



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Faculdade de Ciências

**Deteção de opiáceos em sangue *post-mortem* por
cromatografia líquida de alta eficiência com
deteção eletroquímica usando microextração em
seringa empacotada**

David Carreira Figueirinha

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof^a. Doutora Maria Eugénia Gallardo Alba
Co-orientador: Mestre David Jerónimo Oppolzer

Covilhã, Junho de 2014

Dedicatória

Esta dissertação é o resultado de muitas horas de estudo, reflexão e trabalho. É o culminar de toda uma longa etapa de vida académica que, não teria sido possível sem a ajuda de pessoas como vocês, que me aconselharam, motivaram e orientaram. É por isso, da minha vontade e orgulho dedicar este trabalho a vocês, pai e mãe, que me apoiaram mais do que ninguém. Sem vocês nunca teria tido esta oportunidade e com certeza que o caminho percorrido durante estes anos teria sido muito mais árduo. Obrigado por tudo!

Agradecimentos

A construção de uma dissertação pressupõe um trabalho pessoal de ponderação, investigação e inspiração. Não é um trabalho meramente individualista sendo fruto de vários contributos na construção do incentivo, da vontade e do apoio para a sua elaboração. Por esta razão, é meu desejo, agradecer a todos os que possibilitaram e me ajudaram neste percurso até à sua conclusão.

À minha orientadora, Doutora Maria Eugénia Gallardo, pelo seu entusiasmo revelado nesta área científica que me levou a despertar o interesse pela toxicologia. Obrigado, por se mostrar sempre presente, mesmo em momentos de adversidade, agradeço também o constante incentivo e confiança no meu trabalho, partilhando toda a sua experiência e conhecimento.

Ao meu co-orientador, mestre David Jerónimo Oppolzer, pela sua amizade, colaboração e incentivo constante, pela permanente disponibilidade, troca de ideias e pelo exemplo de rigor e dedicação laboratorial, que sempre constituiu uma referência em todo o meu trabalho.

Aos meus pais Jorge e Fátima, por me terem acompanhado nesta longa viagem de 23 anos. Pelo apoio incondicional e pela demonstração de grande amizade, por nunca deixarem de acreditar em mim e me terem educado da melhor forma que eu poderia desejar, pelo amor que sempre demonstraram e por fazerem parte ativa da minha vida em todos os momentos. Obrigado!

À minha irmã Ana Catarina, um agradecimento particular não só pelo apoio e companheirismo demonstrado ao longo de todo este trabalho, mas também pela convivência ao longo da vida que me permitiu conhecer muitas das responsabilidades que tenho hoje, em especial de proteção e dedicação aos outros.

A todas as pessoas que de alguma forma me apoiaram e me permitiram aprender a encarar a vida de frente, a superar obstáculos, a enfrentar os medos e anseios, e que me ajudaram a construir o homem que sou hoje.

Por fim, e talvez, o maior dos obrigados, à minha namorada Marta. Desculpa todo o tempo que deixei de passar contigo por causa desta dissertação, e por todas as preocupações que levei quando fui ter contigo. Obrigado pela paciência e por me estares continuamente a desafiar o ego.

A todos vós que espero não desiludir, obrigado.

Resumo

Reconhecendo a gravidade dos problemas relacionados com o abuso e dependência de drogas, e porque direta ou indiretamente fazemos parte desse mundo enigmático, tornou-se pertinente o estudo e reflexão de tal problemática. O consumo de drogas remota há inúmeros anos que, quase se pode afirmar que a história das drogas é a história da humanidade. O seu consumo, bem como os seus efeitos e consequências, são um dos problemas de saúde dominantes, constituindo uma das principais situações de risco da população atual.

Em Portugal, assim como no resto do mundo, o uso abusivo de substâncias psicoativas cresce a cada dia. Em termos de saúde pública, aumentos significativos no número de ocorrências de óbito com o envolvimento de tais substâncias têm sido reportados nas últimas décadas. Assim, existe uma clara necessidade de responder aos problemas causados pelo consumo de múltiplas substâncias psicoativas. A classe dos opiáceos está figurada entre as substâncias de maior prevalência nesse contexto, como tal torna-se necessário dotar os laboratórios com metodologias mais céleres e eficazes de forma a identificar e quantificar estas substâncias.

Assim sendo, neste trabalho pioneiro, descreve-se o desenvolvimento e validação de um método analítico para deteção e quantificação simultânea de opiáceos, morfina (MOR), codeína (COD) e 6-monoacetilmorfina (6-MAM), em amostras de sangue *post-mortem*, por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à deteção eletroquímica de coulometria (HPLC-ED) usando a microextração em seringa empacotada (MEPS). A hidromorfina (HYMOR) foi utilizada como padrão interno.

A elevada quantidade de interferentes biológicos existentes na matriz torna a preparação da amostra um passo fundamental no processo analítico. Desta forma procedeu-se à otimização da técnica extrativa usando o planeamento fatorial fracionado (2^{k-1}), uma ferramenta estatística aplicada ao processo de decisão e que avalia de forma multivariada os fatores intervenientes na extração. O uso do desenho experimental (DOE) fracionado demonstrou ser uma ferramenta útil para a otimização do método de extração, reduzindo o número de experiências, minimizando o tempo de processamento da amostra, reagentes e trabalho laboratorial. As condições finais otimizadas foram o número de aspirações pelo dispositivo (20), quantidade de ácido fórmico na solução de lavagem (3,36%), número de lavagens do sorbente (1), quantidade de hidróxido de amónio na solução de eluição (2,36%) e número de eluições (11).

Utilizando um volume de amostra de 250 μL , o método foi validado de acordo com as normas internacionalmente aceites, da *Food and Drug Administration* (FDA) e *International Conference on Harmonization* (ICH), para a validação de métodos bioanalíticos. Os parâmetros

estudados incluíram a seletividade, modelo de calibração e linearidade, limite de detecção (LOD) e quantificação (LLOQ), precisão, exatidão e recuperação.

O método mostrou-se linear na gama de 25 a 1000 ng/mL, com coeficientes de determinação (R^2) superiores a 0,99 para todos os analitos. Precisão e exatidões intra- e inter-dia estavam em conformidade com os critérios de validação mencionados, ou seja, coeficientes de variação inferiores a 15% e *BIAS* dentro de um intervalo de $\pm 15\%$ da concentração teórica. Quanto à recuperação obtida, os valores variaram entre 6% e 23%.

O método validado mostrou ser aplicável à análise de amostras reais, sendo então uma ferramenta vantajosa não só no âmbito de análises de toxicologia clínica e forense, mas também em análises de despiste de consumo de heroína, morfina e codeína.

Palavras-chave

Opiáceos, MOR, COD, 6-MAM, MEPS, HPLC-ED, sangue *post-mortem*.

Abstract

By recognizing the severity of problems related to drug abuse and addiction and because directly or indirectly we are part of this enigmatic world, it has become important to study and reflect this problematic. The consumption of drugs remotes to several years ago, so that one might even say that the history of drugs is the history of mankind. Their consumption, as well as the respective effects and consequences are one of the biggest health problems, constituting one of the most risky situations of the current population.

In Portugal as also occurs worldwide, the abuse of psychoactive substances is growing each day. In terms of public health, in the last decades significant increases in the number of occurrences of death involving such substances have been reported. Thus, there is a clear need to respond to the problems caused by the abuse of psychoactive substances. The opiates class is figured amongst the most prevalent substances in that context. As such, it becomes necessary to equip labs with faster and effective methods to successfully identify and quantify these substances.

Therefore, this pioneer work describes the development and validation of an analytical method for simultaneous determination of opiates, morphine (MOR), codeine (COD) and 6-monoacetylmorphine (6-MAM) in post-mortem blood samples by high-eficiência liquid chromatography coupled to coulometric electrochemical detection (HPLC-ED), using microextraction in packed syringe (MEPS). Hydromorphine (HYMOR) was used as internal standard.

The high amount of biological interferences existing in the matrix makes the sample preparation a key step in the analytical process. Thus we proceeded to the optimization of the extraction technique using the fractional factorial planning (2^{k-1}), a statistical tool applied to the decision process that assesses in a multivariate way the factors involved in the extraction. The use of the fractionated design of experiments (DOE) showed to be a very useful tool for the optimization of the extraction method, reducing the number of experiments, minimizing the processing time of the sample, reagents and laboratory work. The final optimized conditions were: number of strokes by the device (20), amount of formic acid in the washing solution (3.36%), number of washes of the sorbent (1), amount of ammonium hydroxide in the elution solution (2.36%) and number of elution (11).

Using a sample volume of 250 μ L, the method was validated according to internationally accepted standards, the *Food and Drug Administration* (FDA) and the *International Conference on Harmonization* (ICH) for the validation of bioanalytical methods. The studied parameters included selectivity, calibration model and linearity, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LLOQ), precision, accuracy and recovery.

The method proved to be linear in the range 25-1000 ng/mL with coefficients of determination (R^2) greater than 0.99 for all analytes. Intra-and inter-day accuracy and precision were in accordance with validation criteria mentioned above, in other words, coefficients of variation were less than 15% and BIAS within a range of $\pm 15\%$ of the theoretical concentration. Regarding to the obtained recoveries, the values ranged between 6% and 22%.

The validated method was shown to be applicable to the analysis of real samples being an advantageous tool not only within clinical and forensic toxicology, but also in analyses for the screening of heroin, morphine and codeine.

Keywords

Opiates, MOR, COD, 6-MAM, MEPS, HPLC-ED, *post-mortem* blood

Lista de apresentações em congresso

Apresentação oral

Figueirinha D., Oppolzer D., Barroso M., Gallardo E., “Deteção de opiáceos em sangue post-mortem por cromatografia líquida de alta eficiência com deteção electroquímica usando microextração em seringa empacotada”, IX Annual CICS Symposium 2014, Universidade da Beira Interior (UBI), 30 de Junho e 1 de Julho de 2013, Covilhã, Portugal.

Índice

Dedicatória.....	iii
Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract.....	ix
Lista de Apresentações em Congresso	xi
Lista de Figuras.....	xv
Lista de Tabelas.....	xvii
Lista de Gráficos	xix
Lista de equações.....	xxi
Lista de Acrônimos.....	xxiii
Justificação do Tema.....	xxv
Objetivo	xxv
I. Revisão bibliográfica.....	1
1. Introdução	1
1.1. Drogas de abuso.....	1
1.2. Opiáceos.....	2
1.3. Incidência	3
1.4. Morfina	3
1.5. Codeína.....	4
1.6. Heroína	5
1.7. Propriedades físico-químicas	7
1.8. Recetores opióides	8
1.9. Mecanismo de ação.....	9
1.10. Efeitos farmacológicos e toxicológicos	10
1.10.1. Sistema nervoso Central (SNC)	10
1.10.2. Sistema endócrino	11
1.10.3. Sistema cardiovascular	11
1.10.4. Sistema respiratório.....	11
1.10.5. Sistema gastrointestinal.....	11
1.10.6. Prurido.....	12
1.11. Tolerância e dependência.....	12
2. Detecção de opiáceos em matrizes biológicas	13
2.1. Matriz biológica	13
2.2. Técnicas de extração	14
2.2.1. Microextração em seringa empacotada.....	15
2.3. Técnicas de separação e deteção	17
2.4. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detetor eletroquímico coulométrico	19
II. Parte experimental	21
1. Material e métodos	21
1.1. Reagentes e padrões analíticos	21
1.2. Instrumentação	21
1.3. Padrão interno	22
1.4. Soluções de trabalho	23

1.5.	Sistema cromatográfico e de deteção	23
1.6.	Condições cromatográficas	24
1.7.	Matriz biológica	24
1.8.	Preparação da amostra	25
1.9.	Procedimento de extração.....	25
2.	Resultados e discussão.....	25
2.1.	Otimização dos parâmetros cromatográficos.....	25
2.2.	Otimização do processo de extração.....	28
2.2.1.	Desenho experimental.....	31
2.2.2.	Superfície de resposta.....	36
2.3.	Validação do método	41
2.3.1.	Seletividade	41
2.3.2.	Curva de calibração e linearidade.....	43
2.3.3.	Limite de deteção e quantificação.....	45
2.3.4.	Precisão e exatidão	46
2.3.5.	Recuperação.....	48
2.3.6.	Efeito <i>carryover</i>	49
2.3.7.	Estabilidade	50
2.3.7.1.	Estabilidade em amostras processadas	50
2.3.7.2.	Estabilidade de curta duração	50
2.3.7.3.	Estabilidade a ciclos de congelação/descongelação	51
2.4.	Aplicação do método a amostras reais	52
III.	Conclusões	53
IV.	Referências bibliográficas.....	55
V.	Anexos	63
1.1.	Anexo I: Análise estatística (otimização do processo de extração)	63
1.2.	Anexo II: Gráficos de superfície de resposta (RSM).....	66

Lista de Figuras

Figura 1 - Visão geral do metabolismo da heroína e acetilcodeína. Para maior clareza, os metabolitos glucuronidos foram excluídos (adaptado de MeadWay et al., 2002) [22].	6
Figura 2: Estrutura química da morfina mostrando os seus anéis (A-E) e a sua forma T (Adaptado de Patrick et al., 1995) [10].	7
Figura 3: Eventos intracelulares desencadeados pela ativação de recetores opióides. AC, adenilato ciclase; akt (PKB), proteína quinase B; ATP, adenosina trifosfato; cAMP, monofosfato cíclico de adenosina; cGMP, monofosfato cíclico de guanossina; KATP, canal de potássio sensível a ATP; NO, óxido nítrico; PI3K, fosfatidilinositol 3-quinase; PKG, proteína quinase G (adaptado Tambelli et al., 2009) [26].	10
Figura 4 - Indução da tolerância aos opiáceos por administração crónica. μ , recetor opióide mu; AC, adenilato ciclase; ATP, adenosina trifosfato; cAMP, monofosfato cíclico de adenosina; CREB, fator de transcrição de ligação à enzima cAMP; GDP, guanossina difosfato; GTP, guanossina trifosfato; K ⁺ , potássio; Na ⁺ , sódio; PKA, proteína quinase A; α_i , subunidade α da proteína G; β , subunidade β da proteína G; γ , subunidade γ da proteína G, (adaptado Swift et al., 1997) [31].	13
Figura 5: Seringa MEPS (250 μ L) e BIN da SGE. Representação esquemática da coluna de extração (adaptado de Abdel-Rehim, 2010) [43].	16
Figura 6 - Cromatograma representativo da co-eluição dos compostos COD e 6-MAM e separação da MOR com recurso a fase móvel publicada por Mahdy et al., [62].	26
Figura 7 - Cromatogramas da MOR (tR=4,8min), COD (tR=8,1min), 6-MAM (tR=8,7min) à concentração de 1 μ g/mL e padrão interno HYMOR (tR=5,8min) a 1 μ g/mL. O cromatograma A mostra o sinal do canal E1 (+450mV), usado para quantificar a MOR, 6-MAM e detetar a HYMOR. O cromatograma B mostra o sinal do canal E2 (+850mV), usado para quantificar a COD.	28
Figura 8 - Cromatograma de uma amostra branco.	42
Figura 9 - Cromatograma de uma amostra extraída, fortificada com os analitos em estudo a 500ng/mL e padrão interno a 1 μ g/mL.	42
Figura 10 - Cromatograma de uma amostra branco preparada após a extração do calibrador mais elevado para verificação do efeito carryover.	49
Figura 12 - Cromatograma obtido pela análise de uma amostra real.	52

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Classificação dos alcaloides naturais presentes no ópio com respectiva concentração em percentagem.	2
Tabela 2: Tempos de deteção dos opiáceos em estudo [15,16,18,22].....	6
Tabela 3 - Estrutura e propriedades físico-químicas da morfina, codeína e 6-monoacetilmorfina	8
Tabela 4 - Métodos de microextração para determinação de opiáceos em amostras biológicas.	18
Tabela 5 - Gradiente da fase móvel.....	24
Tabela 6 - Condições cromatográficas aplicadas á proposta de Ahmadi-Jouibari et al., [53].	26
Tabela 7 - Composição da fase móvel proposta por Mahdy et al., [62].	26
Tabela 8 - Condições cromatográficas aplicadas á proposta de Mahdy et al. [62].	27
Tabela 9 - Matriz das diferentes técnicas experimentais para otimização da técnica MEPS ..	29
Tabela 10: Matriz experimental e resultados das extrações do DOE.....	32
Tabela 11 - Matriz experimental e resultados das extrações do RSM.	37
Tabela 12 - BIAS ou erro relativo médio da área prevista e real para a solução compromisso ótima da extração da MOR e 6-MAM.	40
Tabela 13 - BIAS ou erro relativo médio da área prevista e real para a solução compromisso ótima da extração da MOR e 6-MAM.	41
Tabela 14 - Sumário dos resultados da linearidade para os compostos em estudo.....	45
Tabela 15 - Características dos LLOQ de cada composto.	45
Tabela 16 - Precisão intra-dia e exatidão (n=6)	47
Tabela 17 - Precisão inter-dia e exatidão (n=5)	47
Tabela 18 - Média da recuperação, em percentagem (%), para cada composto, calculada para três níveis de concentração (n=3).	49
Tabela 19 - Estabilidade de amostras processadas.....	50
Tabela 20 - Estabilidade a curto prazo à temperatura de laboratório.	51
Tabela 21 - Estabilidade após ciclos de congelação/descongelação.	51
Tabela 22 - Compostos identificados na amostra e respectiva concentração obtida.	52

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Áreas relativas e respetivo desvio padrão para a extração da MOR por cada uma das técnicas testadas.	29
Gráfico 2 - Áreas relativas e respetivo desvio padrão para a extração da COD por cada uma das técnicas testadas.	30
Gráfico 3 - Áreas relativas e respetivo desvio padrão para a extração da 6-MAM por cada uma das técnicas testadas.	30
Gráfico 4 - Diagrama de Pareto da MOR.....	32
Gráfico 5 - Diagrama de Pareto da COD.....	33
Gráfico 6 - Diagrama de Pareto da 6-MAM.....	33
Gráfico 7 - Gráfico de efeitos principais para a MOR.....	34
Gráfico 8 - Gráfico de efeitos principais para a COD.....	34
Gráfico 9 - Gráfico de efeitos principais para a 6-MAM.....	34
Gráfico 10 - Gráfico de interações entre os vários parâmetros para a MOR.....	35
Gráfico 11 - Gráfico de interações entre os vários parâmetros para a COD.....	35
Gráfico 12 - Gráfico de interações entre os vários parâmetros para a 6-MAM.....	36
Gráfico 13 - Gráfico da solução compromisso ótima para a MOR (y, resposta esperada; cur, condição otimizada).....	38
Gráfico 14 - Gráfico da solução compromisso ótima para 6-MAM (y, resposta esperada; cur, condição otimizada).....	39
Gráfico 15 - Gráfico da solução compromisso ótima para a COD (y, resposta esperada; cur, condição otimizada).....	39
Gráfico 16 - Gráfico da solução compromisso ótima para a MOR e 6-MAM (y, resposta esperada; cur, condição otimizada).....	39
Gráfico 17 - Gráfico da solução compromisso ótima para todos os opiáceos em estudo.....	40

Lista de equações

Equação 1 - Erro relativo médio (<i>BIAS</i>).....	43
Equação 2 - Equação de regressão linear	44
Equação 3 - Desvio padrão relativo	46
Equação 4 - Recuperação	48

Lista de Acrónimos

5-HT	Serotonina
6-MAM	6-Monoacetilmorfina
AC	Adenilato ciclase
Ach	Acetilcolina
ACN	Acetonitrilo
akt	Proteína quinase B
ATP	Trifosfato de adenosina
BHE	Barreira hemato-encefálica
BIAS	Erro relativo médio
BIN	Barrel Insert and Needle Assembly
C18	Octadecilsilano
C2	Etilsilano
C8	octilsilano
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CAS	Chemical Abstracts Service
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
cGMP	Monofosfato de guanosina cíclico
COD	Codeína
CREB	Fator de transcrição de ligação à enzima cAMP
CV	Coeficiente de variação
DOE	Design of experiments (desenho experimental)
DOP	Recetor peptídico opióide delta
ED	Detetor eletroquímico
ERM	Erro relativo médio
FDA	Food and Drug Administration
GC	Cromatografia Gasosa
HERO	Heroína
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HYMOR	Hidromorfina
ICH	International Conference on Harmonization
IS	Padrão interno
KATP	Canal de potássio sensível a ATP
KOP	Recetor peptídico opióide kappa
LLE	Extração líquido-líquido
M1	Modo misto octilsilano- permutador catiónico forte
M3G	Morfina-3-glucuronido
M6G	Morfina-6-glucuronido

MEPS	Microextração em seringa empacotada
MIPs	Polímero molecular impresso
MOP	Recetor peptídico opióide mu
MOR	Morfina
MS	Espetrometria de massa
NO	Oxido nítrico
OEDT	Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência
OMS	Organização Mundial da Saúde
OP	Recetor peptídico opióide
PI	Padrão Interno
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PKA	Proteína quinase A
PKG	Proteína quinase G
PMME	Microextração em polímero monolítico
PS-DVB	Poliestireno-divinilbenzeno
PTFE	Politetrafluoroetileno
R ²	Coefficiente de determinação
RAM	Material de acesso restrito
RSM	Modelo de resposta de superfície
SBSE	Agitadores absorptivos
SCX	Permutador catiónico forte
SD	Desvio padrão
SNC	Sistema nervoso central
SPDE	Extração dinâmica em fase sólida
SPE	Extração em fase sólida
SPME	Microextração de fase sólida

Justificação do tema

O consumo abusivo de substâncias psicoativas tem estado estritamente associado a problemas sociais e de saúde pública na Europa nas últimas décadas. Atualmente, a classe dos opiáceos está figurada entre os compostos que mais contribuem para o elevado número de óbitos relacionados com o uso de drogas ilícitas. De acordo com o relatório anual do Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência (OEDT) no ano de 2011 em Portugal, 4388 pacientes foram tratados por abuso de drogas, sendo 70,01% dos casos relativos ao consumo destes compostos.

Sendo assim, muitas vezes os laboratórios são solicitados pelas autoridades a avaliar o possível consumo destas substâncias por parte de um indivíduo, tornando-se então essencial dotar os laboratórios de metodologias mais céleres e eficazes de forma a identificar e quantificar estas substâncias psicoativas.

A análise de amostras biológicas por técnicas cromatográficas exige regra geral um pré-tratamento da amostra, uma etapa laboratorial que consome muito tempo e recursos. Desta forma torna-se essencial o desenvolvimento de novos métodos que diminuam os custos e tempo associado à análise e que sejam simultaneamente confiáveis e de fácil execução.

A microextração em seringa empacotada é uma das novas técnicas extrativas que melhor responde aos desafios apresentados. Entre os prós apontados a sua utilização encontram-se o baixo volume de amostra, baixo consumo de solventes orgânicos, o tempo de extração é reduzido e à possibilidade de automatização de todo o processo.

Objetivo

O objetivo geral deste trabalho prende-se a deteção e quantificação de MOR, COD e 6-MAM em amostras de sangue *post-mortem*. Como objetivos específico podemos referir:

- Desenvolvimento e otimização de uma metodologia analítica de fácil execução e que permita a deteção específica e sensível de MOR, COD e 6-MAM por cromatografia líquida acoplada à deteção eletroquímica de coulometria;
- Desenvolvimento e otimização de um método de extração (MEPS) em amostras de sangue *post-mortem*;

- Validação do método desenvolvido segundo as normas internacionalmente aceites, nomeadamente da *Food and Drug Administration* (FDA) e da *International Conference on Harmonisation* (ICH);
- Análise de amostras reais através da metodologia desenvolvida e validada.

I. Revisão bibliográfica

1. Introdução

1.1. Drogas de abuso

As drogas sempre seduziram o Homem. Desde a antiguidade, ao longo da história, cada sociedade e cultura desenvolveu e integrou no seu seio o consumo de substâncias químicas tóxicas, ou potencialmente tóxicas, com fins terapêuticos e não terapêuticos, por exemplo, associadas a técnicas médicas, rituais espirituais, práticas mágicas, cultos religiosos, ou de utilização meramente recreativa. Porém, é no século XX, devido à confluência de múltiplos fatores (culturais, económicos, meios de comunicação, entre outros) que os consumos abusivos se generalizam e intensificam [1,2].

Durante muito tempo, a definição de droga genericamente aceite foi apresentada na antiga Grécia. Platão referia *phármaka* como algo que se situava entre as coisas que, simultaneamente podiam ser benéficas ou prejudiciais. Já Paracelsus referia que apenas a dose podia fazer essa diferença entre remédio e veneno. Então, uma droga não podia ser catalogada como benigna ou maligna. O que realmente podia afirmar-se era que o efeito de uma droga dependia da dose administrada, da pureza da substância, das condições e das razões da sua utilização, bem como das normas culturais que regiam o seu uso. Assim, Hipócrates e Galeno, fundadores da medicina científica, definiram que droga seria toda a substância que, não sendo vencida pelo corpo humano, teria a capacidade de o vencer [1-4].

De acordo com a definição clássica da Organização Mundial da Saúde (OMS) a palavra droga, refere-se a qualquer substância que uma vez introduzida num organismo vivo pode modificar uma ou várias das suas funções. A definição de abuso, introduzida em 1969 pela OMS, alude ao consumo excessivo, persistente ou esporádico de uma droga, inconsciente ou não, e que não se relaciona com uma utilização terapêutica [5].

De uma maneira geral, o termo “drogas de abuso” refere-se a substâncias psicoativas que modificam o comportamento, a afetividade e a consciência, suscetíveis de consumo com fins não terapêuticos e ilícito. Sob esta designação genérica incluem-se várias substâncias químicas de origens diversas (naturais, sintéticas ou semissintéticas), onde se englobam, entre as mais conhecidas, os opiáceos, a cocaína, os canabinóides e as anfetaminas [3].

Nos dois últimos séculos, a droga, após atravessar tempos mais remotos, acabou por assumir uma tripla dimensão: a de mercadoria, como ponto de ligação entre as componentes jurídica, económica e fiscal; a dimensão lúdica e terapêutica, como fonte de desinibição favorecedora do convívio social e como instrumento de tratamento médico; e, por último, a

dimensão de objeto e de origem do crime, numa perspectiva emergente, sobretudo a partir de meados do século XX [1,3].

1.2. Opiáceos

O termo opiáceo refere-se a todas as substâncias naturais presentes no ópio, como a morfina e codeína, também incluindo alguns derivados semi-sintéticos quando são resultado de modificações parciais das substâncias naturais, como a heroína [6].

A nomenclatura dos derivados do ópio tem sido alterada com o decorrer dos anos. Já foram denominados narcóticos, hipnoanalgésicos e narcoanalgésicos, termos considerados impróprios por incluírem outras substâncias que provocam sono. Também já foram denominados opiáceos, de início uma designação genérica e depois restrita aos derivados naturais do ópio. O termo opióide foi proposto por Acheson para designar as drogas com ação semelhante à morfina (MOR), porém com estrutura química diferente. Contudo, o conceito de opióide evoluiu e passou a incluir todas as substâncias naturais, semi-sintéticas ou sintéticas que reagem com os recetores opióides, quer como agonistas quer como antagonistas [6-8].

O ópio (do grego *ópion*, “sumo de planta”), substância original desse grupo farmacológico, é extraído pela incisão do ovário da papoila *Papaver somniferum*, (também conhecida na gíria popular como papoila dormideira), este têm um aspeto de resina pastosa, coloração acastanhada, forte odor, sabor amargo e 25% do seu peso são alcaloides. Os alcaloides do ópio são de dois grupos distintos, os fenantrénicos e os benzoicoquinoleínas (tabela 1) [7,9].

Tabela 1 - Classificação dos alcaloides naturais presentes no ópio com respetiva concentração em percentagem.

Alcaloides do ópio		
Fenantrénicos	Morfina	10 %
	Codeína	1 %
	Tebaína	0,5 %
Benzoicoquinoleínas	Papaverina	1 %
	Noscapina	6%

O ópio é uma das drogas mais antigas conhecidas pelo homem, remontando o seu uso à pré-história, onde durante escavações de vestígios da era do neolítico, realizadas na Suíça, foram recolhidos restos desta papoila, que indicam com clareza que as suas ações narcóticas já eram conhecidas e aproveitadas [6].

Efetivamente, os escritos de Teofrasto (Século III a.C.) são os primeiros a fazer referência ao ópio. Esta droga era essencialmente usada para esquecer as preocupações

quotidianas, a fome e a fadiga, e até no culto aos seus deuses. Através da cultura grega e, mais tarde, da romana, as propriedades terapêuticas do ópio chegaram aos médicos da Europa Medieval, sendo esta droga prescrita pelas suas propriedades antitússicas, antidiarreicas, hipnóticas, analgésicas, ansiolíticas e euforizantes [7,8,10].

No século XVII no extremo oriente era bastante popular o consumo de ópio através do fumo, sendo uma das principais fontes de rendimento das colónias Inglesas, Holandesas e também Espanholas a partir das Filipinas. Apesar de estar disponível na Europa, nessa altura, o seu consumo ainda não era problemático. A grande época do ópio foi no século XIX, quando esta droga se tornou um centro de conflito internacional que opôs a Inglaterra à China, desencadeando-se a denominada Guerra do Ópio. Nos finais do século XIX, o consumo de ópio estava muito interligado ao meio artístico e literário. O snobismo levado ao seu extremo fez com que se considerasse positivo o consumo de ópio. A classe médica e as autoridades sanitárias ganham consciência do risco que pressupõem o uso dos opiáceos e recomendam que se estabeleça restrições quanto ao seu uso [1,3,7-9].

1.3. Incidência

Os opiáceos estão figurados entre as drogas de abuso mais usadas em todo mundo. Foi estimado entre 15 e 21 milhões o número de pessoas que fizeram uso de opiáceos no ano de 2007 a nível global. Esse uso é bastante comum no hemisfério norte, sendo responsável por grande parte dos óbitos causados pelo envolvimento de drogas, principalmente nos Estados Unidos, Europa e Ásia, sendo que neste último está concentrada mais de metade da população mundial usuária de ópio. Isso deve ao facto de que os países que possuem maior cultivo e produção ilícita de ópio estarem localizados na região asiática. Na Europa, estatísticas divulgadas no ano de 2009 mostram que do total de trinta países estudados, os opiáceos representam cerca de 85% do número de mortes relacionadas ao uso de drogas em onze deles, seguindo de 70% de óbitos em outros seis países [11].

Em Portugal, de acordo com o relatório anual do Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência (OEDT) no ano de 2011, 4388 pacientes foram tratados por abuso de drogas, sendo que, 70% dos casos relativos ao consumo de opiáceos [12].

1.4. Morfina

Em 1803, o farmacêutico alemão Friedrich Sertürner, isolou pela primeira vez um alcaloide específico a partir do ópio ao qual lhe atribui o nome de morfina (MOR), em memória de Morpheu, o deus dos sonhos. Porém é somente em 1833 que os químicos Macfarlane & Co.

(atualmente Macfarlane-Smith), em Edimburgo foram capazes de isolar e purificar a morfina em escala comercial [13,14].

A MOR é um alcaloide de origem natural, com estrutura e atividade semelhante aos opióides endógenos. É normalmente consumida por via oral, retal, intramuscular, intravenosa ou subcutânea. A absorção oral é lenta e incompleta, devido ao metabolismo de primeira passagem pelo fígado, resultando numa biodisponibilidade de apenas 40%. No caso de ser administrada por via subcutânea, em menos de trinta minutos mais de 50% da quantidade injetada já se encontra disponível em circulação [13,15,16].

A sua distribuição para os tecidos e órgãos ocorre imediatamente após a absorção, apresentando o pico plasmático de 1-1,5 horas. Esta apresenta dificuldade em atravessar a barreira hemato-encefálica (BHE), sendo que apenas 20% da dose consegue atingir o cérebro [15,16].

A MOR é biotransformada no fígado e nos rins por uma reação de fase II, através da conjugação com ácido glucurónico pela enzima UGT2B7. Esta conjugação origina dois produtos de biotransformação, a morfina-3-glucuronido (M3G) e a morfina-6-glucuronido (M6G). Esses produtos são muitas vezes reabsorvidos através da circulação entero-hepática, e encontrados no plasma em altas concentrações. Esta metabolização converte 70% de MOR em M3G (55%) e em M6G (15%). Apesar de estar em menor concentração, a M6G é um metabolito ativo da MOR com atividade superior à própria MOR livre. Por sua vez, o M3G não apresenta exercer qualquer atividade sobre recetores opióides, chegando mesmo a exercer um ligeira atividade antagonista, diminuindo os efeitos analgésicos da morfina entre 15 a 20% [16-18].

Após administração cerca de 10% da dose administrada é excretada na bÍlis. Os restantes 90% são excretados na urina, sendo 10% como morfina livre, 65-70% como glucuronidos de MOR, 10% como morfina-3-sulfato e 1% como normorfina. A MOR livre é eliminada nas primeiras horas, mas os derivados conjugados permanecem detetáveis na urina até cerca de 2 dias [16-18].

1.5. Codeína

A codeína (COD) é um opiáceo amplamente utilizado a nível hospitalar apesar de apresentar cerca de 10% da potência analgésica da morfina, motivo pela qual é uma droga de abuso pouco utilizada. A COD é um alcaloide fenantrénico natural do ópio representando apenas 1% do seu peso, por isso a maior parte da COD é sintetizada quimicamente por metilação da morfina [7,19].

Esta é utilizada como antitússico, auxiliar no tratamento da diarreia e no alívio da dor fraca a moderada. É considerada como um analgésico fraco sendo que a sua ação ocorre principalmente pela metabolização da COD a MOR no fígado, já que apresenta pouca afinidade para os recetores opióides. Contudo a sua ação antitússica provavelmente deve-se a interação da própria COD com recetores distintos [18].

A ação da COD depende da sua conversão em MOR por meio da metabolização hepática pela desmetilação pelo citocromo P450 (CYP2D6), em uma das três vias: glucoronidação na posição 6-OH para COD-glucoronido, N-desmetilação para norcodeína (10-20%) e O-desmetilação para MOR (5-15%). A normorfina e hidrocodeína são também metabolitos encontrados em menor quantidade. Assim, o efeito analgésico e antitússico da COD depende da atividade dos metabolitos formados e das enzimas envolvidas na biotransformação do opiáceo, que podem, levar a uma diferença substancial na concentração plasmática dos metabolitos [19].

A COD possui boa biodisponibilidade oral e parenteral com indices de 60% de efetividade e apresenta um tempo de meia-vida plasmático de 2 a 4 horas. Independentemente da forma de consumo, a COD é eliminada principalmente pela via urinária. A maior parte da dose (40-70%) é excretada na urina sob a forma conjugada, 5-17% em COD livre e 10-20% em NORCOD e MOR livre [18,19].

1.6. Heroína

A diacetilmorfina foi registada pela farmacêutica alemã Bayer, com o nome comercial de heroína (HERO). Esta foi utilizada como fármaco de 1898 até 1910, ironicamente (uma vez que é mais aditiva) como substituto não causador de dependência para a morfina e antitússico para crianças. A HERO foi proibida nos países ocidentais no início do século XX, devido aos comportamentos violentos que estimulava nos consumidores [7].

Hoje em dia, a HERO é ainda um indicador principal para a problemática das drogas de abuso que, de acordo com o EMCDDA, define-se como uma droga ilícita com consequências a nível social, psicológico e físico, e por possuir alta capacidade em provocar dependência é considerada uma das drogas de abuso mais perigosa. O consumo de HERO misturada com outras drogas é muito frequente, por exemplo com cocaína (*“speedball”*), para prolongar e intensificar os seus efeitos [20,21].

A HERO é uma droga opióide semi-sintética, obtida a partir da acetilação dos grupos hidroxilo da molécula de MOR através da reação com o anidrido acético. A administração da HERO é feita geralmente por via intravenosa, intranasal (aspirada) e inalatória (fumada em cigarros ou através da inalação dos vapores resultantes da queima direta do pó). A

administração intravenosa é feita tanto na forma de base livre, que é usualmente misturada com ácidos orgânicos (vinagre ou sumo de limão) pelo próprio usuário para aumentar a solubilidade em água, quanto na forma de cloridrato de heroína [6,7,15].

Apesar de apresentar menor eficácia, recentemente, as vias de administração intranasal e inalatória têm substituído de forma gradual a forma de administração intravenosa. Provavelmente devido a serem uma forma de consumo menos invasiva, evitando assim o uso da injeção que é muitas vezes responsável pela contaminação pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH) e da hepatite, e também evita as hemorragias venosas [20].

A HERO é mais lipossolúvel que a MOR, e desta forma, atravessa mais facilmente a BHE, pelo que a sua ação é mais rápida e intensa. No organismo a HERO sofre uma rápida hidrólise por esterases, presentes no sangue e fígado, e é convertida em 6-monoacetilmorfina (6-MAM) que, atingem o pico plasmático em simultâneo, em cerca de 5 minutos, apresentando a HERO uma tempo de meia-vida plasmática de 4-6 minutos e a 6-MAM de 15-30 minutos. A metabolização da HERO ocorre de seguida pela hidrólise da 6-MAM formando a MOR com um tempo de meia-vida plasmático de 1,5-3h (tabela 2; figura 1) [22].

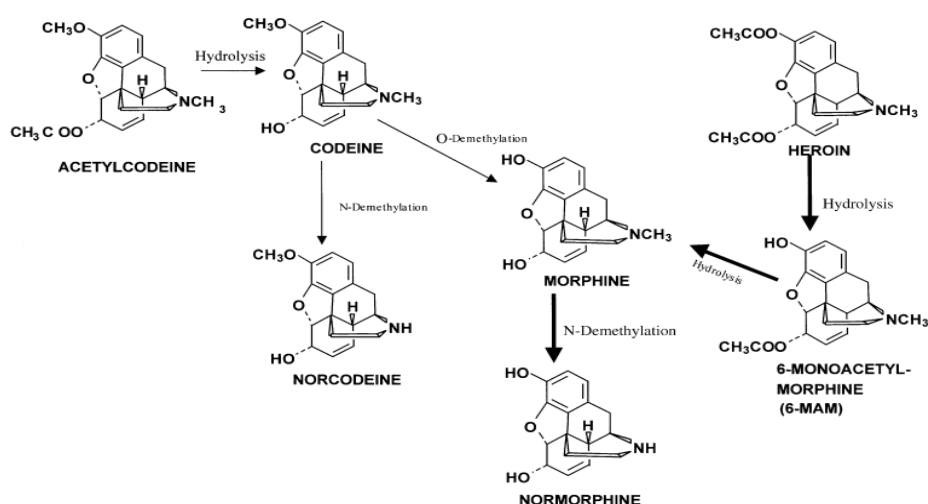


Figura 1 - Visão geral do metabolismo da heroína e acetilcodeína. Para maior clareza, os metabolitos glucuronidos foram excluídos (adaptado de MeadWay *et al.*, 2002) [22].

Tabela 2: Tempos de deteção dos opiáceos em estudo [15,16,18,22]

Compostos	Pico plasmático	Tempo de meia-vida plasmático	Janela de deteção sanguínea	Janela de deteção urinária
HERO	5 minutos	4-6 minutos	< 5-10 minutos	Metabolizada
6-MAM	5 minutos	15-30 minutos	1-3 horas	7 horas
MOR	1-1,5 horas	1,5-3 horas	6-12 horas	12-48 horas
COD	1-2 horas	2-4 horas	8 horas	24-48 horas

Devido ao tempo de deteção da HERO ser relativamente curto (5-10 minutos) geralmente, o despiste do consumo de HERO é realizado através da deteção dos seus metabolitos ativos, a 6-MAM e MOR. A acetilcodeína é um subproduto da fabricação da HERO,

desta forma, a COD (metabolito ativo da acetilcodeína) é também encontrado em consumidores de HERO e portanto, é importante a sua detecção [22,23].

Cerca de 70-90% do total da HERO administrada é excretada nas primeiras 24 horas por filtração glomerular (via urinária) e 7-10% por excreção biliar. A HERO não apresenta grande afinidade pelos recetores opióides. Pelo que, a sua ação narcótica é mediada pelos seus produtos ativos de biotransformação [23,24].

1.7. Propriedades físico-químicas

A MOR é o protótipo de todos os opióides. A sua estrutura básica consiste na fusão de cinco anéis rígidos (A-E) que se apresentam na forma de T (figura 2). Possui um grupo amina terciário fundamental para a sua atividade, contem também um grupo fenólico, um grupo álcool, um anel aromático, uma ponte éter e uma dupla ligação [10].

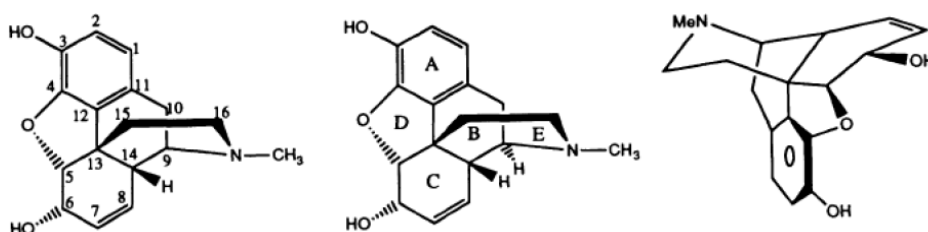
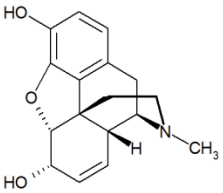
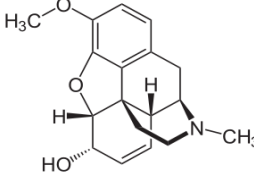
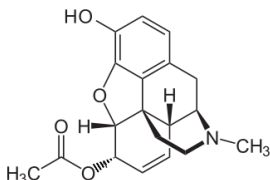


Figura 2: Estrutura química da morfina mostrando os seus anéis (A-E) e a sua forma T (Adaptado de Patrick *et al.*, 1995) [10].

A COD é o éter metílico da MOR, esta sofre uma metilação na ligação fenólica 6-OH, que causa a redução da atividade analgésica para 0,1% da MOR. Essa queda na atividade é observada em análogos da MOR que possuam o grupo fenólico mascarado, com isto, pode-se inferir que o grupo fenólico livre é crucial para a atividade dos opióides. Já o mascaramento ou a perda completa do grupo álcool não diminui a atividade analgésica e pode, em alguns compostos ter o efeito contrário. Em análogos da MOR em que ocorreu a remoção do grupo 6-hidroxilo, da ponte éter, da dupla ligação ou substituição do metil no grupo N também não apresentaram redução na atividade. Já o grupo N e o anel aromático parecem ser cruciais, pois se um destes grupos for removido, toda a atividade analgésica demonstrada pelos opióides é perdida [10].

Na tabela 3 estão resumidas as principais características físico-químicas dos opiáceos em estudo.

Tabela 3 - Estrutura e propriedades físico-químicas da morfina, codeína e 6-monoacetilmorfina

Composto	CAS	Estrutura química	Fórmula molecular	Peso molecular (g/mol)	pKa
MOR	57-57-2		C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	285,4	9,12
COD	76-57-3		C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	299,35	9,19
6-MAM	2784-73-8		C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	327,37	9,08

1.8. Recetores opióides

Desde a primeira metade do século XX, existia o conceito da provável existência de estruturas celulares que reconhecessem as diversas moléculas num organismo, permitindo assim a sua ativação. Essas estruturas, denominados recetores, demonstravam alto grau de especificidade para cada substância. No entanto, somente com o desenvolvimento de técnicas modernas de biologia molecular foi possível conhecer os seus detalhes [25].

No estudo pioneiro de Candace Pert e Solomon Snyder, publicado em 1973, usando uma molécula de MOR marcada com um radioisótopo demonstraram a existência de recetores específicos para a MOR no cérebro de mamíferos e cobaias. Essa descoberta desencadeou uma pesquisa por vários investigadores na procura da molécula endógena que estimulava esse recetor, que culminou com a descoberta das endorfinas, por John Hughes e Hans Kosterlitz em 1975. Desde essa altura, uma grande variedade de recetores e subtipos foram identificados [16,10].

Os recetores opióides podem ser ativados tanto pelas drogas derivadas do ópio como por substâncias endógenas chamadas “péptidos opióides endógenos”, como as encefalinas, endorfina e dinorfinas, que são produzidas por estímulos nociceptivos. Esses recetores podem ser de três tipos: μ (mu), κ (kappa), δ (delta). O recetor μ também chamado de OP3 ou MOP caracteriza-se por ser agonista da morfina, e é encontrado no tronco cerebral e tálamo medial. Este recetor é responsável pela analgesia supra-espinal, controlo do ciclo respiratório e trânsito

intestinal, euforia, sedação e dependência física. Os subtipos de μ incluem o μ_1 e μ_2 , com μ_1 relacionado com a analgesia, euforia e serenidade, enquanto μ_2 está relacionado com a depressão respiratória, prurido, libertação de prolactina, dependência, anorexia e sedação. O recetor κ , agonista da cetociclazocina, está localizado no sistema límbico, tronco cerebral e medula espinal. Este é responsável pelas funções de nociceção, termorregulação, controle da diurese e secreção neuroendócrina. Este tipo de recetor é também conhecido por OP2 ou KOP. O recetor δ caracteriza-se por ser agonista da delta-alanina-delta-leucina-encefalina e é encontrado em grande parte do cérebro, nomeadamente nos núcleos pontinos, amígdalas, bulbo olfatório, córtex cerebral profundo e nos neurónios sensitivos periféricos. Os seus efeitos não são bem conhecidos, mas pensa-se estarem ligados a efeitos emocionais. Estes recetores são chamados também por OP1 ou DOP [8,10,17, 26].

1.9. Mecanismo de ação

A nível molecular, os recetores opióides são recetores metabotrópicos acoplados a proteínas G inibitórias (G_i/G_o), que consistem em sete domínios hidrofóbicos transmembranares (I-VII). A ligação do opióide ao seu recetor resulta na fosforilação da proteína G e ocorre a dissociação de $G_{i/o}$ do dímero $G_{\beta\gamma}$. A dissociação entre as subunidades inicia uma cascata de eventos intracelulares que medeiam o efeito antinociceptivo dos opióides em neurónios aferentes primários. Estes eventos (figura 3) incluem:

- Inibição da enzima adenilato ciclase (AC), provocando uma diminuição na síntese de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) intracelular;
- Inibição dos canais Ca^{2+} sensíveis á voltagem;
- Ativação da via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)/AKT, que por sua vez ativa a via da L-arginina/ óxido nítrico/ monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) no tecido subcutâneo que leva á ativação dos canais K^+ dependentes de ATP, provocando hiperpolarização da membrana plasmática [26,27].

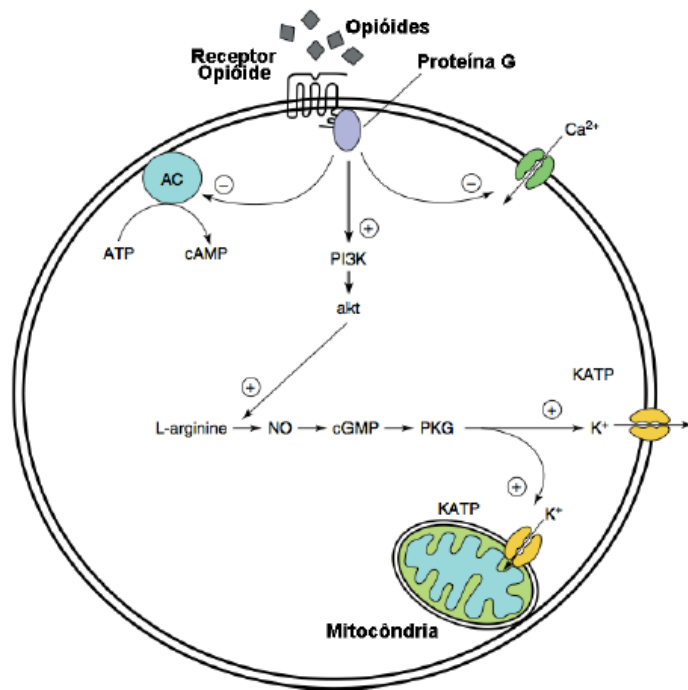


Figura 3: Eventos intracelulares desencadeados pela ativação de receptores opióides. AC, adenilato ciclase; akt (PKB), proteína quinase B; ATP, adenosina trifosfato; cAMP, monofosfato cíclico de adenosina; cGMP, monofosfato cíclico de guanosina; KATP, canal de potássio sensível a ATP; NO, óxido nítrico; PI3K, fosfatidilinositol 3-quinase; PKG, proteína quinase G (adaptado Tambelli et al., 2009) [26].

Como consequência, há hiperpolarização do neurônio e redução da libertação de neurotransmissores excitatórios (acetilcolina, noradrenalina, serotonina, substância P e dopamina) na fenda sináptica, bloqueando a percepção dos sinais de dor [16].

1.10. Efeitos farmacológicos e toxicológicos

Os opiáceos afetam tanto as funções cognitivas como motoras. Os efeitos variam em função da quantidade consumida, qualidade do produto, tolerância, contexto de consumo e a forma de consumo. Em casos de intoxicação crônica, o uso regular de opiáceos favorece a perda de apetite e subnutrição. O estado de saúde em geral deteriora-se devido à diminuição das defesas naturais do organismo, problemas de origem cardíaca e respiratória, bem como a nível hormonal [28].

1.10.1. Sistema nervoso Central (SNC)

- **Analgesia:** Eficaz no alívio de dores leves, contínuas e sem localização específica, proveniente de órgãos internos. Menos eficaz para dores superficiais tipo pontada. As dores neuropáticas podem ser resistentes, porém os pacientes

referem discreta redução na intensidade e melhoria em relação ao desconforto gerado pela dor;

- Sedação: Dificuldade de concentração e sonolência;
- Euforia e disforia: Sensação de bem-estar (euforia) em indivíduos com dores, caso contrário, pode gerar agitação e inquietação (disforia);
- Alucinações.

Um aspeto importante da analgesia destes opiáceos é que ocorrem sem perda de consciência [13,16,29].

1.10.2. Sistema endócrino

- A temperatura corporal baixa depois de uma dose momentânea mas aumenta com dosagens crónicas;
- Aumento da libertação da hormona antidiurética (ADH);
- Inibição da secreção da hormona adrenocorticotrofina (ACTH);
- Inibição da secreção das hormonas gonadotrofinas: hormona folículo estimulante (FSH) e hormona luteinizante (LH);
- Inibição da secreção da hormona libertadora da tirotrófina (TSH) [13,16,29].

1.10.3. Sistema cardiovascular

- Discreta bradicardia pela redução do tónus simpático e efeito direto sobre o nó sinoatrial;
- Vasodilatação periférica causada pela libertação de histamina e redução do tónus simpático que pode levar á hipotensão, principalmente em caso de hipovolemia associada [13,16,29].

1.10.4. Sistema respiratório

- Depressão respiratória mediada pelos recetores μ localizados no centro respiratório do tronco cerebral. Ocorre a diminuição da frequência respiratória e a dessensibilização dos quimiorrecetores centrais a alterações de pressão parcial do dióxido de carbono;
- Supressão do reflexo da tosse [13,16,29].

1.10.5. Sistema gastrointestinal

- Aumento do tónus do musculo liso e redução da motilidade gástrica, resultando numa diminuição da absorção, aumento da pressão no sistema biliar e obstipação;
- Pode desencadear vómitos e náuseas [13,16,29].

1.10.6. Prurido

- Alguns opióides desencadeiam a libertação de histamina pelos mastócitos resultando em urticária, prurido, broncospasmos e hipotensão [13,16,29].

Estes efeitos são agravados no caso de serem consumidas quantidades superiores de opiáceos. Em caso de overdose a morte quase sempre acontece por paragem respiratória devido à elevada depressão respiratória que estes alcaloides originam [15].

1.11. Tolerância e dependência

A tolerância é caracterizada pela redução progressiva do efeito gerado por uma mesma dose de droga, quando repetidas doses são administradas, com perda gradual da sua eficácia. Para que se consiga a resposta original é necessário a administração de uma dose mais alta. A tolerância é muitas vezes acompanhada pelo desenvolvimento de dependência. Esta é definida pela ocorrência de uma síndrome característica (síndrome de abstinência) quando a droga é interrompida ou quando se administra um antagonista [30].

A tolerância e dependência são um fenómeno comum a todos os opiáceos, não se devendo a um único fator, mas sim dependente de várias circunstâncias. Em primeiro lugar, produzem-se mecanismos neurológicos de adaptação aos recetores opióides, especialmente os recetores μ , que modificam a interação dos opióides com os seus ligandos ou com a proteína G, estando este mecanismo de adaptação na base da dependência farmacológica aos opiáceos que se inicia com as primeiras doses. Em segundo lugar, a capacidade de biotransformação de desintoxicação encontra-se diminuída, contribuindo para o aumento do tempo de semi-vida plasmático deste tóxico aumentando a sensibilidade do organismo ao mesmo [30,31].

A administração crónica (figura 4) de opiáceos supra-regula o fator de transcrição de ligação à enzima cAMP (CREB) que estimula a transcrição da AC, que por sua vez, restaura a produção de cAMP a níveis normais. O aumento do cAMP estimula a proteína cinase A (PKA), que fosforila (ativa) a CREB e o canal de sódio dependente de voltagem. Sendo assim, a supra-regulação da via do cAMP neutraliza os efeitos agudos da droga, resultando em tolerância [31].

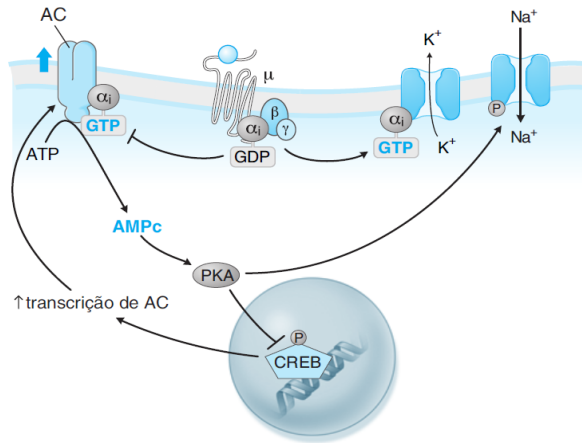


Figura 4 - Indução da tolerância aos opiáceos por administração crônica. μ , recetor opióide mu; AC, adenilato ciclase; ATP, adenosina trifosfato; cAMP, monofosfato cíclico de adenosina; CREB, fator de transcrição de ligação à enzima cAMP; GDP, guanosina difosfato; GTP, guanosina trifosfato; K^+ , potássio; Na^+ , sódio; PKA, proteína quinase A; α_i , subunidade α da proteína G; β , subunidade β da proteína G; γ , subunidade γ da proteína G, (adaptado Swift et al., 1997) [31].

Com o uso crônico de opiáceos, após a retirada brusca destes ocorre a diminuição da libertação de dopamina, redução dos níveis de endorfinas e aumento da libertação de norepinefrina, ocasionando o chamado síndrome de abstinência caracterizado por ansiedade, salivação excessiva, sudorese, vômitos, febre, diarreia, respiração ofegante, dores, insónias, entre outros [29,31].

2. Deteção de opiáceos em matrizes biológicas

2.1. Matriz biológica

Atualmente são várias as amostras biológicas utilizadas em toxicologia forense e clínica, com o objetivo de detetar e quantificar analitos. A escolha do material biológico para a realização de análises toxicológicas deve ter em consideração as características toxicocinéticas dos compostos a detetar e a finalidade da análise.

O sangue total, matriz de grande complexidade, é das amostras mais utilizadas para pesquisa de substâncias desconhecidas. Esta possui como principais vantagens:

- Correlação direta entre a concentração e os efeitos biológicos da droga;
- Fácil manuseamento;
- Difícil de adulterar;
- Possibilidade de obter um volume elevado de amostra;

- São necessários apenas alguns minutos, após o consumo, para que a droga e/ou os metabolitos possam ser detetáveis.

Apesar das diversas vantagens que suportam a elevada taxa de utilização de sangue total como amostra, o seu uso também está associada a algumas desvantagens, como:

- Processo de recolha invasivo;
- A colheita tem de ser efetuada por pessoal especializado e exige equipamento específico;
- A obtenção de uma segunda amostra, num momento diferente da primeira, não pode servir de contra-análise;
- Curta janela de deteção quando comparado com outras matrizes não convencionais, (Ex: cabelo);
- O seu elevado conteúdo proteico que dificulta o processo de extração.

Estas mesmas características também se aplicam para os restantes derivados sanguíneos: soro e plasma [32,33].

Nesta dissertação, a matriz biológica escolhida foi o sangue *post-mortem*. Pois, no contexto atual da toxicologia forense esta matriz torna-se cada vez mais importante na investigação em casos de morte, devido ao aumento crescente da disponibilidade e do uso abusivo de fármacos e drogas ilícitas, a nível mundial. Em geral, a avaliação da intoxicação é feita através da análise da concentração sanguínea *post-mortem* do possível agente tóxico envolvido. Neste caso é recomendado recolher o sangue total da veia femoral ou subclávia, pois este encontra-se mais afastado da região central do corpo e desta forma é usualmente menos afetado pelas mudanças *post-mortem* (fenómenos de redistribuição e contaminação, entre outros) [32,33].

2.2. Técnicas de extração

A análise de amostras biológicas por técnicas cromatográficas requerem um procedimento preparatório da amostra, devido à complexidade das matrizes envolvidas, remoção de interferências, incompatibilidade com os sistemas cromatográficos e ao facto de muitos dos compostos a analisar se encontrarem em concentrações vestigiais. Esse procedimento de pré-tratamento da amostra permite a obtenção dos analitos de interesse numa forma e concentração que possam ser rapidamente injetados e separados no sistema cromatográfico, com uma seletividade e sensibilidade adequada. Por outro lado, a presença de compostos endógenos, como proteínas, lípidos, entre outros, incompatíveis com certas colunas cromatográficas são responsáveis pela diminuição da eficiência extrativa e pela sensibilidade do método. Dado que em geral os compostos a analisar se encontram em quantidades vestigiais,

a preparação da amostra permite também aumentar a sensibilidade do método pela concentração dos analitos no extrato obtido [33-35].

Nos últimos anos tem-se procurado o desenvolvimento de técnicas extrativas que sejam mais céleres, mais simples e que utilizem uma menor quantidade de solventes orgânicos, diminuindo desta forma os custos e tempo gastos com esta etapa morosa em laboratório. Entre as várias técnicas de preparação de amostra, as mais utilizadas são a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE). No entanto, devido às razões anteriormente descritas, existe uma tendência crescente, para o uso de técnicas mais amigas do ambiente, como é o caso da microextração em fase sólida (SPME), a microextração em seringa empacotada (MEPS), a extração dinâmica em fase sólida (SPDE), a microextração em polímero monolítico (PMME), agitadores adsorptivos (SBSE), entre outros [34-37].

2.2.1. Microextração em seringa empacotada

A microextração em seringa empacotada (MEPS) é uma técnica de microextração, desenvolvida em 2004 por Abdel-Rehim nos laboratórios da AstraZeneca, Suécia. A técnica MEPS é considerada como uma versão miniatura da técnica convencional SPE, empregando os seus princípios básicos, mas na forma de uma pequena coluna de enchimento inserida numa seringa, por onde se faz passar amostra múltiplas vezes, a fim de aumentar a recuperação dos analitos de interesse numa matriz [38,39].

Quando comparada com outras técnicas, a MEPS é uma técnica relativamente rápida de executar, simples e robusta que pode ser aplicada não só a amostras mais complexas como plasma e urina, como também a amostras com conteúdos elevados de solventes orgânicos. Por outro lado, têm ainda como vantagem o facto de se obterem rendimentos de extração elevados (60-90%) quando comparados com a SPME (1-25%), o uso de solventes orgânicos ser reduzido e a quantidade de amostra necessária ser tão baixa quanto 10-100µL, ao contrário do que acontece com técnicas mais tradicionais como LLE e a SPE. Além disso, o suporte sólido pode ser reutilizado até 100 vezes em extrações de plasma/sangue e mais de 400 vezes no caso de amostras de água, contrariamente às colunas de SPE que são descartadas após cada utilização, tendo por isso esta técnica um baixo custo por análise. Outra grande conquista da MEPS é a possibilidade de esta permitir injetar diretamente os eluatos (normalmente 20-50µL) nos sistemas cromatográficos, sem qualquer modificação do dispositivo de extração, o que facilita o seu acoplamento *on-line* a estes sistemas [38-42].

A seringa MEPS disponível comercialmente consiste em duas partes, uma seringa semelhante à de injeção em LC (100-250µL) e um dispositivo cilíndrico (BIN - *Barrel Insert and Needle Assembly*) que contém a coluna de SPE. No BIN encontra-se a fase estacionária, onde está empacotado aproximadamente 1mg de material sólido, protegido por dois discos (frits)

quimicamente inertes de politetrafluoroetileno (PTFE), polietileno ou estruturas de aço inoxidável que impedem o movimento da fase estacionária (figura 4) [39,40,43].

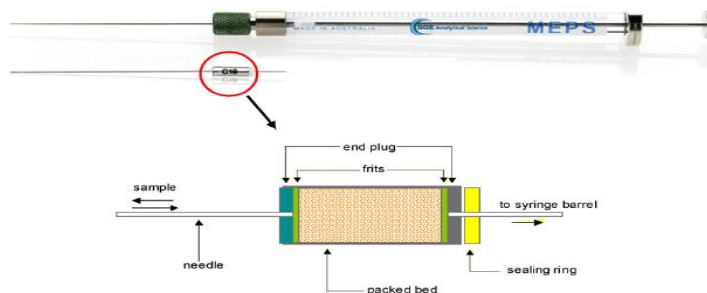


Figura 5: Seringa MEPS (250µL) e BIN da SGE. Representação esquemática da coluna de extração (adaptado de Abdel-Rehim, 2010) [43].

A MEPS tem como objetivo remover compostos interferentes que estejam presentes numa matriz, permitindo em simultâneo o isolamento e a concentração seletiva dos analitos de interesse. Esta técnica de extração consiste na passagem da amostra líquida, por meio de aspirações, por uma coluna que contém no seu interior o sólido sorbente, deste modo o analito fica retido na fase sólida isolado da matriz, sendo que os interferentes são eliminados pela lavagem da coluna. Seguidamente, o composto de interesse é eluído da coluna por intermédio de um solvente orgânico, levando desta forma à obtenção de um extrato onde os analitos estão purificados e concentrados [34,39,40,43].

O desempenho da técnica MEPS é afetado por vários fatores, tais como a diluição da amostra, pH, composição e volume da solução de lavagem e de eluição, quantidade de sorbente e o mais importante o material sorbente. Sendo assim, o passo principal no desenvolvimento de uma extração por MEPS a otimização destas variáveis [40,43].

Os materiais sorbentes usados em MEPS são em grande parte dos casos constituídos por sílica. A sílica é um material sólido, amorfo e poroso, que apresenta a superfície química ocupada por grupos hidroxilo, designados de silanol. A seleção adequada do sorbente é de extrema importância para alcançar resultados satisfatórios de limpeza e recuperação de analitos. Sendo vários os sorbentes comercialmente disponíveis: octadecilsilano (C18), etilsilano (C2), octilsilano (C8)), permutador catiónico forte (SCX), material de acesso restrito (RAM), copolímero de poliestireno-divinilbenzeno (PS-DVB), modo-misto C8/SCX (M1) e polímeros moleculares impressos (MIPs) [40,43].

Numa primeira fase (acondicionamento), o suporte sólido é ativado com um solvente adequado, normalmente metanol, que vai solvatar os grupos funcionais da fase estacionária permitindo uma interação máxima entre o soluto e a fase orgânica ligada. O ar que se encontra na coluna é removido e os espaços vazios são preenchidos pelo solvente. Terminada a passagem do solvente, é aplicada na coluna água ou tampões aquosos de modo a manter o equilíbrio

químico. Seguidamente, a amostra é aspirada pela seringa, a fim de os analitos de interesse ficarem retidos na fase estacionária. Normalmente, este processo é realizado com várias repetições, de forma a garantir a concentração dos analitos no interior da seringa. Para uma aspiração bem-sucedida da amostra através do sorbente, a amostra requer uma diluição para reduzir a viscosidade (1:5 para urina e plasma e 1:25 para sangue) bem como a remoção de macropartículas por centrifugação e eventual desproteínação. A velocidade de aspiração não deve ser muito elevada (normalmente variando entre 10-20 μ L/s), para permitir uma forte interação entre os analitos e o sorbente, bem como para não forçar fisicamente e destruir o sorbente da coluna. A terceira etapa diz respeito à lavagem da coluna, tendo como finalidade remover proteínas e outros interferentes que possam ter interagido com o sorbente da coluna. Nesta fase os solventes a utilizar devem ser miscíveis com a fase estacionária, devendo ainda ter pouca afinidade pelos analitos, de forma a evitar que estes sejam removidos da fase estacionária. Na quarta etapa é feita a eluição dos analitos com recurso a um solvente orgânico pelo qual o analito tem afinidade para interromper a interação sorbente-analito. Este solvente deve ser capaz de eluir todos os analitos em pequenos volumes e ser miscível com a fase móvel do sistema cromatográfico, normalmente usa-se metanol, isopropanol ou acetonitrilo. Em alguns casos, o eluente volátil pode ser seco sob uma corrente fraca de azoto e o analito ser redissolvido na fase móvel ou outra solução antes da injeção. O último e quinto passo é a re-lavagem e tem como objetivo diminuir ou eliminar o efeito *carryover* e a reutilização do sorbente da coluna MEPS. Esta lavagem pode ser efetuada com água pura e metanol [34,40,41,43].

2.3. Técnicas de separação e deteção

Devido aos opiáceos serem das substâncias mais consumidas a nível mundial, existem inúmeros métodos analíticos de deteção e quantificação destes compostos em diferentes matrizes biológicas com recurso aos mais variados sistemas de extração e análise. Desta forma, a tabela 4, foca-se de forma resumida nos trabalhos publicados ao nível da deteção e quantificação dos compostos em estudo em amostras biológicas com recurso a técnicas de microextração. Esta pesquisa foi efetuada na base de dados da *U.S. National Library of Medicine, National Institutes of Health* (PubMed), limitada a artigos científicos publicados entre Janeiro de 2004 e Junho de 2014 (10 anos). Foram utilizadas como palavras-chave: *morphine, codeine, 6-monoacetylmorphine e microextraction*.

Tabela 4 - Métodos de microextração para determinação de opiáceos em amostras biológicas.

Analito	Amostra (volume)	Técnica de extração	Modo de detecção	LOD (ng/ml)	LLOQ (ng/ml)	Recuperação (%)	Referência
MOR COD	Urina (500µL)	SPME	HPLC-DAD	10	30	41,3 38,4	[44]
MOR COD	Cabelo (50mg)	SE-LPME	HPLC-DAD	20	50	58 62	[45]
MOR COD	Urina (500µL)	LPME	HPLC-DAD	21	100	8 17	[46]
MOR 6-MAM	Urina (500µL)	SPME	GC-MS	30 1	35 7	n/d	[47]
COD MOR	Urina (500µL)	SPME	ESI-MS	5 2	100	72 64	[48]
MOR COD 6-MAM	Urina (5mL)	PMME	CE-UV	19,5 13,4 11,2	65,1 37,5 44,5	98 102 96	[49]
MOR COD 6-MAM	Cabelo (10mg)	SPME	GC-MS	0,2 (ng/mg)	0,6 (ng/mg)	n/d	[50]
MOR COD 6-MAM	Cabelo (10mg)	SPME	GC-MS	0,005 (ng/mg) 0,002 (ng/mg) 0,005(ng/mg)	0,01 (ng/mg) 0,005 (ng/mg) 0,01 (ng/mg)	2 68	[51]
MOR COD	Urina (5mL)	DLLME	HPLC-DAD	0,2	20 30	28,7 38,3	[52]
MOR COD	Plasma (1mL)	DLLME-SFO	HPLC-DAD	5	25	97 93,7	[53]
MOR	Urina (5mL)	LPME	HPLC-DAD	50	100	94,6	[54]
MOR 6-MAM	Plasma (500µL)	SPME	LC-MS/MS	n/d	0,5	90 95	[55]
MOR COD 6-MAM	Sangue (500µL)	SPME	LC-MS/MS	n/d	50	93 87 83	[56]
MOR COD	Urina (5mL)	DLLME	HPLC-DAD	0,2	20 30	31,5 42,7	[57]
MOR COD 6-MAM	Cabelo (20mg)	SPME	GC-MS	n/d	0,5 (ng/mL)	35,2 37,87 34,15	[58]

Legenda: 6-MAM, 6-monoacetilmorfina; CE, eletroforese capilar; COD, codeína; DAD, detetor diode array; DLLME, microextração líquido-líquido dispersiva; ESI, ionização por electrospray; GC, Cromatografia gasosa; HPLC, cromatografia líquida de alta eficiência; LC, cromatografia líquida; LPME, microextração em fase líquida; MOR, morfina; MS, espectrometria de massa; MS/MS, espectrometria de massa em tandem; n/d, não disponível; PMME, microextração em polímero monolítico; SE, *Surfactant enhanced*; SFO, gota orgânica flutuante; SPME, microextração em fase sólida;

2.4. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detetor eletroquímico coulométrico

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma extensão da cromatografia líquida clássica, e é caracterizada pelo uso de colunas com um diâmetro interno de 2-5mm, empacotadas com partículas de baixo tamanho, 3-10 μ m, que constituem a fase estacionária. A fase móvel circula sob alta pressão ao longo da coluna com um fluxo controlado. Esta alta pressão permite separações mais rápidas e o uso de fases estacionárias constituídas por micro partículas permite uma elevada eficiência de separação [59].

O HPLC revelou ser um dos métodos cromatográficos mais eficientes na separação, em virtude do desenvolvimento de instrumentação automatizada. Permitiu a injeção de volumes de amostra cada vez menores e reprodutíveis, e a deteção de quantidades de analito cada vez menores pelos sistemas de deteção acoplados. Esta técnica cromatográfica veio completar a cromatografia gasosa (GC) no tipo de compostos que podem ser separados, uma vez que, o HPLC permite a separação e quantificação de substâncias termicamente instáveis [29,59].

Os detetores eletroquímicos (ECD ou ED) acoplados à HPLC estão atualmente entre os métodos utilizados mais sensíveis para deteção de biomoléculas. Estes detetores baseiam-se na característica eletroquímica de um composto poder sofrer uma reação de oxidação ou redução num eléctrodo a um dado potencial constante (em corrente contínua, DC). Se o potencial aplicado for suficientemente elevado, este vai oxidar/reduzir todos os elementos presentes na fase móvel que sejam eletroativos. Este potencial de oxidação/redução origina um cromatograma de intensidade de corrente em função do tempo. Ao seleccionar um potencial adequado, em que os compostos a detetar sofram oxidação/redução, é produzido um sinal proporcional à concentração de analito presente na amostra. Esse potencial aplicado é característico para cada composto e depende de vários fatores tais como, a natureza eletroquímica da superfície da célula, composição da fase móvel e pH [59,60].

Na voltametria cíclica, o potencial aplicado ao eléctrodo de trabalho varia continuamente com o tempo, partindo de um valor inicial até um valor limite pré-definido. O sinal de corrente registado dá origem a um voltamograma, que se traduz numa curva de corrente em função do potencial. Esta técnica indica de forma rápida qual o potencial máximo de oxidação/redução do composto e, pode também ser usado para escolher um potencial no qual nenhuma interferência é detetada, diminuindo assim o sinal de ruído [59].

Os detetores eletroquímicos podem ser de dois tipos: amperométrico ou coulométrico. No detetor amperométrico, a célula eletroquímica possui uma superfície plana por onde flui a fase móvel. Desta forma, os analitos eletroativos a detetar são expostos parcialmente à superfície do eléctrodo, e conseqüentemente apenas uma parte das espécies presentes no fluxo sofrem reação eletroquímica. O sinal de intensidade de corrente desta fração (tipicamente 5-15% da concentração total) é então convertido numa estimativa das espécies presentes na

amostra. Apesar da sensibilidade elevada, os detetores amperométricos normalmente não conseguem detetar concentrações muito baixas do analito eletroativo. O aumento da sensibilidade pode ser conseguido com recurso ao detetor eletroquímico de coulometria. Este tipo de detetor é caracterizado por ter um eléctrodo de grafite poroso, por onde flui a fase móvel. A diferença deste eléctrodo relativamente ao usado na deteção amperométrica é uma maior área de exposição ao solvente e conseqüentemente uma maior quantidade de espécies eletroativas são oxidadas/reduzidas, resultando num pico de sinal mais elevado sem um aumento do sinal ruído, permitindo desta forma a deteção de concentrações mais baixas do composto de interesse. Tipicamente, neste tipo de deteção, o sinal corresponde a quase 100% dos analitos presentes na fase móvel [59,60].

II. Parte experimental

1. Material e métodos

1.1. Reagentes e padrões analíticos

- Acetato de etilo ($C_4H_8O_2$) (*analytical grade*), Sigma-Aldrich (Sintra, Portugal);
- Acetonitrilo PROLABO® (*HPLC-grade*), VWR Internacional (Carnaxide, Portugal);
- Ácido acético (CH_3COOH), VWR Internacional (Carnaxide, Portugal);
- Ácido Fórmico ($CHOOH$), Sigma-Aldrich (Sintra, Portugal);
- Água desionizada Milli-Q;
- Diclorometano, Sigma-Aldrich (Sintra, Portugal);
- Dihidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4), Sigma-Aldrich (Sintra, Portugal);
- Hidrogenofosfato dissódio (Na_2HPO_4), Panreac Química (Cascais, Portugal);
- Hidróxido de amónio (NH_4OH) (*pro-analysis*), Sigma-Aldrich (Sintra, Portugal);
- Hidróxido de sódio ($NaOH$), Sigma-Aldrich (Sintra, Portugal);
- Isopropanol, (*pro-analysis*), Sigma-Aldrich (Sintra, Portugal);
- Metanol LiChrosolv® (*HPLC-grade*), VWR Internacional (Carnaxide, Portugal);

Os padrões analíticos usados neste estudo bem como o padrão interno (HYMOR), foram adquiridos a LGC Promochem (Barcelona, Espanha).

- 6-Monoacetilmorfina a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em metanol;
- Codeína a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em metanol;
- Hidromorfina a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em metanol;
- Morfina a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em metanol;

1.2. Instrumentação

- Balança analítica da Sartorius S.A. - modelo CP225 (Lisboa, Portugal);
- Bomba de vácuo da GAST - modelo DOA-P505-BN (Califórnia, EUA);
- Câmara de refrigeração (a 4°C) da Dagard Ibérica (Odivelas, Portugal);
- Coluna analítica de fase reversa - modelo Agilent Zorbax 300SB C_{18} (5 μm , 250 x 4,6 mm i.d.), Soquímica (Lisboa, Portugal);
- Coluna MEPS M1 da SGE - Analytical Science (Austrália) adquirida á ILC (Porto, Portugal);

- Filtros de membrana de Nylon da Pall Corporation, VWR Internacional (Carnaxide, Portugal);
- Heraeus Multifuge IS-R-Thermo Electron (Osterode, Alemanha);
- Medidor de pH da Metrohm - modelo 744, Soquímica (Lisboa, Portugal);
- Micropipetas automáticas da Gilson (volumes máximos de 20, 200, 1000 e 5000µL), VWR Internacional (Carnaxide, Portugal);
- Placa de agitação magnética da J.P. Selecta - modelo ASINCRO, ILC (Porto, Portugal);
- Seringa MEPS (100-250 µL) da SGE - Analytical Science (Austrália) adquirida à ILC (Porto, Portugal);
- Sistema de purificação de água Milli-Q Advantage A10® system da Milipore (Amadora, Portugal);
- Sistema de ultra-som da Elma - modelo Transonic 460/H, VWR Internacional (Carnaxide, Portugal);
- Vortéx Mixer da Labnet International - modelo 230V, VWR Internacional (Carnaxide, Portugal);

1.3. Padrão interno

Na determinação de substâncias em amostras biológicas é comum recorrer-se à adição de uma substância conhecida a uma concentração constante (padrão interno) à amostra, com o objetivo de controlar a reprodutibilidade da análise. Esta substância deve ter características físico-químicas o mais próximo possível dos analitos que se pretendem analisar, para que o seu comportamento durante todo o processo seja semelhante, e principalmente, deve-se assegurar que este composto não está presente na matriz biológica [61].

Por outro lado, na construção de modelos de calibração é comum usar-se como resposta a razão da área cromatográfica entre o analito e o padrão interno, minimizando o efeito de eventuais perdas de analito e assim, manter a precisão, exatidão e linearidade do método [61].

Sendo assim foi selecionada a hidromorfina (HYMOR), um agonista opióide semi-sintético muito semelhante estruturalmente à MOR, como padrão interno (PI). Por outro lado, apresenta um bom comportamento cromatográfico e não interfere com os opiáceos a quantificar nem com a matriz biológica utilizada.

1.4. Soluções de trabalho

As soluções padrão de trabalho, dos opiáceos em estudo, foram preparadas por diluições sucessivas com metanol a partir das soluções *stock* anteriormente referidas. Foram preparadas soluções individuais à concentração final de 250 e 2500ng/mL. No caso do padrão interno, a solução padrão de trabalho HYMOR (1µg/mL), foi preparada pela diluição com metanol da solução *stock* anteriormente referida.

Todas as soluções de padrões foram armazenadas a 4 °C e ao abrigo da luz.

Ácido fórmico (CHOOH) 2% em H₂O (1L): Pipetou-se 20mL de ácido fórmico para um balão volumétrico de 1000mL de capacidade contendo 500mL de água Milli-Q. Adicionou-se água Milli-Q até perfazer o volume e homogeneizou-se por inversão. A solução foi armazenada a 4 °C.

Tampão fosfato 0,1M pH 6 (50mL): Para um volume final de 50mL foram pesados 648,5mg de NaH₂PO₄ e 41,4mg de Na₂HPO₄ para um balão volumétrico de 50mL e dissolvidos em 10mL de água Milli-Q. Adicionou-se água Milli-Q até perfazer o volume do balão e homogeneizou-se por inversão. A solução foi armazenada a 4 °C.

Fase móvel: Dihidrogenofosfato de sódio 10mM pH 6,6 (1L): Para um volume final de 1000mL foi pesado 1,379g de NaH₂PO₄ para um balão volumétrico de 1000mL e dissolvido em 200mL de água Milli-Q. Adicionou-se água Milli-Q até perfazer o volume do balão e homogeneizou-se por inversão e ajustou-se o pH de 6,6 com NaOH 1M. A fase móvel foi filtrada e desgaseificada num banho de ultrassons durante 15 minutos. A solução foi armazenada a 4 °C até a sua utilização.

Ácido fórmico (CHOOH) 3,36% em H₂O (25mL): Pipetou-se 840µL de ácido fórmico para um balão volumétrico de 25mL de capacidade contendo 10mL de água Milli-Q. Adicionou-se água Milli-Q até perfazer o volume e homogeneizou-se por inversão. A solução foi armazenada a 4 °C.

Hidróxido de amónio (NH₄OH) 2,36% em MeOH (250mL): Pipetou-se 5,9mL de NH₄OH para um balão volumétrico de 250mL de capacidade contendo 200mL de MeOH. Adicionou-se MeOH até perfazer o volume e homogeneizou-se por inversão. A solução foi armazenada a 4 °C.

1.5. Sistema cromatográfico e de deteção

Para a otimização e validação do método foi utilizado um sistema HPLC (1260) com bomba quaternária e injetor automático da Agilent (Santa Clara, EUA). O sistema HPLC foi acoplado a um detetor eletroquímico coulométrico modelo Coulochem III da ESA (Dias de Sousa

S.A., Lisboa, Portugal). Os compostos foram separados utilizando uma coluna de fase reversa Zorbax 300 SB-C₁₈ (5 µm, 4,6 x 250 mm i.d.) da Agilent (Santa Clara, EUA). Na detecção coulométrica foi utilizada uma célula eletroquímica (5011A) da ESA (Dias de Sousa S.A., Lisboa, Portugal).

1.6. Condições cromatográficas

No sistema HPLC-ED, a separação dos compostos foi realizada em modo gradiente (tabela 5) com recurso a uma fase móvel de acetonitrilo e dihidrogenofosfato de sódio (NaH₂PO₄) com concentração final de 10mM ajustada a um pH 6,6 com hidróxido de sódio (NaOH), a fluxo constante de 1,2 mL/minuto a 25°C. A temperatura do *sampler* foi mantida a 4°C e o volume de injeção de 40 µL. O tempo total de corrida cromatográfica foi de 11 minutos com 2 minutos de *post time* para garantir a estabilização das condições iniciais antes da próxima injeção. O potencial de oxidação escolhido para a detecção dos analitos foi de +450mV para a célula E1 e de +850mV na célula E2 com uma sensibilidade de 200nA, parâmetros estes que foram anteriormente otimizados.

Tabela 5 - Gradiente da fase móvel

% NaH ₂ PO ₄	90	80	84	84	90
% ACN	10	20	16	16	10
Tempo (minutos)	0	5	8	11	13

A fase móvel foi preparada com água Milli-Q num volume final de 1 ou 2 litros, filtrada com uma membrana de *nylon* de 0,2 µm e desgaseificada no mínimo durante 15 minutos antes de ser usada. O seu armazenamento foi feito a 4°C e antes da utilização foi deixada a atingir a temperatura ambiente.

1.7. Matriz biológica

No presente trabalho foi utilizado como matriz biológica sangue procedente de excedente de transfusões sanguíneas do Instituto Português do Sangue e da Transplantação (Delegação do centro). Para tentar simular as condições de sangue *post-mortem*, este sangue foi deixado durante pelo menos 24 horas a temperatura ambiente, tempo após o qual se congelou e descongelou num ciclo de 24 horas. Além disso, foram utilizados *pools* de sangue total extraído da veia femoral de indivíduos autopsiados em ambiente hospitalar. As amostras foram conservadas a -21°C antes da sua utilização.

1.8. Preparação da amostra

Para diminuir a quantidade de interferentes e o conteúdo proteico das amostras e aumentar a fluidez da amostra, sujeitou-se a amostra de sangue a um pré-tratamento que consistiu na adição de 400µL de tampão fosfato 0,1M pH 6, 50µL de padrão interno a 1µg/mL e acetonitrilo (ACN) refrigerado a -21°C numa razão de 3:1 (ACN:sangue), com subsequente centrifugação a 4500 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi em seguida evaporado sob uma corrente suave de azoto para assim eliminar o ACN adicionado anteriormente.

1.9. Procedimento de extração

A 250µL de sangue adicionaram-se 8,5mL de ácido fórmico à concentração de 2% em água, seguido de agitação no sistema de agitação em rolos durante 10 minutos.

Tendo em conta as diferenças no comportamento químico entre os três compostos (valores de pKa) e de forma a obter um compromisso viável na extração de todos eles, optou-se por utilizar uma coluna de modo misto (C8/SCX) para todas as extrações. Este tipo de coluna engloba a separação por interação hidrofóbica com a separação por troca catiónica.

Após acondicionamento da coluna com MeOH (3 vezes 250µL) e 2% de ácido fórmico em H₂O (3 vezes 250µL), procedeu-se à aspiração da amostra a uma velocidade aproximada de 10µL/s (20 vezes 250µL). A lavagem do sorbente foi realizada com 250µL de uma solução de 3,36% de ácido fórmico em H₂O. Finalmente procedeu-se a eluição dos analitos com uma solução de 2,36% de NH₄OH em MeOH, tendo-se procedido no fim á reutilização da coluna bem como para evitar fenómenos de *carryover* com MeOH (3 vezes 250µL) e H₂O (3 vezes 250µL). Por fim o extrato obtido foi evaporado sob corrente de azoto e ressuspenso em 100µL de fase móvel.

2. Resultados e discussão

2.1. Otimização dos parâmetros cromatográficos

De modo a obter uma boa resolução dos picos cromatográficos dos compostos a detetar, tornou-se essencial a otimização da fase móvel. Deste modo, foi necessário experimentar várias fases móveis até obter a separação pretendida. Esta seleção foi realizada com base na literatura publicada sobre estes compostos. Assim, numa primeira fase, cada analito foi injetado isoladamente, de forma a conhecer o tempo de retenção e o seu potencial de oxidação/redução ótimo. De seguida, foi injetada uma mistura de todos os opiáceos incluindo o padrão interno de forma a verificar se não existia sobreposição de picos.

Inicialmente foi utilizada a fase móvel composta por 10mM de NaH₂PO₄, 0,7mM de dodecil sulfato de sódio (OSA) ajustado a um pH de 6,6 e 40 % de acetonitrilo, proposta por Ahmadi-Jouibari *et al.*, [53]. As condições testadas encontram-se representadas na tabela 6.

Tabela 6 - Condições cromatográficas aplicadas á proposta de Ahmadi-Jouibari *et al.*, [53].

Tentativa	% Fase Móvel	% Acetonitrilo	Fluxo (mL/min)	Temperatura (°C)	Observações
1	60	40	1	n/a*	Os analitos foram eluídos na frente de solvente e a linha base era pouco estável.
2	70	30	1	n/a*	Os analitos foram eluídos na frente de solvente e a linha base era pouco estável.
3	90	10	1	n/a*	Conseguiu-se a separação da MOR. Quanto á COD e 6-MAM os tempos de retenção eram muito próximos ocorrendo sobreposição dos picos.
4	90	10	1	25	À temperatura controlada de 25°C não houve melhoria na resolução dos picos relativamente á tentativa anterior.

*n/a: Não aplicável

Dado que, a resolução dos picos não foi conseguida com a anterior fase móvel, recorreu-se à proposta de Mahdy *et al.*, [62], que consistia numa fase móvel de NaH₂PO₄ 10mM a pH 6,6 (solução A) e acetonitrilo (solução B) em modo gradiente (tabela 7) à temperatura de 25°C.

Tabela 7 - Composição da fase móvel proposta por Mahdy *et al.*, [62].

Tempo (min)	% A	% B
0	5	95
5	10	90
10	20	80
12	25	75
20	30	70
23	5	95

Com esta tentativa notou-se que os compostos ficavam mais tempo retidos na coluna mas, após os 12 minutos, quando a percentagem de ACN era superior a 20%, a COD e 6-MAM eram co-eluídas no mesmo tempo de retenção. A MOR com este gradiente, já se encontravam bem resolvida (figura 6).

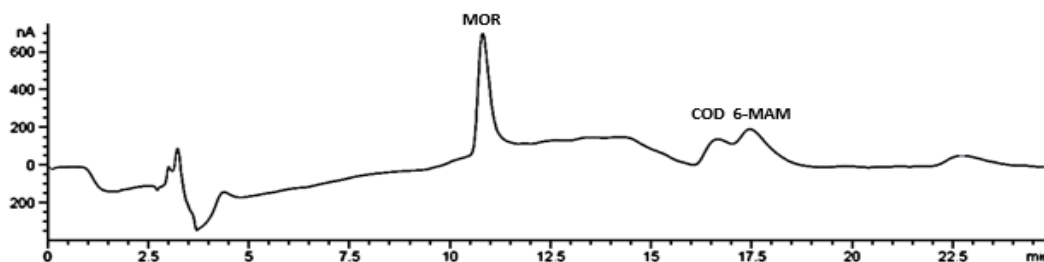


Figura 6 - Cromatograma representativo da co-eluição dos compostos COD e 6-MAM e separação da MOR com recurso a fase móvel publicada por Mahdy *et al.*, [62].

Desta forma, foram realizadas algumas alterações (tabela 8) que a seguir se indicam:

Tabela 8 - Condições cromatográficas aplicadas á proposta de Mahdy *et al.* [62].

Proposta de fase móvel	Gradiente			Fluxo (mL/min)	Temperatura (°C)	Observações
	Tempo (min)	% A	% B			
1	0	95	5	1	25	Ao baixar a percentagem de ACN após os 10 minutos para 18%, fez com que os compostos COD e 6-MAM aumentassem o tempo de retenção. Mas mesmo assim os picos estavam sobrepostos
	5	90	10			
	10	80	20			
	12	82	18			
	25	82	18			
	30	95	5			
2	0	95	5	1	25	Nesta tentativa baixou-se ainda mais a percentagem ACN (16%) e os resultados foram bastante satisfatórios, pois os tempos de retenção distanciaram-se cerca de 1 minuto entre a COD e 6-MAM
	5	90	10			
	10	80	20			
	12	84	16			
	25	84	16			
	30	95	5			
3	0	95	5	1	25	Com esta alteração (redução no tempo) o tempo de corrida diminui-o para metade e os compostos saíram bem resolvidos.
	5	90	10			
	7	80	20			
	10	84	16			
	15	84	16			
4	0	95	5	1,2	25	Ao aumentar o fluxo para 1,2mL/min os compostos eluíram mais cedo e, desta forma foi possível encurtar a corrida de 15 para os 11 minutos
	5	90	10			
	7	80	20			
	10	84	16			
	12	95	16			

Estas condições finais (proposta 4) foram então mantidas e os tempos de retenção dos compostos foram: 4,8 minutos para a MOR, 8,7 minutos para a 6-MAM, 8,1 minutos para a COD e 5,8 minutos para o padrão interno HYMOR (figura 7).

Como descrito por Garrido *et al.*, [63], a oxidação eletroquímica da MOR e 6-MAM é mais eficaz com um potencial de oxidação de +450mV (canal E1) enquanto, para a 6-MAM esse potencial é de +850mV (canal E2). Desta forma, os compostos MOR, HYMOR e 6-MAM foram quantificados pelo canal de oxidação E1 enquanto, a COD foi quantificada no canal E2.

A sensibilidade do método manteve-se nos 200nA uma vez que, sensibilidades de deteção menores originavam uma linha base muito instável o que dificultava a quantificação de concentrações mais baixas (25ng/mL).

Desta forma, a figura 6, é o exemplo de um cromatograma com as condições finais de otimização da fase móvel bem como do sistema de detecção, para a quantificação dos opióides MOR, COD, 6-MAM e HYMOR.

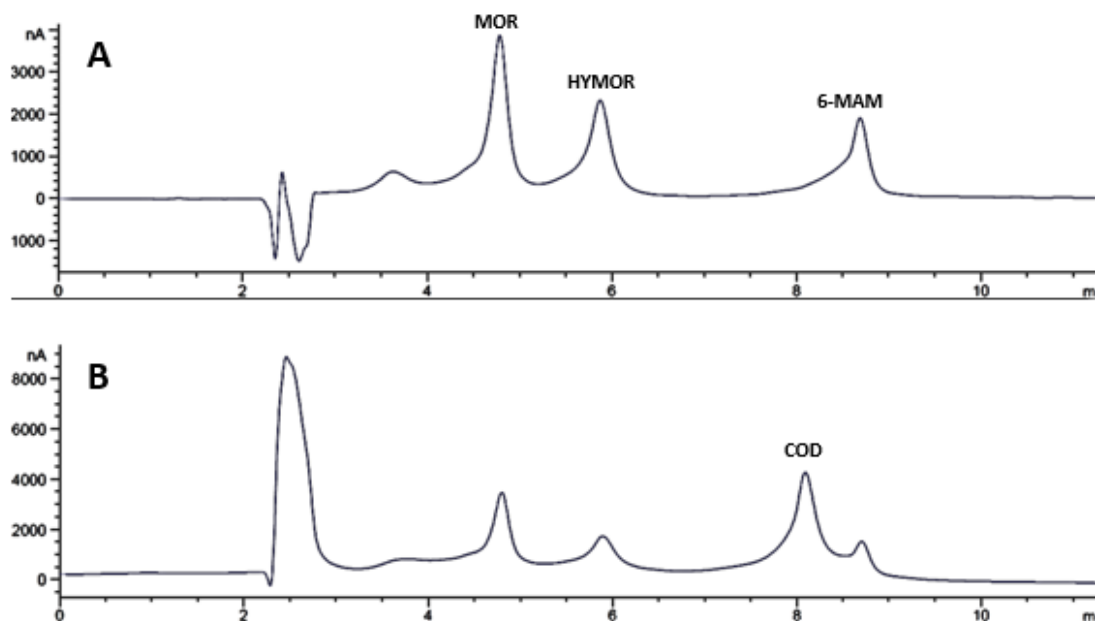


Figura 7 - Cromatogramas da MOR ($t_R=4,8\text{min}$), COD ($t_R=8,1\text{min}$), 6-MAM ($t_R=8,7\text{min}$) á concentração de $1\mu\text{g/mL}$ e padrão interno HYMOR ($t_R=5,8\text{min}$) a $1\mu\text{g/mL}$. O cromatograma A mostra o sinal do canal E1 (+450mV), usado para quantificar a MOR, 6-MAM e detetar a HYMOR. O cromatograma B mostra o sinal do canal E2 (+850mV), usado para quantificar a COD.

2.2. Otimização do processo de extração

Com o objetivo de minimizar o número de interferentes e aumentar a eficácia do processo analítico, foi utilizada como técnica extrativa a microextração em seringa empacotada. Durante toda a otimização do processo extrativo foi utilizada uma coluna de modo misto (C8/SCX) e um volume de amostra de $250\ \mu\text{L}$, fortificado com os compostos em estudo a uma concentração de $500\ \text{ng/mL}$. Às amostras, foi posteriormente adicionado $8,5\text{mL}$ de 2 % de ácido fórmico em água de forma a obter um fator de diluição de 1:35 como recomendado [40].

A escolha do tipo de coluna (C8/SCX) e a utilização de um meio ácido para a diluição da amostra deveu-se às propriedades físico-químicas dos opiáceos (tabela 3). Pois como estes têm uma constante de acidez (pK_a) entre 9,08-9,19, em meio ácido estes compostos encontram-se na forma ionizada. Desta forma, como a coluna de modo misto é caracterizada por favorecer a troca catiónica, os opiáceos são assim mais facilmente retidos no interior do sorbente.

Com base na literatura [40], o procedimento inicial de otimização consistiu na ativação e acondicionamento da coluna com metanol (3 vezes 250 μ L) e 2% de ácido fórmico em água Milli-Q (3 vezes 250 μ L). Após eluição dos analitos da coluna, esta foi lavada com MeOH (3 vezes 250 μ L) e água Milli-Q (3 vezes 250 μ L), de forma a evitar/reduzir os efeitos de memória (*carryover*). No final do processo extrativo foi adicionado ao eluato o padrão interno a uma concentração de 1 μ g/mL.

Tendo em conta as características dos compostos e a bibliografia já publicada relacionada com outros métodos extrativos dos compostos em estudo, foram sujeitas a estudo, para seleção da técnica ótima, as propostas extrativas referenciadas na tabela 9.

Tabela 9 - Matriz das diferentes técnicas experimentais para otimização da técnica MEPS

Técnica	Lavagem	Eluição (6x250 μ L)
1.	1x200 μ L (5% MeOH em 2% CH ₂ O ₂)	6x250 μ L (3% NH ₄ OH em ACN+MeOH, 6:4)
2.	1x200 μ L (5% MeOH em 2% CH ₂ O ₂)	6x250 μ L (3% NH ₄ OH em MeOH)
3.	1x100 μ L (2% CH ₂ O ₂ em H ₂ O) + 1x100 μ L (H ₂ O+ACN, 95:5)	6x250 μ L ACN
4.	1x200 μ L (2% CH ₂ O ₂ em H ₂ O)	6x250 μ L (3% NH ₄ OH em MeOH)
5.	1x200 μ L (H ₂ O+ACN, 85:15)	6x250 μ L (Hexano+Acet. Etilo+NH ₄ OH, 75:22:3)
6.	1x200 μ L (H ₂ O+ACN+Ác.Acético, 84:15:1)	6x250 μ L (ACN+Acet. Etilo+NH ₄ OH, 75:22:3)
7.	1x200 μ L (3% NH ₄ OH em H ₂ O)	6x250 μ L (DicloroMe+Isopropanol, 75:25)
8.	1x200 μ L (1% Ác. Acético em H ₂ O) + 1x200 μ L (5% MeOH em H ₂ O)	6x250 μ L (3% NH ₄ OH+MeOH)
9.	1x200 μ L (1% Ác. Acético em H ₂ O) + 1x200 μ L (5% MeOH em H ₂ O)	6x250 μ L (3% NH ₄ OH+DicloroMe+Isopropanol, 5:20:75)
10.	1x200 μ L (2% CH ₂ O ₂ em H ₂ O)	6x250 μ L (3% NH ₄ OH+MeOH)

Cada uma das técnicas foi efetuada em triplicado, tendo-se expresso os resultados em termos de média e desvio padrão da razão área do composto/área padrão interno (gráfico 1-3).

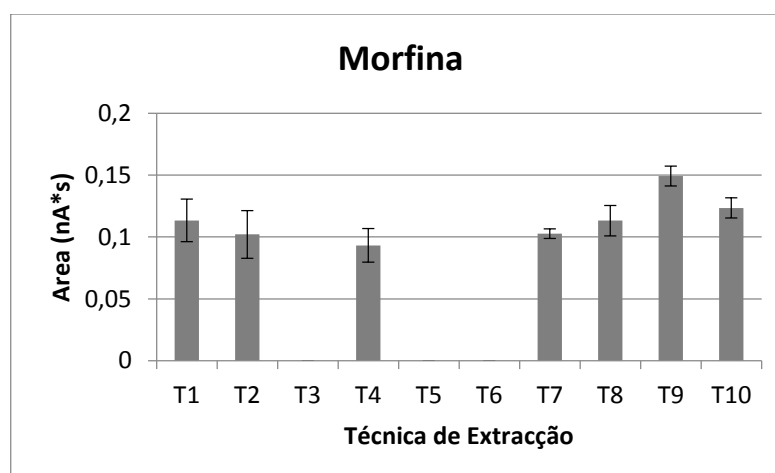


Gráfico 1 - Áreas relativas e respetivo desvio padrão para a extração da MOR por cada uma das técnicas testadas.

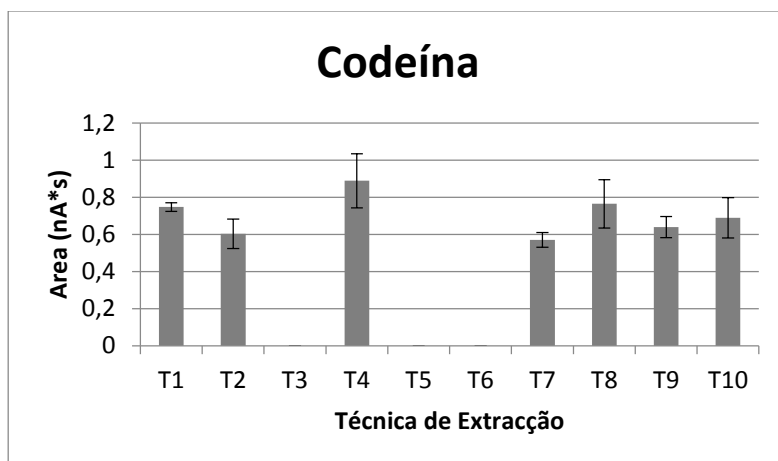


Gráfico 2 - Áreas relativas e respetivo desvio padrão para a extração da COD por cada uma das técnicas testadas.

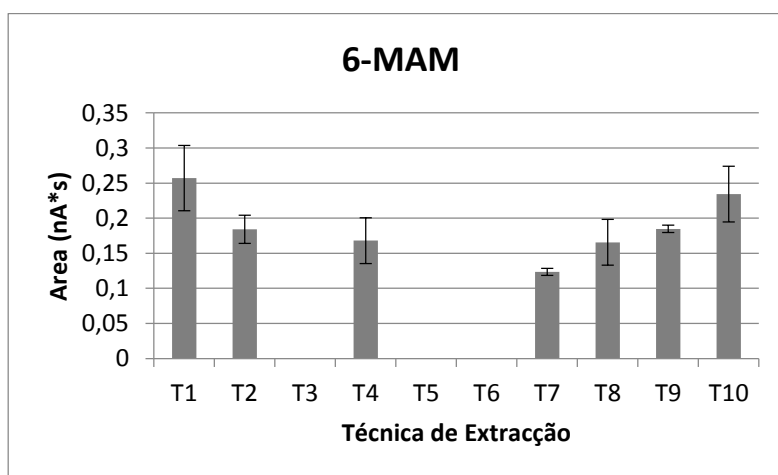


Gráfico 3 - Áreas relativas e respetivo desvio padrão para a extração do 6-MAM por cada uma das técnicas testadas.

Pela análise individual de cada um dos gráficos anteriores podemos concluir que as técnicas extrativas que melhores recuperações demonstraram foram a técnica T9 para MOR, a T4 para a COD e a T1 para 6-MAM. Contudo, considerar uma destas técnicas (T1, T4 e T9) como sendo a melhor vai prejudicar a recuperação dos outros dois analitos. Desta forma, analisando os gráficos de forma geral comprovamos que a melhor técnica para os três compostos é a técnica T10, pois é a técnica que melhores recuperações obtém para os três opiáceos.

De forma a confirmar estas conclusões, retiradas de forma intuitiva, foram aplicados métodos estatísticos (ANOVA, Teste t e Teste F) de comparação de variáveis de forma a verificar se existem ou não diferenças estatisticamente significativas entre as técnicas T9 e T10 para a MOR, T4 e T10 para a COD e T1 e T10 para a 6-MAM.

Da análise estatística (anexo 1) é possível concluir que a diferença entre as técnicas não é estatisticamente significativa pois o valor-p é em todos os casos superiores ao nível de

significância (α) de 5%. Desta forma, substituir cada uma das melhores técnicas para cada opiáceo pela T10 não vai alterar estatisticamente o resultado da recuperação final.

Desta forma, foi sujeito a estudo pelo desenho experimental a técnica T10, na tentativa de entender se existia a possibilidade de aumentar a recuperação dos compostos, alterando algum dos parâmetros de extração nesta técnica.

2.2.1. Desenho experimental

De forma a otimizar o processo extrativo e aumentar o rendimento de extração, recorreu-se ao desenho experimental ou *Design of Experiments* (DOE). O DOE é uma ferramenta estatística que permite o planeamento de todo um processo, avaliando de forma multivariada os diversos fatores intervenientes, minimizando os efeitos dos fatores não controlados e o número de experiências. Assim, conseguem-se melhores resultados com uma redução do tempo e recursos do laboratório. O tratamento de resultados foi efetuado no programa estatístico MINITAB®, versão 16 [64,65].

Os fatores analisados durante este estudo foram o número de aspirações da amostra, o número de lavagens do sorbente, percentagem de ácido fórmico na solução de lavagem, número de eluições e percentagem de hidróxido de amónio utilizada na solução de eluição. Para a avaliação das interações entre estes fatores foi feito um planeamento fatorial fracionado (2^{k-1}) com controlo por ponto intermédio (em triplicado). Quando comparada com uma avaliação univariada, esta abordagem permite uma diminuição no número total de experiências, já que pelo recurso a um planeamento fatorial é possível avaliar de forma simultânea os efeitos de um elevado número de variáveis a partir de um número reduzido de ensaios experimentais [64].

O procedimento extrativo a utilizar foi o anteriormente descrito. As amostras de sangue *post-mortem* num volume de 250 μ L sofreram uma diluição 1:35. Apresenta-se de seguida a matriz experimental (tabela 10) utilizada neste estudo bem como a resposta (área relativa) obtida para cada composto.

Tabela 10: Matriz experimental e resultados das extrações do DOE

Ordem da experiência	Aspirações	% Ácido fórmico	Número de lavagens	% Hidróxido de amônio	Número de eluições	Resposta (rácio)		
						MOR	COD	6-MAM
3	10	1	3	1	4	0,46	2,32	0,99
6	26	3	1	3	4	0,77	3,18	1,54
17	18	2	2	2	7	0,65	3,25	1,22
18	18	2	2	2	7	0,58	2,71	1,51
8	26	3	3	1	4	0,38	2,90	1,61
19	18	2	2	2	7	0,51	2,56	1,20
4	26	1	3	3	4	0,29	2,08	1,11
1	10	1	1	3	4	0,41	1,59	0,64
11	10	1	3	3	10	0,44	2,31	0,97
7	10	3	3	3	4	0,30	1,46	0,56
9	10	1	1	1	10	0,95	2,85	0,90
14	26	3	1	1	10	1,15	4,34	1,95
15	10	3	3	1	10	0,34	2,19	1,09
10	26	1	1	3	10	0,12	1,14	0,52
13	10	3	1	3	10	0,62	2,68	1,02
2	26	1	1	1	4	0,92	3,27	1,04
5	10	3	1	1	4	0,32	2,11	0,91
16	26	3	3	3	10	0,15	1,74	0,82
12	26	1	3	1	10	0,33	1,91	0,91

A resposta foi obtida como a razão entre a área absoluta do pico de cada composto e a área do pico do padrão interno que foi adicionado no fim da extração. Com base nessa resposta, são apresentados em seguida os diagramas de *Pareto* (gráficos 4-6) obtidos pela análise dos resultados do DOE.

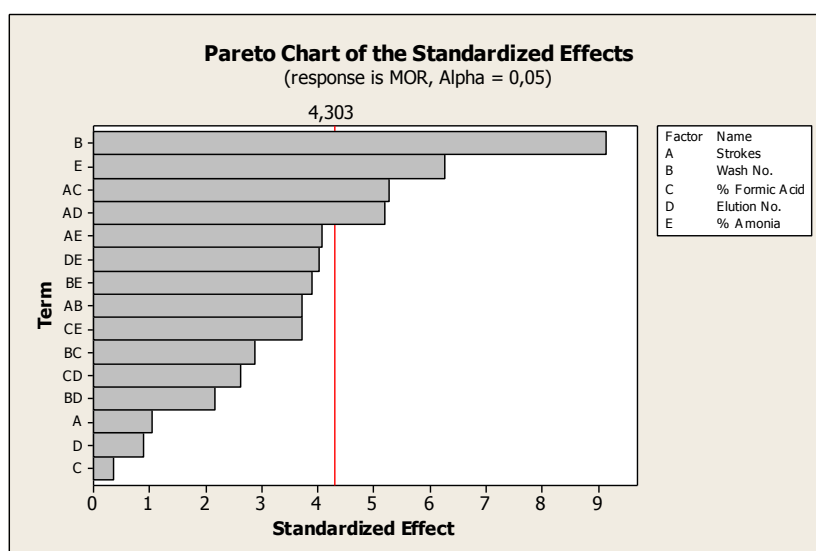


Gráfico 4 - Diagrama de Pareto da MOR

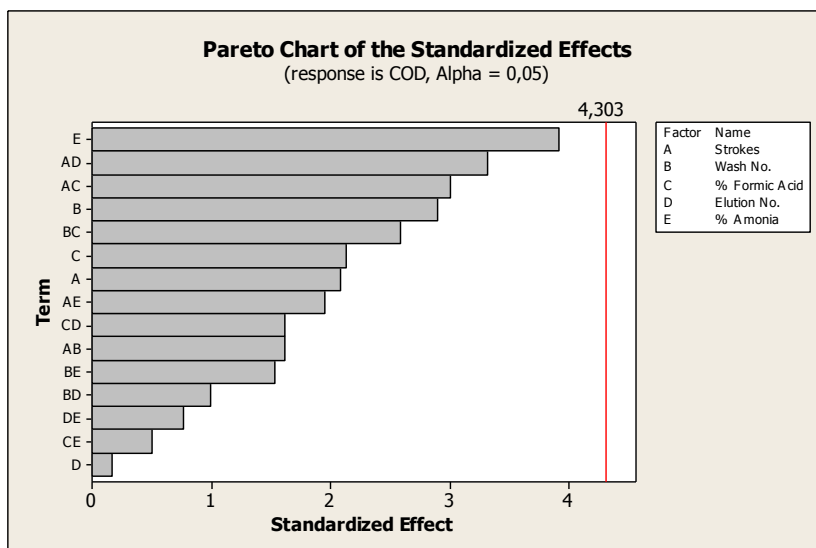


Gráfico 5 - Diagrama de Pareto da COD

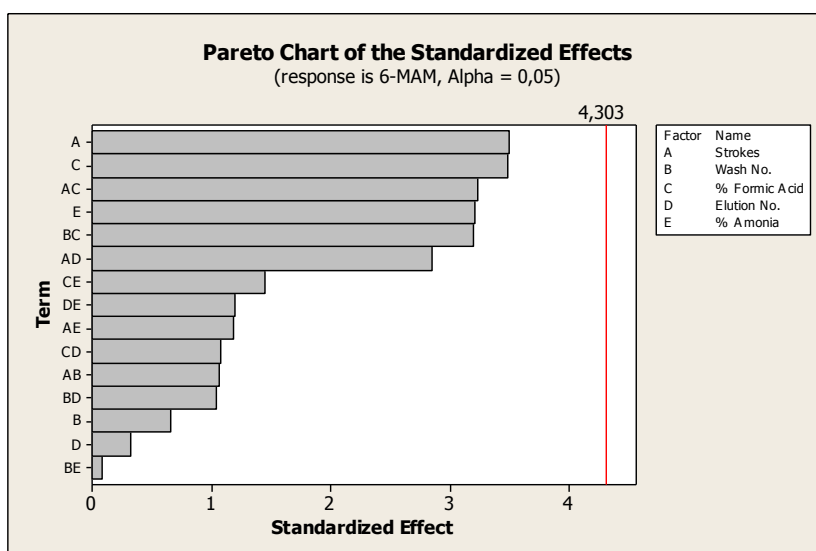


Gráfico 6 - Diagrama de Pareto da 6-MAM

Nestes diagramas os efeitos de cada um dos fatores e interação entre fatores são apresentados por ordem decrescente de magnitude e só os fatores que ultrapassam a linha traçada (nível de significância de 5%) são considerados estatisticamente significativos assumindo-se assim que têm influência na resposta.

Pela análise do diagrama de *Pareto* da MOR (gráfico 4) podemos afirmar que todos os parâmetros em estudo têm influência estatística (nível de confiança de 95%) na resposta para a MOR. Pois, analisando este diagrama, vemos que o número de lavagens e a percentagem de amônia na solução de eluição são fatores isolados que afetam a recuperação da MOR. Já a interação entre o número de aspirações com a percentagem de ácido fórmico na solução de lavagem e o número de aspirações com o número de eluições também tem influência estatística na resposta final. Já para os restantes compostos (COD e 6-MAM), os parâmetros avaliados não apresentam diferenças estatísticas, pois nenhum destes parâmetros atravessa a linha de

significância de 5%. Esta mesma interpretação é reforçada pela análise dos gráficos de efeitos principais, representados pelos gráficos 7-9.

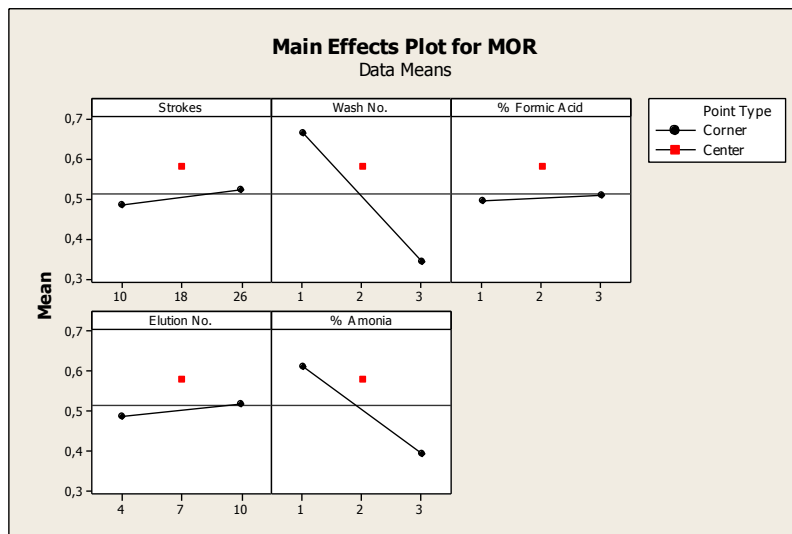


Gráfico 7 - Gráfico de efeitos principais para a MOR

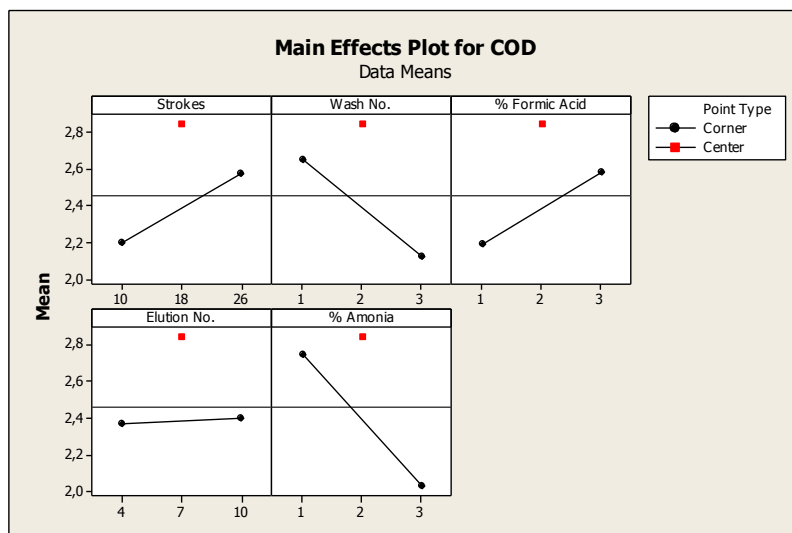


Gráfico 8 - Gráfico de efeitos principais para a COD

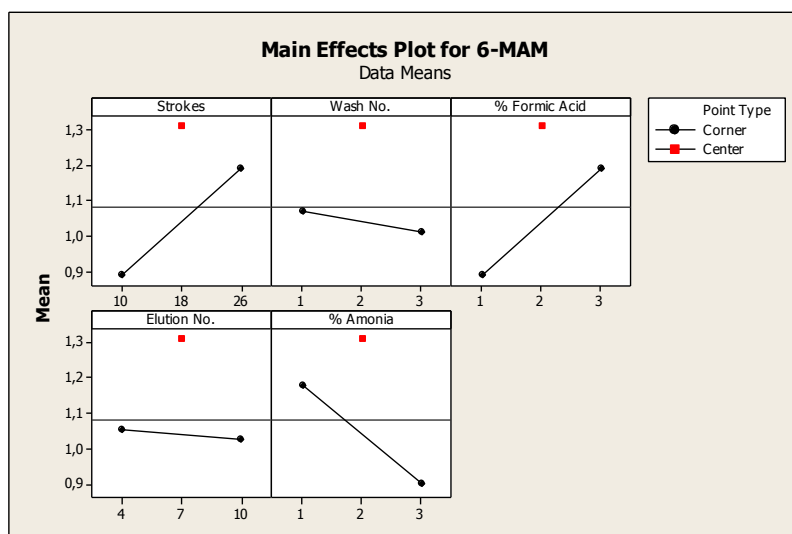


Gráfico 9 - Gráfico de efeitos principais para a 6-MAM

No gráfico 7, é então provado que o número de aspirações, o número de eluições e a percentagem de ácido fórmico não têm significância estatística para a recuperação da MOR pois, a linha dos efeitos médios não apresenta declive acentuado. Já para o número de lavagens e percentagem de amónia comprova-se o contrário. Tendo em conta estes resultados, podemos afirmar que a realização de apenas uma lavagem do sorbente é melhor que três e, a eluição da MOR tem melhor resposta com uma solução de 1% de amónia em MeOH que numa solução de 3%. Já nos gráficos 8 e 9, pela observação das linhas de efeito médio da COD e 6-MAM concluímos que existem variáveis com melhores respostas na recuperação dos compostos, contudo essas diferenças não apresentam significância estatística.

A influência na resposta originada pelas interações entre os vários fatores também foi estudada. Esses resultados encontram-se apresentados nos seguintes gráficos (gráficos 10-12).

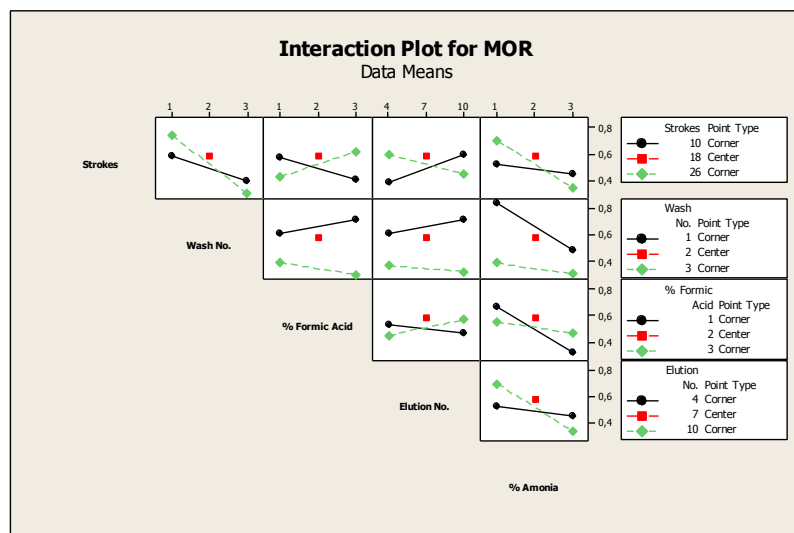


Gráfico 10 - Gráfico de interações entre os vários parâmetros para a MOR

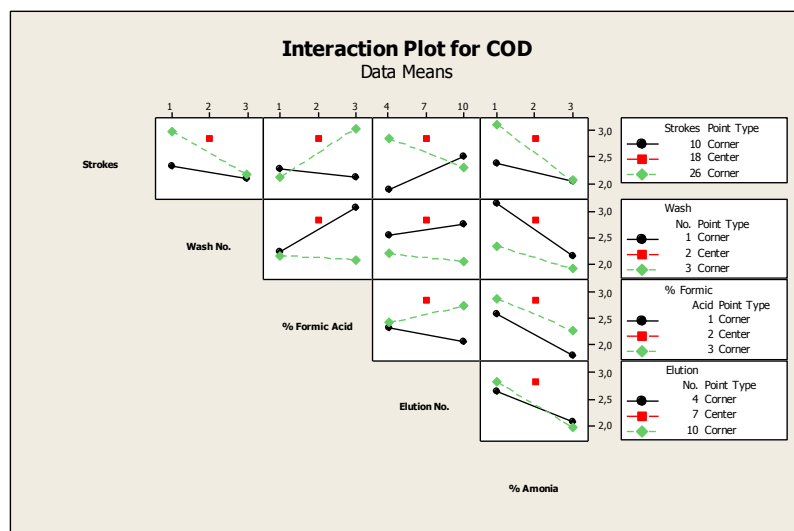


Gráfico 11 - Gráfico de interações entre os vários parâmetros para a COD

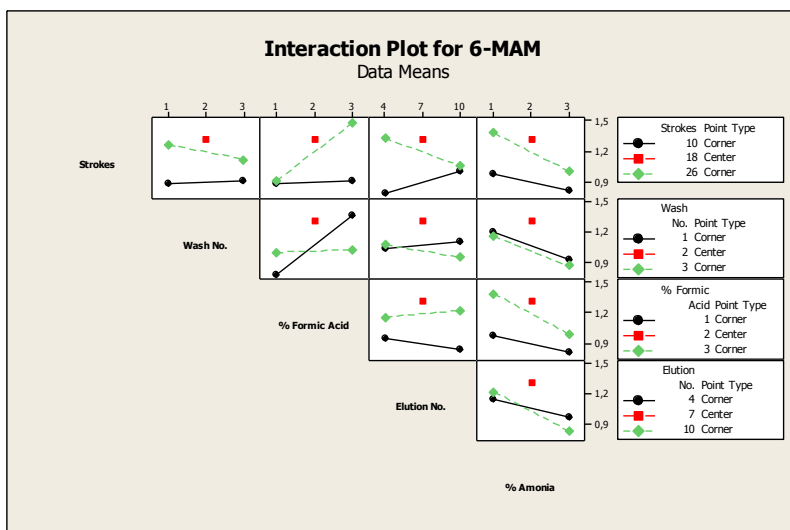


Gráfico 12 - Gráfico de interações entre os vários parâmetros para a 6-MAM

Os diagramas *Interaction Plot* são uma ferramenta estatística que permite detetar quando duas variáveis independentes têm interação uma com a outra. Essa interação é observada neste tipo de diagrama, quando duas variáveis independentes se cruzam entre elas [65]. Como foi provado pelo diagrama de *Pareto*, a MOR apresenta alterações estatisticamente significativas de recuperação quando ocorre a interação entre os fatores: número de aspirações com a percentagem de ácido fórmico e número de aspirações com o número de vezes que é feita a eluição. Esta conclusão é intensificada pela análise do gráfico 10 onde se visualiza o cruzamento da linha de efeito médio das variáveis anteriormente salientadas. Existem mais fatores onde há interação, contudo essas interações não são estatisticamente significativas.

Relativamente à COD e 6-MAM pela análise dos gráficos 11 e 12 verificamos que não existem fatores com interações entre eles. Embora, haja situações em que dois fatores se cruzam esse cruzamento dá-se no ponto máximo ou mínimo, ou em situações em que uma das variáveis se mantém constante ao longo do ensaio, desta forma não afetam estatisticamente a recuperação.

2.2.2. Superfície de resposta

Como o desenho experimental se mostrou inconclusivo devido às interações entre fatores, recorreu-se ao modelo bioestatístico de superfície de resposta (RSM). Esta ferramenta estatística é usada em situações em que a resposta é influenciada por vários fatores, cujo objetivo é a otimização dessa resposta [65].

Pelo método anterior (DOE), não se conseguiu excluir nenhum fator. Desta forma, voltou-se a recorrer ao programa Minitab v.16 para a construção de uma nova matriz. Esta foi criada com as mesmas cinco variáveis do DOE (número de aspirações, número de lavagens, percentagem de ácido fórmico, número de eluições e percentagem de hidróxido de amónio),

mas neste caso, recorreu-se a um planeamento fatorial completo. A matriz das condições usadas neste estudo encontra-se descrita na tabela 11.

Tabela 11 - Matriz experimental e resultados das extrações do RSM.

Ordem da experiência	Aspirações	Número de lavagens	% Ácido fórmico	Número de eluições	% Hidróxido de amónio	Resposta (rácio)		
						MOR	COD	6-MAM
1	20	3	2,4	8	1	2,430	1,330	7,083
2	10	3	1	4	3	3,150	1,556	6,595
3	20	3	1	4	1	1,982	2,007	6,593
4	15	2	1,7	6	2	1,524	1,130	5,219
5	10	3	2,4	4	1	1,225	1,004	4,952
6	20	3	2,4	4	3	2,153	1,278	6,409
7	15	2	1,7	6	2	1,545	1,500	4,732
8	10	3	2,4	8	3	1,187	0,657	5,173
9	15	2	1,7	6	2	1,610	1,170	4,187
10	10	1	2,4	4	3	1,389	1,318	2,307
11	15	2	1,7	6	2	1,628	1,531	5,282
12	10	1	1	8	3	2,127	1,011	5,190
13	10	3	1	8	1	2,178	1,034	5,959
14	20	1	2,4	8	3	3,099	1,933	8,484
15	20	3	1	8	3	1,356	1,528	6,454
16	20	1	2,4	4	1	1,594	1,864	6,296
17	10	1	2,4	8	1	1,717	1,605	4,792
18	20	1	1	4	3	1,596	1,791	5,000
19	20	1	1	8	1	2,439	2,641	6,987
20	10	1	1	4	1	1,976	1,189	4,686
21	15	2	1,7	1,268	2	0,867	1,710	4,448
22	15	2	3,3562	6	2	0,852	1,976	4,961
23	15	2	1,7	6	2	1,271	1,602	5,488
24	3,17	2	1,7	6	2	0,472	0,177	1,349
25	15	-0,366	1,7	6	2	3,635	4,686	11,537
26	15	2	1,7	6	2	1,295	1,746	5,808
27	15	4,366	1,7	6	2	1,425	4,303	9,841
28	15	2	1,7	6	2	1,563	1,328	3,947
29	15	2	1,7	6	-0,366	0,274	0,219	0,301
30	15	2	1,7	6	2	1,533	1,359	4,898
31	15	2	1,7	6	4,366	1,809	3,832	6,627
32	26,83	2	1,7	6	2	1,234	1,344	3,893
33	15	2	1,7	10,732	2	0,810	1,595	5,604
34	15	2	0,0438	6	2	1,158	1,667	4,966
35	20	3	2,4	4	1	0,894	1,637	3,928
36	20	1	2,4	8	1	1,896	2,399	6,505
37	10	3	1	4	1	1,033	1,281	4,324
38	20	3	1	4	3	1,460	1,896	5,356
39	10	3	1	8	3	0,949	0,790	2,578

Ordem da experiência	Aspirações	Número de lavagens	% Ácido fórmico	Número de eluições	% Hidróxido de amónio	Resposta (rácio)		
						MOR	COD	6-MAM
41	10	1	2,4	8	3	1,295	1,281	3,772
42	10	1	2,4	4	1	0,909	2,047	5,221
43	20	1	1	8	3	1,911	2,055	5,769
44	10	3	2,4	4	3	0,998	1,130	4,587
45	10	3	2,4	8	1	0,545	1,088	2,835
46	20	3	1	8	1	0,854	2,033	5,254
47	15	2	1,7	6	2	1,152	1,669	5,604
48	10	1	1	8	1	1,259	1,732	4,477
49	15	2	1,7	6	2	1,107	1,495	4,706
50	20	3	2,4	8	3	0,905	1,582	5,282
51	10	1	1	4	3	1,211	0,974	3,752
52	15	2	1,7	6	2	1,133	1,190	3,736
53	15	2	1,7	6	2	1,193	1,599	4,540
54	20	1	1	4	1	1,446	2,545	6,413

A resposta foi obtida como a razão entre a área absoluta do pico de cada composto e a área do pico do padrão interno que foi adicionado no fim da extração. Com base nessa resposta, são apresentados no anexo 2 os gráficos de superfície de resposta obtidos para cada composto em função das variáveis em estudo.

Pela análise dos gráficos de RSM verifica-se que este modelo estatístico se mostrou bastante satisfatório, uma vez que, se obtiveram gráficos com curvas de resposta bastante acentuadas. Desta forma, recorreu-se à avaliação dos coeficientes de correlação do RSM e construiu-se um gráfico da resposta de cada composto em função da condição ótima para cada variável (gráficos 13-15).

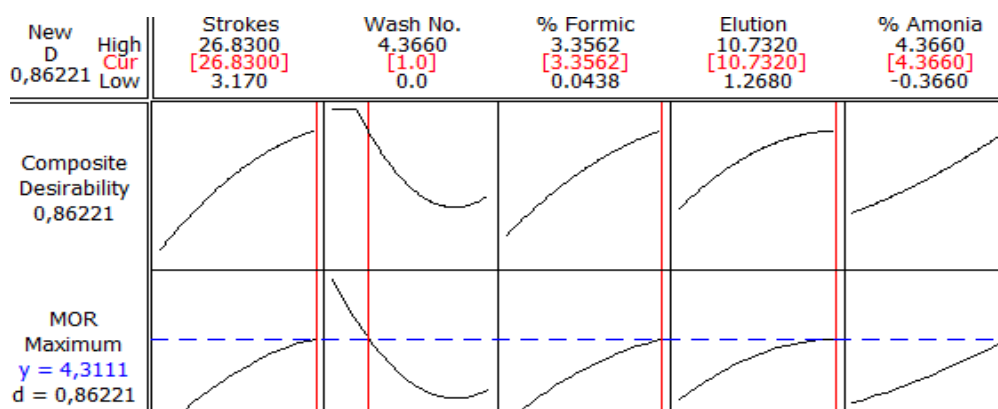


Gráfico 13 - Gráfico da solução compromisso ótima para a MOR (y, resposta esperada; cur, condição otimizada).

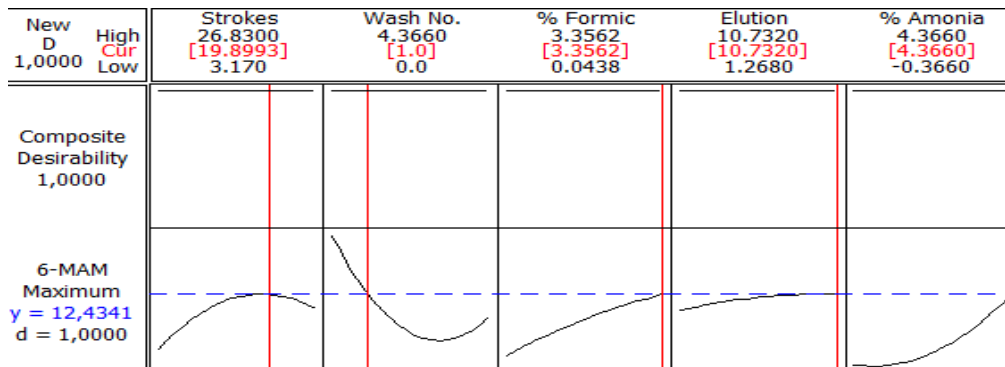


Gráfico 14 - Gráfico da solução compromisso ótima para 6-MAM (y, resposta esperada; cur, condição otimizada).

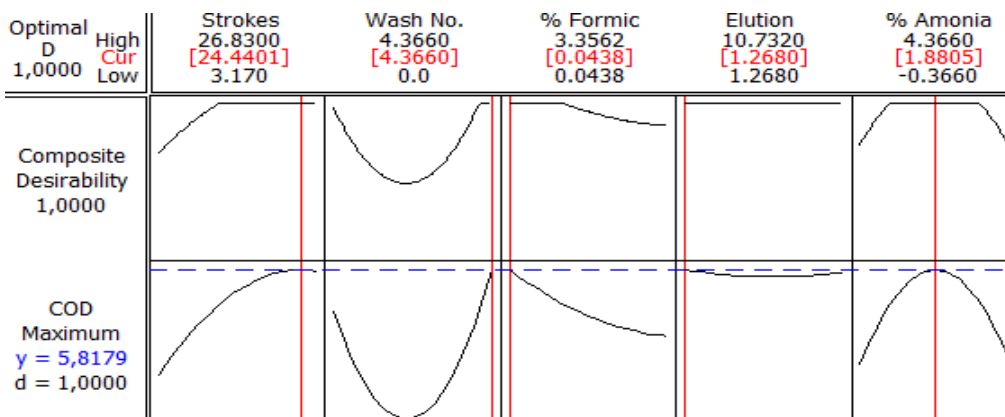


Gráfico 15 - Gráfico da solução compromisso ótima para a COD (y, resposta esperada; cur, condição otimizada).

Pela análise dos gráficos 13-15, verificamos que a condição ótima de resposta de cada opiáceo é diferente. Desta forma é impossível realizar a recuperação máxima indicada pelo modelo RSM. Assim sendo, optou-se por prejudicar a COD em benefício da MOR e 6-MAM. A escolha da COD foi devido, a ser o opiáceo que possui melhor sinal com detetor coulométrico e por ser também, o composto menos usual encontrar em casos de óbito causado por opiáceos. Assim, foi construído um novo modelo para a solução compromisso ótima para a MOR e 6-MAM (gráfico16).

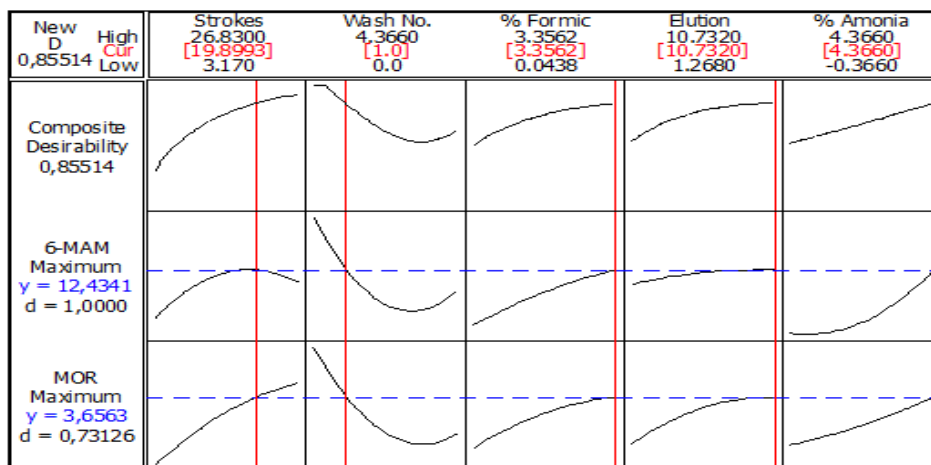


Gráfico 16 - Gráfico da solução compromisso ótima para a MOR e 6-MAM (y, resposta esperada; cur, condição otimizada).

Com os dados retirados do gráfico 16 (número de aspirações, número de lavagens, percentagem de ácido fórmico, número de eluições e percentagem de amónia), correspondentes às condições ótimas de extração da MOR e 6-MAM, foi efetuado um ensaio em triplicado destas condições para comprovar que a resposta teórica (y, gráfico 16) é igual à resposta real obtida pela extração por MEPS (tabela 12).

Tabela 12 - *BIAS* ou erro relativo médio da área prevista e real para a solução compromisso ótima da extração da MOR e 6-MAM.

	MOR	6-MAM
Área Relativa Esperada (média)	3,65	12,43
Área Relativa Observada	1,29	5,07
<i>BIAS</i>	64,50	59,18

Pela análise da tabela anterior verificou-se pelo erro relativo médio (*BIAS*), que avalia a inexatidão de um método, que os valores reais se distanciaram muito do valor esperado. Logo, o modelo teórico obtido pelo RSM não se aplica à realidade e desta forma não pode ser considerado como a solução compromisso ótima de extração de opiáceos por MEPS.

Ao recorrer ao artigo publicado por Rehim [40], que resume os passos iniciais da técnica MEPS, verifica-se que o autor não recomenda o uso de percentagens superiores a 3% de NH₄OH. Desta forma, este poderá ser o principal problema para não se conseguir alcançar as recuperações teóricas esperadas para a MOR e 6-MAM. Assim sendo, ao analisar o gráfico da solução compromisso para os três compostos (MOR, COD e 6-MAM), observou-se que apesar de baixar bastante a área teórica dos picos, a percentagem de amónia se encontrava abaixo dos 3% (gráfico 17).

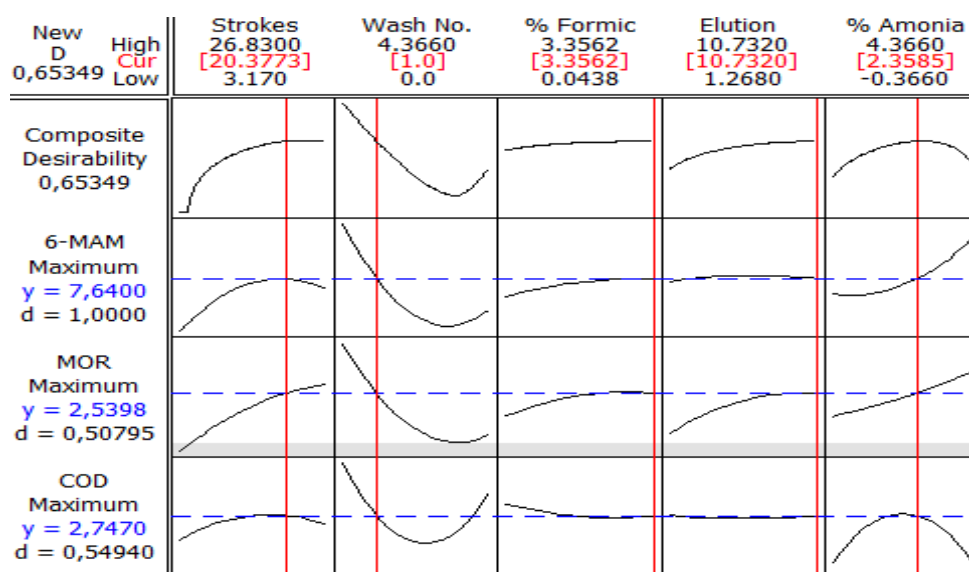


Gráfico 17 - Gráfico da solução compromisso ótima para todos os opiáceos em estudo

Como tal, procedeu-se à extração dos opiáceos com estas condições ótimas finais de forma a comparar o valor esperado com o valor real. Ao comparar a área esperada com a área

observada experimentalmente com recurso ao erro relativo médio (*BIAS*), observa-se que os valores reais se aproximam dos teóricos. Pois, o valor do *BIAS* é aceitável se inferior a $\pm 15\%$ e neste caso todos os erros relativos foram inferiores a esse valor.

Tabela 13 - *BIAS* ou erro relativo médio da área prevista e real para a solução compromisso ótima da extração da MOR e 6-MAM.

	MOR	COD	6-MAM
Área Relativa Esperada (média)	2,54	2,74	7,64
Área Relativa Observada	2,45	2,56	7,34
<i>BIAS</i>	3,53	6,78	3,95

Desta forma, estamos na condição de afirmar que a técnica de extração de opiáceos por MEPS se encontra otimizada. Sendo as condições finais de extração as seguintes:

- Aspiração e acondicionamento - 3x250 μ L de MeOH + 3x250 μ L de 2% CH₂O₂;
- Aspirações - 20x250 μ L de amostra diluída (1:35);
- Lavagem - 1x250 μ L de 3,36% CH₂O₂;
- Eluição - 11x250 μ L de 2,36% NH₄OH;
- Re-utilização - 3x250 μ L de MeOH + 3x250 μ L de água Milli-Q;

2.3. Validação do método

A fiabilidade dos resultados analíticos é de extrema importância em toxicologia, já que constitui um requisito essencial à correta interpretação dos resultados. O processo de validação deve incluir todos os procedimentos necessários para demonstrar que uma técnica analítica destinada à determinação quantitativa de um ou mais analitos numa determinada amostra é adequada [61].

A conformidade da metodologia deve ter alguns parâmetros obrigatórios, tais como seletividade/especificidade, precisão, exatidão, linearidade e curva de calibração, limites de deteção e de quantificação, e recuperação. O método descrito foi validado nestes parâmetros seguindo as normas da *Food and Drug Administration* (FDA) e da *International Conference on Harmonisation* (ICH) [66,67].

2.3.1. Seletividade

A seletividade é a capacidade que um método tem em distinguir e quantificar o analito na amostra de forma inequívoca, numa matriz complexa sem interferência de outros elementos eventualmente presentes na amostra. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse, sendo um dos primeiros passos no desenvolvimento

e validação de um método. Tal deverá também ser reavaliado continuamente, uma vez que certas amostras podem sofrer degradação, gerando compostos não observados inicialmente e que podem co-eluir com a substância de interesse. Pode acontecer que o método não seja específico mas a interferência ser mínima e relativamente estável, permitindo que, a partir do limite de quantificação do analito, deixe de ter relevância [66,67].

Com o objetivo de avaliar a seletividade do método analítico selecionaram-se dez amostras de sangue isento de drogas obtidos em diferentes indivíduos. De cada um dos *pools* foi retirado uma alíquota de 250µL e processou-se a amostra como descrito anteriormente.

Pela análise dos cromatogramas das amostras branco (figura 8), em comparação com uma amostra fortificada (figura 9), podemos afirmar que o método é seletivo para a detecção dos compostos pretendidos, pois ao tempo de retenção dos compostos e do padrão interno não se verifica sinal no cromatograma.

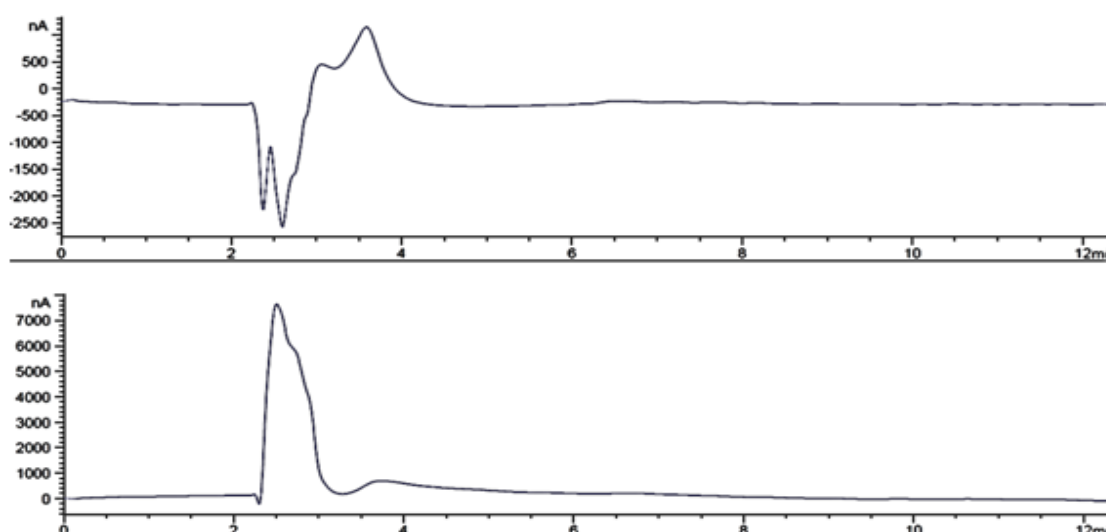


Figura 8 - Cromatograma de uma amostra branco.

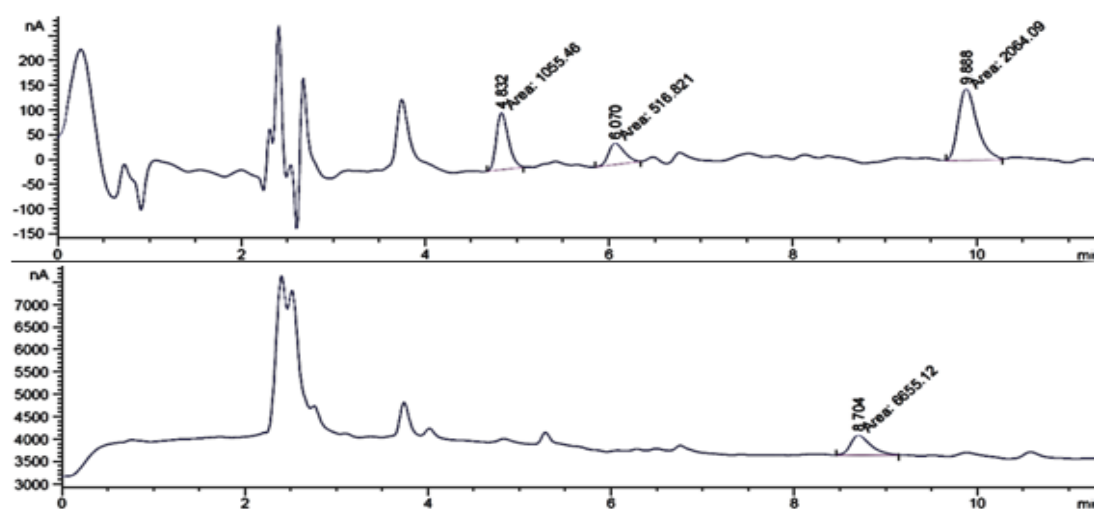


Figura 9 - Cromatograma de uma amostra extraída, fortificada com os analitos em estudo a 400ng/mL e padrão interno a 1µg/mL.

Adicionalmente, foram analisadas outras substâncias passíveis de ser encontradas em amostras reais, incluindo outras drogas de abuso [piperazinas (1-(3-trifluorometilfenil)-piperazina), 1-(3-clorofenil)-piperazina, 1-(4-metoxifenil)-piperazina], opiáceos (tramadol), cocaína (cocaína, benzoilecgonina, ecgonina metil éster), canabinóides (delta-9-tetrahydrocannabinol, 11-*nor*-9-carboxi-delta-9-tetrahydrocannabinol, 11-hidroxi-delta-9-tetrahydrocannabinol)] e cafeína. No entanto não foram observadas interferências nos cromatogramas, aos potenciais de oxidação selecionados.

2.3.2. Curva de calibração e linearidade

A linearidade diz respeito à capacidade do método analítico produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito dentro de uma determinada gama de concentrações. A faixa linear de um método é definida como o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com precisão, exatidão e a linearidade exigidas sob as condições especificadas para o ensaio [66,67].

No presente estudo, o intervalo de linearidade foi estabelecido tendo em conta o intervalo de toxicidade destes compostos descritos pela *The International Association of Forensic Toxicologist* [68].

A curva de calibração é definida como a relação entre a resposta do detetor e a concentração conhecida do analito. Para cada analito deve ser construída uma curva de calibração, devendo ser preparada na mesma matriz que a do estudo previsto, por adição (fortificação) de concentrações conhecidas do mesmo. O número de pontos de calibração para a construção da curva deve ser suficiente de forma a definir, adequadamente, a relação concentração-resposta. As concentrações dos padrões serão escolhidas com base no intervalo das concentrações esperadas no estudo em causa [66,67,70].

A curva de calibração (rácio da área do pico do analito com o padrão interno vs concentração de cada analito) foi estabelecida utilizando amostras branco fortificadas com concentrações crescentes dos analitos em estudo pelo procedimento de extração anteriormente descrito. Foram preparados 7 calibradores distribuídos uniformemente numa gama de concentrações entre 25-1000ng/mL, essas concentrações testadas, foram: 25, 50, 100, 250, 500, 750 e 1000ng/mL. A exatidão das concentrações obtidas, ao longo do intervalo de concentrações descrita, foi analisada em termos do erro relativo médio (ERM) ou *BIAS* (equação 1). O erro relativo médio (ERM) é a relação entre as concentrações obtidas e as concentrações teóricas.

$$(Equação 1) \text{ BIAS} = \frac{(\text{concentração calculada} - \text{concentração teórica})}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

As condições que devem ser respeitadas no desenvolvimento de uma curva de calibração, são o coeficiente de variação inferior a 20% e $\pm 20\%$ do *BIAS* da concentração teórica no limite inferior de quantificação (LLOQ), coeficiente de variação inferior a 15% e $\pm 15\%$ do *BIAS* da concentração teórica para os restantes calibradores [66,67].

A estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear. A equação da curva (equação 2) que descreve uma curva analítica pode ser expressa pela seguinte equação:

$$(Equação 2) \quad y = mx + b$$

Onde,

- y é a resposta medida (altura, área do pico ou rácio);
- x é a concentração de analito;
- m é o declive da curva de calibração;
- b é o coeficiente linear (interseção da curva com o eixo das ordenadas).

A partir da regressão linear, além dos coeficientes de regressão m e b , também é possível calcular o coeficiente de determinação (R^2). O seu valor deve ser superior a 0,99, pois quanto mais próximo de 1,0, menor será a dispersão do conjunto de pontos experimental e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados.

Ao estudar a linearidade assume-se que a variância é constante ao longo da gama de trabalho. No entanto, em grande parte dos casos pelo facto de estarmos perante intervalos de concentrações amplos é de esperar que a variância em cada ponto da reta seja diferente, pelo que, a condição de homogeneidade de variâncias, não é cumprida. Consequentemente, as concentrações mais elevadas tendem a influenciar mais o modelo de calibração, resultando na perda de exatidão, especialmente nos seus pontos mais baixos [69].

Desta forma, procedeu-se neste trabalho, à utilização do modelo de regressão linear ponderada através de fatores empíricos, uma forma simples e efetiva de harmonizar as discrepâncias entre as variâncias dos diferentes pontos que constituem a reta. Dos fatores de ponderação estudados $(\frac{1}{x}, \frac{1}{x^2}, \frac{1}{y}, \frac{1}{y^2}, \frac{1}{\sqrt{x}}, \frac{1}{\sqrt{y}})$ foi determinado o mais adequado para cada analito, tendo em conta o *BIAS* para as várias concentrações estudadas. Os melhores valores de *BIAS* foram obtidos com a ponderação $\frac{1}{x^2}$ para todos os compostos em estudo. Os resultados do estudo da linearidade encontram-se sumariados na tabela 14.

Tabela 14 - Sumário dos resultados da linearidade para os compostos em estudo

Composto	Regressão	Gama de trabalho (ng/mL)	Linearidade (média ± SD)		R ² (média ± SD)
			Declive (m)	Ordenada na origem (b)	
MOR	$\frac{1}{x^2}$	25-1000	0,008±3,15E-3	0,029±3,15E-3	0,992±3,30E-3
COD	$\frac{1}{x^2}$	25-1000	0,021±1,32E-3	-0,101±8,79E-3	0,994±2,99E-3
6-MAM	$\frac{1}{x^2}$	25-1000	0,011±5,42E-4	-0,147±1,06E-2	0,992±3,71E-3

Pode-se concluir, por análise da tabela anterior, que o método descrito é linear na gama de trabalho utilizada para os compostos em estudo, uma vez que a análise da regressão linear ponderada mostrou valores de R² superiores a 0,99 para todos os compostos e os valores de *BIAS* entre as concentrações teóricas e as concentrações calculadas são considerados adequados, enquadrando-se no intervalo de ±15% para todos os calibradores exceto para o LLOQ que é de ±20% [66,67].

Juntamente com cada curva de calibração foram preparadas amostras controlo a três concentrações, gama baixa (75ng/mL), gama intermédia (400ng/mL) e gama alta (800ng/mL).

2.3.3. Limite de deteção e quantificação

O limite de deteção (LOD) de um método analítico é definido como a menor quantidade de analito numa amostra que pode ser detetada mas não necessariamente quantificada como um valor exato. O limite inferior de quantificação (LLOQ) é definido como a concentração de analito que pode ser medida com precisão e exatidão adequadas, isto é, com um CV inferior a 20% e *BIAS* num intervalo de ± 20% da concentração teórica [66,67,70].

Em relação aos LLOQ, foram considerados como concentrações mais baixas das curvas de calibração de cada composto, de acordo com as condições anteriormente referenciadas. Apresenta-se na tabela 15 um resumo das características dos LLOQ de cada composto.

Tabela 15 - Características dos LLOQ de cada composto.

Composto	LLOQ (ng/mL)	Concentração teórica (média ng/mL±SD)	CV (%)	<i>BIAS</i> (%)
MOR	25	25,08±1,21	4,82	0,34
COD	25	25,33±1,26	4,95	1,33
6-MAM	25	24,68±0,98	3,99	-1,28

Para a determinação do LOD foram analisadas 6 pools de amostras fortificada com os compostos em estudo à mesma concentração que os valores de LLOQ, a 25 ng/mL, e o respetivo padrão interno a 1µg/mL.

Estes resultados são satisfatórios, tendo em conta o reduzido volume de amostra, 250 µL e o facto de se usar um detetor de baixo custo por análise, quando comparado a um

espectrómetro de massas. Contextualizando os resultados alcançados com outros já realizados na revisão bibliográfica (tabela 4) do presente trabalho, pode-se então afirmar que a sensibilidade do método criado é adequada.

De facto, os limites de quantificação obtidos no presente estudo foram de 25ng/mL para todos os analitos, valor muito satisfatório quando comparado com os obtidos por Dowling *et al.* [56] (50 ng/mL) utilizando LC-MS/MS ou os obtidos por Ahmadi-Jouibari *et al.* [53] onde o volume de amostra foi o dobro. No entanto, foram superiores aos obtidos por Zhaohui *et al.* [55] (0,5ng/mL) usando um equipamento mais sensível (LC-MS/MS), mas utilizando um volume de amostra superior (0,5mL versus 0,25mL). De salientar que em nenhuma destas técnicas publicadas foi utilizado MEPS, pelo que a sua comparação é realizada em função do tipo de amostra e da metodologia analítica utilizada.

2.3.4. Precisão e exatidão

A precisão de um método analítico descreve a proximidade dos valores individuais de um analito, quando o procedimento é aplicado repetidamente a várias alíquotas de uma amostra homogénea, em idênticas condições de análise. A precisão deve ser determinada usando, um mínimo de 5 determinações por concentração. No fundo, a precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, de uma mesma amostra em determinadas condições. A precisão é avaliada usualmente através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD) (equação 3), também conhecido como coeficiente de variação (CV). A precisão expressa a repetibilidade da área do pico, sendo considerado um excelente resultado quando o CV (%) para o equipamento é menor que 5%. Quando tal não se consegue alcançar, a precisão determinada a cada nível de concentração não deve exceder $\pm 15\%$ do CV, exceto para o LLOQ, que não deverá exceder os $\pm 20\%$ [66,67,70,71].

$$(Equação 3) \text{ RSD (\%)} \text{ ou } \text{ CV (\%)} = \left(\frac{S}{\bar{X}} \right) \times 100$$

No decorrer da validação foram estudadas a precisão intra-dia e a precisão inter-dia. A precisão intra-dia, ou repetibilidade, representa o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sobre as mesmas condições de medição, que compreendem um mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento, mesmo local e repetições num curto espaço de tempo. A precisão inter-dia ou reprodutibilidade refere-se à precisão avaliada que envolve a variação de certas condições previamente definidas, tais como: diferentes dias de análise, diferentes analistas, diferentes equipamentos [66,67,70,71].

A exatidão de um método analítico descreve o grau de proximidade entre as médias dos resultados obtidos com o método e o verdadeiro valor de concentração dos analitos na amostra. A exatidão é determinada através da repetição da análise de amostras que contêm quantidades

conhecidas de analito. O valor médio deve encontrar-se nos $\pm 15\%$ do valor teórico, exceto para o LLOQ, que não pode apresentar um desvio $\pm 20\%$. O desvio da média do valor nominal serve como medida da exatidão [66,67].

No trabalho em questão foram analisadas amostras de sangue fortificadas com todos os analitos alvo de estudo à concentração de 50, 500 e 1000ng/mL. Para cada uma destas concentrações foram efetuadas 6 réplicas para assim se proceder à avaliação da precisão das medidas efetuadas no mesmo dia (precisão intra-dia). O estudo da precisão inter-dia foi efetuada na gama de concentrações das amostras fortificadas (calibradores) durante os cinco dias de validação. Nas tabelas 16 e 17 apresentam-se os resultados relativos à precisão intra- e inter-dia respetivamente.

Tabela 16 - Precisão intra-dia e exatidão (n=6)

Compostos	Concentração (ng/mL)	Concentração calculada (média ng/mL \pm SD)	CV (%)	BIAS (%)
MOR	50	46,23 \pm 4,28	9,26	-7,52
	500	529,52 \pm 12,57	2,375	5,90
	1000	1011,81 \pm 12,04	1,190	1,18
COD	50	52,22 \pm 7,17	13,739	4,45
	500	553,51 \pm 12,77	2,308	10,70
	1000	1139,55 \pm 11,05	0,970	13,95
6-MAM	50	54,76 \pm 3,57	6,533	9,53
	500	530,75 \pm 11,37	2,144	6,15
	1000	1033,85 \pm 8,90	0,861	3,38

Tabela 17 - Precisão inter-dia e exatidão (n=5)

Compostos	Concentração (ng/mL)	Concentração calculada (ng/mL) \pm SD	CV (%)	BIAS (%)
MOR	25	25,08 \pm 1,21	4,82	0,34
	50	49,59 \pm 4,96	10,01	-0,81
	100	100,76 \pm 8,40	8,34	0,76
	250	248,77 \pm 15,22	6,11	-0,48
	500	485,06 \pm 34,83	7,18	-2,98
	750	740,10 \pm 60,71	8,20	-1,31
	1000	1044,97 \pm 36,90	3,53	4,49
COD	25	25,33 \pm 1,25	4,95	1,33
	50	48,98 \pm 5,26	10,74	-2,02
	100	97,83 \pm 5,75	5,88	-2,16
	250	257,65 \pm 13,44	5,21	3,06
	500	480,26 \pm 22,61	4,70	-3,94
	750	760,39 \pm 30,93	4,06	1,38
	1000	1023,50 \pm 47,30	4,62	2,35

Compostos	Concentração (ng/mL)	Concentração calculada (ng/mL) ± SD	CV (%)	BIAS (%)
6-MAM	25	24,67±0,98	3,99	-1,28
	50	49,35±5,20	10,55	-1,29
	100	108,60±4,45	4,09	8,60
	250	249,41±23,57	9,45	-0,23
	500	495,82±29,20	5,89	-0,83
	750	725,36±18,63	2,56	-3,28
	1000	983,29±70,88	7,20	-1,67

Analisando os resultados, pode-se afirmar que a precisão intra- e inter-dia se mantiveram dentro dos valores regulamentados, com CV abaixo dos 20% no LLOQ e 15% nos restantes calibradores.

Nas tabelas 16 e 17, foi também destacado o parâmetro de exatidão (*BIAS*) para cada opiáceo em estudo e para todas as concentrações. Em todos os casos o valor obtido para este parâmetro foi inferior a ±15% da concentração teórica. Sendo assim, pode-se inferir que estes valores estão em conformidade com os critérios de validação utilizados.

2.3.5. Recuperação

A recuperação de um analito num ensaio define-se pela resposta do detetor a uma quantidade de analito adicionado e extraído da matriz biológica comparada com a resposta do detetor obtida da concentração real do padrão de referência puro (sem extração). A recuperação indica portanto a eficácia da extração de um método analítico. Esta pode ser calculada através da equação 4 [66,67,70,71].

$$(Equação 4) \% Recuperação = \frac{\text{Área relativa do pico do analito sujeito a extração (x\%)}}{\text{Área relativa pico do analito não sujeito a extração (100\%)}} \times 100$$

A recuperação do analito não precisa de ser 100%, desde que seja reprodutível e o método apresente precisão adequada. No entanto, este parâmetro deverá ser otimizado antes da validação do método [61,71].

Para calcular a recuperação foram fortificadas, com os analitos em estudo, amostras de sangue às concentrações de 50, 500 e 1000ng/mL (em triplicado), seguindo-se a extração e posterior adição de padrão interno. Para as amostras correspondentes ao 100% de recuperação, foi feita a extração da matriz biológica sem prévia fortificação sendo, a fortificação feita só após a extração. Em ambos os casos cada uma das concentrações foi preparada e analisada em triplicado. Os resultados do estudo da recuperação encontram-se na tabela 18.

Tabela 18 - Média da recuperação, em percentagem (%), para cada composto, calculada para três níveis de concentração (n=3).

Concentração (ng/mL)	Recuperação (média % ± SD)		
	MOR	COD	6-MAM
50	8,01±0,81	13,37±1,27	20,26±1,01
500	6,22±0,63	20,22±2,76	14,00±0,96
1000	6,06±0,21	22,50±1,59	20,08±1,81

Recorrendo à tabela anterior, verifica-se que os resultados obtidos para os três opiáceos apresentam recuperações bastante baixas, mesmo após otimização do procedimento de extração. No entanto estes valores mostram-se suficientes tendo em conta os valores de LLOQ e LOD, apresentando resultados precisos, consistentes e reprodutíveis.

2.3.6. Efeito *carryover*

A avaliação da existência de fenómenos *carryover* foi efetuada em simultâneo com a determinação da curva de calibração. Este parâmetro foi avaliado pela injeção no sistema cromatográfico da solução de eluição (11x2,36% de amónia em MEOH) após a análise de amostra fortificada à concentração do calibrador mais alto da curva de calibração (1000ng/mL). Através do cromatograma da figura 10, verifica-se que não existe efeito *carryover*, uma vez que, nenhum outro pico é detetado ao tempo de retenção dos compostos em estudo.

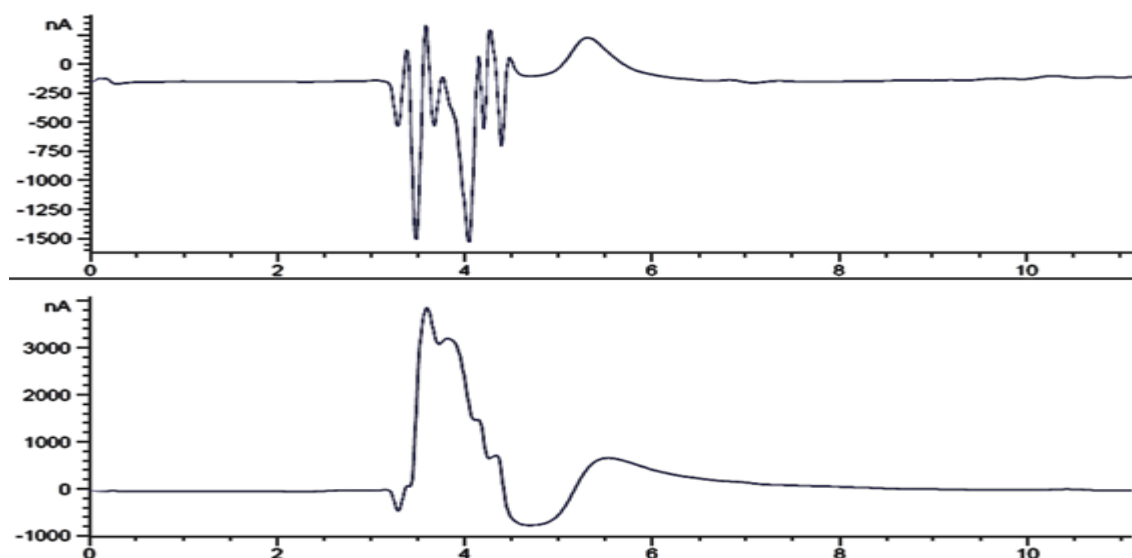


Figura 10 - Cromatograma de uma amostra branco preparada após a extração do calibrador mais elevado para verificação do efeito *carryover*.

2.3.7. Estabilidade

A estabilidade dos compostos numa matriz biológica depende de diversos fatores, tais como a as condições de armazenamento e das propriedades físicas e químicas da matriz e do recipiente de armazenamento. As condições testadas devem refletir situações prováveis que poderão ser encontradas durante o manuseamento e análise de amostras reais. Desta forma, foram avaliadas no decorrer da validação: a estabilidade de amostras processadas, a estabilidade de curta duração e a estabilidade de congelação/descongelação [66,67,70,71].

2.3.7.1. Estabilidade em amostras processadas

A estabilidade de amostras processadas deve ser avaliada em função do tempo esperado para o tamanho do lote em amostra para validação [66,67].

Este parâmetro foi estudado a três níveis de concentração, em triplicado: 75, 400 e 800ng/mL. Após todo o procedimento de extração, os extratos foram deixados no injetor durante 24 horas e injetados após esse tempo. Os resultados procedentes dessas amostras foram então avaliados e comparados (em termos de CV e *BIAS*) com os resultados obtidos pela análise de amostras nas mesmas concentrações, mas extraídas e injetadas no sistema cromatográfico no mesmo dia.

Através da análise dos resultados obtidos (tabela 19), pode-se afirmar que os extratos dos analitos em estudo são estáveis após 24 horas a temperatura ambiente, pois os valores de *BIAS* foram inferiores a 14% e os CV inferiores a 11%.

Tabela 19 - Estabilidade de amostras processadas.

Compostos	Concentração (ng/mL)	Concentração calculada (ng/mL ± SD)	CV (%)	<i>BIAS</i> (%)
MOR	75	73,32±6,42	8,76	-2,23
	400	454,27±25,74	5,66	13,56
	800	865,57±21,24	2,45	8,19
COD	75	69,02±3,46	5,01	-7,87
	400	428,50±18,31	4,27	7,12
	800	787,03±38,49	4,89	-1,62
6-MAM	75	69,72±7,48	10,73	-7,03
	400	431,33±26,51	6,14	7,83
	800	706,46±73,50	10,40	-11,69

2.3.7.2. Estabilidade de curta duração

A estabilidade de curta duração das amostras foi estudada em três níveis de concentrações: 75, 400 e 800ng/mL (em triplicado para cada uma das concentrações). As amostras previamente fortificadas foram deixadas 24 horas a temperatura ambiente e protegidas da luz, período após o qual foram extraídas e analisadas. Os valores obtidos foram comparados (em termos de CV e *BIAS*) com os obtidos em amostras preparadas e analisadas no mesmo dia. Os coeficientes de variação obtidos foram inferiores a 12% e os *BIAS* situaram-se

num intervalo de $\pm 12\%$ para as várias concentrações estudadas, pelo que podemos afirmar que os compostos são estáveis à temperatura ambiente pelo menos durante 24 horas. Os resultados encontram-se sumariados na tabela 20.

Tabela 20 - Estabilidade a curto prazo à temperatura de laboratório.

Compostos	Concentração (ng/mL)	Concentração calculada (ng/mL \pm SD)	CV (%)	BIAS (%)
MOR	75	73,10 \pm 6,05	8,27	-2,44
	400	447,00 \pm 52,98	11,85	11,72
	800	792,79 \pm 71,88	9,06	-0,90
COD	75	77,15 \pm 5,41	7,01	2,84
	400	383,39 \pm 23,51	6,13	-4,13
	800	770,97 \pm 100,15	12,99	-3,62
6-MAM	75	72,12 \pm 2,4	3,43	-3,80
	400	387,59 \pm 42,35	10,92	-3,12
	800	845,52 \pm 110,85	13,11	5,51

2.3.7.3. Estabilidade a ciclos de congelação/descongelação

A determinação da estabilidade a ciclos de congelação/descongelação foi estudada em três gamas de concentração: 75, 400 e 800ng/mL (em triplicado para cada uma das concentrações). As amostras após fortificação foram submetidas a congelação durante 24 horas, seguida de descongelação, permanecendo à temperatura ambiente durante 2 horas. Aquando da sua descongelação, as amostras foram novamente congeladas durante 24 horas. O ciclo de congelação/descongelação foi repetido mais duas vezes e só depois se procedeu à adição do padrão interno e processamento das amostras. Após extração foram comparadas as áreas relativas com as amostras preparadas e analisadas no próprio dia. Os resultados encontram-se sumariados na tabela 21.

Tabela 21 - Estabilidade após ciclos de congelação/descongelação.

Compostos	Concentração (ng/mL)	Concentração calculada (ng/mL \pm SD)	CV (%)	BIAS (%)
MOR	75	80,58	5,26	7,43
	400	438,01	3,76	9,50
	800	705,90	14,03	-11,76
COD	75	80,25	0,73	7,00
	400	452,73	9,52	13,18
	800	747,58	7,90	-6,55
6-MAM	75	77,40	2,44	3,20
	400	432,93	10,81	8,23
	800	802,47	2,79	0,30

Através da análise dos resultados obtidos na tabela 21, pode-se afirmar que dos três compostos em estudo, o que apresenta uma maior estabilidade a ciclos de congelação/descongelação é a 6-MAM, pois apresenta valores de CV e BIAS mais baixos. Contudo, podemos afirmar que os opiáceos em estudo são estáveis a ciclos de congelação/descongelação, pois os valores de BIAS e CV foram inferiores a 15%.

2.4. Aplicação do método a amostras reais

Uma parte integrante e fundamental do processo de validação é a aplicação do método a amostras reais para deteção e quantificação dos analitos de interesse.

Assim sendo, a metodologia anteriormente descrita foi aplicada a 3 amostras reais procedentes de indivíduos com suspeita de intoxicação e que deram entrada ao serviço de urgência do Centro Hospitalar Cova da Beira, EPE. A título de exemplo apresenta-se na figura 12 um cromatograma relativo a um caso de intoxicação e respetivas concentrações (tabela 22).

Tabela 22 - Compostos identificados na amostra e respetiva concentração obtida.

Composto	Concentração (ng/mL)
MOR	344,33
COD	196,38
6-MAM	196,54

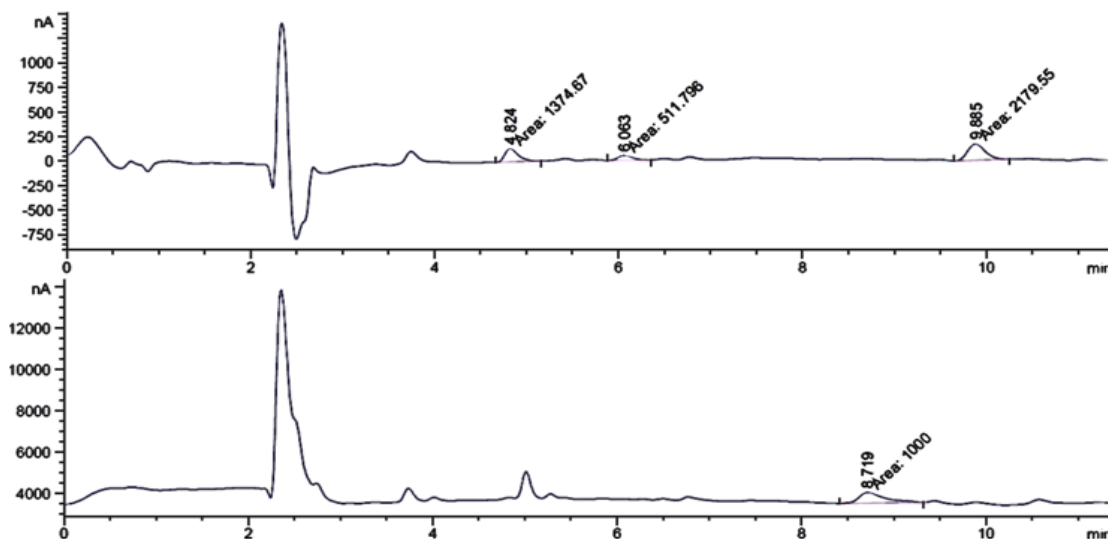


Figura 11 - Cromatograma obtido pela análise de uma amostra real.

III. Conclusões

Foi desenvolvido um método analítico específico, de fácil e rápida execução, baseado na microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor eletroquímico coulométrico para determinação quantitativa e qualitativa de morfina, codeína e 6-monoacetilmorfina em amostras de sangue *post-mortem*.

A metodologia apresentada revelou ser seletiva, sensível, precisa, exata e linear dentro do intervalo de concentrações estudado segundo os critérios internacionalmente aceites da FDA e ICH para validação de métodos bioanalíticos.

Os principais fatores suscetíveis de influenciar o processo extrativo foram otimizados com o objetivo de maximizar a recuperação e assim obter baixos limites de deteção e quantificação. Neste contexto, o planeamento fatorial fracionado revelou ser uma ferramenta útil na otimização da extração, diminuindo o número de experiências a realizar.

O método proposto mostrou ser linear na gama de concentração de 25-1000ng/mL para todos os opiáceos em estudo com valores de R^2 superiores a 0,99 excelentes limites de deteção e quantificação (25ng/mL) mesmo obtendo recuperações entre 6-23%.

Com os resultados aqui apresentados, podemos afirmar que a metodologia proposta nesta dissertação pode ser uma alternativa vantajosa aos métodos habitualmente utilizados para determinação de opiáceos, devido à rapidez do processo de extração (15 minutos), ao baixo volume de amostra (250 μ L) e à diminuição do consumo de solventes orgânicos.

É de salientar que este é o primeiro estudo que permite a deteção e quantificação de opiáceos em amostras biológicas com recurso à microextração em seringa empacotada.

IV. Referências bibliográficas

- (1) Jólluski G., Nunes L., “*O uso de drogas: breve análise histórica e social*”, Ciências humanas e sociais, 4 (2007), pp 230-237;
- (2) Henriques S., “*Risco cultivado no consumo de novas drogas*”, Sociologia - Problemas e práticas, 40 (2002), pp 63-85;
- (3) Poiares, C., “*Contribuição para uma análise histórica da droga*”, Toxicodependências, 5 (1999), pp3-12;
- (4) Sequeira J., “*As origens psicológicas da toxicomania*”, Lisboa: Climepsi Editores, 1 (2006), pp 6-14;
- (5) World Health Organization, “*World health organization expert committee on drug dependence - Sixteenth report*”, Genève, Switzerland: WHO Technical Report Series, 407 (1969), pp 6;
- (6) Julien R., “*Drogen und Psychopharmaka*”, Spektrum Akademischer Verlag, 3th edition (1997), pp 253-273;
- (7) Duarte D., “*Opium and opioids: A brief history*”, Revista Brasileira de Anestesiologia, 55 (2005), pp 135-146;
- (8) Brownstein M., “*A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors*”, Proceedings of the Academy of Natural Sciences of USA, 90 (1993), pp 5391-5393;
- (9) “*The Opiates*”, Drugtext - International Substance Use Library, disponível on-line em: <http://www.drugtext.org/sub/opiat1>, (retirado a 18/05/2014);
- (10) Patrick G., “*An Introduction to Medicinal Chemistry*”, Oxford University Press, 1st edition (1995), pp 45-66;
- (11) European Monitoring Centre for Drugs and Drugs Addiction, “*Drug use: An overview of general population surveys in Europe*”, Luxemburgo: Office for oficial publications of the european communities (2009);
- (12) “*Country overview: Portugal*”, European Monitoring Centre for Drugs and Drugs Addiction, disponível on-line em: <http://www.emcdda.europa.eu/publications/country-overviews/pt/data-sheet> (retirado a 15/05/2014);
- (13) Osswald W., Guimarães S., “*Terapêutica Medicamentosa e suas Bases Farmacológicas*”, Porto Editora, 4^a Edição (2005), pp 163-178;

- (14) Busse G., *“Drugs, the straight facts: Morphine”*, Chelsea House Publishers, 1st edition (2006), pp 33-42;
- (15) Barroso M., Gallardo E., Vieira D., Queiroz J., López-Rivadulla M., *“Bioanalytical procedures and recent developments in the determination of opiates/opioids in human biological samples”*, *Anal Bioanal Chem*, 400 (2011), pp 1665-1690;
- (16) Andrea M., Trescot M., Sukdeb D., Marlon L., *“Opioid pharmacology”*, *Pain Physician*, 11 (2008), pp 133-153;
- (17) Ferreira D., Faccione M., *“Opiate, Opioid analgesics and antagonists”*, *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, 26 (2005), pp 125-136;
- (18) Cooper J.R., Bloom F.E., Roth R.H., *“The biochemical basis of neuropharmacology”*, Oxford University Press, 8th edition (2003);
- (19) Williams D., Patel A., Howard R., *“Pharmacogenetics of codeine metabolism in an urban population of children and its implications for analgesic reliability”*, *British of Anaesthesia*, 89 (2002), pp 839-845;
- (20) European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, *“EMCDDA Insights: New heroin-assisted treatment”*, Luxemburgo: Office for official publications of the European Union (2012);
- (21) Pattison P., McIntosh S., Hemby SE., *“Differential regulation of accumbal dopamine transmission in rats following cocaine, heroin and speedball self-administration”* *Journal of Neurochemistry*, 112 (2012), pp 138-146;
- (22) Meadway C., George S., Braithwaite R., *“A rapid GC-MS method for the determination of dihydrocodeine, codeine, norcodeine, morphine, normorphine and 6-MAM in urine”* *Forensic Science International*, 127(2002), pp 136-141;
- (23) Konstantinova S., Normann P., Arnestad M., Karinen R., Morland J., *“Morphine to codeine concentration ratio in blood and urine as a marker of illicit heroin use in forensic autopsy samples”*, *Forensic Science International*, 217 (2012), pp 216-221;
- (24) Marieb E.N., Hoehn K., *“Human Anatomy & Physiology”*, Benjamin Cummings, 7th edition (2007), pp 415-426;
- (25) Siegel G., Albers R.W., Brady S., Price D., *“Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects”*, American Society for Neurochemistry, 7th edition (2006), pp 211-248;
- (26) Tambelli C., Parada C., *“Peripheral Receptor Targets for Analgesia: Novel Approaches to Pain Management”* Wiley, 1st edition (2009), pp 347-373;

- (27) Purves D., Augustine G.J., Fitzpatrick D., Hall W.C., Lamantia A.S., McNamara J.O., Williams S.M., *“Neuroscience”*, Sinauer Associates, 3rd edition (2004), pp 147-151;
- (28) Klaasse C., *“Casarett and Doull’s Toxicology: The Basic Science of Poisons”*, McGraw Hill Medical Publishing Division, 7th edition, pp 453-807;
- (29) Moffat A., Osselton D., Widdop B., *“Clarke’s Analysis of Drugs and Poisons”*, Pharmaceutical Press, 4th edition, pp190-200;
- (30) Yamada H., Ishii Y., Oguri K., *“Metabolism of drugs of: abuse: Its contribution to the toxicity and the inter-individual differences in drug sensitivity”*, Journal of Health Science, 51 (2005), pp 1-7;
- (31) Swift M., Lewis D., *“Farmacologia da dependência e abuso de drogas”*, 1st edition (1997) pp 265-268;
- (32) Moeller M., Steimmeyer S., Kraemer T., *“Determination of drugs of abuse in blood”*, Journal of chromatography B, 713 (1998), pp 91-109;
- (33) Mali N., Karpe M., Kadam V., *A review on biological matrices and analytical methods used for determination of drug of abuse.*, Journal of Applied Pharmaceutical Science, 1:6 (2011), pp 58-65;
- (34) Gallardo E., Costa S., Barroso M., *“A microextração em fase sólida como técnica de preparação de amostras em química analítica e toxicologia: Teoria e aplicações”*, Revista Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde, 1 (2009), pp 105-124;
- (35) Spietelun A., Marcinkowski L., Namiesnik J., *“Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques”*, Talanta, 119 (2014), pp 34-45;
- (35) Abdel-Rehim M., *New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography-mass spectrometry.*, Journal of Chromatography B, 801 (2004), pp 317-321;
- (36) Spietelun A., Marcinkowski L., Namiesnik J., *“Recent developments and future trends in solid phase microextraction techniques towards green analytical chemistry”*, Journal of chromatography A, 1321 (2013), pp 1-13;
- (37) Barroso M. Moreno I., Fonseca B., Queiroz J., Gallardo E., *“Role of microextraction sampling procedures in forensic toxicology”* Future Science, 4 (2012), pp 1805-1826;

- (38) Nováková L., Vlcková H., “A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation”, *Analytica Chimica Acta*, 656 (2009), pp 8-35;
- (39) Oppolzer D., Moreno I., Fonseca B., Passarinha L., Barroso M., Costa S., Queiroz J., Gallardo E., “Analytical approach to determine biogenic amines in urine using microextraction in packed syringe and liquid chromatography coupled to electrochemical detection”, *Biomedical Chromatography*, 27 (2013), pp 608-614;
- (40) Abdel-Rehim M., “Microextraction by packed sorbent (MEPS): A tutorial”, *Analytica Chimica Acta*, 701 (2011), pp 119-128;
- (41) Altun Z., Abdel-Rehim M., “Study of the factors affecting the efficiency of microextraction by packed sorbent (MEPS) using liquid scintillation counter and liquid chromatography-tandem mass spectrometry”, *Analytica Chimica Acta*, 630 (2008), pp 116-123;
- (42) Abdel-Rehim M., Altun Z., Blomberg L., “Microextraction in packed syringe (MEPS) for liquid and gas chromatographic applications. Part II—Determination of ropivacaine and its metabolites in human plasma samples using MEPS with liquid chromatography/tandem mass spectrometry”, *Journal of Mass Spectrometry*, 39 (2004), pp 1488-1493;
- (43) Abdel-Rehim M., “Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis”, *Journal of Chromatography A*, 1217, (2010), pp 2569-2580;
- (44) Gonçalves A., Neng N., Carvalho A., Nogueira J., “Development of a Powdered Activated Carbon in Bar Adsorptive Micro-Extraction for the Analysis of Morphine and Codeine in Human Urine” *Journal of Chromatographic Science*, 50 (2012), pp 574-581;
- (45) Sarafraz A., Eshaghi Z., “Surfactant enhanced liquid-phase microextraction of basic drugs of abuse in hair combined with high efficiency liquid chromatography”, *Journal of Chromatography A*, 11 (2005), pp 1-8;
- (46) Li B., Peterson N., Payan M., Hansen S., “Design and implementation of an automated liquid-phase microextraction-chip system coupled on-line with high efficiency liquid chromatography”, *Talanta*, 120 (2014), pp 224-239;
- (47) Djozan D., Baheri T., “Preparation and evaluation of solid-phase microextraction fibers based on monolithic molecularly imprinted polymers for selective extraction of diacetylmorphine and analogous compounds” *Journal of Chromatography A*, 1166 (2007), pp 16-23;
- (48) Candish E., Gooley A., Wirth H., Dawes P., Shellie R., Hilder E., “A simplified approach to direct SPE-MS” *Journal Sep. Science*, 35 (2012), pp 2399-2408;

- (49) Wei F., Zhang M., Feng Y., “*Application of poly (methacrylic acid-ethylene glycol dimethacrylate) monolith microextraction coupled with capillary zone electrophoresis to the determination of opiates in human urine*” *Electrophoresis*, 27 (2006), pp 1939-1948;
- (50) Aleksa K., Walasek P., Fulga N., Koren G., “*Simultaneous detection of seventeen drugs of abuse and metabolites in hair using solid phase micro extraction (SPME) with GC/MS*” *Forensic Science International*, 218 (2012), pp 31-36;
- (51) Moller M., Aleksa K., Karaskov T., Koren G., “*Solid-phase microextraction for the detection of codeine, morphine and 6-monoacetylmorphine in human hair by gas chromatography-mass spectrometry*”, *Forensic Science International*, 196 (2010), pp 64-69;
- (52) Shamsipur M., Fattahi N., “*Extraction and determination of opium alkaloids in urine samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-eficiência liquid chromatography*”, *Journal of Chromatography B*, 879 (2011), pp 2978- 2983;
- (53) Ahmadi-Jouibari T., Fattahi N., Shamsipur M., Pirsahab M., “*Dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection to determination of opium alkaloids in human plasma*”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 85 (2013) pp 14-20;
- (54) Al-Asmari A., Anderson R., Kidd S., Thomson A., “*Method for the Quantification of Diamorphine and its Metabolites in Pediatric Plasma Samples by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*”, *Journal of Analytical Toxicology*, 34 (2010) pp 177-195;
- (55) Zhaohui Z., Chenggong Z., Su X., Ming M., “*Carrier-mediated liquid phase microextraction coupled with high eficiência liquid chromatography for determination of illicit drugs in human urine*”, *Analytica chimica acta*, 621 (2008), pp 185-192;
- (56) Dowling G., Regan L., “*A new mixed mode solid phase extraction strategy for opioids, cocaines, amphetamines and adulterants in human blood with hybrid liquid chromatography tandem mass spectrometry detection*”, *Journal of Pharmaceutical an Biomedical Analysis*, 54 (2011), pp 1136-1145;
- (57) Ahmadi-Jouibari T., Fattahi N., Shamsipur M., Pirsahab M., “*Dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-eficiência liquid chromatography-ultraviolet detection to determination of opium alkaloids in human plasma*” *Journal of Pharmaceutical an Biomedical Analysis*, 85 (2013), pp 14-20;
- (58) Barroso M., Dias M., Vieira D., López-Rivadulla M., Queiroz J., “*Simultaneous quantitation of morphine, 6-ecetylmorphine, codeine, 6-acetylcodeine, and tramadol in hair using mixed-mode solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry*”, *Anal Bioanal Chem*, 396 (2010), pp 3059-3069;

(59) Skoog D., West D., Holler F., Crouch S., “Fundamentos de Química Analítica”, Editora Thomson, 8ª Edição (2003), pp 627-634,899-945;

(60) *Coulochem III* - Reference Manual, ESA Inc. (2004), disponível on-line em: www.esainc.com/download/?id=1980 (retirado a 10/06/2014);

(61) Wille S., Peters F., Fazio V., Samyn N., “*Practical aspects concerning validation and quality control for forensic and clinical bioanalytical quantitative methods*”, *Accred Qual Assur*, 16 (2011), pp 279-292;

(62) Mahdy T., El-Shihi T., Emara M., Giorgi M., “*New HPLC Method to Detect Individual Opioids (Heroin and Tramadol) and their Matabolites in the Blood of Rats on Combination Treatment*”, *Journal of Chromatography Science*, 50 (2012), pp 658-665;

(63) Garrido J., Delerue C., Borges F., Macedo T., Brett A., “*Electrochemical Analysis of Opiates - an Overview*”, *Analytical Letters*, 37 (2004), pp 831-844;

(64) Costa, S., Barroso, M., Castañera, A., Dias, M., “*Design of experiments, a powerful tool for method development in forensic toxicology: application to the optimization of urinary morphine 3-glucuronide acid hydrolysis*”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396 (2010), pp 2533-2542;

(65) Miller J., Miller J., “*Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*”, Pearson Education, 5th edition (2005), pp 181-209;

(66) “*Guidance for Industry - bioanalytical method validation*”, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM) (2001), disponível on-line em : <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf> (retirado a 12/06/2014);

(67) “*Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)*”, International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (2005), disponível on-line em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf (retirado a 16/06/2014).

(68) “*D.R.A. Uges: Therapeutic and Toxic Drug Concentration List*” The International Association of Forensic Toxicologist (2013), disponível on-line em: <http://www.tiaft.org>, (retirado a 19/06/2014);

(69) Costa S., “*Métodos de análise de piperazinas em fluidos biológicos*”, dissertação de mestrado (2007), Aveiro;

(70) Cassiano N., Barreiro J., Martins L., Oliveira R., Cass Q., “*Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas*”, *Química Nova*, 4 (2009), pp 1021-1030;

(71) Peters F., Maurer H., “*Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology - An review*”, *Accred Qual Assur*, 7 (2002), pp 441-449;

V. Anexos

1.1. Anexo I: Análise estatística (otimização do processo de extração)

Análise ANOVA: Comparação das técnicas T9 e T10 para a MOR

Técnica	Rácio (área analito/área padrão interno)
T9	0,155
	0,152
	0,140
T10	0,123
	0,132
	0,116

SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
T9	3	0,447636	0,149212	6,28E-05
T10	3	0,370239	0,123413	6,61E-05

ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	0,000998	1	0,000998	15,48719	0,017026	7,708647
Dentro de grupos	0,000258	4	6,45E-05			
Total	0,001256	5				

Teste F: duas amostras para variâncias

	T9	T10
Média	0,149212	0,123413
Variância	6,28E-05	6,61E-05
Observações	3	3
gl	2	2
F	0,950259	
P(F<=f) uni-caudal	0,487248	
F crítico uni-caudal	0,052632	

Teste T: duas amostras com variâncias iguais

	T9	T10
Média	0,149212	0,123413
Variância	6,28E-05	6,61E-05
Observações	3	3
Variância agrupada	6,45E-05	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	4	
Stat t	3,935377	
P(T<=t) uni-caudal	0,008513	
t crítico uni-caudal	2,131847	
P(T<=t) bi-caudal	0,017026	
t crítico bi-caudal	2,776445	

Análise ANOVA: Comparação das técnicas T4 e T10 para a COD

Técnica	Rácio (área analito/área padrão interno)
T4	0,923
	0,730
	1,014
T10	0,697
	0,795
	0,578

SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
T4	3	2,667645	0,889215	0,02107
T10	3	2,070324	0,690108	0,01189

ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	0,059465	1	0,059465	3,608295	0,130306	7,708647
Dentro de grupos	0,065921	4	0,01648			
Total	0,125386	5				

Teste F: duas amostras para variâncias

	T4	T10
Média	0,889215	0,690108
Variância	0,02107	0,01189
Observações	3	3
gl	2	2
F	1,772073	
P(F<=f) uni-caudal	0,360741	
F crítico uni-caudal	19	

Teste T: duas amostras com variâncias desiguais

	T4	T10
Média	0,889215	0,690108
Variância	0,02107	0,01189
Observações	3	3
Hipótese de diferença de média	0	
gl	4	
Stat t	1,899551	
P(T<=t) uni-caudal	0,065153	
t crítico uni-caudal	2,131847	
P(T<=t) bi-caudal	0,130306	
t crítico bi-caudal	2,776445	

Análise ANOVA: Comparação das técnicas T1 e T10 para a 6-MAM

Técnica	Rácio (área analito/área padrão interno)
T4	0,304
	0,211
	0,255
T10	0,221
	0,203
	0,279

SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
T1	3	0,771319	0,257106	0,002166
T10	3	0,702989	0,23433	0,001568

ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	0,000778	1	0,000778	0,41675	0,553729	7,708647
Dentro de grupos	0,007469	4	0,001867			
Total	0,008247	5				

Teste F: duas amostras para variâncias

	T1	T10
Média	0,257106	0,23433
Variância	0,002166	0,001568
Observações	3	3
gl	2	2
F	1,381216	
P(F<=f) uni-caudal	0,419954	
F crítico uni-caudal	19	

Teste T: duas amostras com variâncias desiguais

	T1	T10
Média	0,257106	0,23433
Variância	0,002166	0,001568
Observações	3	3
Hipótese de diferença de média	0	
gl	4	
Stat t	0,645562	
P(T<=t) uni-caudal	0,276864	
t crítico uni-caudal	2,131847	
P(T<=t) bi-caudal	0,553729	
t crítico bi-caudal	2,776445	

1.2. Anexo II: Gráficos de superfície de resposta (RSM)

