelo humano [66, 67, 68, 87, 89, 130, 201, 291, 296, 305, 306, 326] a CPZ nem sempre foi o analito alvo, tendo sido pesquisada apenas em alguns casos [66, 67, 68, 130, 201, 291, 296, 305, 306]. Foram Sato *et al* [296] quem pela primeira vez detectaram CPZ em cabelo humano.

A análise das fenotiazinas em cabelo humano ocorre predominantemente usando a HPLC [66, 67, 87, 130, 201, 296, 362] com detecção por MS-MS [130, 201, 362], ou por UV [66, 67, 68], ou ECD [296] ou, ainda, por PDA [87]. Os sistemas HPLC-PDA são apropriados na identificação de neurolépticos por permitirem a sua detecção a concentrações infraterapêuticas [86]. A LC/MS-MS é considerada uma técnica com elevada selectividade e especificidade que permite quantificar compostos presentes nas amostras a baixas concentrações. Além disso, pode ser usada na análise de várias matrizes sem que sejam necessárias grandes variações na preparação das amostras [130].

É também utilizada, ainda que em menor escala, a análise por GC/MS e GC/NPD [66, 305, 306].

3.6.8.1 - Metodologia analítica por GC/MS

Carmona *et al.* [36] referem que a GC/MS é uma boa opção para análise de fenotiazinas pela sensibilidade e facilidade de identificação, sendo o método de eleição quando se pretende uma completa informação estrutural e/ou uma identificação inequívoca.

Tamanho da amostra e descontaminação

Na tabela 3.33 resumem-se, com base na revisão bibliográfica efectuada, os parâmetros: tamanho, procedimento de descontaminação e preparação dada à amostra de

cabelo, a qual foi usada para determinar a CPZ, antes das etapas de isolamento, extracção e análise.

Tabela 3.33 - Tamanho, procedimento de descontaminação e preparação das amostras de cabelo, na determinação da CPZ.

Tamanho da amostra (mg)	Descontaminação	Preparação da amostra	Ref
10-100	Mergulhar 5 min em H ₂ O destilada; Enxaguar 3X com MeOH	Inteira	[66]
10-20	SDS 0,1%; Enxaguar com H ₂ O desionizada e acetona	Cortada em fragmentos de 1 - 3 mm	[306]

O tamanho das amostras é variável entre 10-100 mg (Tabela 3.33).

Couper *et al.* [66] sugerem uma breve lavagem das amostras com metanol porque permite a remoção da contaminação superficial sem que haja perdas significativas da droga incorporada no cabelo. O SDS pode também ser empregue nesta etapa [306].

Não é usual a pulverização do cabelo porque no isolamento da CPZ utiliza-se preferencialmente uma hidrólise alcalina (Tabela 3.34), sofrendo o cabelo uma completa dissolução.

Libertação e Extracção

Na tabela 3.34 resumem-se os procedimentos de libertação e extracção aplicados às amostras de cabelo, usadas para determinar a CPZ, antes da sua análise.

Tabela 3.34 - Padrões internos, métodos de libertação e extracção da CPZ em cabelo.

Padrão interno (I.S.)	Libertação	Extracção	Ref
Ciclizina	1 mL NaOH 1M, durante 30 min a 70°C; Ajustar o pH para 9,5-10 com HCl	(LLE) Para análise qualitativa: Adicionar 1 mL de tampão Tris a 1 mL da solução resultante da hidrólise alcalina; extrair 20 min em 8 mL de cloreto de butilo; centrifugar 5 min a 2000 rpm; extrair a fracção solvente em 1 mL de HCl, 20 min. Evaporar a fracção solvente sob corrente de N ₂ .	[66]
SKF 525	a) { 1mL de NaOH 0,1M, durante 30min a 80°C; ajustar o pH para 9,5-10 com HCl 1mL de HCL 0,1M, durante 18 h a 45°C; ajustar o pH para 9,5-10 com NaOH 2 mL de MeOH; Ultrassons durante 1 h; incubar toda a noite à temperatura ambiente	(LLE) Éter	[306]
		(LLE) Éter	

a) Comparação entre os três métodos

A avaliação dos três métodos de extracção, em amostras positivas para CPZ, efectuada por Shen *et al.* [306] mostra-nos que a hidrólise alcalina é o mais eficiente. As razões apontadas pelos autores são a completa dissolução dos componentes do cabelo e a estabilidade da droga nas condições químicas usadas (hidrólise básica). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Couper *et al.* [66] os quais evidenciam que a hidrólise alcalina é significativamente mais efectiva, no que concerne à recuperação de drogas antidepressivas e antipsicóticas presentes em cabelo humano, comparativamente ao tratamento ácido, enzimático e metanólico.

No entanto, um pré-tratamento que mantenha a estrutura do cabelo relativamente intacta terá como vantagem a possibilidade de se obterem extractos mais limpos, com menos interferentes [166]. McClean *et al.* [201] referem que, apesar da completa dissolução do cabelo possibilitar uma maior libertação das drogas da matriz, a necessária centrifugação das amostras mais do que uma vez (se se usar a LLE), origina longos processos extractivos havendo consequentes perdas dos compostos, o que se reflecte nos valores de recuperação obtidos.

A LLE é o procedimento comum nos diversos trabalhos [66, 306] inclusive naqueles que utilizam outras técnicas de análise para a CPZ [67, 68, 130, 201, 296].

Relativamente aos solventes usados no processo extractivo, a recuperação da CPZ é superior utilizando éter, comparativamente à obtida quando se utiliza acetato de etilo ou clorofórmio [306]. Além de possibilitar maior recuperação, o uso deste solvente permite obter menor ruído nos cromatogramas [306]. A utilização de hexano, após uma digestão alcalina, permite igualmente obter uma recuperação satisfatória da CPZ (86%) [201].

Para se obterem quantificações mais precisas dos compostos torna-se necessária a adição de um padrão interno [130]. Não é frequente o uso de deuterados análogos da CPZ, mesmo quando se utilizam outras técnicas de análise do composto, no cabelo.

Análise

Derivatização e métodos de detecção

Na análise específica da CPZ, em cabelo, apenas foi possível obter dados de dois trabalhos aplicando a técnica GC/MS [66, 306] Uma das desvantagens do uso da GC/MS na análise de neurolépticos, como comprova o trabalho desenvolvido por Shen *et al.* [306], é a

obtenção de espectros pobres em que os iões mais abundantes apresentam uma $m/z = 58, 72$ ou 86 , pouco específicos, sendo muito poucos os iões com massas elevadas [86].

Na análise da CPZ não é necessário o recurso a processos de derivatização.

Limite de detecção e concentrações determinadas em amostras

A análise da tabela 3.35 não nos permite concluir acerca das concentrações de CPZ determinadas em cabelo uma vez que não é usual a análise quantitativa por GC/MS. Porém, os resultados quantitativos, obtidos por outras técnicas, revelam que a concentração de CPZ excede, regra geral, as determinadas para as BZD [306] e que a sua detecção ocorre, em maiores concentrações, em cabelo escuro [296]. O valor máximo de CPZ determinado em cabelo foi de $68,2 \text{ ng/mg}$ e reporta-se a um consumo em dose terapêutica [306].

Tabela 3.35 - Técnicas de análise da CPZ em cabelo e resultados.

Derivatização	Reconstituição	Análise (cromatógrafo) (detector)	LOD (ng/mg)	Nº de casos analisados	Nº de casos positivos	Intervalo (média) (ng/mg)	Ref
Sem derivatização	100 µL em MeOH	GC/MS* (HP 5890A) (HP 5970A)	NR	21	2	Só análise qualitativa	[66]
Sem derivatização	25 µL em MeOH	GC/MS-EI* (GC/MS-PCI* (Saturn 2000))	0,1-0,5 a)	35	16	Só análise qualitativa	[306]

a) Não especifica qual é o valor para a CPZ; * Equipamento usado na detecção.

Verifica-se que a deposição dos metabolitos no cabelo é menos efectiva comparativamente à da droga mãe, o que se deve provavelmente ao aumento da sua hidrofiliabilidade [306]. A sua detecção só é possível a partir de determinados valores de concentração da droga mãe (superior a 10 ng/mg) [306]. As concentrações determinadas para os metabolitos são apenas 5 - 10% da determinada para a droga mãe [42, 306].

Nos vários trabalhos desenvolvidos tem-se verificado a existência de uma relação directa entre a acumulação da CPZ no cabelo e a dose diária consumida [296, 306]. Conclui-se, desta forma, que o cabelo serve como indicador da exposição individual aos neurolépticos podendo fornecer uma retrospectiva do consumo. A análise ao cabelo pode constituir uma boa ferramenta para monitorizar neurolépticos [296] ou mesmo para conhecer a história de consumo de indivíduos já cadáveres [66].

Embora não seja especificado o LOD, para a CPZ, podemos concluir que é possível obter valores iguais ou inferiores a $0,5 \text{ ng/mg}$ (Tabela 3.35).

Na separação cromatográfica da CPZ são usadas colunas capilares apolares (Tabela 3.36).

Tabela 3.36 - Colunas e iões usados na identificação da CPZ.

Coluna	Iões <i>m/z</i>	Ref
Capilar Ultra 2 (25 m X 0,2 mm i.d. X 0,33 µm de película de revestimento)	<i>Full Scan</i> (<i>m/z</i> =29-245)	[66]
Capilar DB-5 (30 m X 0,25 mm i.d.)	(<i>m/z</i> =318, 58) ^{a)} (<i>m/z</i> =319, 58) ^{b)}	[309]

a) iões de confirmação usados apenas na detecção da CPZ mediante a comparação do tempo de retenção e da abundância relativa-modo de ionização electrónica; b) iões de confirmação usados apenas na detecção da CPZ mediante a comparação do tempo de retenção e da abundância relativa-modo de ionização química positiva.

Em nenhum trabalho foram referidos limites de positividade para a CPZ, na matriz cabelo.

Todos os trabalhos referentes à análise de CPZ, incluíram outros analitos alvo sendo todos eles drogas terapêuticas.

PARTE EXPERIMENTAL

CAPÍTULO 4

Método múltiplo de análise de drogas, terapêuticas e não terapêuticas e seus metabolitos em cabelo, por GC/MS e sua validação

4.1 - MATERIAL

4.1.1 - Amostras utilizadas nos ensaios

As amostras de cabelo isentas de drogas, usadas nos ensaios, foram colhidas em crianças e pessoal funcionário do STF do INML-DC, com idades compreendidas entre 1-37 anos, não consumidores de drogas, que voluntariamente participaram no trabalho. O diâmetro de cabelo obtido foi, mais ou menos, equivalente ao de um lápis variando a cor entre grisalha, preta, castanha e loira.

Estas amostras foram utilizadas no desenvolvimento da metodologia analítica e na avaliação da qualidade dos resultados obtidos (estudos de linearidade, determinação dos limites de detecção e quantificação, recuperação e precisão - validação do método, e em controlos negativos e controlos positivos (controlos referência padrão para o cabelo).

Na aplicação da metodologia analítica desenvolvida utilizaram-se amostras de cabelo pertencentes a indivíduos espanhóis que prestaram depoimento em tribunal por delitos cometidos relacionados com a droga. A cor do cabelo variou entre grisalha, preta, castanha, ruiva e loira. O comprimento dos segmentos foi igualmente variável (1-3 cm) permitindo, em alguns casos, a realização de uma análise segmentar.

4.1.2 - Químicos e soluções

4.1.2.1 - Padrões de drogas e metabolitos

Para preparação das soluções padrão das drogas e metabolitos em estudo usaram-se reagentes com o maior grau de pureza comercialmente disponível. O DIAZ, FLU, NORDIAZ, Δ^9 -THC, Δ^9 -THC-COOH, CBN, CBD, 6-MAM, MOR, NORMOR, COD, COC, BE, EME, COCE, NORCOC, AP e a CPZ, foram adquiridos à Lipomed (Arlesheim, Switzerland).

4.1.2.2 - Padrões internos (deuterados e outros)

Os compostos deuterados usados como padrões internos nas diferentes metodologias – 6-MAM-d₃, MOR-d₃, COD-d₃, COC-d₃, BE-d₃, EME-d₃, COCE-d₃ - foram fornecidos pela Lipomed (Arlesheim, Switzerland). Os restantes padrões internos utilizados - NAL, PRAZ, KP e ketamina - foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, USA).

Cada uma das soluções padrão de DIAZ, FLU, NORDIAZ, Δ^9 -THC-COOH, CBN, CBD, 6-MAM, MOR, NORMOR, COD, COC, BE, EME, COCE, NORCOC, AP, CPZ, PRAZ, KP, 6-MAM-d₃, MOR-d₃, COD-d₃, COC-d₃, BE-d₃, EME-d₃, COCE-d₃, NAL e ketamina foi preparada a concentrações de 100,0 µg/mL, 10,0 µg/mL, 100,0 ng/mL e 1,0 ng/mL (soluções de trabalho) em metanol, a partir de uma solução mais concentrada a 1,0 mg/mL. As soluções de Δ^9 -THC foram efectuadas do mesmo modo, à excepção da concentração mais elevada que se obteve por diluição a partir da solução fornecida pelo fabricante, à concentração de 10,0 mg/mL, em metanol. As soluções dos padrões foram armazenadas, fora do alcance da luz, à temperatura de 4°C.

4.1.2.3 – Reagentes e soluções usados nos processos de libertação das drogas e metabolitos do cabelo, extracção e reconstituição

A β -glucuronidase (*Type IX-A* de *E. coli*), o SDS e o DTT foram adquiridos à Sigma (St. Louis, MO, USA). A mistura β -glucuronidase (30 unidades/mL)/arylsulfatase (60 unidades/mL) de *Helix pomatia*, dihidrogenofosfato de potássio anidro e o hidrogenofosfato dipotássico anidro, o cloreto de sódio, acetato de sódio anidro, e o hidróxido de sódio foram obtidos na Merck (Darmstadt, Germany). Trishidroximetilaminometano (Trizma base), foi fornecido pela Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). O metanol, *n*-hexano, clorofórmio, diclorometano, ácido acético e ácido clorídrico foram comprados à Merck (Darmstadt, Germany); o acetato de etilo, o isopropanol, o *n*-heptano e a amónia a 25% foram fornecidos pela Riedel-de-Haën (Seelze, Germany).

A solução enzimática de β -glucuronidase 1,0 mg/mL foi preparada numa solução de NaCl a 2% por diluição, do respectivo sólido, em balão aferido.

A solução de acetato de sódio 10 mM (pH 5,2 unidades) foi obtida pela mistura, após medição de 10,5 mL de uma solução de ácido acético (0,0577 mL/100 mL de água desionizada), 39,5 mL de uma solução de acetato de sódio anidro (0,082 mL/100 mL de água desionizada) e 50,0 mL de água desionizada.

A solução de DTT 0,4M em acetato de sódio 10 mM foi obtida pela adição do respectivo sólido, após pesagem (6,10 g), ao volume da solução de acetato de sódio anteriormente referido.

A solução de tampão de digestão foi obtida pela mistura de 1 mL de tampão Tris 1M, 20 mL de SDS (10%) e 79 mL de água desionizada.

O tampão fosfato (20 mM, pH 7,6 unidades) foi preparado misturando-se na proporção 1:4 (*v/v*), uma solução de dihidrogenofosfato de potássio anidro (2,7218 g/L) com uma solução de hidrogenofosfato dipotássico anidro (3,4836 g/L). Cada uma das soluções aquosas envolvidas na mistura foi previamente preparada por pesagem dos compostos sólidos, seguidas de diluição a um volume preciso, com água desionizada.

O tampão Tris (pH 9,5) foi preparado adicionando uma solução Tris (hidroximetil) aminometano (121,0 g/L) (Tris reagente) a uma solução de HCl 32% e água desionizada. O pH da solução foi ajustado a 9,5 unidades com uma solução de NaOH 1N.

Todos os tampões foram armazenados a 4°C e protegidos da ação da luz por envolvimento do balão contentor em papel estanhado. Antes da sua utilização esperou-se sempre que atingissem a temperatura ambiente e o valor do pH foi confirmado.

As diversas soluções de extração foram preparadas por mistura, após medições, de clorofórmio/isopropanol/*n*-heptano, nas proporções 50:17:33 (*v/v*); *n*-hexano/acetato de etilo, nas proporções 90:10 (*v/v*); clorofórmio/isopropanol, nas proporções 93:3 (*v/v*); diclorometano/isopropanol/amónia 28%, nas proporções 78:20:2 (*v/v*). Esta solução foi sempre preparada minutos antes da sua utilização para evitar a ocorrência de alteração.

A água utilizada no trabalho, na preparação de todas as soluções aquosas, foi sempre desionizada.

4.1.2.4 - Reagentes derivatizantes

Os reagentes de derivatização – PFPA e o PFPOH - usados nas metodologias de GC/MS foram adquiridos à Aldrich (Steinheim, Germany).

4.1.2.5 - Reagentes para silanização

O TMCS, foi comprado à Merck (Darmstadt, Germany) e o tolueno foi adquirido à Panreac (Barcelona, Spain).

A solução a 10% em tolueno de TMCS, para silanização do material de vidro usado no processo de libertação e extracção das drogas da matriz cabelo, foi preparada pela mistura na proporção 90:10 (*v/v*) de tolueno e TMCS.

Todos os solventes orgânicos foram de qualidade HPLC e os reagentes utilizados de qualidade analítica ou semelhante, e não foram submetidos a qualquer purificação adicional.

4.1.3 - Gases

Como gás de arraste nos processos de cromatografia gasosa usou-se hélio alphagaz 2. O gás reagente usado no processo de ionização química negativa foi o metano N45. Para evaporação das amostras utilizou-se azoto alphagaz 1. Todos os gases foram fornecidos pela empresa Air Liquid (Algés, Portugal).

4.1.4 – Equipamento usado

4.1.4.1- Na preparação das soluções

Para preparação de todas as soluções foram usados balões volumétricos de classe A, com diferentes capacidades.

Para medições de volumes superiores a 1,00 mL usaram-se pipetas graduadas e volumétricas de vidro, classe A. Para volumes iguais ou inferiores utilizaram-se pipetas automáticas de volume regulável, da marca Gilson, modelos P₂₀, P₁₀₀ e P₁₀₀₀ (Villiers le Bel, France) e pipetas automáticas de volume fixo (25 µL e 50 µL), da marca Eppendorf, modelo Research.

Sempre que necessário também se utilizaram copos de vidro, da marca Schott, com diferentes capacidades, bem como, provetas graduadas de vidro *Normax* ISO 4788. Por vezes

houve necessidade de utilização de funis de vidro com várias dimensões facilitando a adição dos componentes das várias misturas aquosas efectuadas.

As pesagens dos padrões foram realizadas numa balança da marca Precisa, modelo 92SM-202 A, com sensibilidade de 0,01 mg. As restantes pesagens foram efectuadas numa balança da marca Mettler, modelo AE 200 com sensibilidade de 0,0001 g.

Para promover a dissolução de substâncias sólidas ou a mistura de soluções, usou-se um agitador vórtex modelo VF2 IKA®- Labortechnik, da Janke & Kunkel;

A medida do pH, quando da preparação das soluções de tampão, foi efectuada recorrendo a um potenciómetro da marca Hanna Instruments, modelo pH-Meter HI 8424, equipado com eléctrodo de vidro combinado da mesma marca, modelo HI 1331B.

4.1.4.2 - Na colheita, preparação e tratamento do cabelo

Na colheita e segmentação do cabelo, em fragmentos de 1 mm, foi usada uma tesoura de pontas finas. A segmentação do cabelo em porções de 1 cm efectuou-se com auxílio de um bisturi sobre uma régua de papel. As diversas porções de cabelo foram colocadas em tubos de ensaio graduados, com capacidade de 10 mL, com tampas de vidro, onde foram submetidas ao processo de descontaminação. Nesta etapa usou-se um agitador mecânico *P Selecta* com rotação de 360° e um concentrador de amostras da Techne, modelo Sample Concentrator Techne Dri-Block® DB.3D que permitiu a secagem do cabelo sob corrente de azoto, a uma temperatura de 40°C.

As pesagens das amostras de cabelo foram efectuadas numa balança da marca Mettler, modelo AE 200 com sensibilidade de 0,1 mg, utilizando tubos de ensaio graduados, com capacidade de 10 mL, com tampas de vidro, previamente silanizados.

4.1.4.3 – Na libertação e extracção das drogas

Libertação

Para se efectuar a hidrólise alcalina, utilizou-se uma placa eléctrica termostaticada com agitador magnético da marca *Heidolph*, modelo MR 2002.

Foi utilizada uma estufa de marca *memmert*, modelo 500, com temperatura regulável, no processo de libertação de drogas do cabelo por acção enzimática.

Extracção

A medida do pH das amostras, durante o processo extractivo, foi efectuada recorrendo a um potenciómetro da marca Hanna instruments, modelo pH-Meter HI 8424, equipado com eléctrodo de vidro combinado da mesma marca, modelo HI 1331 B.

Por extracção em fase sólida

Em função da metodologia aplicada utilizaram-se colunas *Bond Elut Certify*® da Varian e *Sep Pack C₁₈* da Waters. As etapas de activação dos cartuchos, passagem da amostra pelo cartucho, desorção dos analitos e eluição foram efectuadas num sistema de vácuo marca Vac Elut, modelo SPS 24.

Por extracção líquido-líquido

A agitação do tubo de extracção efectuou-se com agitador mecânico *P Selecta* com rotação de 360°; Na separação das fases (aquosa e orgânica) utilizou-se uma centrífuga modelo Labofuge 400 Function Line da Heraeus Instruments; Para remoção da fase orgânica foram empregues pipetas de Pasteur e pêra de sucção.

Por solvente orgânico

Utilizou-se um banho de ultrassons, termostatizado, da marca Bandelin, modelo Sonorex RK 100.

Independentemente do método extractivo aplicado, os extractos foram concentrados num concentrador de amostras da Techne, modelo Sample Concentrator Techne Dri-Block® DB.3D.

4.1.4.4 - Na derivatização das drogas

Para proceder à completa secagem dos extractos a derivatizar utilizou-se, posteriormente ao concentrador de amostras mencionado, um exsiccador com sílica. No processo de derivatização propriamente dito foi empregue um banho termostatizado marca *Pselecta*, modelo *Univeba* 401.

4.1.4.5 - Instrumentação de análise das drogas e condições operacionais

Os compostos foram identificados e quantificados por GC/MS. Na execução deste trabalho usaram-se três aparelhos distintos de GC/MS todos da marca Hewlett-Packard (HP, Estados Unidos). Em virtude de existirem algumas diferenças no equipamento, em função dos compostos que se pretendiam identificar/quantificar, optou-se, para simplificação, denominá-los de sistema 1, sistema 2 e sistema 3. As características do equipamento foram as que a seguir se descrevem:

Sistema 1-

Sistema GC/MS: Cromatógrafo Gasoso HP 6890 series II (USA) equipado com coluna capilar HP Ultra 1 (com fase estacionária de dimetilsiloxano, 12 m de comprimento, 0,20 mm i.d. e 0,33 μm de espessura da fase estacionária - película de revestimento) acoplado a um Detector Selectivo de Massa HP 5973. A temperatura do injector foi de 220°C, tendo sido usada injeção split com um *ratio* split 10:1. O fluxo do gás de arraste foi de 1,0 mL/min (helium, alphagazTMHe 2). A temperatura do injector foi de 200°C, tendo sido usada injeção split com um *ratio* split 10:1. A temperatura do forno, onde se localiza a coluna, foi programada para uma temperatura inicial de 150°C, mantida 1 min, atingindo 270°C a 20°C/min, mantendo-se durante 5 min. A temperatura da Interface MS foi de 280°C. As temperaturas da fonte iónica e do quadrupolo foram 150°C e 230°C, respectivamente. O detector foi operado em modo EI a +70 eV, em modo *full scan*, para determinar o tempo de retenção de cada composto e seleccionar os iões m/z característicos. A calibração das massas foi feita diariamente de forma automatizada com recurso à perfluorotributilamina e a voltagem do multiplicador de electrões foi a voltagem do autotune (1100-1600 V).

Sistema 2 -

Sistema GC/MS: Cromatógrafo Gasoso HP 6890 series II (USA), com injector automático HP 7683 series (USA), equipado com coluna capilar HP Ultra 2 (fase estacionária de dimetilsiloxano com 5% de grupos fenilo, 12 m X 0,20 mm i.d. X 0,33 μm de película de revestimento) acoplado a um Detector Selectivo de Massa HP 5973 (USA), operando por ionização química negativa. A temperatura do injector foi de 200°C, tendo sido usada injeção

split com um *ratio* split 10:1. O fluxo do gás de arraste através da coluna foi o mesmo do sistema anterior. A temperatura do forno onde se localiza a coluna foi programada, no caso de análise de DIAZ, NORDIAZ e FLU, para uma temperatura inicial de 150°C, mantida 2 min, atinge mesmo indo de 230°C, a 20°C/min, e 270°C a 10°C/min, mantendo-se durante 1 min. Na análise de Δ^9 -THC-COOH, a rampa de temperatura é equivalente, variando a apenas a temperatura máxima atingida que foi de 260°C. A temperatura da Interface MS foi de 280°C. As temperaturas da fonte iónica e do quadrupolo foram 150°C e 106°C, respectivamente. O gás reagente usado foi o metano com uma pressão aparente na fonte iónica de $1,8 \times 10^{-4}$ Torr.

Sistema 3 -

Sistema GC/MS idêntico ao *sistema 2* mas com detector, operando por ionização electrónica. A temperatura do injector foi de 220°C, tendo sido usada injeção split com um *ratio* split 10:1. O fluxo do gás de arraste através da coluna foi o mesmo dos sistemas anteriores. A temperatura do forno onde se localiza a coluna foi programada para uma temperatura inicial de 150°C, mantida 1 min, atingindo 270°C, a 20°C/min, mantendo-se durante 5 min. A temperatura da Interface MS foi de 280°C. As temperaturas da fonte iónica e do quadrupolo foram 150°C e 230°C, respectivamente. O detector foi operado em modo EI a +70 eV, pelo modo *full scan*, apenas para determinar o tempo de retenção de cada composto e seleccionar as iões mais característicos. A calibração das massas foi feita diariamente de forma automatizada com recurso à perfluorotributilamina e a voltagem do multiplicador de electrões foi a do autotune (1100-1600 V).

Todos os restantes consumíveis, referentes aos sistemas de GC/MS, foram da marca HP/Agilent.

4.2 – MÉTODO

4.2.1 - Silanização do material de vidro

Por forma a evitar-se a absorção dos canabinóides, sobretudo do metabolito Δ^9 -THC-COOH, na superfície do vidro dos tubos de ensaio usados nos processos de isolamento e extracção torna-se conveniente a eliminação dos locais activos por silanização [157]. Para esse efeito adoptou-se o procedimento utilizado na rotina do STF: pipetou-se para cada tubo de ensaio, com tampa de vidro, 7 mL de solução a 10% em tolueno de TMCS; submeteram-se os tubos de ensaio a agitação mecânica, durante 2 horas, à temperatura ambiente, num agitador promovendo uma rotação de 360° (assegurando-se, assim, o contacto de toda a superfície interna e tampa dos tubos de ensaio com a solução); após remoção desta solução procedeu-se à lavagem interna dos tubos pipetando, para cada um, 7 mL de tolueno e submendo-os a agitação mecânica durante 15 minutos, nas condições acima referidas; seguiu-se, após remoção do tolueno, nova pipetagem de 7 mL de metanol e agitação mecânica durante 15 minutos, nas mesmas condições das anteriores, completando-se o processo de lavagem. Os tubos de ensaio destapados e as respectivas tampas foram colocados a secar na estufa, à temperatura de 40°C, durante 15 minutos, tendo o cuidado de inverter a abertura dos tubos de ensaio, no respectivo suporte, e de não tocar com as mãos nos bordos esmerilados das tampas de vidro.

4.2.2 - Corte e descontaminação

As amostras de cabelo isentas de drogas foram colhidas na coroa da cabeça, na região do vértice posterior, por corte com tesoura o mais próximo possível do couro cabeludo, com um diâmetro de cabelo de mais ou menos equivalente ao de um lápis.

As amostras do cabelo isento de drogas foram descontaminadas por lavagem com solução de sabão neutra, durante 30 minutos, sofrendo agitação mecânica, e posteriormente enxaguado várias vezes com água destilada até remover completamente o sabão. O cabelo foi seco com acetona e colocado na estufa, durante 24 horas, a 40°C [328]. Apesar da

descontaminação com diclorometano ser um procedimento bastante eficaz [190], na eliminação da contaminação externa, e menos moroso, o mesmo não foi usado. O objectivo foi colocar nas mesmas condições de descontaminação, o cabelo utilizado no estudo e o cabelo das amostras reais por nós analisadas as quais nos foram gentilmente cedidas, já descontaminadas por esse processo [328], pelo Instituto de Medicina Legal de Santiago de Compostela.

Após secagem, o cabelo foi reduzido a segmentos de aproximadamente 1 mm de comprimento, por corte com tesoura de pontas finas em funil de papel de filtro. Num matraz procedeu-se à mistura de todos os segmentos obtidos e, desse contentor foram pesadas amostras de 50 mg as quais se colocaram em tubos de ensaio graduados, com capacidade de 10 mL, com tampas de vidro, e previamente silanizados.

Quando o objectivo foi a análise segmentar do cabelo (centímetro a centímetro), as extremidades foram amarradas com linhas de cores diferentes assinalando-se, assim, a porção distal e proximal ao couro cabeludo. Com um bisturi seccionou-se o cabelo em porções de um centímetro. Separaram-se as mesmas e etiquetaram-se com I, II, III, etc., representando I o centímetro mais proximal. No caso de não ser possível análise segmentar, devido ao comprimento do cabelo não o permitir, toda a amostra recolhida foi colocada num tubo de ensaio com as características descritas, devidamente identificado. Dado que as amostras reais tinham já sido descontaminadas, procedeu-se à sua redução a segmentos de aproximadamente 1 mm de comprimento. Todas as amostras foram tratadas em separado. Dos segmentos obtidos, foram pesadas amostras de 50 mg que se colocaram em tubos de ensaio graduados, previamente silanizados. Todos os tubos de ensaio foram devidamente identificados. O cabelo excedente aos 50 mg usado na análise foi guardado no contentor inicial, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, para eventual confirmação dos resultados.

4.2.3 - Libertação das drogas

Às amostras de cabelo (50mg), colocadas em tubos de ensaio de vidro silanizados com capacidade de 10 mL, foram adicionados os IS referidos na tabela 4.1. À mistura juntaram-se 2 mL de tampão fosfato a pH 7,6 e 75 μ L da mistura β -glucuronidase/arylsulfatase. Após agitação no vórtex, os tubos de ensaio vedados com tampas de vidro, foram colocados na

estufa a 40°C, durante 2 horas. (Método de Möeller *et al.* [211], mas com uma concentração enzimática diferente).

Na tabela 4.1 apresentam-se os IS usados na quantificação dos compostos.

Tabela 4.1 – Padrões internos usados na quantificação de cada composto.

Composto	Padrão interno (IS)	IS alternativo
6-MAM-PFP	6-MAM-d ₃ -PFP	
MOR-2 PFP	MOR-d ₃ -2 PFP	NAL-2 PFP
NORMOR-2 PFP	MOR-d ₃ -2 PFP	
COD-PFP	COD-d ₃ -PFP	
COC	COC-d ₃	-----
NORCOC	COC-d ₃	
BE-PFP	BE-d ₃ -PFP	NAL-2 PFP
EME-PFP	EME-d ₃ -PFP	
COCE	COC d ₃	-----

4.2.4 - Extracção das drogas

Após a libertação das drogas do cabelo e atingida a temperatura ambiente, ajustou-se o pH da solução entre 8,5 - 8,7 com tampão Tris (pH 9,5). Adicionaram-se 5,0 mL da mistura clorofórmio/isopropanol (97:3, *v/v*) e procedeu-se à agitação do tubo de extracção usando um agitador mecânico com rotação de 360°, durante 25 minutos.

Após centrifugação a 3000 rpm durante 10 minutos a fracção orgânica foi transferida para um tubo de ensaio silanizado.

O pH da fracção aquosa foi ajustado com ácido acético concentrado, para 3,0 - 4,0 unidades, sofrendo uma reextracção líquido-líquido com 5,0 mL da mistura *n*-hexano/acetato de etilo (90:10, *v/v*), por agitação do tubo de extracção num agitador mecânico com rotação de 360°, durante 25 minutos. Durante este período de tempo a fracção orgânica correspondente à primeira extracção foi evaporada sob corrente de azoto em banho termostaticado, a 40°C, até à secura.

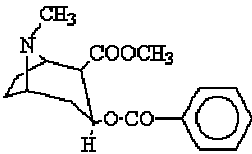
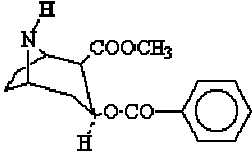
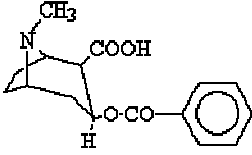
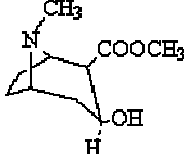
Para separar as fracções orgânica e aquosa referentes à segunda extracção (extracção em meio ácido), procedeu-se à centrifugação a 3000 rpm durante 25 minutos. Utilizando uma pipeta de Pasteur a fracção orgânica foi transferida para o tubo de ensaio que continha o extracto referente à primeira extracção (extracção em meio alcalino) e procedeu-se à evaporação da mesma até à secura, sob corrente de azoto em banho termostaticado a 40°C. Os extractos misturados, secos, sem derivatização, foram reconstituídos em 50 µL de acetato de etilo e agitados no vórtex.

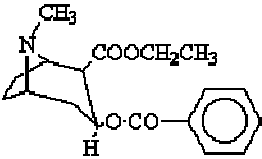
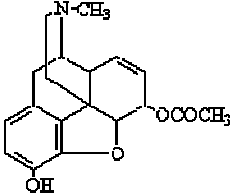
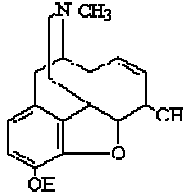
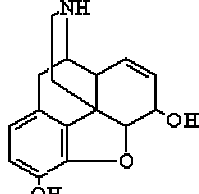
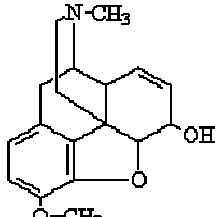
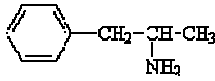
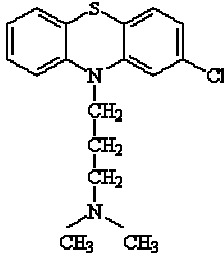
4.2.5 - Derivatização das drogas

O solvente orgânico onde se encontrava o composto padrão ou o extracto resultante da aplicação das diferentes metodologias de isolamento e extracção das drogas foi evaporado à secura, num concentrador de amostras sob corrente de azoto, a 40°C. Após a permanência dos tubos de ensaio e das respectivas tampas, durante 30 minutos, no exsiccador com sílica, de forma a eliminar vestígios de humidade (do material de vidro ou dos extractos), cada extracto foi derivatizado com a mistura 50 µL PFPA e 25 µL de PFPOH, durante 30 minutos, num banho termostaticado a 65°C, de acordo com o trabalho de Marques *et al.* [190] Após a derivatização, e tendo atingido a temperatura ambiente, os extractos foram evaporados à secura sob corrente de azoto nas mesmas condições anteriormente referidas e os resíduos reconstituíram-se em 50 µL de acetato de etilo.

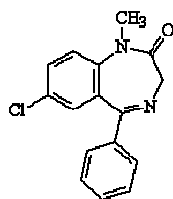
Na tabela 4.2 apresentam-se as estruturas químicas dos compostos analisados.

Tabela 4.2 - Estrutura química das drogas e metabolitos analisados no presente trabalho.

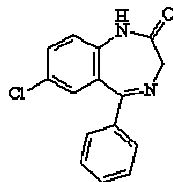
Composto	Estrutura
COC [61]	
NORCOC [61]	
BE [61]	
EME [61]	

COCE [61]	
6-MAM	
MOR	
NORMOR	
COD	
AP [147]	
CPZ [105]	

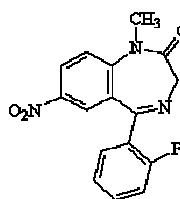
DIAZ



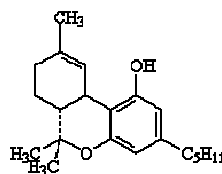
NORDIAZ



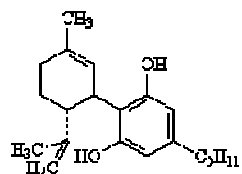
FLU



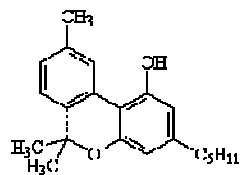
Δ^9 -THC



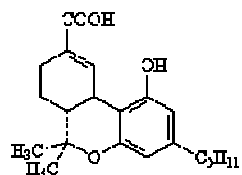
CBD

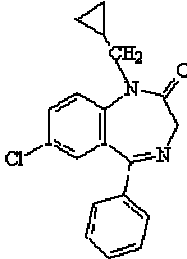
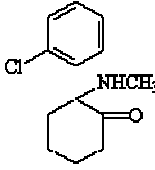
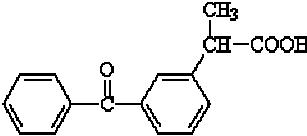
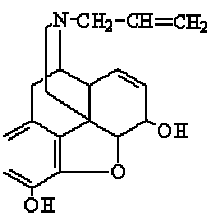


CBN



Δ^9 -THC-COOH



Padrões internos	
PRAZ	
Ketamina	
KP	
NAL	

4.2.6 - Análise das drogas por GC/MS

A análise foi efectuada nos três sistemas de GC/MS descritos no ponto 4.1.4.5, relativo à instrumentação de análise de drogas.

Os extractos reconstituídos em 50 μL de acetato de etilo e agitados no vórtex foram analisados, sem derivatização, por GC/MS-EI (*sistema 1*), GC/MS-NCI (*sistema 2*) e, se necessário, por GC/MS-EI (*sistema 3*), injectando 2 μL . O resíduo foi, de novo, seco sob corrente de azoto, derivatizado e, após reconstituição em 50 μL de acetato de etilo e agitação no vórtex, os extractos foram analisados por GC/MS-EI (*sistema 1*) e GC/MS-NCI (*sistema 2*) injectando, também, 2 μL .

4.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1- Liberação e extracção

Foram estudados vários métodos de libertação e extracção de drogas em cabelo.

Os organigramas das figuras 4.1 e 4.2 e a tabela 4.3 esquematizam as metodologias usadas, apresentando-se a sublinhado as modificações por nós introduzidas relativamente aos autores em que nos baseámos.

Nas figuras 4.1 e 4.2 encontram-se representados esquematicamente os procedimentos para libertação/extracção utilizados no desenvolvimento de uma metodologia que permitisse a detecção/quantificação simultânea de 18 compostos DIAZ, FLU, NORDIAZ, Δ^9 -THC, Δ^9 -THC-COOH, CBN, CBD, 6-MAM, MOR, NORMOR, COD, COC, BE, EME, COCE, NORCOC, AP, e CPZ numa análise ao cabelo por GC/MS.

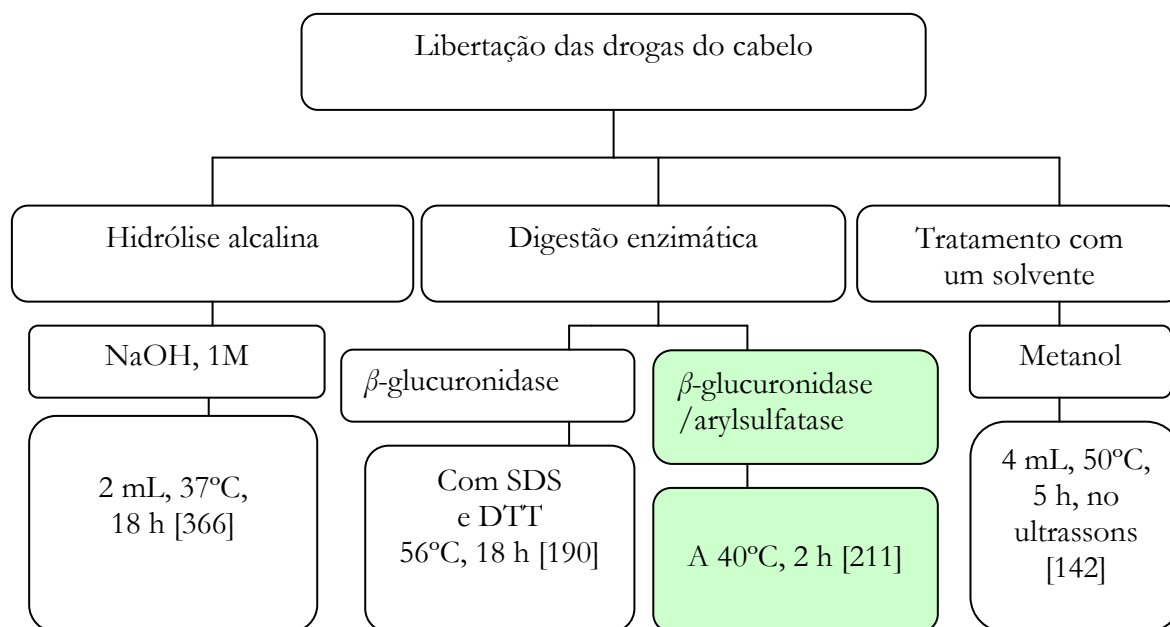


Figura 4.1 - Representação esquemática dos procedimentos de libertação ensaiados. A metodologia definitiva apresenta-se sombreada.

Como se esquematiza na figura 4.1 ensaiaram-se três tipos de procedimentos para a libertação das drogas do cabelo: tratamento com substâncias alcalinas (hidrólise com NaOH); tratamento com um solvente (metanol); e tratamento com enzimas (digestão enzimática). No procedimento de digestão enzimática foram usadas a β -glucuronidase isoladamente e a mistura β -glucuronidase/arylsulfatase em diferentes condições de temperatura e de duração do procedimento. A utilização do procedimento de libertação com metanol foi também estudada.

Foram ensaiados diversos procedimentos extractivos: SPE utilizando colunas *Bond Elut Certify* e *Sep Pack C18* e LLE com várias misturas de solventes: *n*-hexano/acetato de etilo (90:10, *v/v*); clorofórmio/isopropanol/*n*-heptano (50:17:33, *v/v*) e clorofórmio/isopropanol (97:3, *v/v*) em diferentes condições de pH (Figura 4.2).

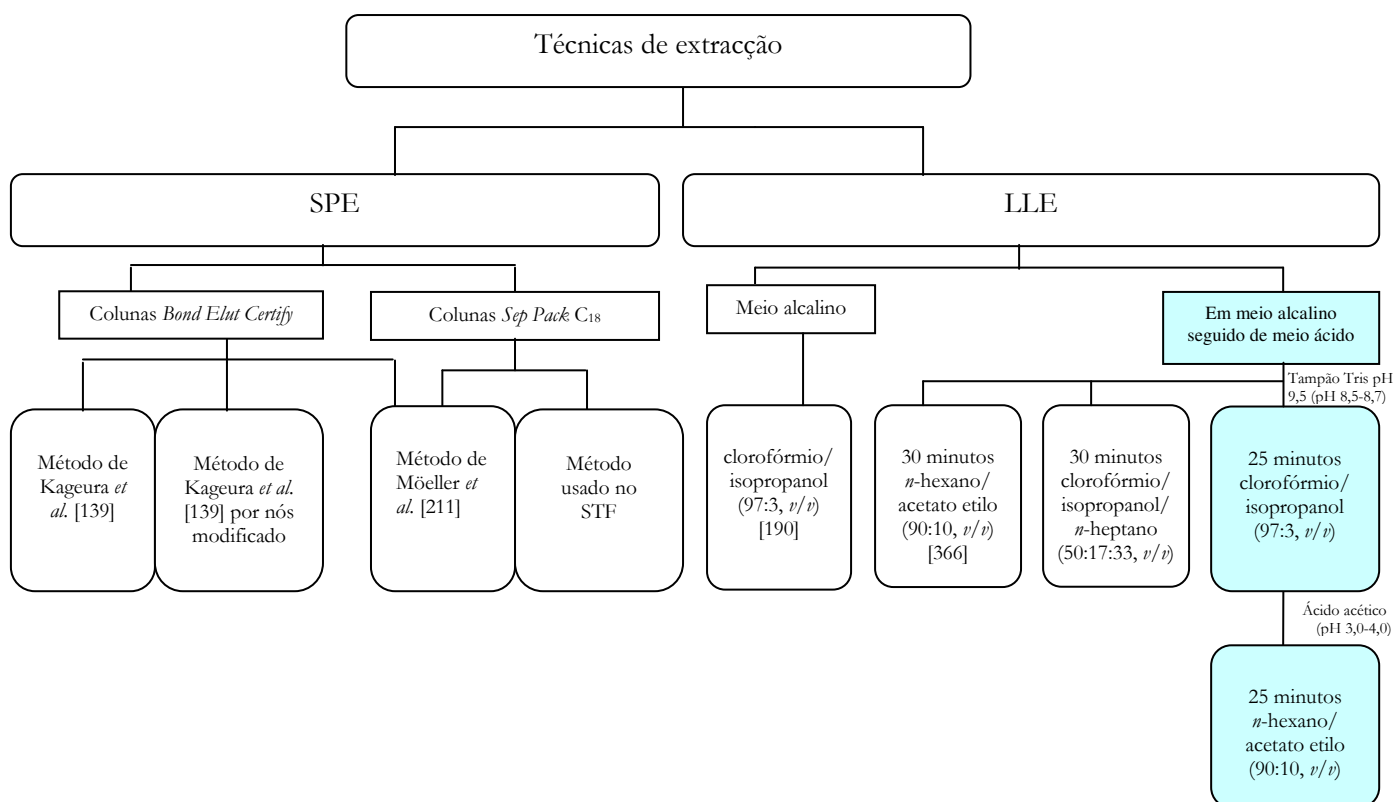


Figura 4.2 - Representação esquemática de metodologias de extração ensaiadas. A metodologia definitiva apresenta-se sombreada.

Na tabela 4.3 apresentam-se as combinações (processos de libertação e extração) ensaiadas com as sucessivas adaptações introduzidas (de acordo com os resultados mais relevantes que se foram obtendo) no desenvolvimento da metodologia analítica e que se encontram sublinhadas.

Tabela 4.3 - Combinações (procedimentos de libertação/extracção) ensaiadas.

Método de libertação	Método de extracção
NaOH 1M, a 37°C durante 18 h [366]	LLE - 2mL de <i>n</i> -hexano/acetato de etilo (90:10, <i>v/v</i>), em meio alcalino seguindo-se em meio ácido, durante 30 minutos [366]
	LLE - clorofórmio/isopropanol/ <i>n</i> -heptano (50:17:33, <i>v/v</i>), em meio alcalino seguido de meio ácido
Metanol a 50°C durante 5 horas em ultrassons [142]	
β -glucuronidase [190]	LLE - [366]
	SPE - Método usado no laboratório com colunas <i>Sep Pack</i> C18 para extracção de drogas a partir de sangue
	SPE - Método de Möeller <i>et al.</i> [212] com colunas <i>Bond Elut Certify</i>
	SPE - Método de Kageura <i>et al.</i> [139]
	SPE - Método de Kageura <i>et al.</i> [139] com colunas <i>Bond Elut Certify</i> <u>separando as fracções ácida e alcalina em tubos de ensaio diferentes.</u>
	SPE - Método de Kageura <i>et al.</i> [139] com colunas <i>Bond Elut Certify</i> <u>recolhendo as fracções ácida e alcalina no mesmo tubo de ensaio.</u>
β -glucuronidase/ arylsulfatase [211]	LLE - [190]
	SPE - Método de Kageura <i>et al.</i> [139] modificado (<u>tampão fosfato pH 7,6, com adição de água à solução de digestão, secagem das colunas sob vácuo e misturando as fracções ácida e alcalina no mesmo tubo de ensaio</u>)
	SPE - Método de Kageura <i>et al.</i> [139] modificado (<u>tampão Soerensen pH 7,6, sem adição de água à solução de digestão, secagem das colunas sob vácuo e misturando as fracções ácida e alcalina no mesmo tubo de ensaio</u>)
	SPE - Método de Kageura <i>et al.</i> [139] modificado (<u>tampão fosfato pH 7,6, sem adição de água à solução de digestão sem lavagem das colunas com metanol, secagem das colunas sob vácuo e misturando as fracções ácida e alcalina no mesmo tubo de ensaio</u>)
	SPE - Método de Möeller <i>et al.</i> [212] com colunas <i>Sep Pack</i> C18.
	LLE - clorofórmio/isopropanol (97:3, <i>v/v</i>) a pH 8,5-8,7, seguida de extracção a pH 3 -4 com <i>n</i> -hexano/acetato de etilo (90:10, <i>v/v</i>) (metodologia por nós desenvolvida)

Por hidrólise alcalina

Os estudos preliminares efectuados consistiram apenas na comparação, relativamente às abundâncias dos compostos Δ^9 -THC e Δ^9 -THC-COOH, mediante a aplicação da metodologia de libertação e extracção descrita na literatura [366] em amostras de cabelo fortificadas com estes dois compostos. Nestes estudos o cabelo foi apenas analisado por GC/MS-EI por não se encontrar ainda, nesta fase do trabalho, montado no laboratório o equipamento GC/MS-NCI.

Posteriormente adicionou-se DIAZ, CBN, CBD, 6-MAM, MOR, COD, COC, BE, EME, AP, CPZ, NAL e ketamina e submeteram-se as amostras a dois procedimentos de extracção LLE (Tabela 4.3)

A mistura clorofórmio/isopropanol/*n*-heptano mostrou-se mais eficiente para extracção de compostos básicos-neutros (COC, BE, AP, BZD, canabinóides), dado a análise dos cromatogramas ter revelado uma maior abundância para esses compostos.

Contrariamente, na extracção dos compostos ácidos-neutros (canabinóides) a mistura *n*-hexano/acetato de etilo foi mais eficiente. Estes resultados são concordantes com os descritos por vários autores, uma vez que na LLE de BZD são utilizadas as mistura clorofórmio/isopropanol/*n*-heptano (50:17:33, *v/v*) ou éter/clorofórmio (80:20, *v/v*) (Tabela 3.5). Por outro lado, a mistura *n*-hexano/acetato de etilo (90:10, *v/v*) é a mais usada na LLE de canabinóides e metabolitos (Tabela 3.10), sendo muito eficiente para a obtenção de recuperações elevadas de Δ^9 -THC e Δ^9 -THC-COOH [83].

A hidrólise alcalina foi um procedimento adequado à libertação de canabinóides (Δ^9 -THC, Δ^9 -THC-COOH, CBN e CBD) CPZ, NAL, ketamina, MOR e COD, mas desadequado à libertação de BZD (DIAZ), COC, BE, EME, 6-MAM. A instabilidade destes compostos nas condições de hidrólise conduziu à sua substituição por métodos que usam enzimas e solventes, onde os compostos são mais estáveis [246, 372].

Por solvente orgânico

A extracção em metanol com utilização de ultrassons [142] é sem dúvida um método simples, mas que se considerou inapropriado ao objectivo do trabalho, em virtude de se terem obtido recuperações muito baixas de MOR, BE e Δ^9 -THC-COOH, tornando impossível a sua detecção em amostras fortificadas com concentrações muito pequenas. Estes resultados são

também referidos por outros autores [54, 253, 289] confirmando-se, assim, a necessidade de aplicar outro método de extracção.

Os resultados obtidos por Marques *et al.* [190] revelaram que o melhor método para isolamento simultâneo de opiáceos, COC e seus metabolitos é o que utiliza a β -glucuronidase, comparativamente ao que usa metanol ou a proteinase K. Devido a este facto optou-se pelo estudo utilizando enzimas.

Libertação por enzimas

β -glucuronidase

Após aplicação do método de isolamento com β -glucuronidase [190] a amostras de cabelo fortificadas com a mistura PRAZ, DIAZ, ketamina, Δ^9 -THC, COC, BE, MOR, NAL, CPZ, foram aplicados diversos procedimentos de extracção apresentados na tabela 4.3. Verificou-se que:

- por LLE, em meio alcalino seguido de meio ácido, usando a mistura *n*-hexano/acetato de etilo (90:10, *v/v*), a BE não foi detectada.

- por SPE com colunas *Sep Pack* C18, utilizando o procedimento seguido no STF, para extracção de opiáceos e COC e seus metabolitos na matriz sangue, não foram obtidos bons resultados, sobretudo para os outros grupos de compostos.

- por SPE, aplicando a metodologia de Möeller *et al.* [212] e usando colunas *Bond Elut Certify* foram detectados todos os compostos em estudo, evidenciando abundâncias inferiores à LLE, destacando-se a abundância do Δ^9 -THC, a qual foi muito reduzida;

- por SPE, aplicando a metodologia de Kageura *et al.* [139] foram igualmente detectados todos os compostos, não obstante as abundâncias de DIAZ, PRAZ, ketamina e Δ^9 -THC terem sido inferiores às obtidas pela aplicação da LLE, com especial destaque para o Δ^9 -THC que foi bastante inferior. A abundância deste canabinóide foi, no entanto, superior à obtida pela aplicação do método de Möeller *et al.* [212], sendo para os restantes compostos semelhante. No que concerne à COC verificou-se uma abundância ligeiramente superior à obtida pela LLE.

Relativamente à recolha dos eluatos alcalino e ácido, os resultados evidenciaram a existência de perdas ocasionadas não pela ordem de adição dos extractos (ácido ao alcalino ou alcalino ao ácido) mas provavelmente devido à aderência do resíduo ao material de vidro do tubo de ensaio e da pipeta de Pasteur usada no processo. Decidiu-se, desta forma, recolher o

eluato das drogas alcalinas, no mesmo tubo de ensaio onde se havia recolhido a fracção orgânica eluente das drogas ácidas. Os extractos misturados foram evaporados sob corrente de azoto, a 40°C.

Com estes ensaios mais uma vez se confirmaram piores resultados nos extractos derivatizados para as BZD (PRAZ e DIAZ) CPZ, COC e ketamina, comparativamente aos não derivatizados, como era esperado.

β-glucuronidase/arylsulfatase

A referência à utilização de outros procedimentos de digestão enzimática mais rápidos e eficazes [81, 211, 212, 289], nomeadamente empregando a mistura β-glucuronidase/ arylsulfatase, na libertação de AP, COC, BE, EME, 6-MAM, MOR, COD, di-hidrocodeína, metadona, EDDP, Δ⁹-THC, sendo uma das recomendadas nas *Guidelines for testing drugs under international control in hair, sweat and saliva*, publicadas pelas Nações Unidas, no âmbito do programa internacional do controlo de drogas, condicionaram as nossas escolhas nos estudos subsequentes.

Com o objectivo de melhorar os resultados obtidos, aplicou-se o método de Möeller *et al.* [212], com a modificação da coluna por uma *Sep Pack* C18, por supormos que os resultados por nós obtidos anteriormente difeririam dos dos autores, por não termos inicialmente utilizado, como eles, a mistura β-glucuronidase/arylsulfatase, no isolamento das drogas e a coluna *Chromabond* C18 (indisponível no laboratório). O objectivo não foi alcançado.

Para melhorar os resultados de DIAZ, PRAZ, ketamina e Δ⁹-THC, aplicou-se o método de Kageura *et al.* [139], mas com a libertação dos compostos agora por esta mistura enzimática. Introduziram-se sucessivas modificações na tentativa da sua optimização. Assim, foi estudada a mistura -PRAZ, DIAZ, ketamina, Δ⁹-THC, COC, BE, MOR, NAL e CPZ, e efectuaram-se as seguintes alterações, de forma sucessiva, para obter maiores abundâncias dos compostos em análise:

- utilização de tampão fosfato a pH 7,6 em vez de pH 6,0. Um pH intermédio na gama dos usados na libertação e extracção de BZD (Tabela 3.5), COC e metabolitos (Tabela 3.24), AP (Tabela 3.29) e CPZ (Tabela 3.34) e que também foi utilizado pelo método de Möeller *et al.* [212]. Com esta mudança de pH do tampão não foram visíveis alterações nos resultados;

- ausência de adição de água desionizada ou adição dum menor volume aos extractos, antes da passagem pelas colunas. O resultado apenas se traduziu na facilidade da solução atravessar a coluna, que é tanto menor quanto maior a concentração da solução;

- mistura no mesmo tubo de ensaio dos extractos alcalino e ácido, que como anteriormente já tínhamos verificado apresentava melhores resultados. Esta alteração facilitou bastante o processo de extracção por não haver necessidade de remoção das colunas do equipamento e, também, garantiu que as colunas fossem secas com a mesma eficácia, em simultâneo e nas mesmas condições;

- aplicação de 5 minutos de vácuo após cada uma das misturas eluentes ter atravessado a coluna para facilitar a eluição das drogas;

Apesar da obtenção de melhores resultados, estes não foram os pretendidos.

Passou-se ao estudo pelo procedimento por LLE da mistura PRAZ, DIAZ, ketamina, Δ^9 -THC, Δ^9 -THC-COOH, COC, BE, 6-MAM, MOR, NAL e CPZ, com a mistura clorofórmio/isopropanol (97:3, *v/v*) a pH 8,5-9,0 [190], após isolamento com β -glucuronidase/arylsulfatase [211]. Foram detectados todos os compostos, mas a abundância do Δ^9 -THC e principalmente do Δ^9 -THC-COOH foi muito reduzida.

Os resultados anteriormente obtidos sugeriram a necessidade de utilizarmos outra mistura e/ou outro valor de pH na extracção do Δ^9 -THC e sobretudo do metabolito Δ^9 -THC-COOH.

Da revisão da literatura constata-se:

-que as condições ácidas ou básicas fortes não podem ser usadas no isolamento e extracção das BZD [67, 87, 89, 160, 291, 372] nem da BE, EME, 6-MAM [166, 328];

- que a melhor solução de compromisso para a extracção de COC, BE, EME, 6-MAM, MOR e COD deve ser efectuada a pH 8,5 - 9,0 [190], com a mistura clorofórmio/isopropanol (97:3, *v/v*) [190, 280] ou clorofórmio/isopropanol/*n*-heptano (50:17:33, *v/v*) [45];

- que os canabinóides e o metabolito Δ^9 -THC-COOH são quimicamente estáveis [137] em meios alcalinos e ácidos;

- que o pH para extrair canabinóides, sobretudo o metabolito Δ^9 -THC-COOH é ácido [33, 51, 137, 156], utilizando para acidificar a amostra o ácido acético [51, 156];

-que a mistura usada mais frequentemente para a LLE de canabinóides é *n*-hexano/acetato de etilo, variando as proporções *v/v* dos componentes da mistura (Tabela 3.10);

- que a extracção da AP ocorre em meio básico [153, 268, 308], assim como a da CPZ [201].

Perante estes dados e os resultados obtidos, optou-se por uma solução de compromisso, em que a extracção foi efectuada em meio básico (pH 8,5 – 8,7) com a mistura clorofórmio/isopropanol (97:3, *v/v*) seguida de uma extracção em meio ácido (pH 3 - 4) com a mistura *n*-hexano/acetato de etilo (90:10, *v/v*). Este procedimento foi o escolhido para o método múltiplo de análise, e que já foi descrito em pormenor no ponto 4.2.4.

4.3.2 - Derivatização

Algumas das substâncias apresentam mau comportamento cromatográfico, o qual está associado à presença dos grupos funcionais polares (-NH, OH e COOH) dos compostos analisados. As técnicas de derivatização permitem a modificação destes grupos funcionais de modo a produzir derivados suficientemente voláteis e dotados de propriedades adequadas para a sua análise cromatográfica.

Destacam-se os chamados reagentes acilantes por apresentarem, em regra, melhores resultados a nível de resolução e de detectabilidade.

A utilização no procedimento de derivatização da mistura PFPA/PFPOH revelou-se uma boa opção, permitindo obter uma boa sensibilidade dos compostos derivados. A mesma tem sido utilizada por vários investigadores no procedimento de derivatização de canabinóides, sobretudo do Δ^9 -THC, e do metabolito Δ^9 -THC-COOH [51, 156], AP, BE e EME, 6-MAM, MOR, COD [81, 211, 325]. A derivatização com agentes perfluorinados é indicada para a análise usando detectores de massa (GC/MS e GC/MS/MS) no modo NCI, uma vez que com a introdução de átomos halogenados a sensibilidade aumenta [33, 301, 345, 347]. Relativamente às BZD, optou-se por não derivatizar o DIAZ e o NORDIAZ, uma vez que na análise por GC/MS-NCI esta é a melhor opção, na obtenção de melhores LOD's, caso haja impossibilidade de efectuar a derivatização com BSTFA (Tabela 3.7) [370]. Na análise de CPZ [306] e de FLU [239] por GC/MS não se utilizaram agentes de derivatização.

4.3.3- Fragmentação (GC/MS)

Determinou-se o tempo de retenção das drogas e obteve-se o respectivo espectro de massa, em modo SCAN, numa gama de massa de m/z 50 a m/z 650, em modo de ionização por EI. No modo NCI a gama de massas foi de m/z 100 a m/z 700. A escolha dos iões m/z a monitorizar efectuou-se em função da sua abundâncias no espectro de massa dos compostos em estudo, da sua especificidade e da ausência de interferentes, seleccionando-se 2 a 3 iões m/z para cada composto. No caso das drogas e metabolitos em que se usaram os respectivos isótopos deuterados como padrão interno, seleccionaram-se os iões m/z correspondentes à mesma fragmentação, para os compostos e para o respectivo padrão interno.

Tendo em consideração os dados da literatura relativos às concentrações de Δ^9 -THC-COOH e FLU detectadas no cabelo humano, decidiu-se que a análise destes compostos deveria ser preferencialmente efectuada por uma técnica que à partida garantisse uma maior sensibilidade, permitindo detectar valores muito reduzidos destes compostos nas amostras. Optou-se, então, por analisar estes compostos por GC/MS-NCI, por se conseguirem menores LOD's, sendo por conseguinte menor o risco de obtenção de falsos negativos para estes compostos [156].

Uma vez que as concentrações de NORDIAZ presentes no cabelo humano poderão ser igualmente baixas (apesar de geralmente não serem tão baixas como as dos dois compostos referidos) e ao facto de ter apresentado o mesmo tempo de retenção da CPZ, decidiu-se efectuar a sua análise exclusivamente por GC/MS-NCI.

Assim todo o trabalho laboratorial desenvolvido orientou-se no sentido de se analisar por GC/MS-NCI as BZD (DIAZ, NORDIAZ e FLU) e o metabolito Δ^9 -THC-COOH. Foram analisados por GC/MS-EI os compostos: DIAZ, FLU, Δ^9 -THC, CBN, CBD, COC e metabolitos, opiáceos, AP e CPZ.

A título de exemplo apresentam-se os espectros de massa (Figura 4.3 – 4.15) produzidos pelos compostos que tiveram mais relevo neste trabalho: canabinóides e o metabolito Δ^9 -THC-COOH e o FLU, como exemplo das BZD, com detecção por EI e/ou NCI. Seleccionaram-se também os da NORCOC, COCE e NORMOR, que passarão, a partir de agora, a constar dos exames de drogas a realizar no STF. São também apresentados os espectros de massa dos IS, ketamina e KP.

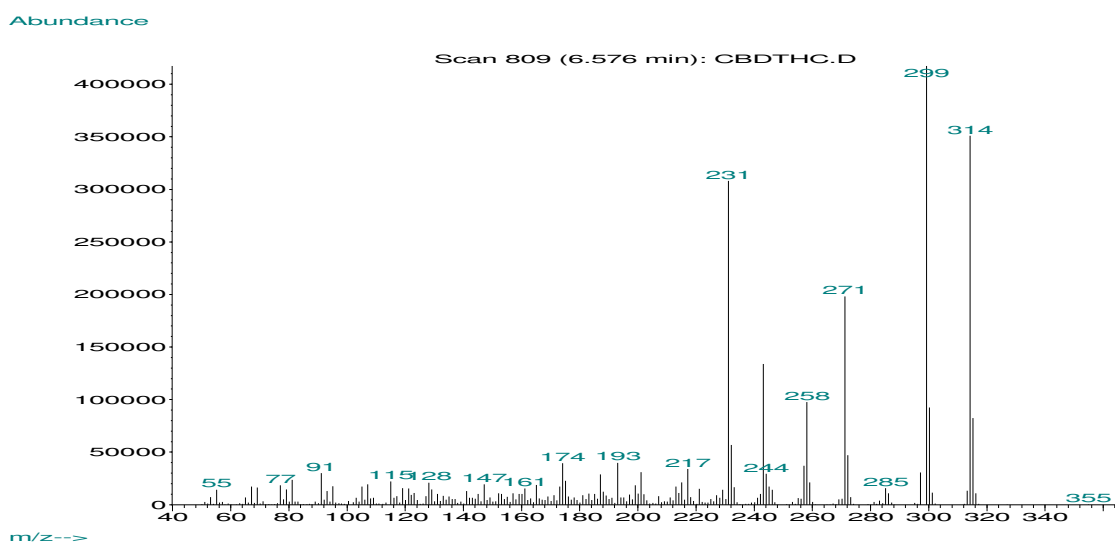


Figura 4.3 - Espectro de massa do Δ^9 -THC obtido por ionização electrónica, modo *full scan*.

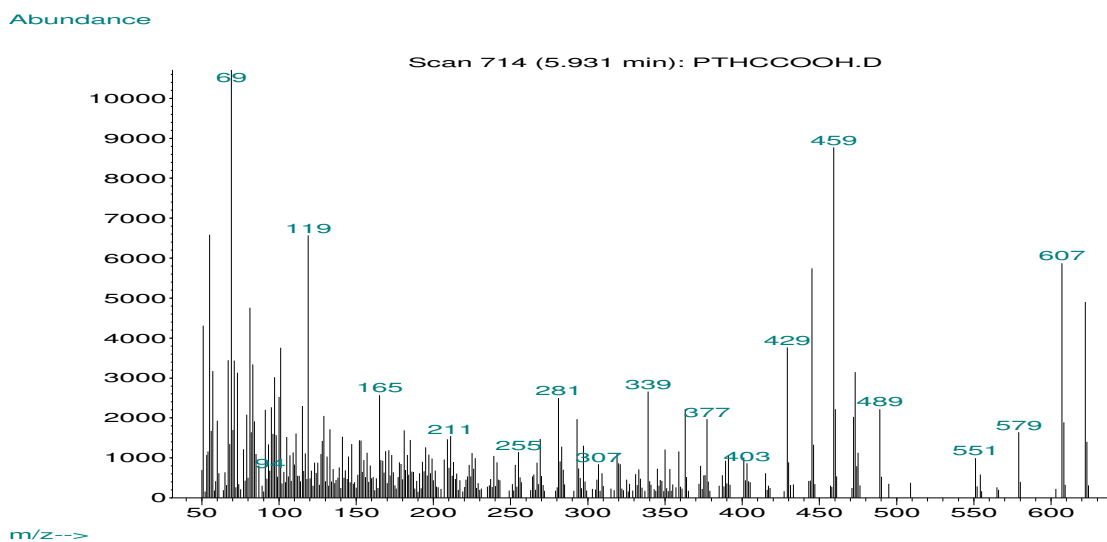


Figura 4.4 - Espectro de massa do Δ^9 -THC-COOH derivatizado por PFPA/PFPOH e obtido por ionização electrónica, modo *full scan*.

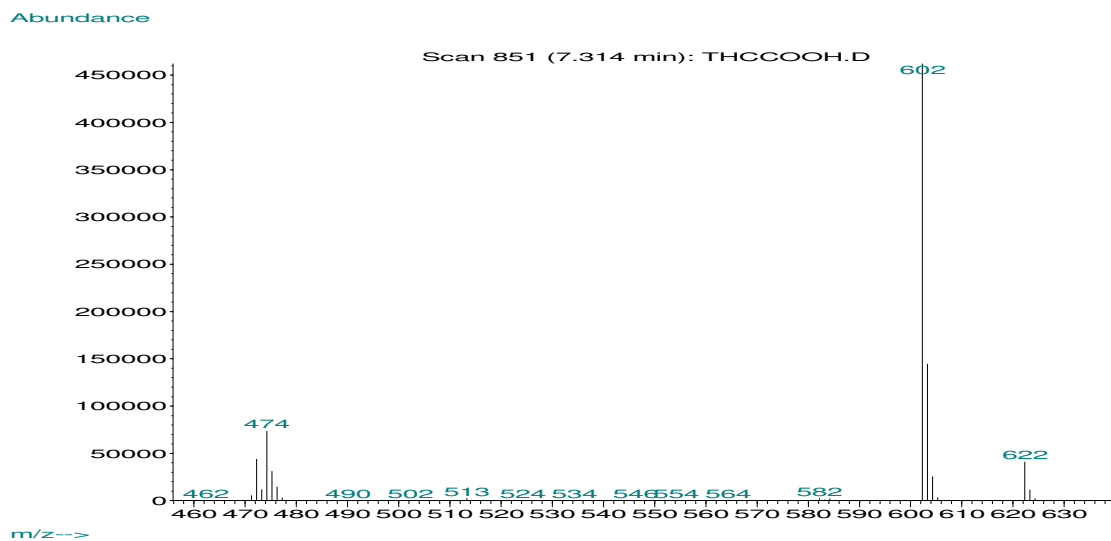


Figura 4.5 - Espectro de massa do Δ^9 -THC-COOH derivatizado por PFPA/PFPOH e obtido por ionização química negativa com metano, modo *full scan*.

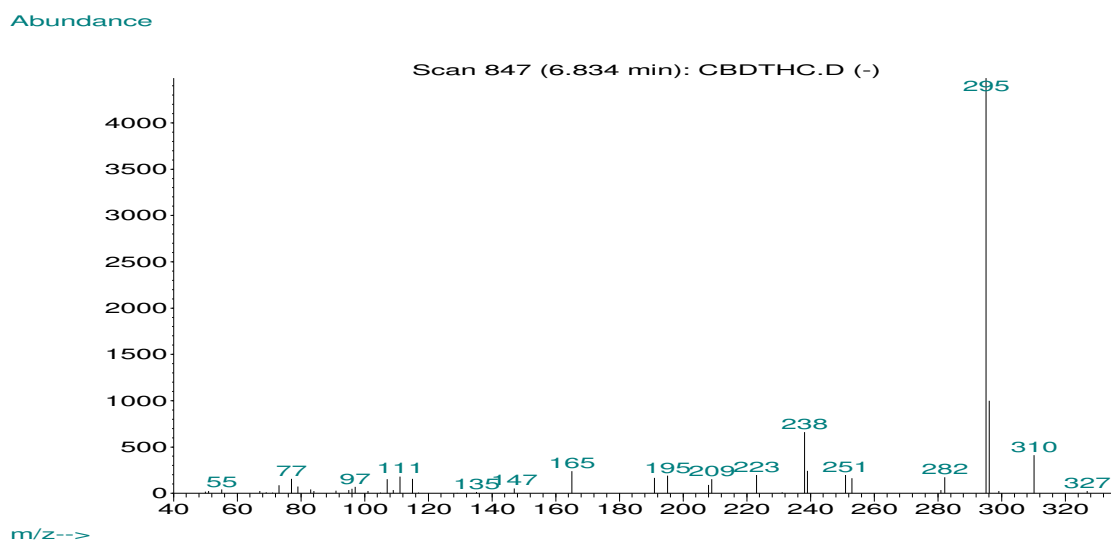


Figura 4.6 - Espectro de massa do CBN obtido por ionização electrónica, modo *full scan*.

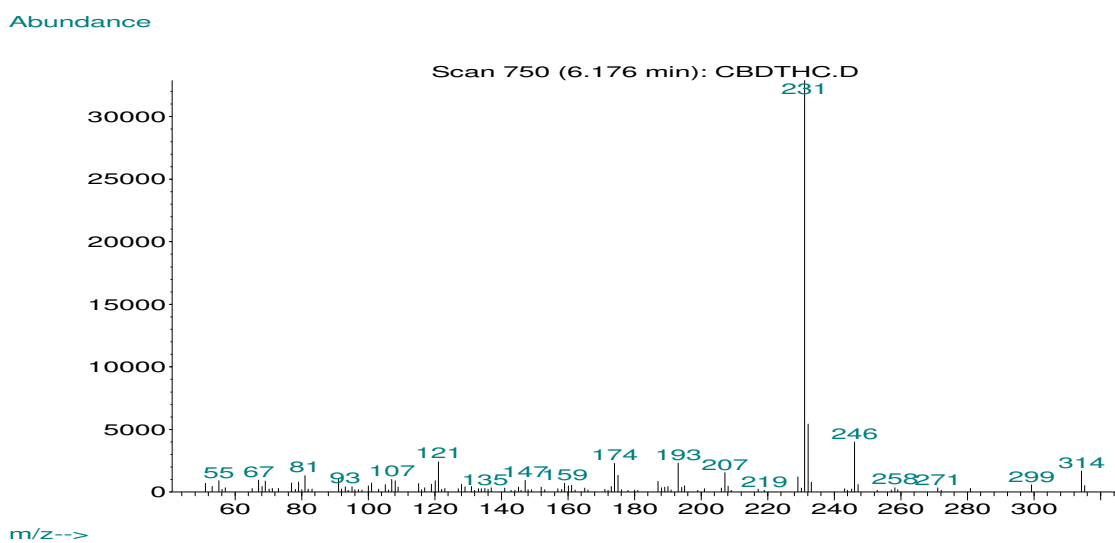


Figura 4.7 - Espectro de massa do CBD obtido por ionização electrónica, modo *full scan*.

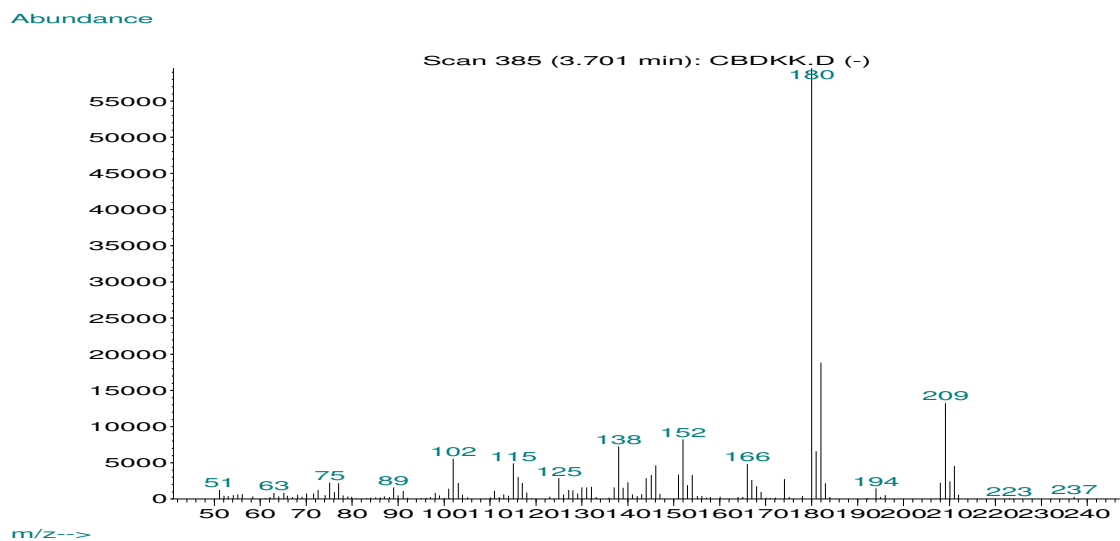


Figura 4.8 - Espectro de massa da ketamina obtido por ionização electrónica, modo *full scan*.

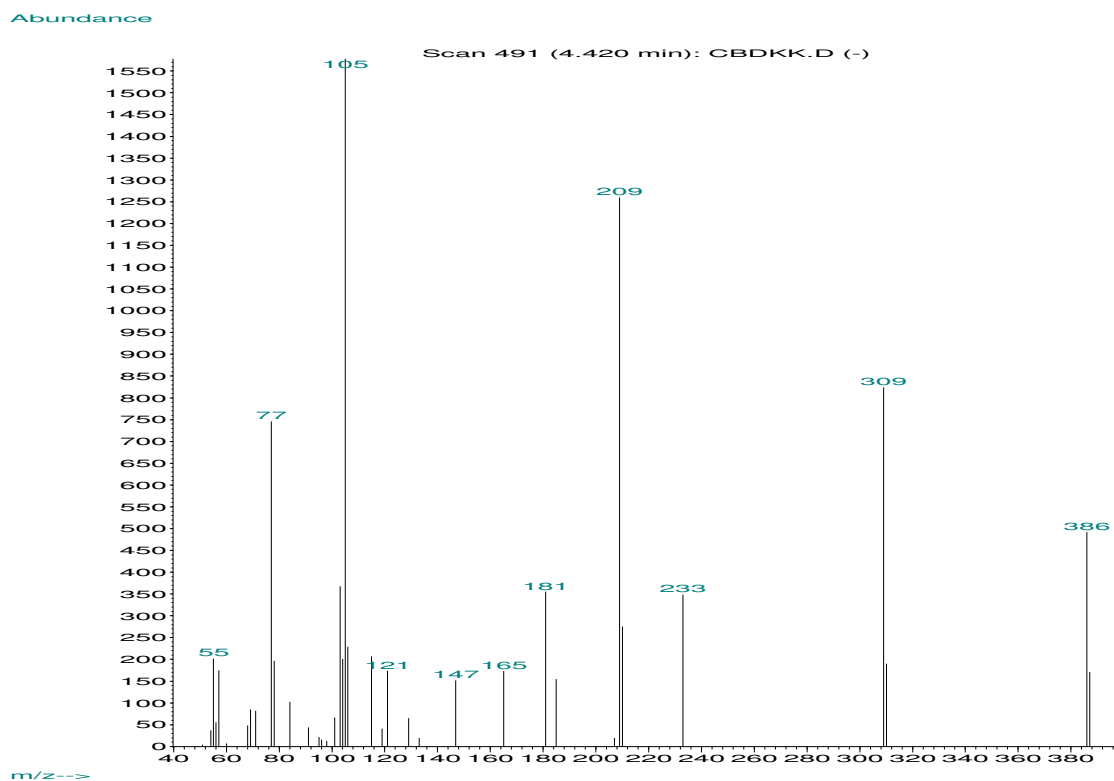


Figura 4.9 - Espectro de massa do KP derivatizado por PFPA/PFPOH e obtido por ionização electrónica, modo *full scan*.

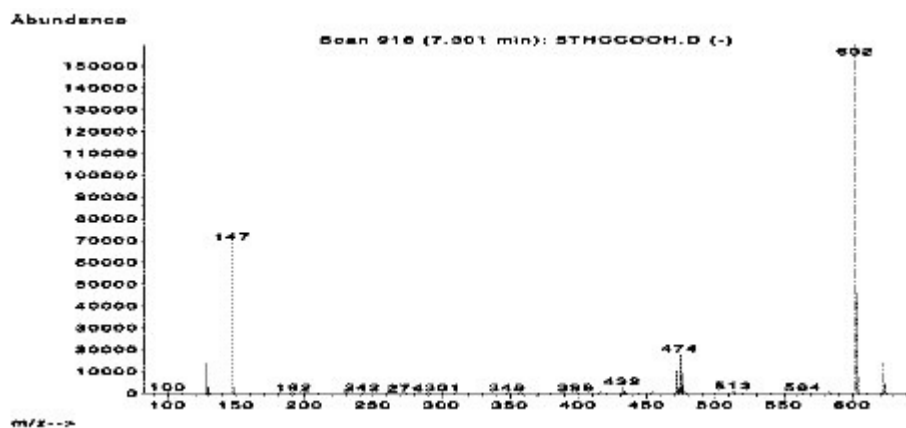


Figura 4.10 - Espectro de massa do KP derivatizado por PFPA/PFPOH e obtido por ionização química negativa com metano, modo *full scan*.

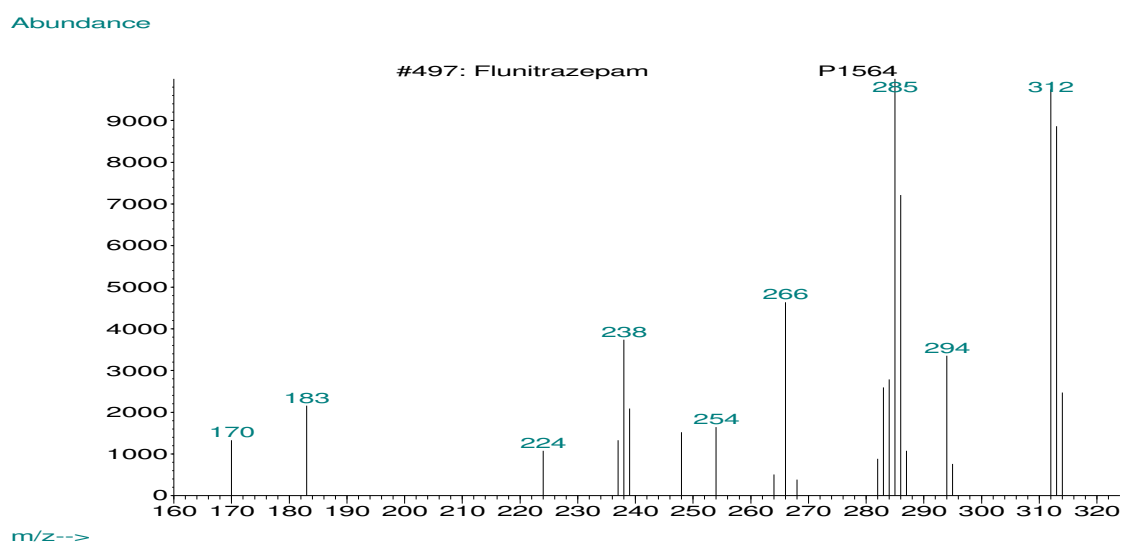


Figura 4.11 - Espectro de massa do FLU obtido por ionização electrónica, modo *full scan*.

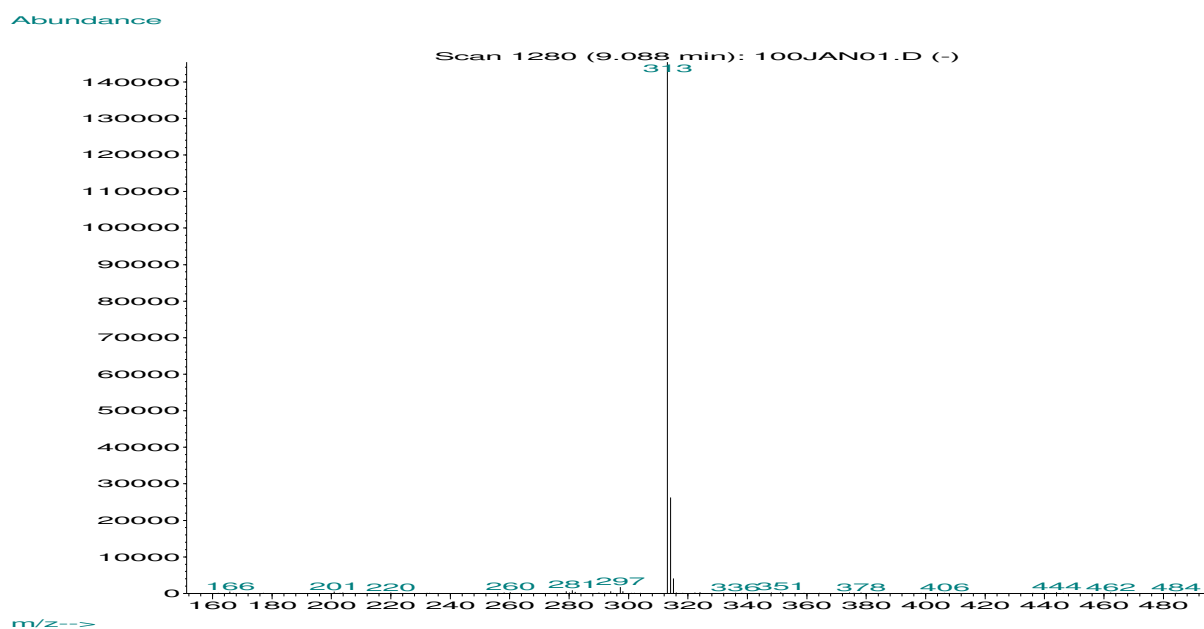


Figura 4.12 - Espectro de massa do FLU obtido por ionização química negativa com metano, modo *full scan*.

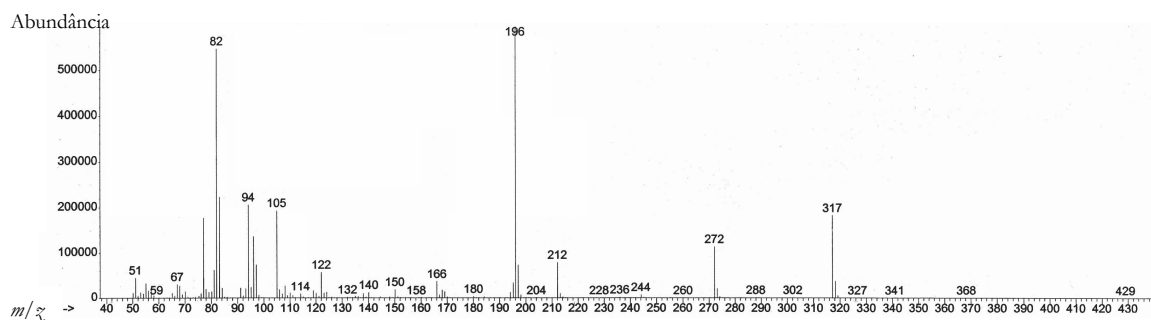


Figura 4.13 - Espectro de massa do COCE obtido por ionização electrónica, modo *full scan*.

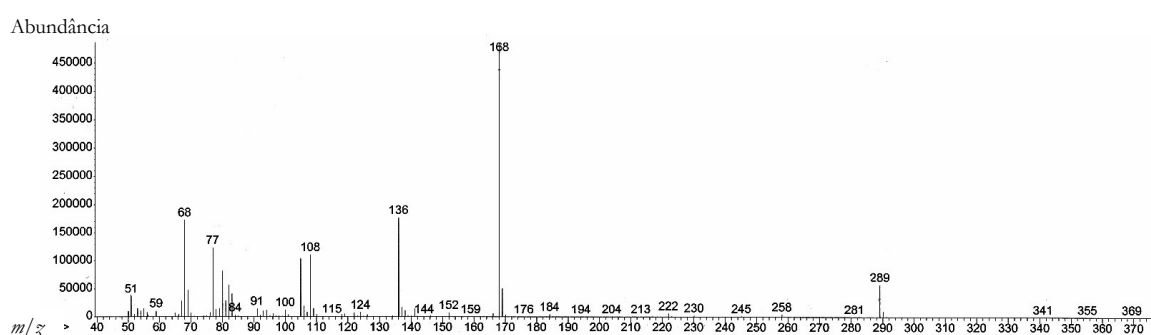


Figura 4.14 - Espectro de massa NORCOC obtido por ionização electrónica, modo *full scan*.

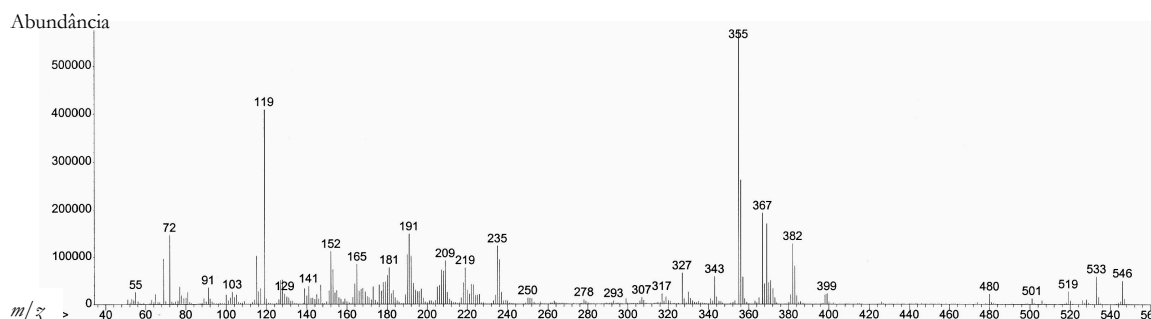


Figura 4.15 - Espectro de massa da NORMORF derivatizada por PFPA/PFPOH obtido por ionização electrónica, modo *full scan*.

Nos espectros de massa produzidos por NCI é evidente uma menor fragmentação dos compostos, quando comparados aos produzidos por EI, para os mesmos compostos (Figuras 4.4 e 4.5; 4.9 e 4.10; 4.11 e 4.12).

Os resultados obtidos permitiram identificar e quantificar, por GC/MS em modo SIM, todos os compostos em estudo, através dos seus tempos de retenção, dos iões m/z monitorizados e abundâncias relativas.

Na tabela 4.4 apresentam-se os compostos pesquisados antes e/ou após derivatização, em cada um dos sistemas de injeção, os tempos de retenção, os iões m/z monitorizados para cada analito e os usados na quantificação.

Tabela 4.4 - Tempos de retenção (t_R) e iões seleccionados (m/z) para cada analito.

Analito	Análise por GC/MS-EI, <i>Sistema 1</i>		Análise por GC/MS-NCI, <i>Sistema 2</i>		Análise por GC/MS-EI, <i>Sistema 3</i>	
	t_R (min)	Iões (m/z)	t_R (min)	Iões (m/z)	t_R (min)	Iões (m/z)
AP-PFP	0,97	<u>118</u> , 190	NA		NA	
EME-PFP	1,55	<u>182</u> , 345	NA		NA	
EMEd3-PFP (IS)	1,55	<u>185</u> , 348	NA		NA	
Ketamina (IS)	3,50	<u>180</u> , 209	NA		3,70	<u>180</u> , 209
KP-PFP (IS)	4,04	<u>209</u> , 386	5,55	<u>384</u> , 386	4,42	<u>209</u> , 386
BE-PFP	4,76	<u>300</u> , 421	NA		NA	
BE d3-PFP (IS)	4,76	<u>303</u> , 424	NA		NA	
Δ^9 -THC-PFP	5,03	<u>377</u> , 460	NA		4,99	<u>377</u> , 480
NORCOC	5,16	<u>168</u> , 289	NA		NA	
COC	5,25	<u>182</u> , 303	NA		NA	
COC d3 (IS)	5,25	<u>185</u> , 306	NA		NA	
COCE	5,52	<u>196</u> , 317	NA		NA	
MOR-2 PFP	5,61	<u>414</u> , 577	NA		NA	
MOR d3-2 PFP (IS)	5,61	<u>417</u> , 580	NA		NA	
COD-PFP	5,76	<u>282</u> , 445	NA		NA	
COD d3-PFP (IS)	5,76	<u>285</u> , 448	NA		NA	
NORMOR-2 PFP	5,90	<u>119</u> , 355	NA		NA	
Δ^9 -THC-COOH-2 PFP	6,39	<u>459</u> , 489	7,30	<u>602</u> , 603, 622	5,94	<u>459</u> , 489
CBD	6,02	<u>231</u> , 246	NA		6,21	<u>231</u> , 246
6 MAM-PFP	6,06	<u>414</u> , 473	NA		NA	
6 MAM d3-PFP (IS)	6,06	<u>417</u> , 476	NA		NA	
NAL-2 PFP (IS)	6,16	<u>440</u> , 603	NA		NA	
DIAZ	6,30	<u>283</u> , 256	7,99	<u>284</u> , 286	NA	
NORDIAZ	NA		8,39	<u>270</u> , 272	NA	
Δ^9 -THC	ND		NA		6,58	<u>299</u> , 314
CPZ	6,62	<u>58</u> , 318	NA		NA	
CBN	6,81	<u>295</u> , 310	NA		6,84	<u>295</u> , 310
FLU	6,98	<u>285</u> , 312	9,08	<u>313</u> , 314	NA	
PRAZ (IS)	7,18	<u>269</u> , 324	9,29	<u>324</u> , 326	NA	

t_R - Tempo de retenção; Os iões sublinhados são os usados na quantificação. Os restantes, são usados para confirmar a identidade do composto; NA- Não analisado; ND- Não detectado.

Pesquisaram-se nos extractos por derivatizar, no *sistema 1*, a NORCOC, COC, COCE; CBD; DIAZ, CPZ, CBN, FLU e como IS a Ketamina, COC-d3 e PRAZ e no *sistema 2*, o DIAZ, NORDIAZ, FLU e como IS o PRAZ. Nas extractos derivatizados injectados no *sistema 1* pesquisaram-se os derivados AP-PFP, EME-PFP, BE-PFP, Δ^9 -THC-PFP, MOR-2 PFP, COD-PFP, NORMOR-2 PFP, Δ^9 -THC-COOH-2 PFP, 6 MAM-PFP e como IS o EME-d3-PFP, KP-PFP, BE-d3-PFP, MOR-d3-2 PFP, COD-d3-PFP, 6 MAM-d3-PFP e NAL-2 PFP; no *sistema 2* pesquisaram-se os derivados Δ^9 -THC-COOH-2 PFP e o KP-PFP como IS

Em caso de ser detectada a presença de CBD nos extractos não derivatizados injectados no *sistema 1*, procedeu-se à injeção dos mesmos no *sistema 3*. Este procedimento deveu-se ao facto de verificármos, tal como Báez *et al.* [7], que este composto apresenta nos extractos derivatizados o mesmo tempo de retenção e fragmentação do derivado Δ^9 -THC-PFP. Consequentemente, a detecção de Δ^9 -THC-PFP em extractos derivatizados onde se tenha determinado a presença de CBD, pode significar ou não a presença efectiva do composto nas amostras em análise. No *sistema 3* é possível a separação cromatográfica e a detecção dos três canabinóides na mesma corrida, existentes nos extractos por derivatizar. A diferença entre os sistemas é apenas nas colunas usadas na separação cromatográfica, ambas de características apolares, mas a do *sistema 1* (HP Ultra 1) com menor polaridade do que a do *sistema 3* (HP Ultra 2). Caso o CBN não seja detectado nos extractos por derivatizar, o Δ^9 -THC deve ser determinado nos extractos derivatizados porque a sensibilidade é superior [11].

Na separação cromatográfica dos compostos, a utilização das colunas capilares HP Ultra 1 e HP Ultra 2 mostraram-se adequadas aos nossos objectivos, sendo também elas as usadas por outros autores, na análise das drogas e metabolitos que constam do nosso trabalho, conforme se apresentou na revisão bibliográfica (capítulo 3).

Os programas de temperaturas utilizados permitiram obter, além de uma boa separação cromatográfica, picos de interesse bem definidos, com boa resolução, sendo a análise realizada num tempo razoável, atendendo à grande diversidade de compostos a pesquisar.

O uso da silanização dos tubos de ensaio e respectivas tampas foi fundamental para a detecção do Δ^9 -THC e principalmente do Δ^9 -THC-COOH, uma vez que a não adopção deste procedimento impedia sempre a sua determinação correcta, pois parte destes compostos seriam adsorvidos. Este facto é confirmado por vários autores [78, 142, 205] e verifica-se que esta prática é também adoptada, ainda que com menor frequência, na análise de anfetaminas [265], COC, BE, EME, COCE [101, 117, 336], 6-MAM, MOR, COD, NORCOD, NORMOR, NORCOC [117].

Relativamente aos IS, a selecção do KP na quantificação do Δ^9 -THC-PFP e principalmente no que concerne à quantificação do Δ^9 -THC-COOH-2PFP deveu-se ao facto de no laboratório não estar disponível o deuterado análogo. O KP mostrou-se eficaz na quantificação deste metabolito por GC/MS-NCI e GC/MS-EI, opinião também partilhada por outros investigadores [64]. A ketamina utilizada como IS não necessita de derivatização

provando-se, pelos resultados de validação do método, que é efectiva na quantificação tanto de canabinóides como da CPZ por GC/MS-EI. Relativamente à determinação da AP com a NAL como IS, os resultados de validação não foram tão bons. Em trabalhos futuros, na tentativa de melhorar este aspecto deve utilizar-se o IS deuterado, a AP-d5 (Tabela 3.29), além de outras alterações. A NAL continua a ser utilizada, mesmo nos trabalhos mais recentes, como IS, na análise de 6-MAM, MOR, COD, COC, BE e EME [177, 218, 280], mostrando ser efectiva na quantificação dos mesmos nas amostras. Quanto à NORCOC e à NORMOR, a quantificação com os IS COC-d₃ e MOR-d₃, respectivamente, mostrou ser apropriada.

4.4 - PROCEDIMENTOS DE AVALIAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO.

VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Nas tabelas 4.5 a 4.25 apresentam-se os resultados da validação da metodologia definitiva de análise por GC/MS de 18 compostos em cabelo.

Tabela 4.5 - Parâmetros de validação para o diazepam analisado por GC/MS-EI.

Analito	LOD (ng/mg)	LOQ (ng/mg)	Intervalo de concentração ^{a)} (ng/mg de cabelo)	Recuperação ^{a)} (%)	SD (ng/mg de cabelo)	CV ^{a)} (%)	Linha de regressão	Coefficiente de correlação (r)
DIAZ	0,1	0,5	0,50	87,6	0,02	4,08	Y=0,9303x+0,4971	0,9952
			1,00	80,0	0,03	3,23		
			2,50	98,1	0,03	1,08		
			5,00	98,7	0,12	2,44		
			10,00	104,1	0,80	7,65		
			25,00	97,5	0,28	1,14		
			50,00	101,6	0,91	1,80		

^{a)}n=6; SD- Desvio padrão; CV- Coeficiente de variação

Tabela 4.6 - Parâmetros de validação para o diazepam analisado por GC/MS-NCI.

Analito	LOD (ng/mg)	LOQ (ng/mg)	Intervalo de concentração ^{a)} (ng/mg de cabelo)	Recuperação ^{a)} (%)	SD (ng/mg de cabelo)	CV ^{a)} (%)	Linha de regressão	Coefficiente de correlação (r)
DIAZ	0,005	0,01	0,50	89,0	0,02	4,66	Y=0,8374x+0,5435	0,9975
			1,00	95,0	0,027	2,85		
			2,50	95,2	0,16	6,53		
			5,00	81,3	0,40	9,81		
			10,00	100,0	0,02	0,23		
			25,00	96,3	1,38	5,71		
			50,00	82,9	2,70	6,52		

^{a)}n=6; SD- Desvio padrão; CV- Coeficiente de variação

Tabela 4.7 - Parâmetros de validação para o flunitrazepam analisado por GC/MS-EI.

Analito	LOD (ng/mg)	LOQ (ng/mg)	Intervalo de concentração ^{a)} (ng/mg de cabelo)	Recuperação ^{a)} (%)	SD (ng/mg de cabelo)	CV ^{a)} (%)	Linha de regressão	Coefficiente de correlação (r)
FLU	0,45	1,0	1,00	100,7	0,03	3,19	Y=0,9452x-0,0734	0,9962
			2,50	74,0	0,04	0,04		
			5,00	97,2	0,07	0,007		
			10,00	93,6	0,12	0,12		

^{a)}n=6; SD- Desvio padrão; CV- Coeficiente de variação

Tabela 4.8 - Parâmetros de validação para o flunitrazepam analisado por GC/MS-NCI.

Analito	LOD (ng/mg)	LOQ (ng/mg)	Intervalo de concentração ^{a)} (ng/mg de cabelo)	Recuperação ^{a)} (%)	SD (ng/mg de cabelo)	CV ^{a)} (%)	Linha de regressão	Coefficiente de correlação (r)
FLU	0,005	0,01	0,01	100,0	<0,01	<0,01	Y=1,0115x-0,0093	0,9999
			0,05	95,0	0,01	10,53		
			0,10	95,0	0,01	10,53		
			1,00	101,6	0,05	5,22		
			2,50	99,5	0,01	0,28		
			5,00	99,7	0,37	7,34		
			10,00	100,7	1,20	11,93		

^{a)}n=6; SD- Desvio padrão; CV- Coeficiente de variação

Tabela 4.9 - Parâmetros de validação para o nordiazepam analisado por GC/MS-NCI.

Analito	LOD (ng/mg)	LOQ (ng/mg)	Intervalo de concentração ^{a)} (ng/mg de cabelo)	Recuperação ^{a)} (%)	SD (ng/mg de cabelo)	CV ^{a)} (%)	Linha de regressão	Coefficiente de correlação (r)
NORDIAZ	0,006	0,01	0,50	91,0	0,04	8,19	Y= 0,9844x-0,0721	0,9998
			1,00	66,0	0,037	5,64		
			5,00	98,3	0,25	5,05		
			10,00	101,7	0,59	5,85		
			25,00	97,9	0,94	3,39		

^{a)}n=6; SD- Desvio padrão; CV- Coeficiente de variação

Tabela 4.10 - Parâmetros de validação para o Δ^9 -THC analisado por GC/MS-EI.

Analito	LOD (pg/mg)	LOQ (ng/mg)	Intervalo de concentração ^{a)} (ng/mg de cabelo)	Recuperação ^{a)} (%)	SD (ng/mg de cabelo)	CV ^{a)} (%)	Linha de regressão	Coefficiente de correlação (r)
Δ^9 -THC	20	0,1	0,10	96,7	0,01	5,34	y= 0,8402x + 0,0646	0,9984
			0,50	98,0	0,04	8,90		
			1,00	104,0	0,08	8,16		
			2,50	91,5	0,20	8,53		
			5,00	80,9	0,31	7,69		

^{a)}n=6; SD- Desvio padrão; CV- Coeficiente de variação

Tabela 4.11 - Parâmetros de validação para o Δ^9 -THC-COOH analisado por GC/MS-EI.

Analito	LOD (ng/mg)	LOQ (ng/mg)	Intervalo de concentração ^{a)} (ng/mg de cabelo)	Recuperação ^{a)} (%)	SD (ng/mg de cabelo)	CV ^{a)} (%)	Linha de regressão	Coefficiente de correlação (r)
Δ^9 -THC-COOH	0,5	1,0	1,00	77,7	0,07	8,76	y = 0,9956x - 0,1201	0,9995
			2,50	95,7	0,13	2,65		
			5,00	98,9	0,46	4,61		

^{a)}n=6; SD- Desvio padrão; CV- Coeficiente de variação**Tabela 4.12** - Parâmetros de validação para o Δ^9 -THC-COOH analisado por GC/MS-NCI.

Analito	LOD (pg/mg)	LOQ (pg/mg)	Intervalo de concentração ^{a)} (ng/mg de cabelo)	Recuperação ^{a)} (%)	SD (ng/mg de cabelo)	CV ^{a)} (%)	Linha de regressão	Coefficiente de correlação (r)
Δ^9 -THC-COOH	5	10	0,01	100,0	< 0,01	< 0,01	y = 0,9192x - 0,0277	0,9987
			0,05	88,0	0,01	12,45		
			0,10	95,0	0,01	5,77		
			1,00	92,3	0,03	3,33		
			5,00	85,9	0,15	3,49		

^{a)}n=6; SD- Desvio padrão; CV- Coeficiente de variação**Tabela 4.13** - Parâmetros de validação para o canabinol analisado por GC/MS-EI.

Analito	LOD (pg/mg)	LOQ (ng/mg)	Intervalo de concentração ^{a)} (ng/mg de cabelo)	Recuperação ^{a)} (%)	SD (ng/mg de cabelo)	CV ^{a)} (%)	Linha de regressão	Coefficiente de correlação (r)
CBN	50	0,1	0,10	76,7	0,01	6,74	y = 0,906x - 0,0611	0,9966
			0,50	76,8	0,03	6,79		
			1,00	81,0	0,04	5,18		
			2,50	88,2	0,21	9,30		
			5,00	95,8	0,41	4,29		

^{a)}n=6; SD- Desvio padrão; CV- Coeficiente de variação

Tabela 4.14 - Parâmetros de validação para o canabidiol analisado por GC/MS-EI.

Analito	LOD (pg/mg)	LOQ (ng/mg)	Intervalo de concentração ^{a)} (ng/mg de cabelo)	Recuperação ^{a)} (%)	SD (ng/mg de cabelo)	CV ^{a)} (%)	Linha de regressão	Coefficiente de correlação (r)
CBD	20	0,1	0,10	80,0	< 0,01	<0,01	$y = 0,9483x - 0,0835$	0,9996
			0,50	71,0	0,01	1,63		
			1,00	76,0	0,02	2,84		
			2,50	89,8	0,13	5,98		
			10,00	94,0	0,04	2,30		

^{a)}n=6; SD- Desvio padrão; CV- Coeficiente de variação

Tabela 4.15 - Parâmetros de validação para a 6-monoacetilmorfina analisada por GC/MS-EI.

Analito	LOD (ng/mg)	LOQ (ng/mg)	Intervalo de concentração ^{a)} (ng/mg de cabelo)	Recuperação ^{a)} (%)	SD (ng/mg de cabelo)	CV ^{a)} (%)	Linha de regressão	Coefficiente de correlação (r)
6-MAM	0,05	0,1	0,10	88,3	0,01	8,52	$Y = 0,1361x + 2,1118$	0,6788
			1,00	45,8	0,06	12,28		
			10,00	43,0	0,11	2,48		
			50,00	40,2	0,62	3,09		
			100,00	8,8	0,63	7,15		
			150,00	15,8	0,59	2,51		

^{a)}n=6; SD- Desvio padrão; CV- Coeficiente de variação

Considerando apenas o intervalo de concentração 0,1 ng/mg – 50,00 ng/mg, a linha de regressão apresenta a seguinte equação: $y = 0,4012x + 0,0894$, sendo o valor de $r = 0,9998$

Tabela 4.16 - Parâmetros de validação para a morfina analisada por GC/MS-EI.

Analito	LOD (ng/mg)	LOQ (ng/mg)	Intervalo de concentração ^{a)} (ng/mg de cabelo)	Recuperação ^{a)} (%)	SD (ng/mg de cabelo)	CV ^{a)} (%)	Linha de regressão	Coefficiente de correlação (r)	
MOR	0,02	0,1	0,10	90,0	0,01	7,03	Y=1,3233x+1,5068	0,972	
			1,00	96,3	0,08	8,00			
			5,00	112,8	0,22	3,91			
			10,00	236,5	0,53	2,26			
			50,00	132,35	0,77	1,16			
			10,00	68,2	0,18	2,61			Sem 6-MAM
			50,00	66,13	1,01	3,05			adicionada ao ensaio

^{a)}n=6; SD- Desvio padrão; CV- Coeficiente de variação

Se considerarmos o intervalo de concentração 0,10 ng/mg - 5,00 ng/mg, a equação da linha de regressão é $y=1,1352x- 0,0587$ e o valor de r é 0,9991.

Tabela 4.17 - Parâmetros de validação para a normorfina analisada por GC/MS-EI.

Analito	LOD (ng/mg)	LOQ (ng/mg)	Intervalo de concentração ^{a)} (ng/mg de cabelo)	Recuperação ^{a)} (%)	SD (ng/mg de cabelo)	CV ^{a)} (%)	Linha de regressão	Coefficiente de correlação (r)
NORMOR	0,05	0,1	0,10	100,0	<0,01	<0,01	Y=0,9782x+0,0254	0,9993
			0,50	98,7	0,01	2,34		
			1,00	97,0	0,035	3,57		
			5,00	102,5	0,09	1,79		
			10,00	97,1	0,41	4,27		

^{a)}n=6; SD- Desvio padrão; CV- Coeficiente de variação

Tabela 4.18 - Parâmetros de validação para a codeína analisada por GC/MS-EI.

Analito	LOD (ng/mg)	LOQ (ng/mg)	Intervalo de concentração ^{a)} (ng/mg de cabelo)	Recuperação ^{a)} (%)	SD (ng/mg de cabelo)	CV ^{a)} (%)	Linha de regressão	Coefficiente do correlação (r)
COD	0,03	0,1	0,10	120,0	0,01	8,33	$Y=0,9819x+0,1463$	0,9947
			0,50	91,3	0,02	3,34		
			1,00	80,0	0,02	3,34		
			2,50	68,9	0,01	0,34		
			5,00	97,0	0,15	3,12		
			10,00	97,7	0,46	4,72		

^{a)}n=6; SD- Desvio padrão; CV- Coeficiente de variação

Tabela 4.19 - Parâmetros de validação para a cocaína analisada por GC/MS-EI.

Analito	LOD (ng/mg)	LOQ (ng/mg)	Intervalo de concentração ^{a)} (ng/mg de cabelo)	Recuperação ^{a)} (%)	SD (ng/mg de cabelo)	CV ^{a)} (%)	Linha de regressão	Coefficiente de correlação (r)
COC	0,05	0,1	0,50	90,8	0,03	7,07	$Y=0,8684x-0,4263$	0,9984
			2,50	70,0	0,064	3,65		
			10,00	88,0	0,33	3,73		
			50,00	80,4	0,89	2,22		
			100,00	87,7	0,37	0,42		

^{a)}n=6; SD- Desvio padrão; CV- Coeficiente de variação

Tabela 4.20 - Parâmetros de validação para a BE analisada por GC/MS-EI.

Analito	LOD (ng/mg)	LOQ (ng/mg)	Intervalo de concentração ^{a)} (ng/mg de cabelo)	Recuperação ^{a)} (%)	SD (ng/mg de cabelo)	CV ^{a)} (%)	Linha de regressão	Coefficiente de correlação (r)
BE	0,05	0,1	0,10	92,5	0,05	5,41	Y=0,2735x+0,4667	0,9946
			0,50	83,0	0,04	8,52		
			2,50	94,8	0,11	4,77		
			5,00	50,9	0,09	3,61		
			10,00	28,6	0,07	2,38		
			40,00	26,3	0,54	5,17		
			100,00	28,1	0,52	1,84		

^{a)}n=6; SD- Desvio padrão; CV- Coeficiente de variação

Se considerarmos o intervalo de concentração 0,10 ng/mg - 2,50 ng/mg, a linha de regressão é $y = 0,9524x - 0,0181$ e o $r = 0,9995$.

Tabela 4.21 - Parâmetros de validação para o EME analisado por GC/MS-EI.

Analito	LOD (ng/mg)	LOQ (ng/mg)	Intervalo de concentração ^{a)} (ng/mg de cabelo)	Recuperação ^{a)} (%)	SD (ng/mg de cabelo)	CV ^{a)} (%)	Linha de regressão	Coefficiente de correlação (r)
EME	0,04	0,1	0,10	106,7	0,01	10,83	Y=0,7742x-0,0416	0,9988
			0,50	81,3	0,05	12,60		
			1,00	71,0	0,00	0,00		
			2,50	68,0	0,01	0,83		
			5,00	76,5	0,03	0,80		
			10,00	77,5	0,16	2,03		

^{a)}n=6; SD- Desvio padrão; CV- Coeficiente de variação

Tabela 4.22 - Parâmetros de validação para o cocaetileno analisado por GC/MS-EI.

Analito	LOD (ng/mg)	LOQ (ng/mg)	Intervalo de concentração ^{a)} (ng/mg de cabelo)	Recuperação ^{a)} (%)	SD (ng/mg de cabelo)	CV ^{a)} (%)	Linha de regressão	Coefficiente de correlação (r)
COCE	0,05	0,1	0,10	53,3	0,01	9,68	Y=0,8959x-0,0554	0,9993
			0,50	70,0	0,04	10,17		
			1,00	71,5	0,01	1,93		
			5,00	91,73	0,02	0,33		
			10,00	88,35	0,21	2,32		

^{a)}n=6; SD- Desvio padrão; CV- Coeficiente de variação

Tabela 4.23 - Parâmetros de validação para a norcocaína analisada por GC/MS-EI.

Analito	LOD (ng/mg)	LOQ (ng/mg)	Intervalo de concentração ^{a)} (ng/mg de cabelo)	Recuperação ^{a)} (%)	SD (ng/mg de cabelo)	CV ^{a)} (%)	Linha de regressão	Coefficiente de correlação (r)
NORCOC	0,05	0,1	0,50	73,0	0,03	8,96	Y=0,8452x-0,0713	0,9997
			1,00	70,33	0,05	6,40		
			5,00	82,4	0,15	3,60		
			10,00	84,1	0,28	3,35		

^{a)}n=6; SD- Desvio padrão; CV- Coeficiente de variação

Tabela 4.24 - Parâmetros de validação para anfetamina analisada por GC/MS-EI.

Analito	LOD (ng/mg)	LOQ (ng/mg)	Intervalo de concentração ^{a)} (ng/mg de cabelo)	Recuperação ^{a)} (%)	SD (ng/mg de cabelo)	CV ^{a)} (%)	Linha de regressão	Coefficiente de correlação (r)
AP	0,05	0,1	0,30	157,8	0,06	12,38	Y=0,9454x-0,0678	0,9796
			1,00	76,2	0,26	33,50		
			2,50	74,6	0,54	29,19		
			5,00	97,7	0,13	2,67		

^{a)}n=6; SD- Desvio padrão; CV- Coeficiente de variação

Tabela 4.25 - Parâmetros de validação para a clorpromazina analisada por GC/MS-EI.

Analito	LOD (ng/mg)	LOQ (ng/mg)	Intervalo de concentração ^{a)} (ng/ mg de cabelo)	Recuperação ^{a)} (%)	SD (ng/ mg de cabelo)	CV ^{a)} (%)	Linha de regressão	Coefficiente de correlação (r)
CPZ	0,1	0,5	0,50	98,0	0,01	2,51	$Y=0,9733x+0,008$	1
			1,00	99,5	0,05	4,65		
			2,50	99,3	0,15	6,06		
			5,00	97,7	0,26	5,36		
			10,00	97,3	0,24	2,49		

^{a)}n=6; SD- Desvio padrão; CV- Coeficiente de variação

4.4.1- Selectividade

A selectividade ou especificidade é a capacidade de um método analítico diferenciar o analito da presença de outros constituintes na amostra, e refere-se ao poder de discriminação entre o analito e as substâncias (isómeros, metabolitos, produtos de degradação, substâncias endógenas, constituintes da matriz ou de outras substâncias exógenas interferentes). Para avaliar a especificidade do procedimento analítico foram utilizadas seis amostras de cabelo isento de drogas obtidas em diferentes indivíduos. Cada amostra de cabelo branco (isento de drogas) foi submetida ao processo de isolamento e extração do método a validar e analisada por GC/MS-EI (*sistema 1*) e GC/MS-NCI (*sistema 2*), antes e após derivatização, nas condições descritas. Os resultados foram comparados com os obtidos pela a injeção da solução aquosa do analito, nas mesmas condições, a uma concentração próxima do limite de quantificação (LOQ). A avaliação foi efectuada verificando a ausência ou a existência de interferentes (picos com um *ratio* sinal/ ruído < 2:1) nos tempos de retenção dos analitos nos cromatogramas dos dois, ou três iões monitorizados de cada composto, obtidos pela análise por GC/MS-EI e GC/MS-NCI, antes e após derivatização. Pelo método desenvolvido, os brancos não apresentaram interferentes.

4.4.2 – Linearidade

Este parâmetro representa uma medida da proporcionalidade existente entre os resultados obtidos e a concentração do analito. Nos métodos cromatográficos determina-se através da construção de curvas de calibração com soluções padrão de concentrações conhecidas e com os IS. O coeficiente de correlação serve de indicador da linearidade do método. Cada curva de calibração padrão foi efectuada com 4 - 7 pontos, abrangendo para cada composto uma gama de concentrações esperadas nas amostras de cabelo a analisar. Desta forma, a amplitude de concentrações foi variável para cada composto, encontrando-se especificada na tabela 4.26.

Tabela 4.26 - Concentração dos diferentes analitos nas misturas utilizadas nos ensaios de linearidade, recuperação e precisão.

Analito	Mistura 1 (ng/mg)	Mistura 2 (ng/mg)	Mistura 3 (ng/mg)	Mistura 4 (ng/mg)	Mistura 5 (ng/mg)	Mistura 6 (ng/mg)	Mistura 7 (ng/mg)
AP	0,30	1,00	2,50	5,00	---	---	---
EME	0,10	0,50	1,00	2,50	5,00	10,00	---
EME d ₃ ^{a)}	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	---
KP ^{a)}	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
BE	0,10	0,50	2,50	5,00	10,00	40,00	100,00
BE d ₃ ^{a)}	0,50	0,50	0,5	0,50	0,50	0,50	0,50
THC	0,10	0,50	1,00	2,50	5,00	---	---
NORCOC	0,50	1,00	5,00	10,00	---	---	---
COC	0,50	2,50	10,00	50,00	100,00	---	---
COC-d ₃ ^{a)}	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	---	---
COCE	0,10	0,50	1,00	5,00	10,00	---	---
MOR	0,10	1,00	5,00	10,00	50,00	---	---
MOR-d ₃ ^{a)}	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	---	---
COD	0,10	0,50	1,00	2,50	5,00	10,00	---
COD-d ₃ ^{a)}	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	---
NORMOR	0,10	0,50	1,00	5,00	10,00	---	---
THC-COOH	0,01	0,05	0,10	1,00	2,50	5,00	---
6-MAM	0,10	1,00	10,00	50,00	100,00	150,00	---
6-MAM d ₃ ^{a)}	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	---
NAL ^{a)}	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	---
DIAZ	0,50	1,00	2,50	5,00	10,00	25,00	50,00
NORDIAZ	0,50	1,00	5,00	10,00	25,00	---	---
CPZ	0,50	1,00	2,50	5,00	10,00	---	---
CBN	0,10	0,50	1,00	2,50	5,00	---	---
CBD	0,10	0,50	1,00	2,50	10,00	---	---
FLU	0,01	0,05	0,10	1,00	2,50	5,00	10,00
PRAZ ^{a)}	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Ketamina ^{a)}	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	---

a) Padrões internos

As curvas de calibração das drogas padrão foram realizadas nas diferentes concentrações referidas na tabela 4.26.

As curvas de calibração das drogas em cabelo foram obtidas a partir da matriz isenta de drogas e fortificada com os padrões apresentados na tabela 4.26. Para cada nível de concentração foram usadas seis réplicas ($n=6$), sendo cada uma submetida ao procedimento descrito para libertação, extracção e análise das drogas do cabelo por GC/MS-EI e GC/MS-NCI, antes e após derivatização.

A linearidade foi boa, muito boa e excelente para os compostos em estudo ($> a 0,99$, $> a 0,999$ e igual a $1,0$).

- Para as benzodiazepinas: o DIAZ apresentou um $r > a 0,99$, por EI e NCI, o NORDIAZ e o FLU um $r > a 0,999$, por NCI e, ainda, o FLU um $r > a 0,99$, por EI.

- Para os canabinóides: o Δ^9 -THC teve um $r > a 0,99$, por EI, o Δ^9 -THC-COOH um $r > a 0,999$, por EI e um $r > a 0,99$, por NCI; o CBN apresentou um $r > a 0,99$, por EI e o CBD um $r > a 0,999$, por EI.

- Para os opiáceos, por EI, a 6-MAM teve um r , somente, $> a 0,68$ (este valor seria bem melhor considerando apenas as concentrações entre $0,1 \text{ ng/mg}$ e $50,0 \text{ ng/mg}$ – $r > 0,99$); a MOR apresentou um $r > 0,972$ (este valor foi também melhor, considerando um intervalo de $0,10 \text{ ng/mg}$ a $5,00 \text{ ng/mg}$ – $r > 0,999$); a NORMOR evidenciou um $r > a 0,999$, e a COD um $r > a 0,99$.

-Para a cocaína, por EI: a COC, a BE e a EME apresentaram um $r > a 0,99$ e o COCE e a NORCOC um $r > a 0,999$.

- Para a anfetamina, por EI, foi obtido um $r > a 0,97$. Este valor deverá ser resultante das dificuldades ligadas à sua volatilidade e talvez pelo IS não ter sido o mais adequado.

- Para a fenotiazina, CPZ, por EI, foi obtido um $r = a 1,0$ (resultado excelente).

4.4.3 – Recuperação

A recuperação foi determinada para diferentes concentrações de analito nas amostras.

Amostras de cabelo isentas de droga (50 mg) foram fortificadas com todas as drogas e metabolitos a estudar nas concentrações apresentadas na tabela 4.26 (para cada nível de concentração foram usadas seis réplicas). Tais amostras foram submetidas aos procedimentos de isolamento e extracção do método de análise. Só depois da extracção e exactamente antes da reconstituição do extracto ou da derivatização, é que se adicionaram a todas as amostras os padrões internos. Analisaram-se as amostras no *sistema 1 e 2* antes e pós derivatização. Na

tabela 4.1 já se referiram os padrões internos usados na quantificação de cada composto. A recuperação foi avaliada comparando os resultados obtidos por estas amostras com os da curva de calibração de drogas e metabolitos padrão.

A recuperação foi na generalidade boa. Apresentam-se, de seguida, a média das recuperações, em percentagem:

- Para as benzodiazepinas as recuperações foram muito boas. Obteve-se 95,37%; 91,39%; 90,98%; 91,38 e 98,79%, respectivamente, para a DIAZ, por EI e NCI; para NORDIAZ; por NCI; e para a FLU, por EI e NCI.

- Para os canabinóides as recuperações foram boas.

Os valores obtidos foram: 94,22%; 90,77%; 83,70%; 82,16% para, respectivamente, Δ^9 -THC; Δ^9 -THC-COOH; CBN; e CBD, por EI, e 94,22% para o Δ^9 -THC-COOH, por NCI.

- Para os opiáceos as recuperações, por EI, foram variáveis.

Para a 6-MAM obteve-se 40,31% para concentrações entre 0,1 ng/mg e 150,0 ng/mg. Os resultados seriam um pouco melhores para concentrações inferiores a 50,0 ng/mg. Para a MOR foi de 133,59%, sendo também melhores (99,70%) caso não fossem contemplados os dois níveis elevados. A diminuição da recuperação da 6-MAM com o aumento concomitante da MOR resulta do facto da 6-MAM se hidrolisar em MOR. Esta hidrólise ocorre fundamentalmente durante a digestão enzimática, conforme se comprovou analisando amostras padrão com e sem a hidrólise enzimática. Investigadores que têm utilizado a mesma enzima na análise de 6-MAM [62, 314] referem-se a uma menor conversão. Para a COD e NORMOR foram, respectivamente, de 92,48% e 99,06%.

- Para a cocaína, por EI, as recuperações foram boas.

A COC obteve 83,38%. A da BE foi 80,30%, até 5,0 ng/mg. Acima deste valor as recuperações foram más. A recuperação de extracção é inferior à da COC pela maior polaridade que o composto apresenta [352]. Atendendo a que para baixas concentrações de BE (até 2,5 ng/mg) as recuperações obtidas se encontram dentro dos valores referidos na literatura (70% [300], 75% [214]), uma das explicações possíveis relaciona-se com o volume e o tipo de solvente usado no processo extractivo podendo não ser o mais adequado, para extracção de concentrações mais elevadas de BE presentes nas amostras. As recuperações para a EME; COCE; NORCOC foram, respectivamente, 80,17%; 74,98%; e 77,46%.

- Para a anfetamina, por EI, a recuperação foi 82,83%, com eliminação do nível 0,3 ng/mg. Como já foi referido anteriormente verificaram-se dificuldades com este composto as quais não puderam ser ultrapassadas.

- Para a fenotiazina, CPZ, por EI, a recuperação foi muito boa (98,36%).

4.4.4 – Precisão

A precisão foi determinada fortificando o cabelo a diferentes concentrações de drogas e metabolitos (Tabela 4.26), mantendo também a mesma concentração do IS. Para o mesmo nível de concentração usaram-se seis réplicas e procedeu-se à sua análise (*sistema 1 e sistema 2*). A precisão foi calculada pelos coeficientes de variação, em percentagem.

A precisão foi na generalidade boa. Os resultados obtidos foram inferiores a 15,00%. Segundo Jiménez *et al.* [129] são aceitáveis os CV de 25,00% e de 15,00% em amostras controlo positivo de baixas concentrações e altas concentrações, respectivamente. Apresenta-se a média dos CVs.

-Para as benzodiazepinas a precisão foi boa. O DIAZ obteve CV de 3,06%, por EI e de 5,18%, por NCI. Para o FLU o CV foi de 0,84%, por EI e 6,55%, por NCI. Para o NORDIAZ o CV foi 5,62%.

-Para os canabinóides as precisões foram boas. O Δ^9 -THC obteve um CV de 7,72%, por EI. Para o Δ^9 -THC-COOH foi de 5,34%, por EI e de 5,01% por NCI. Para o CBN e CBD foram, respectivamente, de 6,46% e 2,55%.

- Para os opiáceos foram também boas, por EI. A 6-MAM obteve 6,01%, a MOR 4,47%, a NORMOR 2,39% e a COD 3,87%.

- Para a cocaína os resultados foram bons, por EI. A COC obteve 3,42%, a BE 4,53%, a EME 4,52%, COCE 4,89% e a NORCOC 5,58%.

- Para a anfetamina, por EI, o CV foi de 19,44% com um pico máximo de 33,50%. Este resultado foi insatisfatório.

-Para a CPZ o CV foi de 4,21%.

4.4.5 – Limite de detecção e quantificação

O LOD corresponde ao menor valor de concentração do analito numa amostra, o qual produz um sinal que se diferencia, com confiança, do ruído de fundo inerente ao procedimento analítico adoptado.

O LOQ é a mais baixa concentração do analito presente na amostra, a qual pode ser quantificada com exactidão e precisão aceitáveis [103].

Para determinar o LOD e o LOQ analisaram-se amostras de cabelo, isentas de droga, às quais se adicionaram concentrações decrescentes dos analitos (próximas do LOD esperado).

4.4.5.1- Limite de detecção

Os LOD's foram determinados com base na verificação da seguinte condição: *ratio* sinal/ruído = 3:1, para os dois ou três iões monitorizados em cada composto, na análise por GC/MS-EI e/ou GC/MS-NCI, antes e após derivatização, nas condições descritas.

Relativamente ao LOQ, considerou-se o valor de concentração que produz um *ratio* sinal/ruído de 10, do ião m/z de quantificação usado para cada composto.

Os LOD's obtidos foram bons.

- Para as benzodiazepinas estudadas foram muito bons, por GC/MS-NCI. O determinado para o DIAZ (5 pg/mg) foi < aos mencionados em trabalhos publicados [48, 169, 248, 371, 372]. O encontrado para o NORDIAZ (6 pg/mg) foi < aos dos estudos de outros investigadores [160, 248, 354, 371, 372]. O obtido para o FLU (5 pg/mg) foi também < à maioria dos referidos em vários trabalhos [48, 54, 55], mas > ao de um trabalho [239].

- Para os canabinóides foram bons. O do Δ^9 -THC, por EI, foi 20 pg/mg, sendo este limite inferior aos apresentados por vários investigadores [47, 51, 56, 180, 227, 268, 303, 326]. O LOD encontrado para o Δ^9 -THC-COOH, por NCI (5 pg/mg), foi \leq aos apresentados noutras referências [114, 135, 137, 156] e > aos de outras [203, 221]. Para o CBN e CBD, por EI, foram, respectivamente, de 50 pg/mg e de 20 pg/mg, sendo < aos de outros estudos [180, 268].

- Para os opiáceos, por EI, foram muito bons. Para a 6-MAM (0,05 ng/mg) foi < aos de outros trabalhos [9, 19, 166, 248, 281, 283, 328, 359], igual a alguns referidos por diversos autores [93, 308, 323, 371] e superior relativamente a poucos trabalhos [217, 371]. Para a MOR foi 0,02 ng/mg, sendo < aos de outros estudos [19, 93, 166, 283, 308, 323, 328, 359, 359]. Para a NORMOR e COD foram, respectivamente, 0,05 ng/mg e 0,03 ng/mg. Este valor foi para a NORMOR < ao apresentado na literatura [359]. Para a COD foi inferior aos

apresentados por vários investigadores [9, 19, 93, 123, 166, 328, 359] e superior apenas relativamente a um estudo [371].

- Para a cocaína foram bons. Para a COC, BE, COCE e NORCOC foram de 0,05 ng/mg e para a EME de 0,04 ng/mg. Comparativamente a alguns conhecidos [63, 87, 93, 101, 214, 248, 268, 308, 323, 328, 336, 359, 371] são < a todos os compostos, sendo igual para a COC em três trabalhos publicados [158, 166, 281].

- Para a anfetamina foi 0,05 ng/mg, igual ao mencionado num trabalho [159], inferior relativamente a um número considerável de trabalhos [100, 243, 265, 268, 285, 303, 308] e superior a outros [140, 229, 248, 275].

Para a CPZ obtivemos um valor de 1 ng/mg, o qual é superior ao obtido por outros autores [306].

4.4.5.2 - Limite de Quantificação

Para as BZD foram muito bons:

Para o DIAZ foi 1,0 ng/mg, por EI, e 10,0 pg/mg, por NCI. Para o NORDIAZ foi 0,5 ng/mg, por EI, e 10,0 pg/mg, por NCI. Para o FLU foi 1,0 ng/mg, por EI, e 10,0 pg/mg, por NCI.

Para os canabinóides foram bons: para o Δ^9 -THC foi 0,1 ng/mg, por EI. Para o Δ^9 -THC-COOH foi 1,0 ng/mg, por EI e 10,0 pg/mg, por NCI. Para o CBN e CBD foi 0,1 ng/mg, por EI.

Para os opiáceos, por EI, foram muito bons: para 6-MAM, MOR, COD e NORMOR foram 0,1 ng/mg.

Para a cocaína, por EI, foram muito bons. Para a COC, BE, EME, COCE e NORCOC foram 0,1 ng/mg.

Para a AP, por EI, foi 0,1 ng/mg.

Para a CPZ foi 0,5 ng/mg, por EI.

Na interpretação dos resultados é essencial o estabelecimento dos limites de positividade.

Considerámos como *cut-off* os LOQ's determinados no nosso estudo.

Para as benzodiazepinas, foram de 5 ou 6 pg/mg para todas. Para comparação só temos um valor o qual se refere ao NORDIAZ [160] que é > ao nosso.

Para os canabinóides o *cut-off* relativo ao Δ^9 -THC-COOH é inferior ao referido apenas num trabalho [156], igual ao mencionado noutro [137] e superior à maioria dos trabalhos [33, 221, 345, 346].

Nos opiáceos o *cut-off* para a 6-MAM é inferior aos de alguns trabalhos [217, 252] e é igual a outros [218, 348].

Para a cocaína, BE e EME os *cut-off* foram inferiores a alguns publicados [158, 167, 182, 217, 218, 252, 347] e iguais a outros [101, 300].

Para a anfetamina foi menor do que alguns adoptados por diversos investigadores [57, 100, 152, 365] e > a outros [182, 348].

Para a CPZ não temos termo de comparação, no entanto foi referido por investigadores [306] um valor máximo de 0,5 ng/mg como LOD.

CAPÍTULO 5

**Análise de drogas e metabolitos por
GC/MS-EI e GC/MS-NCI, em cabelo -
Aplicação da metodologia desenvolvida na
análise de amostras reais.**

5.1 - PREPARAÇÃO E TRATAMENTO DAS AMOSTRAS

A metodologia de isolamento, extracção e análise por nós desenvolvida [11] foi utilizada na determinação de drogas (terapêuticas e não terapêuticas) em 87 amostras de cabelo obtidas em 75 indivíduos que prestaram depoimento em tribunal por delitos cometidos relacionados com a droga. Nas análises às amostras de cabelo, embora pudéssemos realizar a quantificação através das curvas de calibração das drogas em cabelo, relativas à metodologia seguida, utilizaram-se amostras de controlo positivo a dois níveis de concentração. Nas figuras 5.1 a 5.4 apresentam-se os TIC de um destes controlos detectados por GC/MS-EI e GC/MS-NCI, antes e após derivatização.

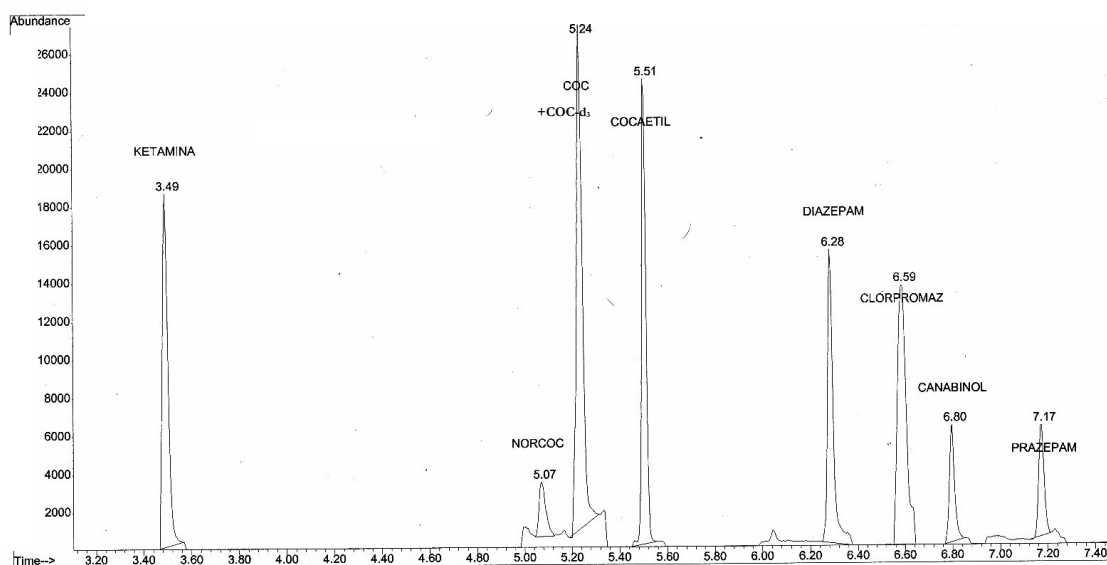


Figura 5.1 - TIC obtido por injeção no *sistema 1* da amostra controlo positivo, antes do processo de derivatização. Esta amostra não foi fortificada com CBD para que no extracto derivatizado fosse determinado o Δ^9 -THC. O FLU foi adicionado a uma concentração (0,1 ng/mg) inferior ao LOD. As concentrações finais para: ketamina, NORCOC, PRAZ, COC, COC-d₃, COCE, DIAZ e PRAZ foram de 5,00 ng/mg; CPZ e CBN foram de 1,00 ng/mg.

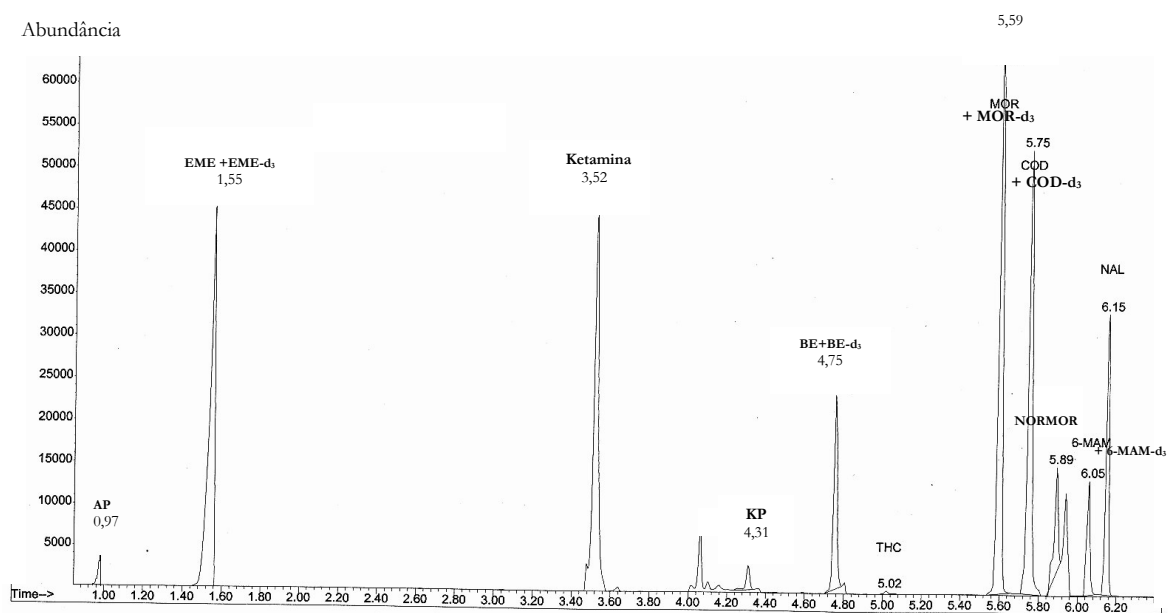


Figura 5.2 - TIC obtido por injeção no *sistema 1* da amostra controle positivo, depois do processo de derivatização. O Δ^9 -THC-COOH foi adicionado a uma concentração (0,1 ng/mg) inferior ao LOD. As concentrações finais para: AP, EME, EME-d₃, Ketamina, BE, BE-d₃, MOR, MOR-d₃, COD, COD-d₃, NORMOR e NAL foram de 5,00 ng/mg; 6-MAM e 6-MAM-d₃, foram de 10 ng/mg; KP e Δ^9 -THC foram de 1,00 ng/mg.

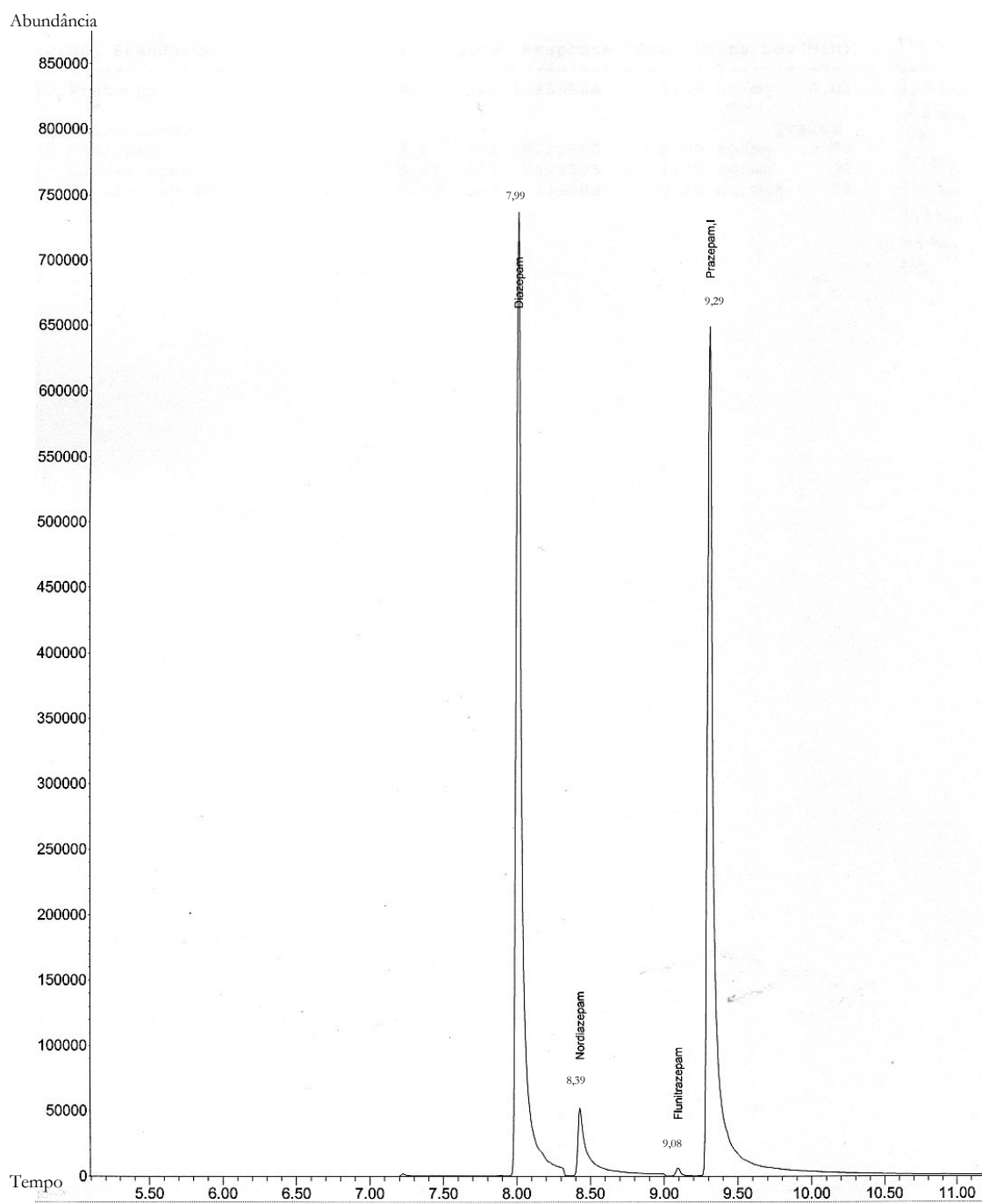


Figura 5.3 - TIC obtido por injeção no *sistema 2* da amostra controlo positivo, antes do processo de derivatização. As concentrações finais de PRAZ e DIAZ foram de 5,00 ng/mg, a de NORDIAZ foi de 1,00 ng/mg, a de FLU foi de 0,1 ng/mg.

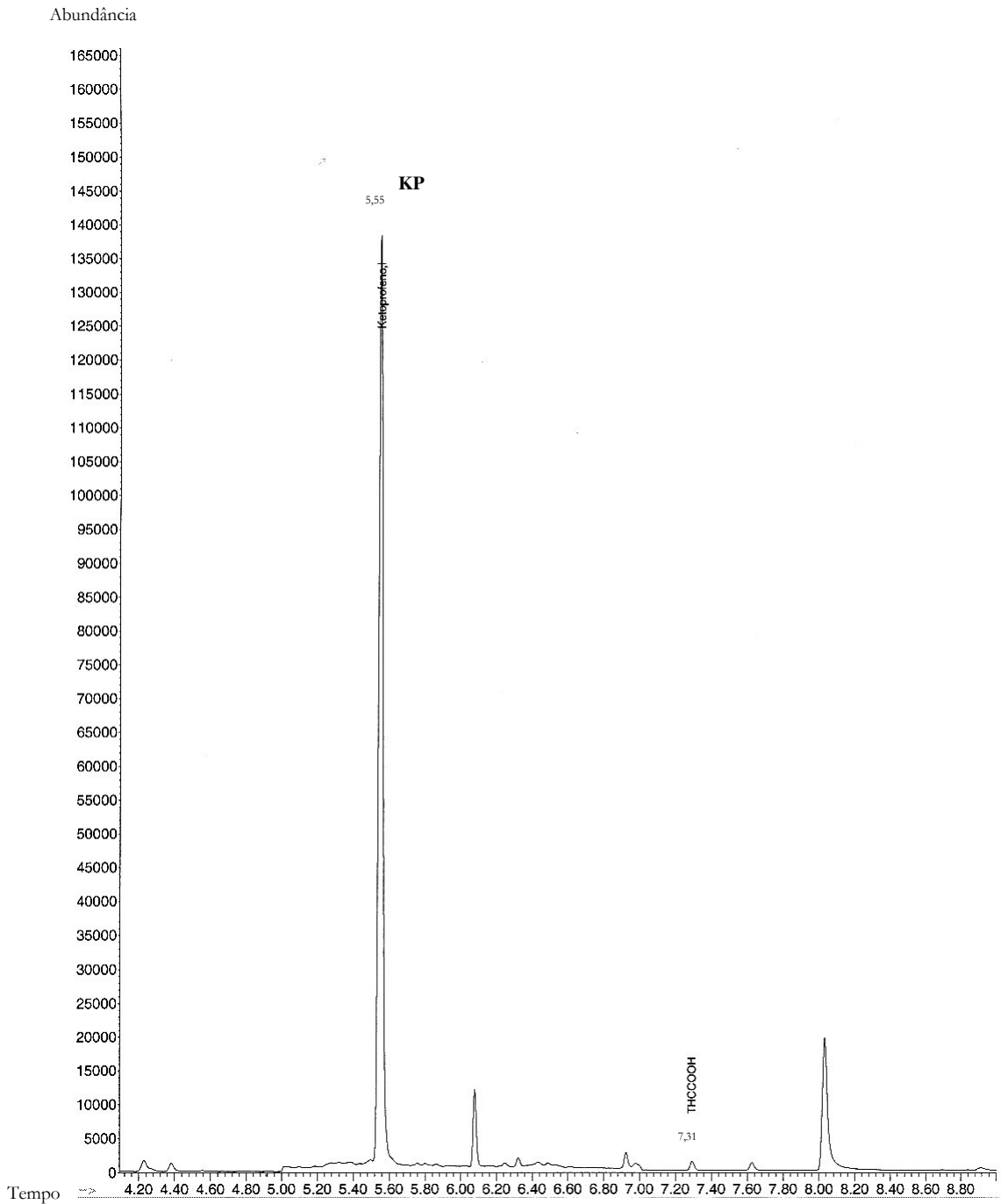


Figura 5.4 - TIC obtido por injeção no *sistema 2* da amostra controlo positivo, depois do processo de derivatização. A concentração final de Δ^9 -THC-COOH foi de 0,1 ng/mg e a de KP foi de 1,00 ng/mg.

Foram analisadas, por GC/MS-EI, 87 amostras (segmentos de cabelo) pesquisando-se simultaneamente as seguintes drogas e metabolitos: DIAZ, FLU, Δ^9 -THC, Δ^9 -THC-COOH, COC, BE, EME, 6-MAM, MOR, COD, CPZ e AP. A pesquisa de NORMOR foi efectuada apenas em 63 dessas amostras, a de COCE e de NORCOC, em 67 amostras, a de CBN e CBD, em 77 amostras.

As 87 amostras foram igualmente analisadas por GC/MS-NCI pesquisando-se o Δ^9 -THC-COOH e, em 77 dessas amostras, pesquisou-se o DIAZ, NORDIAZ e o FLU (Tabelas 5.1 e 5.2).

5.2 - CONDIÇÕES DE POSITIVIDADE

Na identificação e quantificação das substâncias presentes nas amostras adoptaram-se os procedimentos recomendados na legislação (Despacho nº 11055/98). Assim, para que uma amostra fosse considerada positiva para uma determinada substância verificámos os seguintes parâmetros, na sua identificação:

- Coincidência de eluição, no tempo de retenção característico da substância padrão correspondente;
- O valor máximo do pico mais próximo, no cromatograma, separado do pico correspondente à substância em análise, pelo menos, numa largura total de 10% da altura máxima;
- Tempo de retenção relativo da substância em análise, idêntico ao da substância padrão, nas mesmas condições experimentais (margem de $\pm 0,5\%$);
- Coincidência entre os espectros de massa da substância em análise e da substância padrão ou, identificação da substância em análise por pelo menos dois iões de controlo (sempre que possível, incluiu-se o ião molecular) com uma abundância relativa correspondendo à da substância padrão.

5.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados quantitativos e qualitativos constam nas tabelas 5.1 e 5.2, respectivamente.

Tabela 5.1- Resultados quantitativos da análise de drogas e metabólitos em 87 amostras de cabelo.

Compostos	<i>DIAZ</i>	Δ^9 - <i>THC</i>	<i>CBD</i>	<i>CBN</i>	<i>6-MAM</i>	<i>MOR</i>	<i>NORMOR</i>	<i>COD</i>	<i>COC</i>	<i>BE</i>	<i>EME</i>	<i>COCE</i>	<i>NORCOC</i>	<i>AP</i>	<i>CPZ</i>	<i>DIAZ</i>	<i>NORDIA</i>	<i>FLU</i>	Δ^9 - <i>THC-COOH</i>
	<i>GC/MS-EI</i>														<i>GC/MS-NCI</i>				
Casos analisados	75	75	68	68	75	75	55	75	75	75	75	58	58	75	75	67	67	67	75
Casos positivos	7	8	19	2	67	68	11	61	54	26	20	2	0	0	0	67	51	31	18
Amostras analisadas	87	87	78	78	87	87	63	87	87	87	87	67	67	87	87	77	77	77	87
Amostras positivas	9	8	20	3	76	77	11	68	60	26	21	2	0	0	0	77	58	35	18
Intervalo (ng/mg)	0,91-5,77	0,03-0,28	0,04-0,47	0,21-0,38	1,203-1456,1	0,03-78,41	1,9-5,77	0,04-10,25	0,23-90,00	1,47-67,77	0,05-1,5	0,44-1,9	---	---	---	0,01-4,36	0,01-1,05	0,01-1,72	0,01-0,09
Média (ng/mg)	2,36	0,198	0,162	0,303	51,93	2,88	3,36	0,99	4,89	8,04	0,40	1,17	ND	ND	ND	0,13	0,15	0,26	0,028

A NORCOC, CPZ e a AP não foram detectadas em nenhuma amostra, onde foram pesquisadas.

Os opiáceos foram os compostos mais detectados sugerindo que são entre as drogas analisadas as mais consumidas. A 6-MAM foi detectada em 76 amostras (89,33% dos casos analisados) as quais também possuíam MOR. A MOR foi o analito detectado com maior frequência registando-se a sua presença em 77 amostras (90,6% dos casos analisados). A codeína foi detectada em 68 amostras (81,33% dos casos analisados), nas quais também estavam presentes 6-MAM e MOR. Deste modo, não foi detectada COD em todas as amostras onde se detectaram 6-MAM e MOR. A NORMOR foi detectada em 9 amostras das 63 em que foi pesquisada (20% dos casos em que foi analisada). Todos os casos positivos para a NORMOR também o foram para 6-MAM, MOR e COD.

Relativamente às concentrações determinadas, para o grupo dos opiáceos, verificou-se a relação 6-MAM > MOR > COD. A concentração de NORMOR foi sempre menor que a de 6-MAM e superior à concentração de COD. Apenas em quatro, das nove amostras em que foi detectada, a NORMOR apresentou concentração inferior à de MOR.

Os resultados para os opiáceos foram, assim, semelhantes aos obtidos por vários autores [216, 328] no que concerne à maior concentração de 6-MAM seguida da de MOR e por último da de COD. O facto da heroína se transformar rapidamente em 6-MAM e MOR fazem com que a sua detecção no sangue e na urina seja bastante difícil. A sua identificação nessas matrizes revela um uso recente de heroína; ao contrário, aqueles dois compostos, tal como a COC ligam-se rapidamente (após o consumo) ao cabelo e permanecem inalterados o que torna possível a sua detecção por um período longo [328].

No que concerne à COC, esta droga foi detectada em 60 amostras das 87 analisadas. Em 16 dessas amostras, a COC detectou-se conjuntamente com os metabolitos BE e a EME. Em 2 amostras a COC foi detectada conjuntamente com a BE, a EME e o COCE. O COCE foi detectado apenas nestas duas amostras. Em 8 amostras detectou-se apenas conjuntamente a COC e a BE, em 2 amostras COC e EME e em 32 amostras a COC foi detectada isoladamente, i.e. sem que os metabolitos o fossem.

A NORCOC não foi detectada em nenhuma amostra.

Relativamente às concentrações determinadas, para o grupo da COC e metabolitos, verificou-se que a concentração de EME foi sempre inferior à determinada para COC e BE. Nas amostras em que detectou simultaneamente COC e BE, a concentração de COC, excedeu a de BE em 12 amostras, e a de BE excedeu a de COC em 14 amostras. Este resultado sugere

a formação do metabolito durante uma das etapas do processo que antecede a análise, uma vez que é possível a formação *in vitro* de metabolitos da COC, por hidrólise básica [328]. A COC deveria ser o principal composto a detectar-se no cabelo, após o seu consumo [300]. A razão pelo qual não aconteceu em todas as situações (14 amostras) será devido ao facto de facilmente sofrer hidrólise química, o que acontece especialmente a pH alcalino [300]. Segura *et al.* [300] também obtiveram uma situação semelhante numa das amostras analisadas por GC/MS-EI após extracção com mistura de metanol e ácido trifluoroacético (90:10) [300].

Em 17 amostras foram detectados simultaneamente os compostos 6-MAM, MOR, COD, COC, BE e EME. Estes resultados reforçam os obtidos por Strano-Rossi *et al.* [325] que confirmam o hábito dos espanhóis consumirem conjuntamente COC e HERO.

As BZD foram, a seguir aos opiáceos, as drogas mais detectadas. Das 77 amostras analisadas por GC/MS-NCI, obtiveram-se 68 positivas para DIAZ, 58 para NORDIAZ e 35 para FLU. As três BZD foram detectadas, em simultâneo, em 26 amostras. O DIAZ e o NORDIAZ foram detectados em simultâneo em 57 amostras. Em todas as amostras onde se detectou o NORDIAZ também estava presente o DIAZ, mas a situação inversa não se verificou em 10 amostras. A BZD detectada com menor frequência foi o FLU. Esta droga detectou-se isoladamente das outras benzodiazepinas pesquisadas, em 3 amostras. A detecção simultânea de FLU, DIAZ ou NORDIAZ (o que aconteceu em 32 amostras) indica um consumo concomitante de mais de um tipo de BZD.

Os valores de concentração determinados para as BZD foram, em média, baixos o que dificultou a sua detecção. Utilizando a análise por GC/MS-EI, o DIAZ foi detectado apenas em 9 amostras das 87 analisadas.

O Δ^9 -THC e o Δ^9 -THC-COOH não foram pesquisados em simultâneo com o CBD e o CBN em 9 amostras, nas 87 analisadas, uma vez que os padrões destes dois compostos não estavam disponíveis na fase prévia desta pesquisa de drogas.

Os resultados qualitativos apresentados na tabela 5.1, relativamente aos canabinóides (Δ^9 -THC, CBN e CBD) e ao metabolito Δ^9 -THC-COOH evidenciam que o composto mais frequente é o CBD (29,41% dos casos analisados), tal como os resultados obtidos por Cirimele *et al.* [56], isoladamente e em associação com o Δ^9 -THC-COOH. O Δ^9 -THC-COOH foi o segundo composto detectado mais frequente (24,00% dos casos). Apenas em duas amostras, das dezoito positivas para o Δ^9 -THC-COOH, este metabolito foi detectado isoladamente dos canabinóides pesquisados. Em 15 amostras positivas para Δ^9 -THC-COOH, o Δ^9 -THC não foi detectado. Embora o Δ^9 -THC-COOH seja um metabolito do Δ^9 -THC

existem outros casos descritos na literatura [156, 203] em que o Δ^9 -THC-COOH é detectado sem que o Δ^9 -THC o seja. Relativamente aos casos por nós analisados podemos explicar o elevado número de amostras positivas para Δ^9 -THC-COOH e negativas para Δ^9 -THC, uma vez que 17 amostras positivas para Δ^9 -THC-COOH correspondem a segmentos próximos do couro cabeludo. Estes resultados confirmam a tendência dos resultados obtidos por Uhl [347, 348] e por Uhl e Sporkert [349], nos quais as amostras correspondentes a segmentos próximos do couro cabeludo possuem elevada concentração de Δ^9 -THC-COOH e baixas de CBN e Δ^9 -THC. Este factor pode ter dificultado, no nosso caso, a detecção destes compostos naqueles segmentos devido à falta de sensibilidade do equipamento (GC/MS-EI) para o Δ^9 -THC (detectado antes de derivatizar [56]) e para o CBN (composto detectado apenas em 2,94% dos casos). Em três das oito amostras positivas (10,66% dos casos analisados) para Δ^9 -THC, também se detectou o Δ^9 -THC-COOH. Mieczkowski [203] e Sachs e Dressler [290] referem também a detecção de Δ^9 -THC em amostras em que não se detecta o Δ^9 -THC-COOH, sendo esta a situação mais comum. A concentração do metabolito é provavelmente inferior ao LOD (vários autores [33, 203, 347] determinaram concentrações de Δ^9 -THC-COOH, em cabelo humano, inferiores a 5 pg/ mg de cabelo) ou não se encontra presente na amostra.

Não se verificou, em nenhuma amostra, a presença simultânea dos três canabinóides e do metabolito analisado. Não é visível qualquer relação (de presença ou de concentração) entre os canabinóides e o metabolito, detectados nas amostras.

A tabela 5.2 mostra-nos que nas 87 amostras analisadas, referentes a 75 casos, as concentrações de Δ^9 -THC foram na generalidade baixas (média de 0,198 ng/mg de cabelo) nos 8,00% dos casos positivos. Não foram contabilizados dois casos positivos para Δ^9 -THC porque não podemos afirmar, com certeza, que a quantificação corresponde a esse composto uma vez que o CBD não foi analisado e o Δ^9 -THC foi pesquisado apenas no extracto derivatizado.

À semelhança dos resultados obtidos por Cirimele *et al.* [50, 56] e Strano-Rossi e Chiarotti [326], nas amostras analisadas a concentração média de CBN (0,303 ng/mg de cabelo) foi superior à de Δ^9 -THC (Tabela 5.1), por oposição ao que tem sido determinado nas análises ao haxixe de rua. A menor concentração de Δ^9 -THC deve-se provavelmente à degradação pirolítica do composto em CBN, quando fumado [326]. Embora a concentração de CBD seja em média (0,162 ng/mg de cabelo) inferior à de Δ^9 -THC e de CBN, a concentração máxima determinada ultrapassa a concentração máxima determinada para o

Δ^9 -THC e o CBN, estando neste último aspecto, de acordo com os resultados obtidos por alguns autores [50, 56, 326].

A análise por GC/MS-EI não permite em nenhum caso a detecção de Δ^9 -THC-COOH porque este metabolito encontra-se no cabelo a concentrações inferiores ao limite de detecção conseguido com esta metodologia de análise (0,50 ng/mg de cabelo), conforme comprovam os resultados da análise por GC/MS-NCI. Só as análises por GC/MS-NCI evidenciaram a presença de Δ^9 -THC-COOH, apresentando uma concentração média de 0,028 ng/mg de cabelo. As concentrações de Δ^9 -THC-COOH determinadas nas 18 amostras positivas para o composto foram muito reduzidas (nível de pg) tais com as determinadas por outros autores que tal como nós analisaram a presença de Δ^9 -THC-COOH em cabelo humano, por GC/MS-NCI [137, 156, 290].

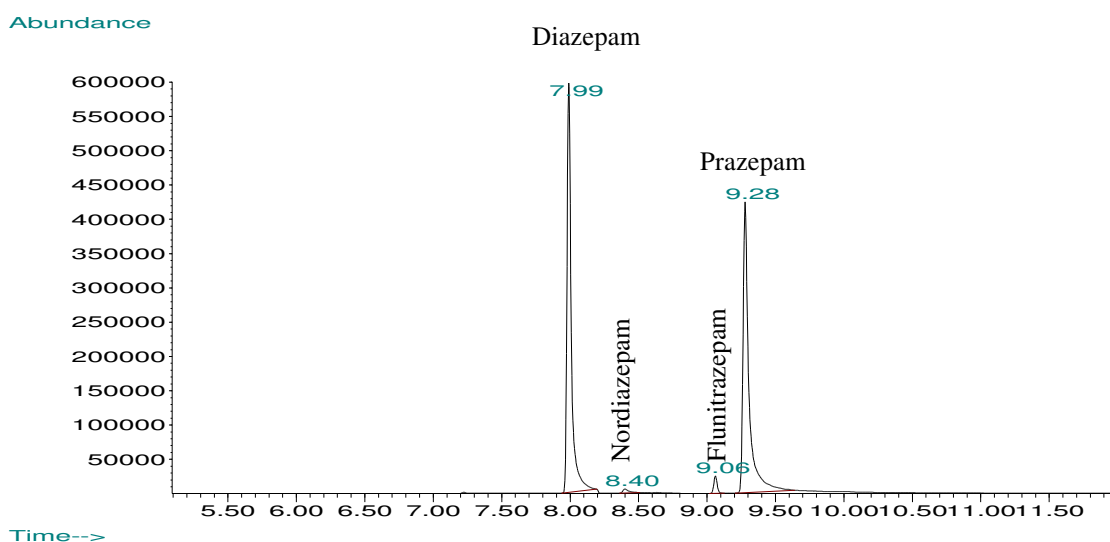


Figura 5.5 - Cromatograma obtido de uma amostra de cabelo positiva para benzodiazepinas, analisada por GC/MS-NCI nas condições referidas no capítulo 4 (*sistema 2*); a concentração determinada para DIAZ, NORDIAZ e FLU foram 4,36 ng/mg, 0,3 ng/mg e 1,57 ng/mg, respectivamente. O Prazepam (IS) foi adicionado à amostra com uma concentração final de 5,00 ng/mg.

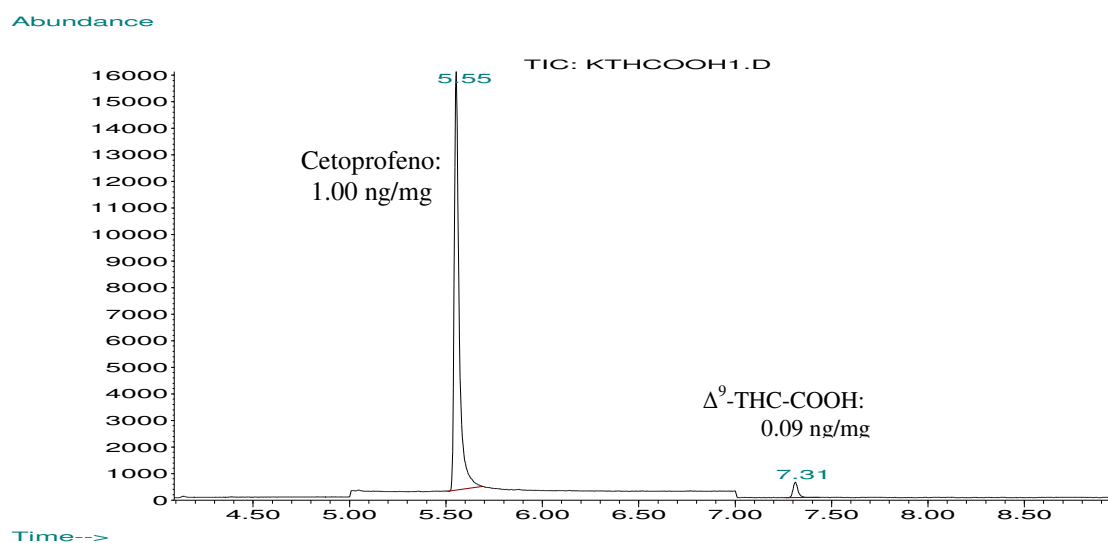


Figura 5.6 - Cromatograma obtido de uma amostra de cabelo positiva para Δ^9 -THC-COOH, analisada por GC/MS-NCI nas condições referidas no capítulo 4 (*sistema 2*); a concentração determinada foi 0,09 ng/mg. O Cetoprofeno (IS) foi adicionado à amostra com uma concentração final de 1,00 ng/mg.

CAPÍTULO 6

Conclusões da Parte Experimental

CONCLUSÕES

Não é tarefa fácil conseguir os melhores parâmetros analíticos para uma vasta gama de compostos. Assumimos desde o início do trabalho uma solução de compromisso dando prioridade às análises de canabinóides e benzodiazepinas.

1ª PARTE

1- O método múltiplo de análise, em cabelo, desenvolvido e validado é específico, linear para diversos intervalos de concentração e sensível. Apresenta, em geral, boas recuperações e precisões e os limites de quantificação são muito bons para os vários grupos de drogas: benzodiazepinas, (DIAZ, NORDIAZ, FLU), canabinóides (Δ^9 -THC, Δ^9 -THC-COOH, CBN e CBD), opiáceos (6-MAM, MOR, COD, NORMOR), cocaína e metabolitos (BE, EME, COCE, NORCOC) e clorpromazina.

2- Apresenta melhores resultados para os canabinóides, benzodiazepinas, clorpromazina, cocaína e alguns metabolitos - COCE, EME, NORCOC e para alguns opiáceos - COD, NORMOR, devido aos bons níveis de linearidade, sensibilidade, recuperação e precisão demonstrados.

3- A análise de benzodiazepinas e do metabolito Δ^9 -THC-COOH deve ser efectuada por GC/MS-NCI.

4- Em relação ao Δ^9 -THC-COOH, o LOD deverá ser um pouco melhor, atendendo aos baixos níveis de concentração, por vezes, existentes em alguns cabelos, e à especificidade deste metabolito como marcador do consumo de canabinóides. Este composto terá que ser alvo de outros estudos para aumentar a sua sensibilidade.

5- Relativamente à 6-MAM, MOR e BE, os resultados são melhores para concentrações mais baixas.

6- A anfetamina não deve ser pesquisada por este método, no cabelo.

Esta metodologia poderá ser utilizada em várias áreas da Toxicologia:

- -Forense – nas intoxicações mortais, nos condutores de veículos para verificar a influência de drogas e na distinção entre traficantes e toxicodependentes;
- - Clínica - no tratamento de toxicodependentes;

- -Ocupacional - nas profissões, principalmente nas de risco;

Salienta-se o potencial da aplicação desta metodologia analítica em investigações epidemiológicas, na determinação do perfil farmacológico/toxicológico de um indivíduo, entre outros estudos.

2ª PARTE

1- Nas amostras reais, pertencentes a indivíduos espanhóis que prestaram depoimento em tribunal por delitos cometidos relacionados com a drogas, foi frequente a existência de um consumo de polidrogas.

2- Os opiáceos seguidos das benzodiazepinas, foram as substâncias mais preponderantes nos indivíduos envolvidos no estudo, estando em conformidade com o que ocorre em Portugal. A cocaína e canabinóides surgiram, respectivamente, na 3ª e 4ª posição.

3- A quantificação do Δ^9 -THC-COOH, DIAZ e FLU usando GC/MS-NCI em vez de GC/MS-EI é mais adequada para evitar falsos negativos, sendo necessário desenvolver um método ainda mais sensível para o Δ^9 -THC-COOH.

4- As concentrações determinadas para os vários grupos de compostos analisados encontram-se, em regra, dentro da gama das publicadas por investigadores.

5- Os limites de positividade que foram por nós adoptados poderão ser adequados para coadjuvar, com outros elementos, na interpretação dos resultados relativamente à presença de grupo(s) de droga(s) consumida(s).

6- Houve, na maioria dos casos, uma concordância nos resultados qualitativos, quantitativos e razões entre determinados compostos chave dos vários grupos de drogas, em relação à maioria dos trabalhos publicados. Este facto possibilitou a detecção das drogas terapêuticas e ilícitas que foram consumidos pelos indivíduos.

NOTA FINAL

Apesar das dificuldades inerentes ao desenvolvimento de uma metodologia analítica para vários grupos de drogas terapêuticas e ilícitas, principalmente as diversas propriedades químicas dos compostos, foi possível obter, como solução de compromisso, um método múltiplo eficiente para análise de drogas.

Nas análises reais as interpretações dos resultados são muito complexas, sendo necessário algumas precauções na tomada de decisões relativamente ao tipo de consumo, ou não, de determinado(s) grupo(s) de droga(s). Pelos resultados obtidos, tendo em conta a falta de quaisquer informações, exceptuando as relativas aos segmentos distal e proximal de alguns cabelos, estamos convictos que a nossa interpretação dos resultados foi praticamente correcta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABBOTT DIAGNOSTIC, 1994. *Le dépistage des conduites toxicophiles*. JMM Graphique, Paris.
- [2] ABBOTT, 1994. *Drogas de Abuso*. ABBOTT (Ed), pp. 42-45.
- [3] ARAGÃO, M.J.; SACADURA, R., 1990. Breve revisão sobre marijuana, seus efeitos na mãe, no feto e no recém-nascido. *Jornal do Médico*, CXXIX, 309-310.
- [4] ARNOLD, W. & PÜSCHEL, K., 1981. Experimental studies on hair as an indicator of past or present drug use. *Journal of Forensic Science Society*, 21, 83.
- [5] AUBRY, A.F., 2002. Applications of affinity chromatography to the study of drug-melanin binding interactions. *Journal of Chromatography B*, 768, 67-74.
- [6] BACKOFEN, U.; MATYSIK, F.M.; LUNTE, C.E., 2002. Determination of cannabinoids in hair using high-pH* non-aqueous electrolytes and electrochemical detection, some aspects of sensitivity and selectivity. *Journal of Chromatography A*, 942, 259-269.
- [7] BÁEZ, H.; CASTRO, M.M.; BENAVENTE, M.A.; KINTZ, P.; CIRIMELE, V.; CAMARGO, C.; THOMAS, C., 2000. Drugs in prehistory: chemical analysis of ancient human hair. *Forensic Science International*, 108, 173-179.
- [8] BALANOVA, S. & HOMOKI, J., 1987. Determination of cocaine in human hair by gas chromatography/ mass spectrometry. *Journal of Legal Medicine*, 98, 235-240.
- [9] BALÍKOVÁ, M.A.; HABRDOVÁ, V., 2003. Hair analysis for opiates: evaluation of washing and incubation procedures. *Journal of Chromatography B*, 789, 93-100.
- [10] BALSTER, R.L., 1991. Drug abuse potential evaluation in animals. *British Journal Addiction*, 86, 1549-1558.
- [11] BAPTISTA, M.J.; MONSANTO, P.V.; MARQUES, E.G.P.; BERMEJO, A.; ÁVILA, S.; CASTANHEIRA, A.M.; MARGALHO, C.; BARROSO, M.; VIEIRA, D.N., 2002. Hair analysis for Δ^9 -THC, Δ^9 -THC-COOH, CBN and CBD, by GC/MS-EI. Comparison with GC/MS-NCI for Δ^9 -THC-COOH. *Forensic Science International*, 128, 66-78.
- [12] BARRERA, P.B.; ALONSO, M.J.L.; BARRERA, A.B.; JUAN, J.A.C.; BERMÚDEZ, J.M.F., 2000. Selenium determination in mother and child's hair by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Forensic Science International*, 107, 149-156.
- [13] BARRERA, P.B.; NAVEIRO, O.M.; PIÑEIRO, A.M.; BARRERA, A.B., 2000. Experimental designs in the optimisation of ultrasonic bath-acid-leaching procedures for the determination of traces elements in human hair samples by atomic absorption spectrometry. *Forensic Science International*, 107, 105-120.

- [14] BASELT, R.C.; CHANG, J.Y.; YOSHIKAWA, D.M., 1990. On the dermal absorption of cocaine. *Journal of Analytical Toxicology*, 14, 383-384.
- [15] BAUMGARTNER, A.M., JONES, P.F., BAUMGARTNER, W. A., BLACK, C.T., 1979. Radioimmunoassay of hair for determining opiate-abuse histories. *Journal of Nuclear Medicine*, 20, 748-752.
- [16] BAUMGARTNER, W.A.; HILL, V.A. Hair Analysis for organic analytes: methodology, reliability issues, and field studies, in: KINTZ, P. (Ed), 1986. *Drug Testing in Hair*, CRC Press, Boca Raton, pp. 223-265.
- [17] BAUMGARTNER, W.A.; HILL, V.A.; BLAHD, W.H., 1989. Hair analysis for drugs of abuse. *Journal of Forensic Sciences*, 34, 1433-1453.
- [18] BERMAN, E., 1977. *Analysis of drugs of abuse*, Heyden, London, 80 pp.
- [19] BERMEJO, A.M.B.; ROSSI, S.S., 1995. Hair and urine analysis: relative distribution of drugs and their metabolites. *Forensic Science International*, 70, 203-210.
- [20] BERTHOIN, K.; WIDMER, F.; GIROUD, C.; MANGIN, P.; BARRET, L., 2000. Human liver carboxylesterases: purification of these two enzymes, properties in relation to cocaine and alcohol metabolism, and specificities. *Problems of Forensic Sciences*, XLIII, 35-42.
- [21] BLANK, D.L.; KIDWELL, D.A., 1993. External contamination of hair by cocaine: an issue in forensic interpretation. *Forensic Science International*, 63, 145-156.
- [22] BOGUSZ, M.J., 2000. Liquid chromatography-mass spectrometry as a routine method in forensic sciences: a proof of maturity. *Journal of Chromatography B*, 748, 3-19.
- [23] BOHEME, C.L.; STRBEL, H.W., 1998. High-performance liquid chromatographic methods for the analysis of haloperidol and chlorpromazine metabolism in vitro by purified cytochrome P450 isoforms. *Journal of Chromatography B*, 718, 259-266.
- [24] BOST, R.O., 1993. Hair analysis-perspectives and limits of a proposed forensic method of proof: a review. *Forensic Science International*, 63, 31-42.
- [25] BOURLAND, J.A., HAYES, E.F.; KELLY, R.C., SWEENEY, S.A., HATAB, M.M., 2000. Quantitation of cocaine, benzoylecgonine, cocaethylene, methylecgonine, and norcocaine in human hair by positive ion chemical ionization (PICI) gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 24, 489-495.
- [26] BREWER, C., 1993. Hair analysis as a tool for monitoring and managing patients on methadone maintenance: a discussion. *Forensic Science International*, 63, 277.
- [27] BRONNER, W.E.; XU, A.S., 1992. Gas Chromatographic-mass spectrometric methods of analysis for detection of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in biological matrices. *Journal of Chromatography Biomedical Applications*, 580, 63-75.

- [28] BRUGUÉ, M.C.; FRAILE, M.G.; MOLINA, L.S. El abuso de flunitrazepam en población toxicómana, in: CASAS, M; GUTIÉRREZ, M.; SAN, Y.L. (Ed), 1993. *Adicción a psicofármacos*, Ediciones en Neurociencias, Bilbao, pp.185- 192.
- [29] BRUHWYLER, J.; HASSOUN, A., 1992. The use of radioreceptor assays for the determination of benzodiazepines in biological samples: a review. *Journal of Analytical Toxicology*, 16, 244-252.
- [30] CAIRNS, T.; HILL, V.; SCHAFFER, M.; THISTLE, W., 2004. Amphetamines in washed hair of demonstrated users and workplace subjects. *Forensic Science International*, 145, 137-142.
- [31] CAIRNS, T.; HILL, V.; SCHAFFER, M.; THISTLE, W., 2004. Levels of cocaine and its metabolites in washed hair of demonstrated cocaine users and workplace subjects. *Forensic Science International*, 145, 175-181.
- [32] CAIRNS, T.; HILL, V.; SCHAFFER, M.; THISTLE, W., 2004. Removing and identifying drug contamination in the analysis of human hair. *Forensic Science International*, 145, 97-108.
- [33] CAIRNS, T.; KIPPENBERGER, D.J.; SCHOLTZ, H.; BAUMGARTNER, W.A., Determination of Carboxy-THC in Hair by Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry, in: KINTZ, P. (Ed), 1996. *Drug Testing in Hair*, CRC Press, Boca Raton, pp.185-193.
- [34] CAPEL, I.D.; PINNOK, M.H.; DONELL, H.M.; WILLIAMS, D.C.; GRANT, E.C.G., 1981. Comparison of concentrations of some trace, bulk and toxic metals in the hair of normal and dyslexic children. *Clinical Chemistry*, 27, 879-881.
- [35] CAPLAN, Y.H.; GOLDBERGER, B.A., 2001. Alternative specimens for workplace drug testing. *Journal of Analytical of Toxicology*, 25, 396-399.
- [36] CARMONA, M.L.O.; CARRASQUILLA, M.H., 1999. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of veterinary tranquilizers in urine: evaluation of method performance. *Journal of Chromatography B*, 734, 113-120.
- [37] CARVALHO, F.; BASTOS, M.L., 1997. Estudos da hepatotoxicidade da anfetamina ensaios *in vitro*. *Revista Portuguesa de Farmácia*, XLVII (3), 111-120.
- [38] CERRO, J.C.L. Cannabis (I). Farmacología, in: LORENZO, P.; LADERO, J.M.; LEZA, J.C.; LIZASOAIN, I. (Ed), 1999. *Drogodependencias. Farmacología. Patología. Psicología. Legislación*. Editorial Medica panamericana, Madrid, pp. 191-213.
- [39] CHAMPION, R.H.; BURTON, J.L.; BURNS, D.A.; BREATHNACH, S.M., 1998. *Textbook of Dermatology*. 4, Sixth Edition, Blackwell Science, pp. 2759- 3683.
- [40] CHASIN, A.A.M.; MÍDIO, A.F., 1997. Exposição Humana à Cocaína e ao Cocaetileno: Disposição e Parâmetros Toxicocinéticos. *Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade São Paulo*, 33, 1-12.

- [41] CHASIN, A.A.M.; MÍDIO, A.F., 2000. Validation of an ion-trap gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of cocaine and metabolites and cocaethylene in post mortem whole blood. *Forensic Science International*, 109, 1-13.
- [42] CHETTY, M.; MOODLEY, S.V.; MILLER, R., 1994. Important metabolites to measure in pharmacodynamic studies of chlorpromazine. *Therapeutic Drug Monitoring*, 16, 30-36.
- [43] CHIAROTTI, M., 1993. Overview on extraction procedures. *Forensic Science International*, 63, 161-170.
- [44] CHIAROTTI, M.; COSTAMAGNA, L., 2000. Analysis of 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol in biological samples by gas chromatography tandem mass spectrometry (GC/MS-MS). *Forensic Science International*, 114, 1-6.
- [45] CHIAROTTI, M.; STRANO-ROSSI, S.; OFFIDANI, C.; FIORI, A., 1996. Evaluation of cocaine use during pregnancy through toxicological analysis of hair. *Journal of Analytical Toxicology*, 20, 555-558.
- [46] CIRIMELE, V. Cannabis and amphetamine determination in human hair, in: KINTZ, P. (Ed), 1996. *Drug Testing in Hair*, CRC Press, Boca Raton, pp.181-189.
- [47] CIRIMELE, V.; KINTZ, P.; JAMEY, C.; LUDES, B., 1999. Are Cannabinoides Detected in Hair After Washing With Cannabis Shampoo? *Journal of Analytical Toxicology*, 23, 349-351.
- [48] CIRIMELE, V.; KINTZ, P.; LUDES, B., 1997. Screening for forensically relevant benzodiazepines in human hair by gas chromatography-negative ion chemical ionization-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 700, 119-129.
- [49] CIRIMELE, V.; KINTZ, P.; LUDES, B., 2001. Testing for flunitrazepam and 7-aminoflunitrazepam in human hair. *Interpretation of hair analysis. International Workshop of the Society of Hair Testing*, Bordeaux, June, France, personal communication.
- [50] CIRIMELE, V.; KINTZ, P.; MAJDALANI, R.; MANGIN, P., 1995. Supercritical fluid extraction of drugs in drug addict hair. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 673, 173-181.
- [51] CIRIMELE, V.; KINTZ, P.; MANGIN, P., 1995. Testing human hair for cannabis. *Forensic Science International*, 70, 175-182.
- [52] CIRIMELE, V.; KINTZ, P.; MANGIN, P., 1996. A comparison of different extraction procedures for drugs addicts. *Biomedical Chromatography*, 10, 179-182.
- [53] CIRIMELE, V.; KINTZ, P.; MANGIN, P., 1996. Detection and quantification of lorazepam in human hair by GC/MS-NCI in a case of traffic accident. *International Journal of Legal Medicine*, 108, 265-267.

- [54] CIRIMELE, V.; KINTZ, P.; MANGIN, P., 1996. Determination of chronic flunitrazepam abuse by hair analysis using GC-MS-NCI. *Journal of Analytical Toxicology*, 20, 596-598.
- [55] CIRIMELE, V.; KINTZ, P.; STAUB, C.; MANGIN, P., 1997. Testing human hair for flunitrazepam and 7-aminoflunitrazepam by GC/MS-NCI. *Forensic Science International*, 84, 189-200.
- [56] CIRIMELE, V.; SACHS, H.; KINTZ, P.; MANGIN, P., 1996. Testing human hair for cannabis III. Rapid screening procedure for the simultaneous identification of Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabinol, and cannabidiol. *Journal of Analytical Toxicology*, 20, 13-16.
- [57] CLAUWAERT, K.; BOCXLAER, J.V.; KRONSTRAND, R.; MOORE, C., 2001. Amphetamines in Hair. *Interpretation of Hair analysis. International Workshop of the Society of Hair Testing*, Bordeaux, June, France, personal communication.
- [58] CLAUWAERT, K.M.; BOCXLAER, J.F.V.; LAMBERT, W.E.; LEENHEER, A.P., 2000. Segmental analysis for cocaine and metabolites by HPLC in hair of suspected drug overdose cases. *Forensic Science International*, 110, 157-166.
- [59] CONE, E.J., 1990. Testing human hair for drugs of abuse I. Individual dose and time profiles of morphine and codeine in plasma, saliva, urine, and beard compared to drug induced effects on pupils and behaviour. *Journal of Analytical Toxicology*, 14, 1-7.
- [60] CONE, E.J., 2000. The power of drug testing. *Problems of Forensic Sciences*, 42, 1-35.
- [61] CONE, E.J.; DARWIN, W.D., 1992. Rapid assay of cocaine opiates and metabolites by gas chromatography-mass spectrometry (review). *Journal of Chromatography Biomedical Applications*, 580, 43-61.
- [62] CONE, E.J.; DARWIN, W.D.; WANG, W.L., 1993. The occurrence of cocaine, heroin and metabolites in hair of drugs abusers. *Forensic Science International*, 63, 55-68.
- [63] CONE, E.J.; YOUSEFNEJA, D; DARWIN, W.D.; MAGUIRE, T., 1991. Testing human hair for drugs of abuse. II, Identification of unique cocaine metabolites in hair of drugs abusers and evaluation of decontamination procedures. *Journal of Analytical Toxicology*, 15, 250-255.
- [64] CONGOST, M., TORRE, R., SEGURA, J., 1988. Optimization of quantitative analysis of the major cannabis metabolite (11-nor-9-COOH-delta 9-tetrahydrocannabinol) in urine by gas chromatography/mass spectrometry. *Biomedical Environmental Mass Spectrometry*, 16, 367-372.
- [65] COUPER, F.J.; LOGAN, B.K., 2004. Addicted to driving under the influence-a GHB/GBL case report. *Journal of Analytical Toxicology*, 28, 512-515.
- [66] COUPER, F.J.; McINTYRE, I.M.; DRUMMER, O.H., 1995. Detection of antidepressant and antipsychotic drugs in *postmortem* human scalp hair. *Journal Forensic*

Science, 40, 87-90.

- [67] COUPER, F.J.; McINTYRE, I.M.; DRUMMER, O.H., 1995. Extraction of psychotropic drugs from human scalp hair. *Journal of Forensic Science*, 40, 83-86.
- [68] COUPER, F.J.; McINTYRE, I.M.; DRUMMER, O.H., in: MUELLER, R.K. (Ed.), 1993. *TIAFT Proceedings of the 31st International Meeting*, Molina Press, Leipzig, p.160.
- [69] DANIEL III, C.R.; PIRACCINI, B.M.; TOSTI, A., 2004. The nail and hair in forensic science. *Journal of American Academy of Dermatology*, 50, 258-261.
- [70] Decreto- Lei nº 45/96 de 3 de Setembro.
- [71] DEVEAUX, M.; RÉVUELTA, E.; MORNAY, E.; HÉDOUIN, V.; GOSSET, D., 1997. Immunoassay of digoxin in hair. *Forensic Science International*, 84, 219-223.
- [72] DIALLO, S.; BUGNI, E.; SENHADJ-RAOUL, F.; GASDEBLAY, S.; MAROT, D.; DESSALLES, M.C.; MAHUZIER, G., 2001. Chromatographic and spectral analytical data for the determination of benzodiazepine abuse in methadone maintenance program. *Talanta*, 55, 721-732.
- [73] DIGREGORIO, G.J.; BARBIERI, E.J.; FERKO, A.P.; RUCH, E.K., 1993. Prevalence of cocaethylene in the hair of pregnant women. *Forensic Science International*, 63, 445-446.
- [74] DRUID, H.; HOLMGREN, P.; AHLNER, J., 2001. Flunitrazepam: an evaluation of use, abuse and toxicity. *Forensic Science International*, 122, 136-141.
- [75] DRUMMER, O.H., 1997. Alternative Specimens for drugs abuse testing. *Un Expert group meeting, Barcelona, Spain*, 2-26.
- [76] DRUMMER, O.H., 1998. Methods for the measurement of benzodiazepines in biological samples. (Review). *Journal of Chromatography B*, 713, 201-225.
- [77] DUPONT, R.L.; BAUMGARTNER, W.A., 1995. Drug testing by urine and hair analysis: complementary features and scientific issues. *Forensic Science International*, 70, 63-76.
- [78] ECKHARDT, B. & CIRIMELE, V., 1998. Determination of cannabis in human hair by GC/MS. *International Workshop of the Society of Hair Testing*, Munich, Station III, 1-4.
- [79] EDDER, P.; STAUB, C.; VEUTHEY, J.L.; PIERROZ, I.; HAERDI, W., 1994. Subcritical fluid extraction of opiates in hair of drugs addicts. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 658, 75-86.
- [80] ELLENHORN, M.J.; SCHONWALD, S.; ORDOG, G.; WASSERBERGER, J. *Ellenhorn's Medical Toxicology: Diagnosis and Treatment of Human Poisoning*, second edition, Williams & Wilkins edition.

- [81] ESER, H.P.; PÖTSCH, L.; SKOPP, G.; MOELLER, M.R., 1997. Influence of sample preparation on analytical results: drug analysis [GC/MS] on hair snippets versus hair powder using various extraction methods. *Forensic Science International*, 84, 271-279.
- [82] FEHN, S.; SACHS, H., 2000. Determination of benzodiazepines in hair by GC/MS-NCI. *Progress in Hair analysis for Illegal Drugs. International Workshop of the Society of Hair testing*, 23-34.
- [83] FELGATE, P.D; DINAN, A.C., 2000. The determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and 11-Nor-9-Carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol in whole blood using solvent extraction combined with polar solid-phase extraction. *Journal of Analytical Toxicology*, 24, 127-132.
- [84] FELLI, M.; MARTELLO, S.; MARSILI, R.; CHIAROTTI, M., 2004. Disappearance of cocaine from human hair after abstinence. *Forensic Science International*, in Press.
- [85] FRITCH, D.; GROCE, Y.; RIEDERS, F., 1992. Cocaine and some of its products in hair by RIA and GC/MS. *Journal of Analytical Toxicology*, 16, 112-114.
- [86] GAILLARD, Y. Méthodes analytiques, in: KINTZ, P. (Ed), 1998. *Toxicologie et pharmacologie médico-légales*, Collection OptionBio, Elsevier, pp. 67-109.
- [87] GAILLARD, Y.; PÉPIN, G., 1997. Screening and identification of drugs in human hair by high-performance liquid chromatography-photodiode-array UV detection and gas chromatography-mass spectrometry after solid-phase extraction. A powerful tool in forensic medicine. *Journal of Chromatography A*, 762, 251-267.
- [88] GAILLARD, Y.; PÉPIN, G., 1998. Evidence of polydrug use using hair analysis: a fatal case involving heroin, cocaine, cannabis, chloroform, thiopental and ketamine. *Journal of Forensic Science*, 43, 435-438.
- [89] GAILLARD, Y.; PÉPIN, G., 1999. Testing hair for pharmaceuticals (Review). *Journal of Chromatography B*, 733, 231-246.
- [90] GARCIA, A.I.S., 1999. *Las Drogas*. Acento Editorial, Madrid, pp. 1-92.
- [91] GARSIDE, D.; GOLDBERGER, B.A. Determination of cocaine and opioids in hair, in: KINTZ, P. (Ed), 1996. *Drug Testing in Hair*, CRC Press, Boca Raton, pp. 151- 180.
- [92] GHYSEL, M.H.. Amphétamines et dérivés, in: KINTZ, P. (Ed), 1998. *Toxicologie et pharmacologie médico-légales*, Collection OptionBio, Elsevier, pp. 465- 541.
- [93] GIROD, C.; STAUB, C., 2000. Analysis of drugs of abuse in hair by automated solid-phase extraction, GC/EI/MS and GC ion trap/CI/MS. *Forensic Science International*, 107, 261-271.
- [94] GOLD, M.S., 1991. *Mariguana*. Ediciones en Neurociencias, Barcelona, pp. 1-190.

- [95] GOLDBERGER, B.A.; CAPLAN, Y.H.; MAGUIRE, T.; CONE, E.J., 1991. Testing human hair for drugs of abuse. III. Identification of heroin and 6-Acetylmorphine as indicators of heroin use. *Journal of Analytical Toxicology*, 15, 226-231.
- [96] GOLDBERGER, B.A.; CONE, E.J.; GRANT, T.M.; CAPLAN, Y.H.; LEVINE, B.S.; SMIALEK, J.E., 1994. Disposition of heroin and its metabolites in heroin-related deaths. *Journal of Analytical Toxicology*, 18, 22-28.
- [97] GOLDBLUM, R. W., GOLDBAUM, L. R., PIPER, W.N., 1954. Barbiturate concentration in the skin and hair of guinea pigs. *Journal of Investigative Dermatology*, 22, 121-128.
- [98] GOULLÉ, J. P.; KINTZ, P., 1998. Le cheveu, la salive et la sueur, leur intérêt en analyse toxicologique. *Bulletin de la STC*, 5.
- [99] GOULLÉ, J.P.; NOYON, J.; BIETRY, F.; PATRICOT, B.; ROUMAJON, A.; BOUIGE, D., 1997. Hair opiates during pain treatment. *Forensic Science International*, 84, 137-144.
- [100] HAN, E.; YANG, W.; LEE, J.; PARK, Y.; KIM, E.; LIM, M.; CHUNG, H., 2005. Correlation of methamphetamine results and concentrations between head, axillary, and pubic hair. *Forensic Science International*, 147, 21-24.
- [101] HARKEY, M.; HENDERSON, G.L.; ZHOU, C., 1991. Simultaneous quantitation of cocaine and its major metabolites in human hair by gas chromatography/ chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 15, 260-265.
- [102] HARKEY, M.R., 1993. Anatomy and physiology of hair. *Forensic Science International*, 63, 9-18.
- [103] HARTMANN, C.; SMEYERS-VERBEKE, J.; MASSART, D.L.; MCDOWALL, R.D., 1998. Validation of bioanalytical chromatographic methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 19, 193-218.
- [104] HEARN, W.L.; FLYNN, D.D.; HIME, G.W.; ROSE, S.; COFINO, J.C.; MANTERO-ATIENZA, E.; WETLI, C.V.; MASH, D.C., 1991. Cocaethylene: A unique metabolite displays high affinity for the dopamine transporter. *Journal Neurochemistry*, 56, 698-701.
- [105] HEFNAWY, M.M., 2002. Analysis of certain tranquilizers in biological fluids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 27, 661-678.
- [106] HENDERSON G.L.; HARKEY, M.R.; ZHOU, C.; JONES, R.T.; JACOB, P., 1998. Incorporation of isotopically labeled cocaine into human hair: Race as a factor. *Journal of Analytical Toxicology*, 22, 156-164.
- [107] HENDERSON, G. L., 1993. Mechanisms of drug incorporation into hair. *Forensic Science International*, 63, 19-29.

- [108] HENDERSON, G.L.; HARKEY, M.R.; JONES, R.T., 1995. Analysis of hair for cocaine. *Hair Testing for drugs of abuse: International Research on Strands and Technology*, 91-120.
- [109] HENDERSON, G.L.; HARKEY, M.R.; ZHOU, C., 1996. Incorporation of isotopically labelled cocaine and metabolites into human hair: 1. Dose-response relationships. *Journal of Analytical Toxicology*, 20, 1-12.
- [110] HENDERSON, G.L.; HARKEY, M.R.; ZHOU, C.; JONES, R.T., 1992. Cocaine and metabolite concentrations in the hair of South American coca chewers. *Journal of Analytical Toxicology*, 16, 199-201.
- [111] HERNÁNDEZ, A.F.; GIL, F.; PLA, A., 1997. Nuevas Perspectivas en el análisis de drogas de abuso para el año 2000. *Actualidad Médica*, 746, 48-55.
- [112] HERNÁNDEZ, I.L.; FERNÁNDEZ, P.L. Anfetaminas, in: LORENZO, P.; LADERO, J.M.; LEZA, J.C.; LIZASOAIN, I. (Ed), 1999. *Drogodependencias. Farmacología. Patología. Psicología. Legislación*. Editorial Medica panamericana, Madrid, pp. 149-156.
- [113] HERNÁNDEZ, L.; SÁNCHEZ, M.A.M. Cocaína (I, II), in: LORENZO, P.; LADERO, J.M.; LEZA, J.C.; LIZASOAIN, I. (Ed), 1999. *Drogodependencias. Farmacología. Patología. Psicología. Legislación*. Editorial Medica panamericana, Madrid, pp. 113-134.
- [114] HERRLE, I.; DRESSLER, U., 1998. Determination of carboxy-THC in human hair by GC/MS-NCI. *Cannabinoids in hair, International Workshop of the Society of Hair Testing*, personal communication.
- [115] HÖLD, K.M.; CROUCH, D.J.; WILKINS, G.; ROLLINS, D.E.; MAES, R.A., 1997. Detection of alprazolam in hair by negative ion chemical ionization mass spectrometry. *Forensic Science International*, 84, 201-209.
- [116] HÖLD, K.M.; HUBBARD, D.L.; WILKINS, D.G.; ROLLINS, D.E., 1998. Quantitation of cocaine in human hair: the effect of centrifugation of hair digests. *Journal of Analytical Toxicology*, 22, 414-424.
- [117] HÖLD, K.M.; WILKINS, D.G.; ROLLINS, D.E.; JOSEPH, R.E.; CONE, E.J., 1998. Simultaneous quantitation of cocaine, opiates, and their metabolites in human hair by positive ion chemical ionization gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatographic Science*, 36, 125-130.
- [118] <http://www.criminology.fsu.edu/journal/mcbay2.html>
- [119] <http://www.sfta.org/Consensus/techniques/amphet.htm>
- [120] HUANG, W.; MOODY, D. E., 1995. Immunoassay detection of benzodiazepines and benzodiazepines metabolites in blood. *Journal of Analytical Toxicology*, 19, 333-342.

- [121] HUBBARD, D.L.; WILKINS, D.G.; ROLLINS, D.E., 2000. The incorporation of cocaine and metabolites into hair: effects of dose and hair pigmentation. *Drug Metabolism and Disposition*, 28, 1464-1469.
- [122] INFARMED, 1997. *Medicamentos em Portugal Relatório Anual*.
- [123] INFARMED, 1999. *Prontuário Terapêutico 1*, Ministério da Saúde, pp. 65-276.
- [124] INFARMED, 2003. *Estatística do Medicamento 2002*, pp. 77-84.
- [125] INSTITUTO DA DROGA E DA TOXICODPENDÊNCIA, 2004. *Droga: Sumários de informação estatística 2003*. Presidência do Conselho de Ministros Lisboa, 1-80.
- [126] JAGER, L.S.; ANDREWS, A.R.J., 2001. Development of a screening method for cocaine and cocaine metabolites in urine using solvent microextraction in conjunction with gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 911, 97-105.
- [127] JANKOVIC, S. M. & JANKOVIC, S. V., 1998. O controlo do crescimento do cabelo. *Dermatology Online Journal*, 4, 2.
- [128] JANZEN, K., 1992. Concerning norcocaine, ethylbenzoylcegonine, and the identification of cocaine use in human hair, Letter to the Editor. *Journal of Analytical Toxicology*, 16, 402.
- [129] JIMÉNEZ, C.; VENTURA, R.; SEGURA, J., 2002. Validation of qualitative chromatographic methods: strategy in antidoping control laboratories. *Journal of Chromatography B*, 767, 341-351.
- [130] JOSEFSSON, M.; KRONSTRAND, R.; ANDERSSON, J.; ROMAN, M., 2003. Evaluation of electrospray ionisation liquid chromatography-tandem mass spectrometry for rational determination of a number of neuroleptics and their major metabolites in human body fluids and tissues. *Journal of Chromatography B*, 789, 151-167.
- [131] JR JOSEPH, R.E.; TSAI, W.J.; TSAO, L.I.; SU, T.P.; CONE, E.J., 1997. *In Vitro* characterization of cocaine binding sites in human hair. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 282, 1228-1241.
- [132] Jr. JOSEPH, R.E.; HÖLD, K.M.; WILKINS, D.G.; ROLLINS, D.E.; CONE, E.J., 1999. Drug testing with alternative matrices II. Mechanisms of cocaine and codeine deposition in hair. *Journal of Analytical Toxicology*, 23, 396-408.
- [133] Jr., JOSEPH, R.E.; TSUNG-PING SU; CONE, E.J., 1996. In vitro binding studies of drugs to hair: influence of melanin and lipids on cocaine binding to Caucasoid and Africoid hair. *Journal of Analytical Toxicology*, 20, 338-344.
- [134] JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J., 1995. *Histologia Básica*. Guanabara Koogan, 8ª Ed., Rio de Janeiro, pp. 301-312.

- [135] JURADO, C.; GIMÉNEZ, M.P.; MENÉNDEZ, M.; REPETTO, M., 1995. Simultaneous quantification of opiates, cocaine and cannabinoids in hair. *Forensic Science International*, 70, 165-174.
- [136] JURADO, C.; KINTZ, P.; MENÉNDEZ, M.; REPETTO, M., 1997. Influence of the cosmetic treatment of hair on drug testing. *International Journal of Legal Medicine*, 110, 159-163.
- [137] JURADO, C.; MENÉNDEZ, M.; REPETTO, M.; KINTZ, P.; CIRIMELE, V.; MANGIN, P., 1996. Hair testing for cannabis in Spain and France. Is there a difference in consumption? *Journal of Analytical Toxicology*, 20, 111-115.
- [138] JURADO, C.; SACHS, H., 2003. Proficiency test for the analysis of hair for drugs of abuse, organized by the Society of Hair Testing. *Forensic Science International*, 133, 175-178.
- [139] KAGEURA, M.; HAMANAKA, T.; KASHIMURA, S.; HARA, K.; HIEDA, Y., 1995. An evaluation of Solid-Phase extractions for the screening of drugs and poisons by GC-NPD. *Proceeding for the 33rd International Congress on Forensic (TLAFT) and 1st on Environmental Toxicology*, Gretox, 286-289.
- [140] KALASINSKY, K.S.; BOSY, T.Z.; SCHMUNK, G.A.; REIBER, G.; ANTHONY, R.M.; FURUKAWA, Y.; GUTTMAN, M.; KISH, S.J., 2001. Regional distribution of methamphetamine in autopsied brain of chronic human methamphetamine users. *Forensic Science International*, 116, 163-169.
- [141] KARLSSON, L.; JONSSON, J.; ÅBERG, K.; ROOS, C., 1983. Determination of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol-11-oic acid in urine as its pentafluoropropyl-pentafluoropropionyl derivative by GC/MS utilizing negative ion chemical ionization. *Journal of Analytical Toxicology*, 7, 198-202.
- [142] KAUERT G.; RÖHRICH, J., 1996. Concentration of delta 9-tetrahydrocannabinol, cocaine and 6-monoacetylmorphine in hair of drug abusers. *International Journal of Legal Medicine*, 108, 294-299.
- [143] KELLY, R.C.; MIECZKOWSKI, T.; SWEENEY, S.A.; BOURLAND, J.A., 2000. Hair analysis for drugs of abuse. Hair color and race differentials or systematic differences in drugs preferences? *Forensic Science International*, 107, 63-86.
- [144] KIDWELL, D.; HILL, V., 1995. Decontamination procedures for drugs of abuse in hair: are they sufficient? *Forensic science International*, 70, 13-38.
- [145] KIDWELL, D.A.; BLANCO, M.A.; SMITH, F.P., 1997. Cocaine detection in a university population by hair analysis and skin swab testing. *Forensic Science International*, 84, 75-86.
- [146] KIELLAND-SMITH, A.; SKUTERUD, B.; MØRLAND, J., 1999. Urinary excretion of 11-nor-9-Carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabinoids in frequent and infrequent drug users. *Journal of Analytical Toxicology*, 23, 323-332.

- [147] KIKURA, R.; NAKAHARA, Y.; KOJIMA, S., 2000. Simultaneous determination of dimethylamphetamine and its metabolites in rat hair by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 741, 163-173.
- [148] KINTZ, P. Clinical applications of hair analysis, in: KINTZ, P. (Ed), 1986. *Drug Testing in Hair*, CRC Press, Boca Raton, pp. 267-277.
- [149] KINTZ, P. Matrices alternatives et toxicologie médico-légale, in: KINTZ, P. (Ed) 1998. *Toxicologie et pharmacologie médico-légales*, Collection OptionBio, Elsevier, pp. 685-710.
- [150] KINTZ, P., 1996. L'expertise toxicologique à partir des cheveux, consensus national analytique, assurance de qualité. *Toxicorama*, 1, 69-71.
- [151] KINTZ, P., 2000. Criteria that can affect the detection of doping agents in hair. *Progress in Hair analysis for Illegal Drugs, International Workshop of the Society of Hair testing*, 79-89.
- [152] KINTZ, P., 2004. Value of hair analysis in *postmortem* toxicology. *Forensic Science International*, in Press.
- [153] KINTZ, P.; CIRIMELE, V., 1997. Interlaboratory comparison of quantitative determination of amphetamine and related compounds in hair samples. *Forensic Science International*, 84, 151-156.
- [154] KINTZ, P.; CIRIMELE, V.; LAFARGUE, P.; MANGIN, P., 1995. Le cheveu révélateur. *Annals pharmaceutiques françaises*, 53, 251-255.
- [155] KINTZ, P.; CIRIMELE, V.; LUDES, B., 2000. Testing for 19-Norsteroids in hair. *Progress in Hair analysis for Illegal Drugs, International Workshop of the Society of Hair testing*, 111-119.
- [156] KINTZ, P.; CIRIMELE, V.; MANGIN, P., 1995. Testing human hair for cannabis II. Identification of THC-COOH by GC-MS-NCI as a unique proof. *Journal of Forensic Sciences*, 40, 619-622.
- [157] KINTZ, P.; CIRIMELE, V.; PEPIN, G.; MARQUET, P.; DEVEAUX, M.; MURA, P., 1996. Identification dosage des cannabinoïdes dans le sang total. *Toxicorama*, 8, 29-33.
- [158] KINTZ, P.; CIRIMELE, V.; SENGLER, C.; TRACQUI, A.; MANGIN, P., 1995. Testing human hair and urine for anhydroecgonine methyl ester, a pyrolysis product of cocaine. *Journal of Analytical Toxicology*, 19, 479-482.
- [159] KINTZ, P.; CIRIMELE, V.; TRACQUI, A.; MANGIN, P., 1995. Simultaneous determination of amphetamine, methamphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine in human hair by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 670, 162-166.
- [160] KINTZ, P.; CIRIMELE, V.; VAYSSETTE, F.; MANGIN, P., 1996. Hair analysis for nordiazepam and oxazepam by gas chromatography-negative-ion chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 677, 241-244.

- [161] KINTZ, P.; JAMEY, C.; CIRIMELE, V.; BRENNEISEN, R.; LUDES, B., 1998. Evaluation of acetylcodeine as a specific marker of illicit heroin in human hair. *Journal of Analytical Toxicology*, 22, 425-429.
- [162] KINTZ, P.; LUDES, B.; MANGIN, P., 1992. Detection of drugs in human hair using Abbott ADx, with confirmation by Gas Chromatography/ Mass spectrometry (GC/MS). *Journal of Forensic Science*, 37, 328-331.
- [163] KINTZ, P.; LUDES, B.; MANGIN, P., 1992. Evaluation of nicotine and cotinine in human hair. *Journal of Forensic Science*, 37, 72.
- [164] KINTZ, P.; MANGIN, P., 1993. Determination of gestational opiate, nicotine, benzodiazepine, cocaine and amphetamine exposure by hair analysis. *Journal Forensic Science*, 33, 139-142.
- [165] KINTZ, P.; MANGIN, P., 1993. Evidence of gestational heroin or nicotine exposure by analysis of fetal hair. *Forensic Science International*, 63, 99-104.
- [166] KINTZ, P.; MANGIN, P., 1995. Simultaneous determination of opiates, cocaine, and major metabolites of cocaine in human hair by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *Forensic Science International*, 73, 93-100.
- [167] KINTZ, P.; MANGIN, P., 1995. What constitutes a positive result in hair analysis: proposal for the establishment of cut-off values. *Forensic Science International*, 70, 3-11.
- [168] KINTZ, P.; TRACQUI, A.; MANGIN, P., 1992. Detection of drugs in human hair for clinical and forensic applications. *International Journal of Legal Medicine*, 105, 1-4.
- [169] KINTZ, P.; MANGIN, P., 1993. Determination of gestational opiate, nicotine, benzodiazepine, cocaine, and amphetamine exposure by hair analysis. *Journal of the Forensic Science Society*, 33, 139-142.
- [170] KINTZ, P.; MANGIN, P., 1993. Opiate concentrations in human head, axillary and pubic hair. *Journal of Forensic Sciences*, 38, 657-662.
- [171] KLEIN, J.; KARASKOV, T.; KOREN, G., 2000. Clinical applications of hair testing for drugs of abuse-the Canadian experience. *Forensic Science International*, 107, 281-288.
- [172] KOIDE, I.; NOGUCHI, O.; OKADA, K.; YOKOYAMA, A.; ODA, H.; YAMAMOTO, S.; KATAOKA, H., 1998, Determination of amphetamine and methamphetamine in human hair by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 707, 99-104.
- [173] KOREN, G., 1995. Measurement of drugs in neonatal hair; a window to fetal exposure. *Forensic Science International*, 70, 77-82.
- [174] KOREN, G.; KLEIN, J.; FORMAN, R.; GRAHAM, K.; PHAN, M.K., 1992. Biological markers of intrauterine exposure to cocaine and cigarette smoking.

Developmental Pharmacology Therapeutics, 18, 228-236.

- [175] KRAEMER, T.; MAURER, H.H., 1998. Determination of amphetamine, methamphetamine and amphetamine-derived designer drugs or medicaments in blood and urine. *Journal of Chromatography B*, 713, 163-187.
- [176] KRONSTRAND, R.; FÖRSTBERG-PETERSON, S.; KÅGEDAL, B.; AHLNER, J.; LARSON, G., 1999. Codeine concentration in hair after oral administration is dependent on melanin content. *Clinical Chemistry*, 45, 1485-1494.
- [177] KRONSTRAND, R.; GRUNDIN, R.; JONSSON, J., 1998. Incidence of opiates, amphetamines, and cocaine in hair and blood in fatal cases of heroin overdose. *Forensic Science International*, 92, 29-38.
- [178] KRONSTRAND, R.; NYSTRÖM, I.; JOSEFSSON, M.; HODGINS, S., 2002. Segmental ion spray LC-MS-MS analysis of benzodiazepines in hair of psychiatric patients. *Journal of Analytical Toxicology*, 26, 479- 484.
- [179] KRONSTRAND, R.; NYSTRÖM, I.; STRANDBERG, J.; DRUID, H., 2004. Screening for drugs of abuse in hair with ion spray LC-MS-MS. *Forensic Science International*, 145, 183-190.
- [180] LACHENMEIER, D.W.; KROENER, L.; MUSSHOF, F.; MADEA, B., 2003. Application of tandem mass spectrometry combined with gas chromatography and headspace solid-phase dynamic extraction for the determination of drugs of abuse in hair samples. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 17, 472-478.
- [181] LEWIN, L., 1970. *Phantastica*. Payot, Paris, 20-40 pp.
- [182] LEWIS, D.; MOORE, C.; MORRISSEY, P.; LEIKIN, J., 1997. Determination of drug exposure using hair: application to child protective cases. *Forensic Science International*, 84, 123-128.
- [183] LEWIS, J.H., 2001. Drug detection and its role in law enforcement. *Trends and Issues in Crime and Criminal Justice*, 205, 1-6.
- [184] LIN, S.N.; MOODY, D.E.; BIGELOW, G.E.; FOLTZ, R., 2001. A validated liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry method for quantification of cocaine and benzoylecgonine in human plasma. *Journal of Analytical Toxicology*, 25, 497- 503.
- [185] LIU, J.; HARA, K.; KASHIMURA, S.; KASHIWAGI, M.; KAGEURA, M., 2001. New method of derivatization and headspace solid-phase microextraction for gas chromatographic-mass spectrometric analysis of amphetamines in hair. *Journal of Chromatography B*, 758, 95-101.
- [186] MACAVOY, Y.; BÄCKSTRÖM, B.; JANHUNEN, K.; STEWART, A.; COLE, M.D., 1999. Supercritical fluid chromatography in forensic science: a critical appraisal. *Forensic Science International*, 99, 107-122.

- [187] MANGIN, P.; KINTZ, P., 1993. Variability of opiates concentrations in human hair according to their anatomical origin: head, axillary and pubic regions. *Forensic Science International*, 63, 77-83.
- [188] MARQUES, E.P.; BERMEJO, A.; BAPTISTA, M.J.; MONSANTO, P.V.; ÁVILA, S.; PROENÇA, P.; CASTANHEIRA, A.M.; VIEIRA, D.N., 2000. Método de determinação de THC e THCCOOH em cabelo e sua adaptação a outras drogas. Estudo de uma população espanhola de detidos por posse e consumo de drogas. *Livro de Resumos do II Congresso de Investigação em Medicina*, 229.
- [189] MARQUES, E.P.; FIDALGO, A.; BAPTISTA, M.J.; ÁVILA, S.; PROENÇA, P.; MONSANTO, P.V.; MARGALHO, C.; TEIXEIRA, H.M.; BARROSO, M.; CASTANHEIRA, A.M.; ALBUQUERQUE, A., 2000. Nova Metodologia Analítica em Ciência Forense. *Livro de Resumos do II Congresso de Investigação em Medicina*, 228.
- [190] MARQUES, E.P.; RAFAEL, A.; MONSANTO, P.V.; PINHEIRO, J.E.S.; VIEIRA, D.N.; 1996. *Proceedings of the 34th Triennial Meeting International TLAFT*, Edition MOLINA press, 372-379.
- [191] MARQUET, P.; GAULIER, J.M.; MERLE, L. Les médicaments anxiolytiques, hypnotiques et antidépresseurs, in: MURA, P. (Ed), 1999. *Alcool, Médicaments, Stupéfiants et Conduit Automobile*, Collection OptionBio, Elsevier, pp. 21-58.
- [192] MARS, U.; LARSSON, B.S., 1999. Pheomelanin as a binding site for drugs and chemicals. *Pigment Cell Research*, 12 (4), 226-274.
- [193] MARSH, A.; EVANS, M.B., 1993. Challenging declarations of abstinence by the determination of morphine in hair by radioimmunoassay. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 8, 693-698.
- [194] MARTINEZ, F.; POET, T.S.; PILLAI, R.; ERICKSON, J.; ESTRADA, A.L.; WATSON, R.R., 1993. Cocaine metabolite (Benzoylcegonine) in hair and urine of drug users. *Journal of Analytical Toxicology*, 17, 138-142.
- [195] MARTZ, R.; DONNELLY, B.; FETTEROLF, D.; LASSWELL, L.; HIME, G.W.; HERNE, W.L., 1991. The use of hair analysis to document a cocaine overdose following a sustained survival period before death. *Journal of Analytical Toxicology*, 15, 279-281.
- [196] MAURER, H.H., 1992. Systematic toxicological analysis of drugs and their metabolites by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 580, 3-41.
- [197] MAZZOTTA, D.; GUARNERI, M.; FAGIOLI, F.; DIPALMA, A.; VULLO, C., 1986. Determination of zinc in serum, hair, and urine in homozygous thalassaemic patients by atomic absorption spectrophotometry. *Farmaco [Prat]*, 41, 397-403.
- [198] MCAVOY, Y.; COLE, M.D.; GUENIAT, O., 1999. Analysis of amphetamines by supercritical fluid chromatography, high-performance liquid chromatography, gas chromatography and capillary zone electrophoresis; a preliminary comparison.

Forensic Science International, 102, 13-22.

- [199] McBAY, A., 1997. Legal challenges to testing hair for drugs: a review. *International Journal of Drug Testing*, 1, 34-42.
- [200] McCLEAN, S.; O'KANE, E.; HILLIS, J.; SMYTH, W.F., 1999. Determination of 1, 4 benzodiazepines and their metabolites by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography using ultraviolet and electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 838, 273-291.
- [201] McCLEAN, S.; O'KANE, E.J.; SMYTH, W.F., 2000. Electrospray ionisation-mass spectrometric characterisation of selected anti-psychotic drugs and their detection and determination in human hair samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 740, 141-157.
- [202] MEADWAY, C.; GEORGE, S.; BRAITHWAIT, R., 2002. A rapid GC/MS method for the determination of dihydrocodeine, codeine, norcodeine, morphine, normorphine and 6-MAM in urine. *Forensic Science International*, 127, 136-141.
- [203] MIECZKOWSKI, T., 1995. A research note: outcome of GC/MS/MS confirmation of hair assays on 93 cannabinoid (+) cases. *Forensic Science International*, 79, 83-91.
- [204] MIECZKOWSKI, T., 1997. Distinguishing passive contamination from active cocaine consumption: assessing the occupational exposure of narcotics officers to cocaine. *Forensic Science International*, 84, 87-111.
- [205] MIECZKOWSKI, T., 2003. Assessing the potential of a "color effect" for hair analysis of 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol: Analysis of a large sample of hair specimens. *Life Sciences*, 74, 463-469.
- [206] MIECZKOWSKI, T.; MUMM, R. & CONNICK, H., 1993. The use of hair analysis in a pre-trial diversion program in New Orleans. *International Journal of Offender Therapy and Comparative Criminology*, 39, 222-241.
- [207] MIKI, A.; KELLER, T.; REGENSCHETT, P.; DIRNHOFER, R.; TATSUNO, M.; KATAGI, M.; NISHIKAWA, M.; TSUCHIHASHI, H., 1997. Application of ion mobility spectrometry to the rapid screening of methamphetamine incorporated in hair. *Journal of Chromatography B*, 692, 319-328.
- [208] MOELLER, M.R., 1992. Drug detection in hair by chromatographic procedures (Review). *Journal of Chromatography, Biomedical Applications*, 580, 125-134.
- [209] MÖELLER, M.R.; ESER, H. The analytical tools for hair testing, in: KINTZ, P. (Ed), 1996. *Drug Testing in Hair*, CRC Press, Boca Raton, pp. 95- 120.
- [210] MÖELLER, M.R.; FEY, P.; SACHS, H., 1993. Hair analysis as evidence in forensic cases. *Forensic Science International*, 63, 43-53.
- [211] MÖELLER, M.R.; FEY, P.; RIMBACH, S., 1992. Identification and quantitation of

- cocaine and its metabolites, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester, in hair of Bolivian coca chewers by Gas chromatography/ Mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 16, 291-296.
- [212] MÖELLER, M.R.; FEY, P.; WENNING, R., 1993. Simultaneous determination of drugs of abuse (opiates, cocaine and amphetamine) in human hair by GC/MS and its application to a methadone treatment program. *Forensic Science International*, 63, 185-206.
- [213] MÖELLER, M.R.; HAMMER, K.; ENGEL, O., 2004. Poppy seed consumption and toxicological analysis of blood and urine samples. *Forensic Science International*, 143, 183-186.
- [214] MÖELLER, M.R.; MUELLER, C., 1995. The detection of 6-monoacetylmorphine in urine, serum and hair by GC/MS and RIA. *Forensic Science International*, 70, 125-133.
- [215] MÖELLER, M.R.; STEINMEYER, S.; KRAEMER, T., 1998. Determination of drugs of abuse in blood. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 713, 91-109.
- [216] MÖELLER, M.R.; KRAEMER, T., 2002. Drugs of abuse monitoring in blood for control of driving under the influence of drugs. *Therapeutic Drug Monitoring*, 24, 210-221.
- [217] MONTAGNA, M.; POLETTINI, A.; STRAMESI, C.; GROPPI, A.; VIGNALI, C., 2002. Hair analysis for opiates, cocaine and metabolites. Evaluation of a method by interlaboratory comparison. *Forensic Science International*, 128, 79-83.
- [218] MONTAGNA, M.; STRAMESI, C.; VIGNALI, C.; GROPPI, A.; POLETTINI, A., 2000. Simultaneous hair testing for opiates, cocaine, and metabolites by GC-MS: a survey of applicants for driving licenses with a history of drug use. *Forensic Science International*, 107, 157-167.
- [219] MOORE, C., 2001. Cocaine and Metabolites in Hair. *Interpretation of hair analysis. International Workshop of the Society of Hair Testing*, Bordeaux, June, France, personal communication.
- [220] MOORE, C.; DEITERMANN, B.S.D.; LEWIS, B.A.D.; FEELEY, B.S.B.; NIEDBALA, R.S., 1999. The detection of cocaine in hair specimens using micro-plate enzyme immunoassay. *Journal of Forensic Science*, 44, 609-612.
- [221] MOORE, C.; GUZALDO, F., 2001. The determination of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THC-COOH) in hair using negative ion gas-mass spectrometry and high-volume injection. *Journal of Analytical Toxicology*, 25, 555-558.
- [222] MOORE, C.M.; BROWN, S.; NEGRUZ, A.; TEBBETT, I.; MEYER, W.; JAIN, L., 1993. Determination of cocaine and its major metabolite benzoylecgonine, in amniotic fluid, umbilical cord blood, umbilical cord tissue, and neonatal urine. *Journal of Analytical Toxicology*, 17, 62.
- [223] MORAL, M. M.; FERNÁNDEZ, P.L. Conceptos fundamentales en drogodependencias, in: LORENZO, P.; LADERO, J.M.; LEZA, J.C.; LIZASOAIN, I.

- (Ed), 1998. *Drogo dependencias, Farmacología, Patología, Psicología, Legislación*, Editorial Medica Panamericana, Madrid, pp. 1-20.
- [224] MORIYA, F.; CHAN, K.M.; NOGUCHI, T.T.; WU, P.Y., 1994. Testing for drugs of abuse in meconium of newborn infants. *Journal of Analytical Toxicology*, 18, 41-45.
- [225] MURA, P.; PIRIOU, A. Cannabis, in: KINTZ, P. (Ed), 1998. *Toxicologie et pharmacology médico-légales*, Collection OptionBio, Elsevier, pp. 543- 554.
- [226] MURA, P.; PIRIOU, A. Le cannabis, in: MURA, P. (Ed), 1999. *Alcool, Médicaments, Stupéfiants et Conduite Automobile*, Collection OptionBio, Elsevier, pp. 59-74.
- [227] MUSSHOF, F.; JUNKER, H.P.; LACHENMEIER, D.W.; KROENER, L.; MADEA, B., 2002. Fully automated determination of cannabinoids in hair samples using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of analytical Toxicology*, 26, 554-560.
- [228] MUSSHOF, F., 2000. Illegal or legitimate use? Precursor compounds to amphetamine and methamphetamine. *Drug Metabolism Reviews*, 32, 15-44.
- [229] MUSSHOF, F.; LACHENMEIER, D.W.; KROENER, L.; MADEA, B., 2002. Automated headspace solid-phase dynamic extraction for the determination of amphetamines and synthetic designer drugs in hair samples. *Journal of Chromatography A*, 958, 231-238.
- [230] NAKAHARA, Y., 1995. Detection and diagnostic interpretation of amphetamines in hair. *Forensic Science International*, 70, 135-153.
- [231] NAKAHARA, Y., 1999. Hair analysis for abused and therapeutic drugs. *Journal of Chromatography B*, 733, 161-180.
- [232] NAKAHARA, Y.; KIKURA, R., 1994. Hair analysis for drugs abuse. VII. The incorporation rates of cocaine, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester into rat hair and hydrolysis of cocaine in rat hair. *Archives of Toxicology*, 68, 54-59.
- [233] NAKAHARA, Y.; KIKURA, R., 1996. Hair analysis for drugs of abuse XIII. Effect of structural factors on incorporation of drugs into hair: the incorporation rates of amphetamine analogs. *Archives of Toxicology*, 70, 841-849.
- [234] NAKAHARA, Y.; KIKURA, R.; TAKAHASHI, K., 1994. Hair analysis for drugs of abuse VIII. Effective extraction and determination of 6-acetylmorphine in hair with trifluoroacetic acid-methanol for the confirmation of retrospective heroin use by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 657, 93-101.
- [235] NAKAHARA, Y.; KIKURA, R.; YASUHARA, M.; MUKAI, T., 1997. Hair analysis for drug abuse XIV. Identification of substances causing acute poisoning. *Forensic Science International*, 84, 157-164.

- [236] NAKAHARA, Y.; TAKAHASHI, K.; KONUMA, K., 1993. Hair analysis of drugs of abuse. VI. The excretion of methoxyphenamine and methamphetamine into beards of human subjects. *Forensic Science International*, 63, 109-119.
- [237] NAKASHIMA, K.; KADDOUMI, A.; ISHIDA, Y.; ITHO, T.; TAKI, K., 2003. Determination of methamphetamine and amphetamine in abuser's plasma and hair samples with HPLC-FL. *Biomedical Chromatography*, 17, 471-476.
- [238] NAVAZA, M.C.D.; GARCÍA-SAAVEDRA, M.J.G.; GARCÍA, J.C.V., 1998. *Fundamentos y Técnicas de Análisis Bioquímico, principios de análisis instrumental*. Ciencias de la Salud, Parainfo, Madrid, 211-258.
- [239] NEGRUSZ, A.; MOORE, C.; DEITERMANN, D.; LEWIS, D.; KALECIAK, K.; KROSTRAND, R.; FEELEY, B.; SAM NIEDBALA, R., 1999. Highly sensitive micro-plate enzyme immunoassay screening and NCI-GC-MS confirmation of flunitrazepam and its major metabolite 7-aminoflunitrazepam in hair. *Journal of Analytical Toxicology*, 23, 429-435.
- [240] NEGRUZ, A.; MOORE, C.M.; HINKEL, K.B.; STOCKHAM, T.L.; VERMA, M.; STRONG, M.J.; JANICAK, P.G., 2001. Deposition of 7-aminoflunitrazepam in hair after a single dose of Rohypnol. *Journal of Forensic Science*, 46, 1143-1151.
- [241] NEGRUZ, A.; MOORE, C.M.; KERN, J.L.; JANICAK, P.G.; STRONG, M.J.; LEVY, N.A., 2000. Quantitation of clonazepam and its major metabolite 7-aminoclonazepam in hair. *Journal of Analytical Toxicology*, 614-620.
- [242] NI, Y.; WANG, L.; KOKOT, S., 2001. Voltammetric determination of chlorpromazine hydrochloride and promethazine hydrochloride with the use of multivariate calibration. *Analytica Chimica Acta*, 439, 159-168.
- [243] NISHIDA, M.; NAMERA, A.; YASHIKI, M.; KOJIMA, T., 2003. Routine analysis of amphetamine and methamphetamine in biological materials by gas chromatography-mass spectrometry and on-column derivatization. *Journal of Chromatography B*, 789, 65-71.
- [244] OBSERVATÓRIO EUROPEU DA DROGA E DA TOXICODPENDÊNCIA, 2002. *Relatório anual sobre a evolução do fenómeno da droga na União Europeia e na Noruega*. Serviço das Publicações Oficiais das Comunidades Europeias. Luxemburgo, 1-63.
- [245] OFFIDANI, C.; CARNEVALE, A.; CHIAROTTI, M., 1989. Drugs in hair: a new extraction procedure. *Forensic Science International*, 41, 35-39.
- [246] OFFIDANI, C.; ROSSI, S.S.; CHIAROTTI, M., 1993. Drug distribution in the head, axillary and pubic hair of chronic addicts. *Forensic Science International*, 63, 105-108.
- [247] OZEKI, H.; ITO, S.; WAKAMATSU, K., 1996. Chemical characterization of melanins in sheep wool and human hair. *Pigment Cell Research*, 9, 51-57.

- [248] PATERSON, S.; MCLACHLAN-TROUP, N.; CORDERO, R.; DOHNAL, M.; CARMAN, S., 2001. Qualitative Screening for drugs of abuse in hair using GC-MS. *Journal of Analytical Toxicology*, 25, 203-208.
- [249] PAULSEN, R.B.; WILKINS, D.G.; SLAWSON, M.H.; SHAW, K.; ROLLINS, D.E., 2001. Effect of four laboratory decontamination procedures on the quantitative determination of cocaine and metabolites in hair by HPLC-MS. *Journal of Analytical Toxicology*, 25, 490-496.
- [250] PÉPIN, G.. Opiacés et opioïdes, in: KINTZ, P. (Ed), 1998. *Toxicologie et pharmacologie médico-légales*, Collection OptionBio, Elsevier, pp. 335- 430.
- [251] PÉPIN, G.; CHÈZE, M.. Les opiacés, in MURA, P. (Ed), 1999. *Alcool, médicaments, stupéfiants et conduite automobile*, Collection OptionBio, Elsevier, pp. 75- 95.
- [252] PÉPIN, G.; GAILLARD, Y., 1997. Concordance between self-reported drug use and findings in hair about cocaine and heroin. *Forensic Science International*, 84, 37-41.
- [253] PICHINI, S.; PACIFICI, R.; ALTIERI, I.; PELLEGRINI, M.; ZUCCARO, P., 1999. Determination of opiates and cocaine in hair as trimethylsilyl derivatives using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 23, 343-348.
- [254] PICHINI, S.; PACIFICI, R.; PELLEGRINI, M.; MARCHEI, E.; PÉREZ-ALARCÓN, E.; PUIG, C.; VALL, O.; GARCÍA-ALGAR, O., 2003. Development and validation of a liquid chromatography-mass spectrometry assay for the determination of opiates and cocaine in meconium. *Journal of Chromatography B*, 794, 281-292.
- [255] PINHEIRO, J.E.S., 1996. *Consumo, detecção e vigilância de drogas ilícitas em meio laboral. Estudo analítico em amostras de cabelo*. Dissertação de Mestrado em Saúde Ocupacional, Coimbra, 215 pp.
- [256] PIROZHKOVA, S.V.; WATSON, R.R.; ESKELSON, C.D., 1992. Gas chromatography detection of cocaine and cocaethylene in hair of mice chronically injected with cocaine or cocaethylene and fed ethanol. *Forensic Science International*, 57, 99-107.
- [257] PIZARRO, N.; ORTUÑO, J.; SEGURA, J.; FARRÉ, M.; MAS, M.; CAMI, J.; TORRE, R., 1999. Quantification of amphetamine plasma concentrations by gas chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 21, 739-747.
- [258] POLETTINI, A.; GROPPA, A.; MONTAGNA, M., 1993. Rapid and highly selective GC/MS/MS detection of heroin and its metabolites in hair. *Forensic Science International*, 63, 217-225.
- [259] POLETTINI, A.; STRAMESI, C.; VIGNALI, C.; MONTAGNA, M., 1997. Determination of opiates in hair. Effects of extraction methods on recovery and on stability of analytes. *Forensic Science International*, 84, 259-269.

- [260] PÖTSCH, L.; SKOPP, G., 1996. Stability of opiates in hair fibers after exposure to cosmetic treatment. *Forensic Science International*, 81, 95-102.
- [261] PÖTSCH, L.; SKOPP, G.; MOELLER, M.R., 1997. Biochemical approach on the conservation of drug molecules during hair fiber formation. *Forensic Science International*, 84, 25-35.
- [262] PRAGST, F.; ROTHE, M.; HUNGER, J.; THOR, S., 1997. Structural and concentration effects on deposition of tricyclic antidepressants in human hair. *Forensic Science International*, 84, 225-236.
- [263] PRESTON, K.L.; HUESTIS, M.A.; WONG, C.J.; UMBRICH, A.; GOLDBERGER, B.A.; CONE, E.J., 1999. Monitoring cocaine use in substance-abuse-treatment patients by sweat and urine testing. *Journal of Analytical Toxicology*, 23, 313-322.
- [264] PRIETO, A.M.G.; TROYA, C.C.; HERNANDO, M.H., 1998. *Tratamientos Capilares*. Imagem Personal, Parainfo, Madrid, 220 pp.
- [265] PUJADAS, M.; PICHINI, S.; POUDEVIDA, S.; MENOYO, E.; ZUCCARO, P.; FARRÉ, M.; TORRE, R., 2003. Development and validation of a gas chromatography-mass spectrometry assay for hair analysis of amphetamine, metamphetamine and methylenedioxy derivatives. *Journal of Chromatography B*, 798, 249-255.
- [266] PUSCHEL, K.; TOMASCH, P.; ARNOLD, W., 1983. Opiates levels in hair. *Forensic Science International*, 21, 181-186.
- [267] QUESADA, J.M.L.; MORAL, M.M.. Cocaína (III), in: LORENZO, P.; LADERO, J.M.; LEZA, J.C.; LIZASOAIN, I. (Ed), 1999. *Drogodependencias. Farmacología. Patología. Psicología. Legislación*. Editorial Medica panamericana, Madrid, pp. 135-147.
- [268] QUINTELA, O.; BERMEJO, A.M.; TABERNEIRO, M.J.; STRANO-ROSSI, S.; CHIAROTTI, M.; LUCAS, A.C.S., 2000. Evaluation of cocaine, amphetamines and cannabis use in university students through hair analysis: preliminary results. *Forensic Science International*, 107, 273-279.
- [269] RAIKOS, N.; CHRISTOPOULOU, K.; THEODORIDIS, G.; TSOUKALI, H.; PSAROULIS, D., 2003. Determination of amphetamines in human urine by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. *Journal of Chromatography B*, 789, 59-63.
- [270] RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M., 1997. *Farmacología*. 3ª Ed, Trad. do original de 1995, Guanabara Koogam, pp. 410-445.
- [271] REN, Y.; ZHANG, Z.; REN, Y.; LI, W.; WANG, M.; XU, G., 1997. Diagnosis of lung cancer based on metal contents in serum and hair using multivariate statistical methods. *Talanta*, 44, 1823-1831.

- [272] REPETTO, M., y colaboradores, 1985. *Toxicología de la Drogadiccion*. Monografías de la Asociación Española de Toxicología, nº1, Ediciones Díaz de Santos S.A., 172 pp.
- [273] RICOSSA, M.C.; BERNINI, M.; FERRARI, F.D., 2000. Hair analysis for driving licence in cocaine and heroin users. An epidemiological study. *Forensic Science International*, 107, 301-308.
- [274] RIVIER, L., 2000. Is there a place for hair analysis in doping controls? *Forensic Science International*, 107, 309-323.
- [275] RÖHRICH, J.; KAUERT, G., 1997. Determination of amphetamine and methylenedioxy-amphetamine and methylenedioxy-amphetamine-derivatives in hair. *Forensic Science International*, 84, 179-188.
- [276] RÖHRICH, J.; ZÖRNTLEIN, S.; BECKER, J., 2000. Analysis of LSD in human body fluids and hair samples applying ImmunElute columns. *Forensic Science International*, 107, 181-190.
- [277] RÖHRICH, J.; ZÖRNTLEIN, S.; PÖTSCH, L.; SKOPP, G.; BECKER, J., 2000. Effect of the shampoo ultra clean on drug concentrations in human hair. *International Journal of Legal Medicine*, 113, 102-106.
- [278] ROLLINS, D.E.; WILKINS, D.G., GYGI, S.P., SLAWSON, M.H., NAGASAWA, P.R., 1997. Testing for drugs of abuse in hair-experimental observations and indications for future research. *Forensic Science International Review*, 9, 24-36.
- [279] ROMANO, G.; BARBERA, N.; LOMBARDO, I., 2001. Hair testing for drugs of abuse: evaluation of external cocaine contamination and risk of false positives. *Forensic Science International*, 123, 119-129.
- [280] ROMANO, G.; BARBERA, N.; SPADARO, G.; VALENTI, V., 2003. Determination of drugs of abuse in hair: evaluation of external heroin contamination and risk of false positives. *Forensic Science International*, 131, 98-102.
- [281] ROMOLO, F.S.; ROTOLO, M.C.; PALMI, I.; PACIFICI, R.; LOPEZ, A., 2003. Optimized conditions for simultaneous determination of opiates, cocaine and benzoylecgonine in hair samples by GC-MS. *Forensic Science International*, 138, 17-26.
- [282] ROPERO-MILLER, J.D.; GOLDBERGER, B.A.; CONE, E.J.; JR JOSEPH, R.E., 2000. The disposition of cocaine and opiate analytes in hair and fingernails of humans following cocaine and codeine administration. *Journal of Analytical Toxicology*, 24, 496-508.
- [283] ROSSI, S.S.; OFFIDANI, C.; CHIAROTTI, M., 1998. Application of hair analysis to document coercive heroin administration to a child. *Journal of Analytical Toxicology*, 22, 75-77.
- [284] ROTHE, M.; PRAGST, F., 1995. Solvent optimisation for the direct extraction of opiates from hair samples. *Journal of Analytical Toxicology*, 19, 236-240.

- [285] ROTHE, M.; PRAGST, F.; SPIEGEL, K.; HARRACH, T.; FISCHER, K.; KUNKEL, J., 1997. Hair concentrations and self-reported abuse history of 20 amphetamine and ecstasy users. *Forensic Science International*, 89, 111-128.
- [286] SACHS, H. Forensic Applications of hair analysis, in: KINTZ, P. (Ed), 1986. *Drug Testing in Hair*, CRC Press, Boca Raton, pp. 211-222.
- [287] SACHS, H., 1995. Theoretical limits of the evaluation of drug concentrations in hair due to irregular hair growth. *Forensic Science International*, 40, 53-61.
- [288] SACHS, H., 1997. History of hair analysis. *Forensic Science International*, 84, 7-16.
- [289] SACHS, H., 2000. Introduction to hair analysis. *Progress in Hair analysis for Illegal Drugs, International Workshop of the Society of Hair Testing*, 7-10.
- [290] SACHS, H.; DRESSLER, U., 2000. Detection of THCCOOH in hair by MSD-NCI after HPLC clean-up. *Forensic Science International*, 107, 239-247.
- [291] SACHS, H.; KINTZ, P., 1998. Testing for drugs in hair, critical review of chromatographic procedures since 1992. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 713, 147-161.
- [292] SACHS, H.; RAFF, I., 1993. Comparison of quantitative results of drugs in human hair by GC/MS. *Forensic Science International*, 63, 207-216.
- [293] SAITO T.; YAMAMOTO, I.; KUSAKABE, T.; HUANG, X.L.; YUKAWA, N.; TAKEICHI, S., 2000. Determination of chronic methamphetamine abuse by hair analysis. *Forensic Science International*, 112, 65-71.
- [294] SÁNCHEZ, M.A.M.; CERRO, J.C.L.. Opiáceos (I, II), in: LORENZO, P.; LADERO, J.M.; LEZA, J.C.; LIZASOAIN, I. (Ed), 1999. *Drogodependencias. Farmacología. Patología. Psicología. Legislación*. Editorial Medica panamericana, Madrid, pp.47-76.
- [295] SÁNCHEZ, M.A.M.; HERNÁNDEZ, I.L. Benzodiazepinas y barbitúricos, in: LORENZO, P.; LADERO, J.M.; LEZA, J.C.; LIZASOAIN, I. (Ed), 1999. *Drogodependencias. Farmacología. Patología. Psicología. Legislación*. Editorial Medica panamericana, Madrid, pp. 317-328.
- [296] SATO, H.; UEMATSU, T.; YAMADA, K.; NAKASHIMA, M., 1993. Chlorpromazine in human scalp hair as an index or dosage history: comparison with simultaneously measured haloperidol. *European Journal Clinical Pharmacology*, 44, 439-444.
- [297] SCHEIDWEILER, K.B.; HUESTIS, M.A., 2004. Simultaneous quantification of opiates, cocaine, and metabolites in hair by LC-APCI-MS/MS. *Analytical Chemistry*, 76, 4358-4363.
- [298] SCHUCKIT, M.A., 1998. *Abuso de Álcool e drogas*. Alcoolismo e Toxicomanias Modernas 2, Climepsi Editores, Lisboa, 414 pp.

- [299] SCIENTIFIC SECTION (Laboratory) POLICY DEVELOPMENT and ANALYSIS BRANCH DIVISION for OPERATIONS and ANALYSIS, 1998. *Terminology and information on drugs*. UNITED NATIONS.
- [300] SEGURA, J.; STRAMESI, C.; REDÓN, A.; VENTURA, M.; SÁNCHEZ, C.J.; GONZÁLEZ, G.; SAN, L.; MONTAGNA, M., 1999. Immunological screening of drugs of abuse and gas chromatographic-mass spectrometric confirmation of opiates and cocaine in hair. *Journal of Chromatography B*, 724, 9-21.
- [301] SEGURA, J.; VENTURA, R.; JURADO, C., 1998. Derivatization procedures for gas chromatographic-mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples with special attention to drugs of abuse and doping agents. *Journal of Chromatography B*, 713, 61-90.
- [302] SELAVKA, C.M.; RIEDERS, F., 1995, The determination of cocaine in hair: a review. *Forensic Science International*, 70, 155-164.
- [303] SELTEN, J.P.; BOSMAN, I.J.; BOER, D.; VEEN, N.D.; GRAAF, Y.; MAES, R.A.A.; KAHN, R.S., 2002. Hair analysis for cannabinoids and amphetamines in a psychosis incidence study. *European Neuropsychopharmacology*, 12, 27-30.
- [304] SENGLER-RAGOUCY, C. Cocaine, in: KINTZ, P. (Ed), 1998. *Toxicologie et pharmacologie médico-légales*, Collection OptionBio, Elsevier, pp. 431- 463.
- [305] SHEN, M., 2000. Detection of antidepressant and antipsychotic drugs in human hair and evaluation of the results. *Fa Yi Xue Za Zhi*, 16, 148-152.
- [306] SHEN, M.; XIANG, P.; WU, H.; SHEN, B.; HUANG, Z., 2002. Detection of antidepressant and antipsychotic drugs in human hair. *Forensic Science International*, 126, 153-161.
- [307] SKENDER, L.; KARAIĆ, V.; BRČIĆ, I., 2001. Comparison of rapid drugs of abuse testing kits and the GC/MS technique in the analysis of human urine after consumption of codeine, pholcodine and poppy seed. *Biochemia Medica god.*, 11, 79-85.
- [308] SKENDER, L.; VARAČIĆ, V.; BRČIĆ, I.; BAGARIĆ, A., 2002. Quantitative determination of amphetamines, cocaine, and opiates in human hair by gas chromatography/ mass spectrometry. *Forensic Science International*, 125, 120-126.
- [309] SKOPP, G.; PÖTSCH, L.; MAUDEN, M., 2000. Stability of cannabinoids in hair samples exposed to sunlight. *Clinical Chemistry*, 46, 1846-1848.
- [310] SLAWSON, M. H.; WILKINS, D.G.; ROLLINS, D.E., 1998. The incorporation of drugs into hair: relationship of hair color and melanin concentration to phencyclidine incorporation. *Journal of Analytical Toxicology*, 22, 406-413.
- [311] SMITH, F.P.; KIDWELL, D.A., 1996. Cocaine in hair, saliva, skin swabs, and urine of cocaine users' children. *Forensic Science International*, 83, 179-189.

- [312] SOARES, M.A., 1994. Medicamentos e condução. *Farmácia Portuguesa*, 88, 9-16.
- [313] SOCIETY OF HAIR TESTING, 2004. Recommendations for hair testing in forensic cases. *Forensic Science International*, 145, 83-84.
- [314] SPIEHLER, V., 2000. Hair analysis by immunological methods from the beginning to 2000. *Forensic Science International*, 107, 249-259.
- [315] SPORKERT, F.; PRAGST, F., 2000. Determination of lidocaine in hair of drug fatalities by headspace solid-phase microextraction. *Journal of Analytical Toxicology*, 24, 316-322.
- [316] SPORKERT, F.; PRAGST, F., 2000. Use of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) in hair analysis for organic compounds. *Forensic Science International*, 107, 129-148.
- [317] SPRINGFIELD, A.D.; CARTMELL, L.W.; AUFDERHEIDE, A. C.; BUIKSTRA, J.; HO, J., 1993. Cocaine and metabolites in the hair of ancient Peruvian coca leaf chewers. *Forensic Science International*, 63, 269-275.
- [318] SRAMEK, J.J.; BAUMGARTNER, W.A.; AHRENS, T.N.; HILL, V.A.; CUTLER, N.R., 1992. Detection of benzodiazepines in human hair by radioimmunoassay. *Annals of Pharmacotherapy*, 26, 469-472.
- [319] SRISURAPANONT, M.; KITTIRATANAPAIBOOM, P.; JARUSURASIN, N., 2001. Treatment for amphetamine psychosis. *Cochrane Database System Review*, 4, CD003026.
- [320] STAUB, C., 1995. Analytical procedures for determination of opiates in hair: a review. *Forensic Science International*, 70, 111-123.
- [321] STAUB, C., 1997. Supercritical fluid extraction and hair analysis: the situation in 1996. *Forensic Science International*, 84, 295-304.
- [322] STAUB, C., 1999. Chromatographic procedures for determination of cannabinoids in biological samples, with special attention to blood and alternative matrices like hair, saliva, sweat and meconium. *Journal of Chromatography B*, 733, 119-126.
- [323] STAUB, C.; GIROD, C., A general solid-phase extraction procedure for drug testing in hair, in: MÜLLER, R.K. (Ed.) 2000. *Progress in Hair analysis for Illegal Drugs, International Workshop of the Society of Hair testing*, Kreischa, pp. 15-22.
- [324] STOUT, P. R.; RUTH, J. A., 1999. Deposition of [3H]cocaine, [3H]nicotine and [3H]flunitrazepam in mouse hair melanosomes after systemic administration. *Drug Metabolism Disposition*, 27, 731-735.
- [325] STRANO-ROSSI, S.; BERMEJO-BARRERA, A.; CHIAROTTI, M., 1995. Segmental hair analysis for cocaine and heroin abuse determination. *Forensic Science International*, 70, 211-216.

- [326] STRANO-ROSSI, S.; CHIAROTTI, M., 1999. Solid-phase microextraction for cannabinoids analysis in hair and its possible application to other drugs. *Journal of Analytical Toxicology*, 23, 7-10.
- [327] SWEENEY, S.A.; KELLY, R.C.; BOURLAND, J.A.; JOHNSON, T.; BROWN, W.C.; LEE, H.; LEWIS, E., 1998. Amphetamines in hair by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Analytical Toxicology*, 22, 418-424.
- [328] TABERNERO, M.J.; BERMEJO, A.M.; FERNANDEZ, P., 1999. Analysis of opiates and cocaine by RIA and GC-MS: distribution of their metabolites in urine and hair from drug addicts. *Addiction Biology*, 4, 421-428.
- [329] TAGLIARO, F.; BATTISTI, Z.; SMITH, F.P.; MARIGO, M., 1998. Death from heroin overdose: findings from hair analysis. *Lancet*, 351, 1923-1925.
- [330] TAGLIARO, F.; DE BATTISTI, Z.; LUBLI, G.; NERI, C.; MANETTO, G.; MARIGO, M., 1997. Integrated use of hair analysis to investigate the physical fitness to obtain the driving licence: a casework study. *Forensic Science International*, 84, 129-135.
- [331] TAGLIARO, F.; MANETTO, G.; CRIVELLENTI, F.; SCARCELLA, D.; MARIGO, M., 1998. Hair analysis for abused drugs by capillary zone electrophoresis with field-amplified sample stacking. *Forensic Science International*, 92, 201-211.
- [332] TAGLIARO, F.; POIESI, C.; AIELLO, R.; DORIZZI, R.; GHIELMI, S.; MARIGO, M., 1993. Capillary electrophoresis for the investigation of illicit drugs in hair: determination of cocaine and morphine. *Journal of Chromatography*, 638, 303-309.
- [333] TAGLIARO, F.; SMITH, F. P.; DE BATTISTI, Z.; MANETTO, G.; MARIGO, M., 1997. Hair analysis, a novel tool in forensic and biomedical sciences: new chromatographic and electrophoretic/ electrokinetic analytical strategies. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 689, 261-271.
- [334] TAGLIARO, F.; SMYTH, W.F.; TURRINA, S.; DEYL, Z.; MARIGO, M., 1995. Capillary electrophoresis: a new tool in forensic toxicology. Applications and prospects in hair analysis for illicit drugs. *Forensic Science International*, 70, 93-104.
- [335] TAGLIARO, F.; VALENTINI, R.; MANETTO, G.; CRIVELLENTI, F.; CARLI, G.; MARIGO, M., 2000. Hair analysis by using radioimmunoassay, high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis to investigate chronic exposure to heroin, cocaine and/or ecstasy in applicants for driving licences. *Forensic Science International*, 107, 121-128.
- [336] TOLEDO, F.C.P.; YONAMINE, M.; MOREAU, R.L.M.M.; SILVA, O.A., 2003. Determination of cocaine, benzoilecgonine and cocaethylene in human hair by solid-phase microextraction and gas chromatography- mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 798, 361-365.
- [337] TORRE, R.; FARRÉ, M.; NAVARRO, M.; PACIFICI, R.; ZUCCARO, P.; PICHINI, S., 2004. Clinical pharmacokinetics of amphetamine and related substances monitoring in

- conventional and non-conventional matrices. *Clinical Pharmacokinetics*, 43, 157-185.
- [338] TRACQUI, A.. Unusual drugs in hair, in: KINTZ, P. (Ed.), 1996. *Drug Testing in Hair*, CRC Press, Boca Raton, pp. 191-210.
- [339] TRACQUI, A.; KINTZ, P.; KREISSIG, P.; MANGIN, P., 1992. Simple and rapid screening procedure for 27 neuroleptics using HPLC/DAD. *Journal of Liquid Chromatography*, 15, 1381-1396.
- [340] TRACQUI, A.; LUDES, B. Médicaments psychotropes, in: KINTZ, P. (Ed), 1998. *Toxicologie et pharmacologie médico-légales*, Collection OptionBio, Elsevier, pp. 233- 274.
- [341] TSATSAKIS, A.M., 1998. Judicial applications of hair testing for addicts in Crete: sectional hair analysis of heavy heroin abusers. *Journal of Clinical Forensic Medicine*, 5, 109-113.
- [342] UEMATSU, T., 1993. Utilization of hair analysis for therapeutic drug monitoring with a special reference to ofloxacin and to nicotine. *Forensic Science International*, 63, 261-268.
- [343] UHL, M & SPORKERT, F., 2001. Detection of Cannabinoids in hair- Interpretation of Results. *Interpretation of hair analysis. International Workshop of the Society of Hair Testing*, Bordeaux, june, France, personal communication.
- [344] UHL, M., 1997. Determination of drugs in hair using GC/MS/MS. *Forensic Science International*, 84, 281-294.
- [345] UHL, M., 1998. Determination of 11-nor-delta-9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid by GC/MS/MS-NCI (TSQ 700). *Cannabinoids in hair. International Workshop of the Society of Hair Testing*, personal communication.
- [346] UHL, M. Interpretation of quantitative findings and data evaluation in hair analysis, in: MÜLLER, R.K. (Ed.) 2000. *Progress in Hair analysis for Illegal Drugs. International Workshop of the Society of Hair testing*, pp. 61-78.
- [347] UHL, M., 2000. Tandem mass spectrometry: a helpful tool in hair analysis for the forensic expert. *Forensic Science International*, 107, 169-179.
- [348] UHL, M.; SACHS, H. 2004. Cannabinoids in hair: strategy to prove marijuana/hashish consumption. *Forensic Science International*, 145, 143-1147.
- [349] UHL, M; SPORKERT, F., 2001. Detection of cannabinoids in hair-Interpretation of Results. *Interpretation of hair analysis. International Workshop of the Society of Hair Testing*, Bordeaux, june, France, personal communication.
- [350] UNITED NATIONS, *Single Convention on Narcotic Drugs*, 1961.
- [351] UNITED NATIONS, *Single Convention on Narcotic Drugs*, 1971.

- [352] VALENTE, D.; CASSINI, M.; PIGLIAPOCHI, M.; VANSETTI, G., 1981. Hair as the sample in assessing morphine and cocaine addiction. *Clinical Chemistry*, 27, 1952-1953.
- [353] VALENTINE, J.L.; MIDDLETON, R.; SPARKS, C., 1996. Identification of urinary benzodiazepines and their metabolites: comparison of automated HPLC and GC-MS after immunoassay screening of clinical specimens. *Journal of Analytical Toxicology*, 20, 416-424.
- [354] VAYSSETTE, F.; CIRIMELE, V.; KINTZ, P.; MANGIN, P., 1996. Detection of nordiazepam in the hair of drug addicts. *Annals Pharmaceutiques Françaises*, 54, 211-216.
- [355] VERSTRAETE, A.G., 2004. Detections times of drugs of abuse in blood, urine and oral fluid. *Therapeutic Drug Monitoring*, 26, 200-204.
- [356] VINNER, E.; DEHON, B.; GHYSEL, M.H.; LHERMITTE, M. Les psychostimulants, in MURA, P. (Ed), 1999. *Alcool, médicaments, stupéfiants et conduite automobile*, Collection OptionBio, Elsevier, pp. 97- 128.
- [357] VINNER, E.; VIGNAU, J.; THIBAUT, D.; CODACCIONI, X.; BRASSART, C.; HUMBERT, L.; LHERMITTE, M., 2003. Hair analysis of opiates in mothers and newborns for evaluating opiate exposure during pregnancy. *Forensic Science International*, 133, 57-62.
- [358] WANG, W.L.; CONE, E.J., 1995. Testing human hair for drugs of abuse. IV. Environmental cocaine contamination and washing effects. *Forensic Science International*, 70, 39-51.
- [359] WANG, W-L.; DARWIN, W.D.; CONE, E.J., 1994. Simultaneous assay of cocaine, heroin and metabolites in hair, plasma, saliva and urine by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical applications*, 660, 279-290.
- [360] WANG, X.; ZHUANG, Z.; ZHU, E.; YANG, C.; WAN, T., 1995. Multi- element ICP-AES analysis of hair samples and chemometric for cancer diagnosis. *Microchemical Journal*, 51, 5-14.
- [361] WASELS, R.; BELLEVILLE, F., 1994. Gas chromatography-mass spectrometry procedures used for identification and determination of morphine, codeine and 6- monoacetylmorphine. *Journal of Chromatography A*, 674, 225-234.
- [362] WEINMANN, W.; MÜLLER, C.; VOGT, S.; FREI, A., 2002. Technical note: LC-MS-MS Analysis of the Neuroleptics Clozapine, Flupentixol, Haloperidol, Penfluridol, Thioridazine, and Zuclopenthixol in hair obtained from psychiatric patients. *Journal of Analytical Toxicology*, 26, 253-261.
- [363] WELCH, M.J.; SNIEGOSKI, L.T.; ALLGOOD, C.C.; HABRAM, M., 1993. Hair analysis for drugs of abuse: evaluation of analytical methods, environmental issues, and development of reference materials. *Journal of Analytical Toxicology*, 17, 389-398.

- [364] WENNING, R., 2000. Potential problems with the interpretation of hair analysis results. *Forensic Science International*, 107, 5-12.
- [365] WENNING, R., 2000. Threshold values in toxicology-useful or not? *Forensic Science International*, 113, 323-330.
- [366] WILKINS, D.; HAUGHEY, H.; CONE, E; HUESTIS, M.; FOLTZ, R.; ROLLINS, D., 1995. Quantitative analysis of THC, 11-OH-THC, and THCCOOH in human hair by negative ion chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 19, 483-491.
- [367] WILLIAMS, J.; PATSALOS, P.N.; WILSON, J.F., 1997. Hair analysis as a potential index of therapeutic compliance in the treatment of epilepsy. *Forensic Science International*, 84, 113-122.
- [368] WINGERT, W.E.; FELDMAN, M.S.; KIM, M.H.; NOBLE, L.; HAND, I.; YOON, J.J., 1994. A comparison of meconium, maternal urine and neonatal urine for detection of maternal drug use during pregnancy. *Journal of Forensic Science*, 39, 150-158.
- [369] WU, J.; LORD, H.; PAWLISZYN, J., 2001. Determination of stimulants in human urine and hair samples by polypyrrole coated capillary in-tube solid phase microextraction coupled with liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Talanta*, 54, 655-672.
- [370] YEGLES, M., 2001. Interpretation of hair analysis Benzodiazepines. *Interpretation of hair analysis. International Workshop of the Society of Hair Testing*, Bordeaux, june, France, personal communication.
- [371] YEGLES, M.; MARSON, Y.; WENNING, R., 2000. Influence of bleaching on stability of benzodiazepines in hair. *Forensic Science International*, 107, 87-92.
- [372] YEGLES, M.; MERSCH, F.; WENNING, R., 1997. Detection of benzodiazepines and other psychotropic drugs in human hair by GC/MS. *Forensic Science International*, 84, 211-218.
- [373] YONAMINE, M.; SILVA, O.A., 2002. Confirmation of cocaine exposure by gas chromatography-mass spectrometry of urine extracts after methylation of benzoylecgonine. *Journal of Chromatography B*, 773, 83-87.

