

**“Desenvolvimento e otimização de um método para a determinação de arilciclohexaminas em amostras de cabelo por microextração em seringa empacotada e cromatografia gasosa-espetrometria de massa em tandem”**

**Hugo Patrik Oliveira**

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

Orientador: Mestre Ana Aysa da Rocha Simão  
Co-orientador: Doutor Tiago Alexandre Pires Rosado  
Co-orientador: Prof. Doutora Maria Eugénia Gallardo Alba

**outubro de 2022**



## **Declaração de Integridade**

Eu, Hugo Patrik Oliveira, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M10774 de/o Bioquímica da Faculdade de Ciências, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 05 /10 /2022



# **Dedicatória**

Quero dedicar esta dissertação a toda a minha família e em especial à minha afilhada.



# Agradecimentos

Nesta vida não há nada que se faça sozinho, e esta dissertação é a prova disso. Esta só foi possível com o apoio imensurável de várias pessoas, que sempre ajudaram até ao fim.

Primeiramente, quero agradecer a todas as pessoas do laboratório de toxicologia. Pessoas estas, que no decorrer deste tempo, se tornaram amigos que vou levar para a vida. Um grande obrigado, do fundo do coração, aos meus orientadores (Professora Eugénia Gallardo, Doutor Tiago Rosado e Mestre Ana Simão) por toda a paciência que tiveram comigo, por toda a orientação e confiança que me deram, por toda a sabedoria que me transmitiram, por todos os bons momentos e por tornarem os maus sempre mais fáceis. Agradecer também aos meus amigos com quem estive no dia a dia no laboratório, com os quais partilhei todas as alegrias, mas também todas as frustrações, um obrigado por me aturarem e tornarem mais fácil e alegre todo este percurso.

Um enorme obrigado a todo este grupo, por todos os bons momentos que proporcionaram e pela amizade que se criou e por terem tornado este ano inesquecível!

Aos meus amigos um obrigado por sempre me apoiarem e estarem sempre presentes. Por todos os cafés, momentos de descontração e diversão que deram, bem como todos os desabafos e frustrações!

À minha família um gigantesco obrigado! Obrigado por me terem dado sempre confiança e força para alcançar todos os meus objetivos ao longo destes anos. Quero agradecer aos meus pais por nunca me deixarem desistir e por todas as oportunidades que me deram apesar de todas as dificuldades! Quero agradecer também à minha irmã pelo apoio e por ter sido sempre um exemplo para mim!

Um sincero e enorme OBRIGADO a todos vós que me ajudaram a alcançar mais uma etapa da vida!



## Resumo

Nos últimos dez anos o consumo de novas substâncias psicoativas (NSP) tem vindo a aumentar sendo que têm sido introduzidas novas substâncias cada semana. O seu consumo constitui um problema social e de saúde pública pelo que a análise toxicológica se torna da maior importância. Neste documento descreve-se o desenvolvimento e otimização de um método simples, rápido, sensível e com baixo consumo de solventes orgânicos para a determinação da ketamina e do seu principal metabolito norketamina em amostras de cabelo. O procedimento descrito incluiu a utilização de uma técnica miniaturizada, a microextração em seringa empacotada (MEPS) bem como a cromatografia de gases acoplada à espectrometria de massa em tandem (GC-MS/MS). Prévio ao processo de *clean-up*, foi otimizado o processo de hidrólise. Foram também otimizados os parâmetros que influenciam o processo de extração com recurso à ferramenta estatística de desenho experimental (DOE). Os limites de deteção obtidos foram de 0,01 e 0,05 ng/mg para a ketamina e norketamina, respetivamente. Quanto à eficiência de extração, este parâmetro variou entre 32 e 60%. É importante salientar que este é o primeiro método descrito que permite a determinação de ketamina e metabolito com recurso à MEPS e GC-MS/MS em amostras de cabelo.

## Palavras-chave

Novas substâncias psicoativas; ketamina; microextração em seringa empacotada; GC-MS/MS; cabelo



# **Abstract**

In the last ten years, the consumption of new psychoactive substances (NPS) has increased rapidly, with new substances being introduced every week. The consumption of these substances is considered a social and public health problem, so toxicological analysis plays a role of utmost importance. This thesis describes the development and optimization of a simple, rapid, sensitive, and low organic solvent consumption method for the determination of ketamine and its main metabolite, norketamine, in hair samples. The described procedure included a miniaturized technique, microextraction by packed sorbent (MEPS), as well as gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). Before the clean-up process, the hydrolysis was optimized. The parameters influencing the extraction were also optimized using the statistical tool Design of Experiments (DOE). The detection limits obtained were 0.01 and 0.05 ng/mg for ketamine and norketamine, respectively. As for extraction efficiency, values between 32 and 60% were obtained. It is crucial to point out that this is the first described method that allows the determination of ketamine and metabolite using MEPS and GC-MS/MS in hair samples.

## **Keywords**

New psychoactive substances; ketamine; microextraction by packed sorbent; GC-MS/MS; hair



# Índice

<b>Dedicatória</b>	v
<b>Agradecimentos</b>	vii
<b>Resumo</b>	ix
<b>Abstract</b>	xi
<b>Lista de Figuras</b>	xv
<b>Lista de Tabelas</b>	xvii
<b>Lista de Acrónimos</b>	xix
<b>Justificação e objetivos do tema</b>	xxi
<b>Capítulo 1 Introdução</b>	1
1 Novas substâncias Psicoativas	1
1.1 Arilciclohexaminas	2
1.2 Ketamina	2
1.2.1 Farmacocinética, farmacodinâmica e efeito terapêutico	3
1.2.2 Efeitos tóxicos, tolerância e dependência	7
1.2.2 Norketamina	10
2 Determinação de ketamina em amostras de cabelo	11
2.1 Amostras de cabelo	11
2.1.1 Biologia, crescimento e mecanismos de incorporação do cabelo	11
2.1.2 Colheita e análise do cabelo	12
2.1.3 Vantagens e desvantagens da amostra de cabelo	13
2.2 Microextração em seringa empacotada	15
<b>Capítulo 2 Procedimento experimental</b>	18
1 Material e Métodos	18
1.1 Reagentes e padrões / Preparação das soluções de trabalho	18
1.2 Amostras de cabelo	18
1.3 Condições cromatográficas e espetrométricas	19
1.4 Preparação da amostra	20
1.4.1 Descontaminação do cabelo e extração	20
1.4.2 Processo de <i>Clean-up</i>	20
2 Resultados e Discussão	21
2.1 Otimização das condições cromatográficas e espetrométricas	21
2.2 Otimização do processo de MEPS	26
2.3 Estudo da influência da hidrólise no cabelo e estudo da influência da ressuspensão após hidrólise	28
2.4 Limites de detecção	31
2.5 Recuperações	33
3 Conclusões	35
Referências	36
Anexos	51



# Lista de Figuras

## Capítulo 1|Introdução

Figura 1. Adsorvente empacotado da MEPS	15
---	----

## Capítulo 2|Procedimento Experimental

Figura 2. Cromatograma em modo SCAN da KET e NK a uma concentração de 100 µg/mL	21
Figura 3. Espectro de massa da KET a uma concentração de 100 µg/mL em modo SCAN	22
Figura 4. Espectro de massa da NK a uma concentração de 100 µg/mL em modo SCAN	22
Figura 5. Cromatograma dos iões pais da KET e NK a uma concentração de 10 µg/mL e 100 µg/mL, respetivamente	23
Figura 6. Espectro de massa do PI do ião 181 da KET a uma concentração de 10 µg/mL	23
Figura 7. Espectro de massa do PI do ião 194.4 da NK a uma concentração de 100 µg/mL	24
Figura 8. Esquema de um espectrómetro de massa triplo quadrupolo	24
Figura 9. Cromatograma das transições quantificadoras (QT) e qualificadoras (QL) da KET e NK e respetivos PI (KET-d4 e NK-d4)	25
Figura 10. Gráficos de Pareto obtidos para a KET e NK	27
Figura 11. Principais fatores para a KET e NK	27
Figura 12. Otimização dos fatores experimentais	28
Figura 13. Resultados relativos ao processo de hidrólise para a KET	29
Figura 14. Resultados relativos ao processo de hidrólise para a NK	29
Figura 15. Cromatograma dos sinais sobrepostos das diferentes hidrólises para a KET	30
Figura 16. Cromatograma dos sinais sobrepostos das diferentes hidrólises para a NK	30
Figura 17. Cromatograma de uma amostra branco	32
Figura 18. Cromatograma de uma amostra fortificada à concentração do LODs	32

## Anexos

Figura 1. Cromatogramas relativos a uma injeção de branco de reagentes (Metanol e ACN)	53
Figura 2. Cromatograma relativo aos analitos em estudo à concentração de 100 µg/mg	53



# Lista de Tabelas

## Capítulo 1|Introdução

Tabela 1. Efeitos causados pela KET (Adaptado de [96])	8
--	---

## Capítulo 2|Procedimento experimental

Tabela 2. Parâmetros GC-MS/MS para a análise de KET e NK	19
Tabela 3. Matriz de desenho, fatores experimentais da MEPS e rácios da área dos picos obtidos	26
Tabela 4. Resultados da recuperação para a KET e NK	33
Tabela 5. Recuperações obtidas utilizando SPE como procedimento de <i>clean-up</i> em amostras de cabelo	34

## Anexos

Tabela 1. Tempos de retenção obtidos para os compostos em estudo com 59% de ACN na fase móvel	52
Tabela 2. Dados relacionados com o estudo da linearidade	55
Tabela 3. Dados relativos à precisão e exatidão intradia para todos os compostos de estudo	56
Tabela 4. Dados relativos à precisão e exatidão interdia	65
Tabela 5. Dados relativos à precisão intermédia	68
Tabela 6. Estudo da estabilidade em amostras processadas à temperatura ambiente e a 4 °C	71
Tabela 7. Concentração de canabinoides presentes numa amostra	73



# Lista de Acrónimos

AAS	Espectroscopia de Absorção Atômica
AMPA	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
CEC	Eletrocromatografia Capilar
DHMK	Desidronorketamina
DI	Água Desionizada
DI-SPME	Microextração em Fase Sólida em Modo Imersão Direta
DL <sub>50</sub>	Dose Letal
DOE	<i>Design of Experiments /desenho experimental</i>
EUA	Estados Unidos da América
EWDTs	<i>European Workplace Drug Testing Society</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GABA	Ácido gama-amino butírico
GC	Cromatografia de Gases
HILIC	Cromatografia de Interação Hidrofílica
HNK	Hidroxinorketamina
HS-SPME	Microextração em Fase Sólida em Modo <i>Headspace</i>
IS	Padrão Interno
KET	Ketamina
LC	Cromatografia Líquida
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
LSD	Dietilamida do Ácido Lisérgico
M <sub>1</sub>	(Modo Misto C <sub>8</sub> /SCX)
MEPS	Microextração em Seringa Empacotada
MIPs	Polímeros de Impressão Molecular
MRM	Monitorização de Rações Múltiplas
MS	Espectrometria de Massa
MS/MS	Espectrometria de Massa em Tandem
mTOR	Proteína Alvo da Rapamicina nos Mamíferos
MXE	Metoxetamina
NCI	Ionização Química Negativa
NIMH	Instituto Nacional de Saúde Mental dos Estados Unidos
NK	Norketamina
NMDA	N-metil-d-aspartato
NSP	Novas Substâncias Psicoativas
ODS	Octadecilsilano
OEDT	Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência
PCP	Fenciclidina
PI	<i>Product Ion</i>
PS-DVB	Poliestireno-divinilbenzeno
RAM	Material de Acesso Restrito
SBSE	Extração por Adsorventes de Barra de Agitação
SCAN	Modo de Varrimento Contínuo
SCX	Permutador Catiónico Forte
SNC	Sistema Nervoso Central
SPE	Extração em Fase Sólida
SoHT	<i>Society of Hair Testing</i>
TR	Tempo de Retenção
UE	União Europeia
V <sub>d</sub>	Volume de Distribuição



## Justificação e objetivos do tema

As novas substâncias psicoativas (NSP), denominadas também de drogas sintéticas, são cada vez mais um problema para a sociedade. O consumo destas tem vindo a aumentar ao longo do tempo, sendo que existe uma enorme diversidade disponível [1].

A maioria das NSP não está registada na legislação relativa a substâncias controladas. De acordo com o Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência (OEDT), no ano 2019 mais de 400 NSP diferentes foram detetadas na Europa, sendo que desde 2015 são detetadas todos os anos cerca de 400 NSP [1].

A ketamina (KET) pertence ao grupo das NSP, contudo a sua venda, importação e produção já está controlada na legislação de Portugal desde 2013. É das poucas NSP usadas em âmbito terapêutico, sendo usada como anestésico sob o nome Ketalar®. Trata-se de um análogo da fenciclidina (PCP) introduzido no mercado com o objetivo de substituir o uso da PCP como anestésico por esta apresentar efeitos secundários muito prolongados.

De forma a determinar o consumo terapêutico de um consumo recreativo é importante que existam métodos para a detetar e quantificar. Neste trabalho foi desenvolvido e otimizado um método analítico para detetar a KET e o seu metabolito, norketamina (NK) em amostras de cabelo por microextração em seringa empacotada (MEPS) e cromatografia de gases acoplada a espectrometria de massa em tandem.

O cabelo tem sido uma alternativa às matrizes mais usadas, urina e sangue, no âmbito da toxicologia. Devido à grande janela de deteção torna-se possível fazer um histórico do consumo. Além disso é de fácil recolha e um procedimento não invasivo.

Como atualmente os problemas ambientais têm tido cada vez mais relevância, muitos laboratórios estão a optar por técnicas que tenham como fundamento a química verde, isto é, que usem poucos solventes e que causem poucos desperdícios. É o caso da MEPS. Esta técnica é uma técnica rápida e de fácil utilização, que segue os princípios da química verde. Atualmente é mais usada em matrizes clássicas, não existindo ainda muitos estudos com aplicação em amostras de cabelo.

Existem dois capítulos neste trabalho. No capítulo 1 apresenta-se uma contextualização do tema baseada na literatura existente sobre a KET e as técnicas utilizadas nesta dissertação e no capítulo 2 é descrito o procedimento experimental desenvolvido.



# Capítulo 1 | Introdução

## 1 Novas substâncias psicoativas (NSP)

As NSP podem ser classificadas como um grupo heterogéneo de substâncias, muitas vezes, conhecidas também como drogas sintéticas, drogas recreativas ou drogas legais [2,3]. As NSP estão comumente associadas a problemas que afetam o próprio indivíduo e a sociedade. De acordo com a composição molecular ou o alvo farmacológico as NSP podem ser subdivididas em subgrupos, tais como canabinoídes, alucinógenos, estimulantes e substâncias depressivas, todos eles compostos sintéticos. Contudo não existe uma classificação que seja universal para categorizar as NSP [4,5]. A existência de uma grande diversidade de NSP constitui um desafio para os laboratórios de toxicologia analítica, devido à dificuldade em identificar estas substâncias, à inexistência de normas de referência, à rápida transformação das estruturas químicas, e à sua taxa de produção e distribuição [6,7]. As NSP são sintetizadas com uma homologia estrutural semelhante às tradicionais drogas de abuso, para mimetizar os efeitos psicoativos de produtos farmacêuticos, medicamentos autorizados e de substâncias controladas [8–10]. A maioria das substâncias mais recentes atuam como estimulantes do sistema nervoso central (SNC), contudo as suas estruturas químicas apresentam diferentes formas, que modulam a intensidade e a duração da sua ação, bem como os seus efeitos secundários [11]. O controlo legal das NSP é ainda mais dificultado pelo facto de, em geral, estas substâncias não estarem incluídas na legislação existente para substâncias controladas [6,7]. Para escaparem a qualquer controlo, as NSP diferem quimicamente, apenas o necessário, dos seus precursores [12], e quando é aprovada uma lei de controlo para alguma NSP, rapidamente outra semelhante é criada [13]. Neste sentido, vários países como o Reino Unido, criam leis para reduzir a produção e circulação destas substâncias [14].

O facto de o mercado das NSP estar em constante mudança, levanta preocupações sobre a sua composição química, metabolismo e toxicidade, bem como o modo de afetação dos seus consumidores, podendo originar problemas ao nível social, físico e mental [6,15,16]. A internet e a existência de fóruns de discussão para os consumidores partilharem as suas experiências, permitiram o aumento da disseminação das NPS [14,17]. Segundo o Observatório Europeu da droga e da Toxicodependência (OEDT), em 2019, foram detetadas mais de 400 NSP diferentes no mercado europeu. Posteriormente, no final do ano 2020, o OEDT detetou cerca de 830 NSP, 46 das quais foram reportadas pela primeira vez na Europa. Desde 2015, foram detetadas anualmente na Europa cerca de 400 NSP, anteriormente notificadas [1]. O consumo de NSP a nível nacional, de 2016/2017, na população geral (15-74 anos) foi de 0,3% e na população jovem adulta (15-34 anos) foi de

0,5 %. Em termos de consumo recente na população geral foi de 0,2% e na população jovem adulta foi de 0,4% [18].

### 1.1 Arilciclohexaminas

Dentro das NSP existem as substâncias do tipo fenciclidina (PCP), que são compostos pertencentes à família das arilciclohexaminas, que são consideradas alucinogénios dissociativos, com uma estrutura química semelhante à PCP e à ketamina (KET), ou também designada como cetamina. As arilciclohexaminas são compostas por uma ciclohexamina com um arilo (geralmente um fenil), ligado ao mesmo átomo ao qual o grupo de aminas está ligado. Quando o grupo arilo é um fenil, passa-se a designar estas substâncias de fenilciclohexaminas, como é o caso da PCP e seus derivados e da ketamina [19–21].

### 1.2 Ketamina

A KET foi sintetizada em 1962, pelo químico Calvin Stevens [22], como uma alternativa mais segura para a PCP – anestésico para uso humano, mas revelou-se imprópria por causar delírio prolongado [23–25]. Quimicamente a KET tem a designação de 2-(2-cloro-fenil)-2-metilaminohexanona e sendo que o centro quiral está no carbono 2 da ciclohexanona, origina uma mistura racémica de S(+)-ketamina [(S)-K] e R(-)-ketamina [(R)-K] [22,26,27]. A KET é um análogo da PCP, e como tal apresenta três modificações estruturais desta molécula. A primeira modificação consiste na substituição do anel de piperidina por uma metilamina. Outra alteração é a presença de um átomo de cloro no grupo fenil na posição dois e por último um grupo carboxílico adicionado ao anel de ciclohexil [22,26]. Não há evidências a longo prazo de que a KET cause neurotoxicidade ou efeitos prejudiciais prolongados ao nível psicológico, em ambiente clínico controlado. Na área da medicina, esta substância foi introduzida como anestésico veterinário em 1963. Em 1966, a KET foi patenteada para uso humano e animal, e tornou-se disponível mediante prescrição médica em 1969 e após a aprovação pela *Food and Drug Administration* (FDA), em 1970 foi comercializada com o nome Ketalar® [22,27–29] começando a ser usada recreativamente, muitas vezes vendida como se fosse ecstasy. A KET é muitas vezes conhecida como “*club drug*” e é consumida recreativamente sobretudo por jovens devido aos efeitos alucinogénios e estimulantes que apresenta. Contudo, também apresenta aplicações humanas e veterinárias, devido à curta duração e rápido aparecimento dos efeitos, tendo diversos usos terapêuticos, como anestesia geral, analgesia, no tratamento da depressão, e psiquiátrico [19,28,30–41]. A partir de 1997 o

enantiómero S foi comercializado em vários países europeus com as mesmas aplicações da R,S-ketamina, enquanto que em 2019 a esketamina, usada para administração intranasal, foi comercializada nos Estados Unidos de América (EUA) e na União Europeia (UE) para o tratamento de depressão [25,42–44].

Em 1971, foi reportado o primeiro caso de uso de KET com efeitos psicadélicos. No início dos anos 90, a mesma começou a ser popular em festas na Europa e a tornar-se popular também em outras partes do mundo. A KET para uso ilícito é comumente chamada de “*Special K*”, “*Vitamin K*” ou “*Ket*”, e encontra-se disponível no mercado negro como uma droga “limpa” e “segura”, na forma líquida ou em pó [30,34,45–47]. A KET também pode ser usada para facilitar agressões sexuais, uma vez que esta não tem odor nem sabor [48–50], e em grandes quantidades imita a PCP (efeitos narcóticos) e o dietilamida do ácido lisérgico (LSD) (efeitos alucinogénios), [51,52], e provoca experiências de quase morte, e delírios [37,47,53]. Um grande número de substâncias com efeitos semelhantes ou piores do que a KET foram criados através de pequenas modificações na sua estrutura [54]. A metoxetamina (MXE), 3-metoxi-fenciclidina e 3-metoxi-etociclidina são exemplos de substâncias criadas a partir da KET, muitas vezes tóxicas e até fatais [7,55–58]. Em Portugal a KET entrou para a lista de NSP a partir do Decreto-Lei nº 54/2013 [59].

### 1.2.1 Farmacocinética, farmacodinâmica e efeito terapêutico

A KET pode ser administrada de diversas maneiras, entre as quais oralmente, via intramuscular, via intravenosa, no espaço epidural, via intranasal e por via intrarectal [60,61], sendo que a infusão intravenosa consegue alcançar rapidamente elevadas concentrações no plasma [62,63]. Todas as vias de administração levam a uma rápida absorção [22,64–66]. Isto deve-se ao facto de ser hidrossolúvel e lipossolúvel [22,64,67].

No que diz respeito à biodisponibilidade, a administração oral apresenta apenas 16 a 29% devido ao metabolismo de primeira passagem, pois a KET é facilmente decomposta pelos ácidos biliares [62,66,68–73] e tem também um efeito de ação mais lento que as outras vias de administração, com concentrações no plasma detetáveis cerca de 30 minutos após o consumo [65]. A administração intramuscular apresenta a maior biodisponibilidade, cerca de 93% [62] e um início de ação em 30 segundos, sendo o mesmo observado na administração intravenosa [22,65,74]. A biodisponibilidade da administração intrarectal é cerca de 25 a 30%, enquanto na administração intranasal é cerca de 45 a 50%. Esta última via de administração não apresenta metabolismo de primeira passagem, é pouco invasiva, tem uma elevada absorção sistémica e atua rapidamente, e por estas razões pode ser uma alternativa à administração intravenosa [27,42,60,65]. A KET é rapidamente absorvida por órgãos permeáveis, tais como o cérebro, coração e pulmões, por ser lipossolúvel e por

ter uma taxa de ligação às proteínas plasmáticas de 10 a 50%, resultando num grande volume de distribuição em estado estacionário ( $V_d = 3-5 \text{ L/KG}$ ). [22,66,67,75-79]. Porém, é no fígado que ocorre maioritariamente o metabolismo deste composto [22,27,64].

O sistema citocromo P450 é o responsável pela metabolização da KET, e a enzima CYP3A4 é a principal enzima responsável pela transformação da KET em norketamina (NK) por *N*-demetilação [47]. Outras enzimas, como a CYP2C19, CYP2B6, CYP2A6, CYP2D6 e CYP2C9 também metabolizam a KET, mas em menor grau [22,27,66]. Por sua vez a NK origina a desidronorketamina (DHNK) por desidrogenação e pode também sofrer hidroxilação e originar hidroxinorketamina (HNK) [42,47]. Também se formam outros metabolitos da KET, mas em menor grau, tais como 4-hidroxi-KET e 5-hidroxi-KET [79]. A KET e os seus metabolitos são excretados maioritariamente na urina, sobretudo na forma conjugada com ácido glucurónico (80%). Contudo metabolitos não conjugados, como a DHNK (16,2%) e NK (1,6%), e a própria KET (2,3%) podem também ser eliminados na urina [22,42,66,75]. A KET pode ser detetada na urina por 5 a 11 dias, a NK por 6 a 14 dias e a DHNK por 10 dias [22,50,66,80]. Nos adultos, a KET tem uma elevada taxa de eliminação e um tempo de meia-vida curto - cerca de 2h a 4h [42,62,81,82]. Como referido anteriormente, a KET é produzida como uma mistura racémica, pelos enantiómeros S(+)-KET e R(-)-KET, onde a S(+)-KET é duas vezes mais potente do que a mistura racémica [66]. Nos humanos a S(+)-KET tem um tempo de meia-vida ligeiramente mais longo (5h) e uma taxa de eliminação superior em comparação com a mistura racémica (Hagelberg et al. 2010; Peltoniemi et al. 2012).

A principal ação da KET é sobre o glutamato, que é o maior neurotransmissor excitatório presente no cérebro. A KET é um antagonista dos recetores de *N*-metil-d-aspartato (NMDA), um dos três recetores ionotrópicos do glutamato, em conjunto com os recetores ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) (e ácido caínico), sendo que os efeitos analgésicos e anestésicos da KET são devido à inibição destes recetores [22,84,85]. Contudo os recetores NMDA não são os seus únicos alvos farmacológicos. A KET interage também com outros recetores e canais iónicos, incluindo os recetores de dopamina, serotonina, sigma, opioides e colinérgicos, bem como canais disparados por nucleotídeos cíclicos ativados por hiperpolarização [42,86,87]. A KET pertence à classe dos antagonistas bloqueadores de canais não competitivos [88] e inibe o recetor NMDA, ao se ligar no sítio PCP, localizado no poro do canal do recetor NMDA, bloqueando assim o fluxo transmembranar de iões, fazendo com que a resposta excitatória do glutamato seja inibida [22,27,42,89]. Os recetores NMDA têm capacidade de manutenção dos sítios competitivos de ligação (glutamato, ácido aspártico e glicina) e dos sítios não-competitivos (aminas primárias, ião de zinco e PCP) [34] e por isso participam em variadas funções biológicas sensoriais, a nível espinal, límbico, cortical e talâmico. Pode ainda ser induzido

um estado de dissociação que interfere com a plasticidade sináptica e também no processo de aprendizagem e memória (Félix et al. 2016; Morgan and Curran 2012). Pelo facto de os recetores NMDA possuírem propriedades antagonistas permite que a KET exerça amnésia, efeitos psicossensoriais e analgésicos, e ainda de hipnose [22,64,86,91].

O bloqueio dos recetores NMDA pela KET impede a libertação do neurotransmissor ácido gama amino butírico (GABA), e este normalmente inibe a libertação de glutamato. Não havendo libertação de GABA vai aumentar assim a quantidade de glutamato [92]. O glutamato vai então estimular os recetores AMPA pós-sinápticos, que medeiam a neurotransmissão rápida e excitatória. Estes recetores desencadeiam a via da proteína alvo da rapamicina nos mamíferos (mTOR), que resulta na expressão de proteínas sinápticas levando a um aumento de espinhas dendríticas. Existe a hipótese de que o aumento de espinhas dendríticas cause o efeito antidepressivo de início rápido [92,93].

Como referido anteriormente, a KET também interage com os recetores opioides, sendo estes designados como mu, kappa e delta. Estes recetores estão expressos no SNC, bem como nos tecidos periféricos, onde a KET exerce as suas ações analgésicas, funcionando como agonista destes recetores e ativando-os [26,42]. A ativação dos recetores opioides inibe a transmissão de estímulos nociceptivos, que resulta no efeito analgésico. Contudo, a KET exerce as suas propriedades anti nociceptivas através do bloqueio dos recetores NMDA, sem ser mediado pelos recetores opioides como a maioria dos analgésicos [88,94]. Sendo assim, a KET é usada como adjuvante no tratamento da dor e em regimes de anestesia opioide, sobretudo em doentes tolerantes a opiáceos [87]. A KET pode ainda atuar como um inibidor da recaptção da serotonina e da noradrenalina, estando estes dois neurotransmissores associados a vias anti nociceptivas [26,95].

Os recetores sigma podem ser classificados em sigma-1 e sigma-2, e são proteínas reticulares endoplasmáticas capazes de atuar como chaperonas para promover a atividade de várias proteínas que têm estado implicadas em distúrbios neuropsiquiátricos [88]. A KET atua como agonista nestes recetores, sendo que os seus efeitos antidepressivos são devidos à remodelação neuronal mediada pelos mesmos [22,26,34].

Ao contrário de outras substâncias psicoativas, a KET é uma substância aprovada e utilizada na medicina pelas suas propriedades anestésicas e está disponível no mercado farmacêutico sob dois nomes comerciais: Ketalar® (cloridrato de KET) e mais recentemente Spravato® (cloridrato de esketamina). O Ketalar® é indicado como o único agente anestésico para procedimentos de diagnóstico e cirúrgicos que não requerem relaxamento muscular esquelético para a indução da anestesia antes da administração de outros agentes anestésicos gerais. Este também complementa agentes de baixa potência, tal como o óxido nitroso. Já o Spravato® é usado no tratamento da depressão em adultos, em conjugação com um antidepressivo oral [96].

Pelo facto de o cloridrato de KET ter um curto tempo de meia-vida e não provocar depressão respiratória, faz com que esta substância seja então um protótipo interessante de anestésico, pois impede o paciente de sentir dor, mas não induz sedação ou hipnose. Por outro lado, os anestésicos comuns estão geralmente associados à depressão cardiovascular e respiratória como efeitos adversos, colocando em risco a vida do indivíduo. Estes efeitos não ocorrem com a KET, tornando-se numa importante vantagem [96].

Passar das propriedades anestésicas da KET para as antidepressivas, não foi algo de extraordinário. Atualmente a KET é utilizada em contextos psicoterapêuticos, tendo sido a esketamina (S-enantiómero) aprovada pela FDA em março de 2019 como uma substância eficaz no tratamento de depressão difícil de tratar e da ideação suicida [97]. Existem provas de possuírem efeitos antidepressivos de ação rápida em indivíduos cujas tentativas no tratamento de desordens depressivas não surtiram efeito. A esketamina apresenta um início de ação mais rápido do que os antidepressivos convencionais [98].

Ao contrário da maioria dos alucinogénios clássicos, o mecanismo de ação da KET e análogos, baseado no antagonismo do recetor NMDA, é eficaz numa variedade de doenças neurológicas e neuropsiquiátricas [99]. Como tal, os antagonistas dos recetores NMDA têm sido amplamente utilizados no tratamento de Alzheimer, epilepsia, síndrome da dor crónica, esquizofrenia, doença de Parkinson, depressão grave, dependência de substâncias e ansiedade [100].

Outros estudos sobre a KET evidenciaram as suas propriedades terapêuticas que se resumem em quatro, nomeadamente anestésicas, analgésicas, anti-inflamatórias e antidepressivas [22].

Em doses sub-anestésicas, a KET é usada como analgésico de emergência, fármaco adjuvante em ambientes perioperatórios de doentes tolerantes a opioides com dor pós-operatória moderada a grave, adjuvante analgésico em doentes tolerantes a opioides com crise de células falciformes e adjuvante analgésico em doentes com apneia obstrutiva do sono [101]. Pode ser usada também como fármaco adjuvante para dor resistente a opioides, nos cuidados paliativos, e para dor crónica intratável não-cancerígena [102].

A produção de diferentes mediadores pró-inflamatórios também pode ser uma aplicação terapêutica da KET, uma vez que estudos constataram que o composto suprime a resposta inflamatória na osteoartrite [103] e reduz a resposta inflamatória da interleucina-6 em pacientes pós cirurgia [104].

O uso de KET para tratar o transtorno de *stress* pós-traumático é controverso uma vez que a KET pode induzir ansiedade. No entanto, a perceção do benefício de uma redução rápida dos sintomas pode constituir uma vantagem importante no tratamento desta condição, evitando um desenvolvimento crónico e futuras comorbilidades [105].

### 1.2.2 Efeitos tóxicos, tolerância e dependência

O mecanismo de ação da KET é muito complexo, refletindo-se diretamente nos seus efeitos tóxicos. Estes estão dependentes da dose, via de administração, capacidade metabólica e sensibilidade intrínseca aos efeitos da droga [106]. A dose letal (DL<sub>50</sub>) estimada é de 4,2 g para humanos com um peso de 70 kg [107].

Os efeitos adversos mais frequentemente relatados são de natureza psicotomimética, incluindo alucinações, agitação, ansiedade, disforia e euforia, podendo também causar outros efeitos evidenciados na Tabela 1 [96].

Uma intoxicação por KET não é facilmente identificada, devido aos sintomas gerais e à variedade de substâncias que induzem intoxicações semelhantes. Tanto a KET como os análogos da PCP, a MXE e o dextrometorfano originam sintomas de intoxicação semelhantes porque todas estas substâncias ligam-se ao recetor NMDA. Existem ainda muitas condições que imitam os sinais de intoxicação por KET, o que dificulta o diagnóstico diferencial e posteriormente o tratamento. Estas condições são distintas e podem incluir: hipertermia maligna devido à succinilcolina ou anestésicos voláteis como o halotano; efeitos secundários de anti-histamínicos e anticolinérgicos; condições psiquiátricas, nomeadamente distúrbio bipolar e esquizofrenia; síndrome maligna neuroléptica; e efeitos secundários de antidepressivos tricíclicos e tetracíclicos. Além disso, o traumatismo craniano e a hemorragia intracerebral podem induzir um estado mental que pode estimular a toxicidade da KET [96].

No contexto do uso recreativo da KET, a sua toxicidade vai variar de acordo com as vias de administração. A mais comum é a via intranasal, isto é, *snifar* o pó de KET ou uma solução através de um vaporizador. Os utilizadores a longo prazo podem ainda usar a KET por via intramuscular, subcutânea ou intravenosa. Os eventos adversos mais comuns incluem náuseas, vômitos, taquicardia, taquipneia, convulsões e alucinações [22]. Conhecida como “*special K*”, para uso recreativo, a KET é consumida para produzir um estado dissociativo ou um estado de bem-estar e relaxamento, mas os efeitos psicotrópicos também incluem a despersonalização e as reações psicóticas. Os indivíduos podem experienciar uma sensação de leveza, distorção do corpo, ausência da percepção do tempo e sensações “fora do corpo”. Geralmente, o típico consumidor de KET consome múltiplas drogas e desenvolve uma tolerância significativa à KET, sem sintomas de abstinência proeminentes [108].

Tabela 1 - Efeitos causados pela KET (Adaptado de [96])

<b>Efeitos de intoxicação</b>	
<b>Geral</b>	sedação, perda de consciência
<b>Cabeça, Ouvido, Olhos, Nariz, Garganta</b>	nistagmo horizontal, vertical ou rotativo, midríase, salivação excessiva
<b>Cardiovascular</b>	hipertensão arterial, taquicardia, palpitações, arritmias, dores no peito
<b>Abdominal</b>	dores abdominais, sensibilidade abdominal, náuseas, vômitos
<b>Neurológico</b>	estado mental alterado (desorientação), paranóia, disforia, ansiedade, confusão, fala arrastada, tonturas, ataxia, disartria, trismo, rigidez muscular, psicomotor, psicomimético, ou reacções distónicas agudas
<b>Genitourinário</b>	sintomas do trato urinário inferior
<b>Trauma</b>	é necessário um exame minucioso para a evidência de trauma, pois podem ocorrer lesões secundárias à intoxicação por cetamina devido à diminuição da percepção da dor.
<b>Overdose, infusão demasiado rápida, combinação com outros medicamentos</b>	
<b>Respiratório</b>	depressão respiratória, apneia
<b>Cardiovascular</b>	hipotensão, bradicardia, enfarte do miocárdio
<b>Neurológico</b>	estupor, coma

Em relação ao sistema cardiovascular a KET induz frequentemente elevações transitórias na tensão arterial [109], mas este aumento cessa dentro de meia hora após a infusão [110]. A administração de KET em indivíduos com patologias cardiovasculares pré-existentes pode culminar na morte [96].

A KET atua também como broncodilatador e por vezes, pode ocorrer depressão respiratória, especialmente após injeções intravenosas rápidas e quando é utilizada intramuscularmente em ambientes pediátricos [22].

Os sintomas gastrintestinais incluem dor epigástrica, disfunção hepática e atividade reduzida da vesícula biliar. Estes sintomas são frequentemente aliviados através de abstinência [95]. No sistema urinário, quando a KET é utilizada cronicamente, está frequentemente associada a cistite e disfunção da bexiga [111], que em casos de lesão renal secundária pode ser irreversível sendo necessário fazer diálise aos doentes [22]. Contudo, numa fase inicial, os sintomas são invertidos pela cessação do consumo da KET [109]. Os doentes com sintomas persistentes do trato urinário inferior podem apresentar disúria, desconforto suprapúbico e hematúria intermitente [107].

Apesar da inexistência de evidências acerca de uma síndrome de abstinência provocada pela KET nos humanos, a tolerância desenvolve-se rapidamente. O uso recreacional desta

substância leva também a dependência, dado que em doses mais elevadas, os indivíduos perdem a capacidade de se lembrarem da experiência que tiveram antes com a KET, desejando consumi-la novamente. As experiências posteriores com a KET resultam em estimulação semelhante à cocaína, relaxamento semelhante aos opioides, imagens semelhantes à canábis, intoxicação semelhante à do álcool e alívio da ansiedade, depressão e avidez mental. A fuga à realidade e a descoberta induzida por esta substância, num estado psicadélico, oferece aos indivíduos uma recompensa psicológica, que contribui para o desenvolvimento da dependência [22].

As possíveis vantagens de utilizar um enantiómero em vez do seu composto racémico podem incluir uma melhor separação entre a eficácia e a toxicidade. Foi demonstrado que a (R)-KET tem efeitos antidepressivos mais potentes e mais duradouros do que a (S)-KET em modelos animais. Ao contrário da (S)-KET, a (R)-KET parece carecer de efeitos adversos, tais como comportamentos psicotomiméticos, neurotoxicidade, e potencial de abuso. Em humanos, um estudo recente, com margem para evoluir, com a (R)-KET, mostrou eficácia antidepressiva sem efeitos dissociativos. No entanto, são necessários mais ensaios para confirmar esta descoberta [112].

Relativamente à KET, verificou-se que a absorção e o metabolismo em diferentes tecidos depende do enantiómero, e acredita-se que o isómero S(+) tem maior clareza, potência e índice terapêutico do que o isómero R(-) [113]. Por outro lado a mistura racémica causa mais sonolência, letargia, deficiência na cognição, declínio na capacidade de concentração e na memória primária, e reações emergentes em relação ao isómero S(+) [98].

Os efeitos secundários da KET vão depender da via de administração e da dose. Se a via de administração for a intravenosa, pode ter como efeitos secundários: dissociação (0,5 mg/kg, numa infusão de 40 min), efeitos psicotomiméticos em pacientes com esquizofrenia (0,3 mg/kg *i.v. bolus*, seguido de uma infusão de 1h de 0,65 mg/kg), deficiência cognitiva e de memória (0,4 – 0,8 mg/kg, numa infusão de 40 a 120 minutos) e uso recreacional (1 – 2 mg/kg). Se a via de administração for intramuscular vai ter como efeito também a deficiência cognitiva e de memória (0,25 – 0,5 mg/kg *i.v. bolus*) e o uso recreacional (50 – 150 mg). As vias de administração for oral ou intranasal são mais utilizadas no consumo recreacional, as concentrações habituais são 100 – 500 mg; 30 – 400 mg, respetivamente [22,42].

No que diz respeito à resposta de intoxicações, não existe nenhum medicamento aprovado pela FDA. No entanto, em casos de *overdose*, o uso de benzodiazepinas como o lorazepam, em doses de 2 a 4 mg por via intravenosa, podem aliviar a agitação, os efeitos psicotomiméticos, a hipertensão, a hipertermia e as convulsões. No entanto, quando num ambiente recreativo, a co-administração de benzodiazepinas com KET sem uma monitorização adequada pode ser muito perigosa, uma vez que pode aumentar os efeitos

depressores respiratórios e do SNC da KET. O haloperidol, se for administrado entre 5 a 10 mg por via intravenosa ou intramuscular pode ajudar a gerir episódios psicóticos e a agitação, sendo administrado a cada dez ou quinze minutos até se conseguir uma sedação completa [96].

### 1.2.3 Norketamina

A NK é o principal metabolito da KET, sendo que, como referido anteriormente, a KET é amplamente metabolizada no fígado pelas enzimas do citocromo P450. A principal via metabólica é através da *N*-desmetilação, pelas enzimas hepáticas CYP2B6 e CYP3A4. Tal como a KET, a NK é uma mistura racémica que contém partes iguais de dois enantiómeros, (S)-NK e (R)-NK [25,114,115]. Este metabolito também possui efeitos anestésicos mas com apenas cerca de um terço da potência da KET [116,117].

Em comparação com (R)-NK, a (S)-NK apresenta uma afinidade 8 vezes maior para o receptor NMDA. Recentemente verificou-se que a (S)-NK, mas não a (R)-NK, apresenta um potencial farmacológico para ser um agente antidepressivo eficaz com menos efeitos secundários prejudiciais. Verificou-se ainda que a (S)-NK exibe efeitos antidepressivos rápidos, sustentados em modelos de roedores, com uma potência semelhante à das ações antidepressivas verificadas para a esketamina [114,118,119]. Ao contrário da esketamina, a (S)-NK não causa anomalias comportamentais e bioquímicas, tais como défices de inibição de impulso ou potencial de abuso. Dada a menor afinidade da (S)-NK para os recetores NMDA as infusões repetidas de (S)-NK podem ter menos efeitos secundários prejudiciais comparativamente ao seu composto parental, a esketamina. No entanto, são necessários estudos adicionais a longo prazo com infusões repetidas deste composto [114,118,119].

A NK é subsequentemente metabolizada em HNK e a DHNK. A HNK possui uma atividade antidepressiva promissora, sendo inativo tanto como anestésico como psicoestimulante, e estas propriedades são bastante favoráveis para o seu uso. Atualmente esta substância está a ser desenvolvida pelo Instituto Nacional de Saúde Mental do Estados Unidos (NIMH) [25,115,120].

## **2 Determinação de ketamina em amostras de cabelo**

### **2.1 Amostras de cabelo**

Durante as últimas décadas, tem sido feito um enorme trabalho de investigação para averiguar as diferentes drogas de abuso e os seus metabolitos em diferentes tipos de amostras, como a urina, sangue, saliva, suor e cabelo. A urina e o sangue são as amostras biológicas mais utilizadas, devido à simplicidade das suas matrizes e ao facto de ser conhecida a farmacocinética de eliminação das drogas ilícitas nestes fluidos. Apesar da utilização generalizada do sangue e da urina como matrizes para análise toxicológica clínica e forense, o uso da matriz cabelo em toxicologia tem crescido, à medida que as limitações associadas a esta matriz são ultrapassadas e surgem novas áreas de aplicação [121,122]. Em vários países, amostras biológicas, para além da urina, estão a ser intensamente exploradas para determinar o consumo de drogas em âmbito laboral, fornecendo informações sobre intoxicação crónica, concessão de carta de condução, toxicologia clínica, na justiça penal, no tratamento de doentes adictos, estudos de toxicologia *post-mortem*, resolução de crimes facilitados por drogas e em casos de proteção infantil [122,123]. Para a análise de novas substâncias psicoativas, os testes em cabelo são um bom complemento aos testes de urina [122,124].

#### **2.1.1 Biologia, crescimento e mecanismos de incorporação do cabelo**

O cabelo é composto principalmente por proteínas, que podem variar entre 65-95% (queratina), lípidos entre 1-9%, água entre 15-35%, e menos de 1% de minerais [125]. O fio de cabelo é composto por três camadas: a cutícula, o córtex e a medula. A cutícula tem alguma capacidade de manter as suas características estruturais durante um período mais longo e também apresenta alguma resistência à decomposição química. O córtex é a segunda camada e está protegido pela cutícula. Em termos forenses o córtex é importante porque contém os grânulos de pigmentos, responsáveis pela cor do cabelo. A medula é um conjunto de células aparentando um canal central que atravessa o fio de cabelo [122,125].

O cabelo humano cresce em três fases de desenvolvimento, nomeadamente as fases anagénica, catagénica e telogénica. A fase anagénica corresponde a um período de crescimento ativo, enquanto a fase catagénica e telogénica correspondem a um período de quiescência. A anagénesse pode durar até 6 anos. Durante esta fase, a raiz permanece presa ao folículo para crescimento contínuo. A catagénesse pode durar de 2 a 3 semanas. Durante esta fase, o cabelo continua a crescer, mas a uma baixa taxa de crescimento. Quando o crescimento do cabelo cessa completamente, a telogénese começa. Nos 2 a 6 meses

seguintes, o cabelo é empurrado para fora do folículo, fazendo com que se solte naturalmente. Os cabelos da cabeça crescem em média a uma taxa de 0,6-1,42 cm/mês. A taxa de crescimento depende do tipo de cabelo, fatores fisiológicos, e da localização anatômica [122,125].

O mecanismo exato pelo qual as substâncias se fixam ao cabelo não é conhecido, mas é geralmente considerado que o xenobiótico entra no cabelo por pelo menos três mecanismos: através da circulação sanguínea durante a formação do cabelo, a partir da transferência de substâncias no suor e sebo, e a partir do ambiente externo após a formação do cabelo [122,123,125]. É importante notar que a natureza da substância/droga a ser incorporada, ou seja, a sua estrutura e propriedades químicas, bem como as características fisiológicas/físicas de um indivíduo afetam fortemente os mecanismos de deposição de drogas [122,123,125]. Embora existam semelhanças entre cabelos de diferentes origens étnicas e de diferentes partes do corpo, existem também diferenças significativas na espessura e pigmentação do cabelo que podem influenciar a absorção e retenção de substâncias. Geralmente o cabelo pigmentado escuro tende a captar maiores quantidades de droga do que o cabelo menos pigmentado (isto é, loiro ou branco). Isto deve-se ao facto da eumelanina, o principal pigmento no cabelo que dá a sua cor, ser responsável pela maior parte da captação de drogas [126].

### 2.1.2 Colheita e análise do cabelo

Não existe um método padrão para a recolha de uma amostra de cabelo ou pelo. No entanto, o vértice posterior (atrás da cabeça) é a melhor área para a recolha de amostras, pois esta área possui menos variabilidade na taxa de crescimento, o número de cabelos na fase de crescimento é mais constante e o cabelo está menos sujeito a fatores relacionados com a idade e o sexo. O pelo púbico, do braço e axilar são possíveis alternativas para a deteção de drogas quando o cabelo do couro cabeludo não está disponível. No entanto, a interpretação é mais complexa. Os cabelos são armazenados num envelope, folha de alumínio, ou num saco de plástico com fecho de correr e guardados à temperatura ambiente. A quantidade de amostra de cabelo colhida depende da substância a ser analisada. Também depende do laboratório que vai realizar a análise, porque diferentes laboratórios têm diferentes procedimentos [122,125,127].

A preparação de amostras, em qualquer procedimento analítico, é um passo fundamental para obter resultados precisos e exatos. Um dos desafios que a análise de cabelo enfrenta é evitar resultados falso-positivos causados pela exposição passiva ao analito. Na maioria dos laboratórios, a análise de cabelo começa com uma etapa de lavagem para remover a contaminação externa. A análise de cabelo envolve pelo menos cinco passos:

descontaminação, preparação (pulverização, segmentação), incubação, muitas vezes denominada de extração (em metanol, ácido, hidróxido de sódio, tampão, ou soluções aquosas), possível pré-concentração (extração líquido/líquido, em fase sólida, ou técnicas de extração miniaturizadas) e análise. O passo da extração por vezes exige uma extração secundária e posterior *clean-up* da amostra, para remover interferências indesejadas e concentrar o analito num pequeno volume [121,125]. No passo da análise do cabelo, pode ser efetuado uma triagem por imunoensaios ou/e cromatografia (gasosa ou líquida) acoplada à espectrometria de massa (MS) ou em *tandem* (MS/MS) para confirmação [125]. Contudo a maioria dos laboratórios recorre à cromatografia acoplada a MS/MS, por ser uma técnica com sensibilidade e seletividade muito elevadas [128].

### 2.1.3 Vantagens e desvantagens da amostra de cabelo

A análise da matriz cabelo apresenta várias vantagens, quando se comparam as suas características com as de outras amostras biológicas. O cabelo oferece várias vantagens relativamente à urina e sangue, tais como a facilidade de recolha e a capacidade de fornecer uma análise retrospectiva da exposição e do consumo de drogas [122,129]. No entanto, a maior vantagem do cabelo é a sua ampla janela de deteção dos compostos, sendo superior à janela de deteção da urina e do sangue. A maioria dos compostos são rapidamente metabolizados e assim, as provas de consumo em urina ou sangue são impossíveis de detetar num período superior de horas ou dias. No entanto, os mesmos compostos ficam retidos na estrutura do cabelo, sendo possível criar um registo do consumo de substâncias através da análise segmental do cabelo, variando de semanas a meses ou mesmo anos, dependendo do comprimento de cabelo ou pelo do indivíduo [121,122,128,129]. Além das vantagens mencionadas, o cabelo não é facilmente adulterado e é fácil de armazenar e de transportar, além de ser também muito estável à temperatura ambiente. O cabelo é ainda colhido de forma não invasiva, sem requerer pessoal especializado e pode ser supervisionado sem constrangimento para o indivíduo, o que torna esta amostra muito difícil de adulterar. De notar que a abstinência de drogas alguns dias antes da colheita da amostra não removerá as drogas do cabelo. Todas estas vantagens fazem do cabelo um instrumento importante na investigação forense e criminal. A maioria dos casos forenses, em que o cabelo é analisado, visa estabelecer dependência crónica, fornecendo dados com valor legal para decisões judiciais em licenças de armas de fogo, custódia de menores, e responsabilidade criminal [121,122,128,129].

No entanto, as amostras de cabelo apresentam várias desvantagens, principalmente devido à biologia complexa da sua matriz (as substâncias estão fortemente ligadas aos constituintes internos do cabelo) e como tal, o seu processamento analítico é

frequentemente considerado trabalhoso e demorado. As duas principais desvantagens na análise do cabelo são a preparação da amostra e a farmacocinética da fixação das substâncias. Relativamente à farmacocinética, não há correlação conhecida entre a dose administrada e as concentrações da substância no cabelo, não sendo possível calcular as concentrações na urina, no sangue ou plasma com base nos resultados do cabelo [128]. Outra desvantagem é a variedade e variabilidade da biologia do cabelo dentro de um indivíduo e entre uma população. Além disso, a quantidade de melanina também produz diferenças intra e inter-individuais. Para além disso, existe ainda controvérsia sobre a forma de interpretar os resultados, particularmente no que diz respeito à ocorrência de contaminação externa, à influência dos tratamentos cosméticos, à etnia, e aos mecanismos de incorporação de drogas [128]. A desvantagem mais importante do cabelo como amostra de interesse forense é a possibilidade de fornecer resultados falso-positivos, particularmente nas situações em que o indivíduo está exposto, mas não consome ativamente, as drogas (por exemplo, no caso de drogas fumadas). Apesar de vários procedimentos de descontaminação terem sido publicados na literatura científica, até agora não existe um consenso sobre estes procedimentos. De facto, presume-se que a eliminação total do fármaco depositado externamente não é alcançada mesmo após laboriosos procedimentos de lavagem [128]. Sendo assim, a *Society of Hair Testing* (SoHT) recomenda a deteção de metabolitos das drogas, que em princípio derivam unicamente do metabolismo endógeno, e o uso de rácios de drogas mãe para metabolitos. Outra forma de lidar com a contaminação externa é avaliar a reprodutibilidade dos resultados utilizando uma amostra de cabelo recém-colhida [128]. As concentrações de drogas no cabelo são frequentemente pequenas, o que exige técnicas altamente sensíveis, e a deteção por MS é obrigatória. Estas técnicas também proporcionam a seletividade necessária para fins forenses, uma vez que permite aos analistas identificar, inequivocamente, os fármacos atuais [121,128,129].

Apesar das desvantagens supramencionadas, o cabelo tem proporcionado uma grande ajuda na análise do consumo crónico de drogas e em casos de crimes. O facto da quantidade de outras amostras ser muito limitada, justifica o esforço adicional necessário para a preparação desta matriz para uma posterior análise [130].

A SoHT e a *European Workplace Drug Testing Society* (EWDTS) publicaram diretrizes para determinação de drogas no cabelo, que devem ser consideradas como referências-chave, vindo a ser atualizadas quando necessário [125,130].

## 2.2 Microextração em seringa empacotada

Como primeiro passo de um procedimento analítico, a preparação de amostras desempenha um papel importante. Um método apropriado para a preparação de amostras influencia bastante a fiabilidade e exatidão dos resultados. A extração em fase sólida (SPE) é o método tradicional de preparação de amostras antes da sua análise num equipamento analítico. As tendências recentes na preparação de amostras incluem a miniaturização, automatização, desempenho de alto rendimento, acoplamento em linha com equipamentos analíticos, serem ecológicas e de baixo custo com pouco ou nenhum consumo de solvente [131,132]. A miniaturização da preparação da amostra evoluiu rapidamente nas últimas três décadas. Estes desenvolvimentos resultaram em abordagens inovadoras de microextração, por exemplo, microextração de fase sólida (SPME), extração sortiva por barra de agitação (SBSE) e microextração em seringa empacotada (MEPS) [132].

A MEPS foi desenvolvida por Abdel-Rehim et al. [133] na AstraZeneca e é basicamente uma versão da SPE que foi miniaturizada para volumes de amostra tão pequenos como 10  $\mu\text{L}$  [129,133,134]. A MEPS é normalmente concebida no formato de seringa de modo que o adsorvente seja colocado dentro do corpo da seringa ou num recipiente especial como um cartucho, sendo este mais comum e mais recente (Figura 1) [131,132]. Além disso é uma técnica simples, rápida e possível de acoplar em linha com equipamentos analíticos [131].

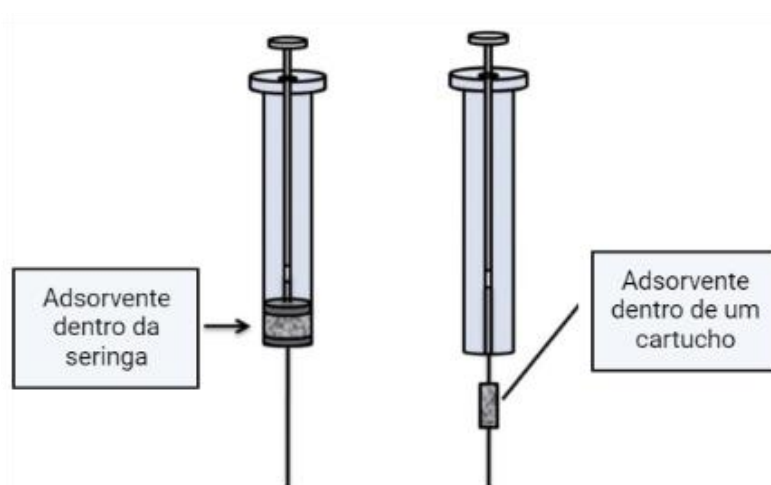


Figura 1 - Adsorvente empacotado da MEPS

Na MEPS, o adsorvente é empacotado numa seringa e pode ser reusado várias vezes, com a vantagem de ser um procedimento rápido e de fácil utilização. Normalmente a amostra aquosa (20-1000  $\mu\text{L}$ ) é puxada através da seringa por um amostrador automático (com ciclos de subida e descida) a fim de promover a adsorção da substância a analisar. A fase sólida é depois lavada com solventes apropriados (50-150  $\mu\text{L}$ ) para eliminar o material interferente. Os analitos são então eluídos diretamente no injetor com um solvente orgânico ou com a fase móvel usada na cromatografia líquida (20-50  $\mu\text{L}$ ) [129,135]. Os dispositivos MEPS podem ser acoplados em linha à eletrocromatografia capilar (CEC), espectroscopia de absorção atômica (AAS) e ainda à cromatografia gasosa e líquida, podendo ser ambas acopladas à MS sem qualquer modificação nos instrumentos analíticos. Sendo assim uma grande vantagem da MEPS é que torna possível a integração da preparação da amostra com o instrumento analítico [131,132].

A principal distinção entre a MEPS e SPE é que na MEPS o adsorvente é inserido numa seringa em vez de ser colocado numa coluna separada como ocorre em SPE. Outra diferença reside no facto de na SPE, o fluxo da solução ser unidirecional (de cima para baixo), enquanto na MEPS é bidirecional (para cima e para baixo) [133,134,136,137]. O curso típico de funcionamento da MEPS inclui: acondicionamento, aspiração da amostra, etapa de lavagem da amostra, eluição e lavagem do adsorvente [131,132]. A etapa de lavagem elimina interferentes indesejáveis e para minimizar a perda de analito, nesta etapa utiliza-se uma percentagem otimizada de solvente orgânico. Já uma solução de eluição eficaz deve recuperar o analito com o menor volume possível. De modo a reutilizar o material adsorvente, no fim de cada extração, realiza-se uma limpeza que evita o “*carryover*” entre amostras [132].

A MEPS tem sido utilizada com sucesso para extrair uma vasta gama de analitos em várias matrizes aquosas e diferentes matrizes biológicas, tais como urina, plasma, saliva e sangue. As matrizes biológicas são complexas e muitas vezes requerem pré-tratamento antes de serem aspiradas no dispositivo da MEPS.

De um modo geral, esta técnica miniaturizada é ainda pouco utilizada na análise do cabelo humano, embora os adsorventes comercialmente disponíveis tenham basicamente a mesma natureza que os utilizados na SPE [129,131]. A seletividade do adsorvente é importante para obter um extrato limpo e uma boa recuperação. Os analitos vão ser retidos pelos materiais adsorventes através de diferentes interações (hidrofóbica, polar e iónica). Qualquer material adsorvente (por exemplo, à base de sílica ( $\text{C}_2$ ,  $\text{C}_8$ ,  $\text{C}_{18}$ ), troca catiónica forte (SCX), material de acesso restrito (RAM), cromatografia de interação hidrofílica (HILIC), carbono, copolímero de poliestireno-divinilbenzeno (PS-DVB) ou polímeros de impressão molecular (MIPs)) pode ser utilizado, mas em relação ao cabelo humano apenas octadecilsilano (ODS),  $\text{C}_{18}$  e M1 (modo misto  $\text{C}_8/\text{SCX}$ ) têm sido aplicados

até agora [129,131,132,134]. O mesmo material adsorvente da MEPS pode ser utilizado em mais de 100 extrações de amostras de plasma e urina humana ou mais de 300 extrações de amostras aquosas [131,132].

Até hoje, poucos métodos analíticos foram relatados com o uso de MEPS, e pelo menos cinco deles foram desenvolvidos nos últimos anos [129,137,138]. Rosado *et al.* [129] têm vindo a adotar a MEPS como uma abordagem de *clean-up* para amostras de cabelo. A sua aplicação foi demonstrada com sucesso, até agora, para opiáceos, metadona e cocaína e seus metabolitos.

A MEPS é então uma técnica muito promissora para a preparação de amostras porque é rápida e fácil de usar, pode ser totalmente automatizada para procedimentos em linha, reduz o volume de solvente e amostra, bem como os resíduos produzidos e o seu custo é mais baixo do que o da SPE convencional. Os dispositivos MEPS podem ser semi- ou totalmente automatizados. A operação automatizada MEPS pode tratar grandes quantidades de amostras paralelas num curto período, de tal forma que a precisão e eficiência das análises são aumentadas [131].

# Capítulo 2|Procedimento experimental

## 1 Material e Métodos

### 1.1 Reagentes e padrões / Preparação das soluções de trabalho

Os padrões analíticos à concentração de 100 µg/mL de KET, NK e respetivos análogos deuterados (KET-d4 e NK-d4) foram adquiridos da LGC Promochem (Barcelona, Espanha). O ácido acético foi adquirido à Fischer chemical (Loughborough, Reino Unido), o hidróxido de amónia à J.T. Baker (Deventer, Holanda), o metanol à Merck Co (Darmstadt, Alemanha), todos com grau de pró-análise. O hidrogenofosfato dipotássico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) e dihidrogenofosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) foram fornecidos pela Enzymatic (Santo Antão do Tojal, Portugal). Foi utilizado um sistema de água desionizada (DI) Milli-Q da Millipore (Billerica, Estados Unidos de América (EUA)). A seringa MEPS (250 µL) e os cartuchos de extração M1 (4 mg; 80% C<sub>8</sub> e 20% SCX) da SGE foram adquiridos à VWR *international* (Alfragide, Portugal).

As soluções de trabalho dos padrões analíticos foram preparadas por diluições com metanol sendo as concentrações utilizadas de 400 ng/mL, 1 µg/mL, e 10 µg/mL. Os padrões internos (IS) foram diluídos para a solução de trabalho final de 1 µg/mL.

Todas as soluções foram protegidas da luz a 4 °C.

### 1.2 Amostras de cabelo

As amostras de cabelo branco utilizadas para a etapa de otimização do método, estudo dos limites e recuperação foram fornecidas pela equipa do laboratório do Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS, Covilhã, Portugal). Foi recolhida uma amostra de fios de cabelo, aproximadamente da espessura de um lápis, num local impercetível, próximo da raiz do cabelo. A zona proximal do cabelo foi identificada através da utilização de uma folha de alumínio. As amostras foram armazenadas em envelopes de papel à temperatura ambiente, protegidas da luz solar direta e numa atmosfera seca.

O estudo foi realizado em conformidade com a Declaração de Helsínquia e foi aprovado pelo Comité de Ética da Universidade da Beira Interior (número CE-UBI-Pj-2022-04).

### 1.3 Condições cromatográficas e espectrométricas

Para este trabalho foi utilizado o sistema de cromatografia de gases da Agilent Technologies modelo HP 7890A acoplado a um espectrômetro de massa triplo quadrupolo também da Agilent Technologies modelo 7000B (Waldbronn, Alemanha). Este sistema inclui ainda um amostrador automático Gerstel MPS2 e um injetor PTV (Mülheim an der Ruhr, Alemanha). Foi utilizada uma coluna capilar (30 m x 0,25 mm I.D., 0,25- $\mu$ m de espessura de película) com 5% de fenilmetil siloxano (HP-5 MS) da J & W Scientific (Folsom, EUA).

As condições cromatográficas utilizadas foram as seguintes: a temperatura inicial do forno foi de 100 °C durante 0,5 minutos, seguiu-se de uma rampa 20 °C/min até alcançar os 280 °C. A temperatura final foi mantida constante durante 7 minutos. O tempo de corrida cromatográfica foi de 16,5 minutos. As temperaturas do injetor e do detetor foram 250 e 280 °C, respectivamente. O fluxo de hélio (gás de arraste) foi mantido constante a 0,8 mL/min. Foi utilizado o modo de injeção *splitless* e 2  $\mu$ L de extrato foram injetados no cromatógrafo de gases. A temperatura da fonte foi de 230 °C. Na célula de colisão o fluxo de hélio foi de 1,5 mL/min e de azoto 2,5 mL/min em modo de impacto eletrônico com uma corrente de 35  $\mu$ A e uma energia de 70 eV. Foi utilizado o *software* MassHunter WorkStation versão B.02.01 (Agilent Technologies) para o tratamento dos dados.

O espectrômetro de massa foi utilizado em modo de varrimento (modo SCAN), num intervalo de razões *m/z* de 50 a 500, com *dwell time* de 235  $\mu$ s. Deste espectro de massa foi escolhido um ião precursor para cada analito que foi posteriormente fragmentado, originando os iões produtos no modo de monitorização de reações múltiplas (MRM).

As condições finais da espectrometria de massa foram otimizadas pela análise de soluções de metanol de KET e NK a 100  $\mu$ g/mL, utilizando várias combinações diferentes de energias de colisão e de *dwell time*. Para maximizar a relação sinal/ruído nos extratos de cabelo, as transições foram escolhidas com base na razão *m/z* e na sua abundância (Tabela 2).

Tabela 2 - Parâmetros GC-MS/MS para a análise de KET e NK

Composto	TR (min)	Transições (m/z)	Energia de colisão (eV)	<i>Dwell time</i> ( $\mu$ s)
KET	8,36	181,0 – 151,0* 181,0 – 116,1	10	50
KET-d4	8,35	183,7 – 155,0	5	
NK	8,18	194,4 – 131,0* 194,4 – 166,1	10	
NK-d4	8,17	169,8 – 135,2	10	

\*Transição quantificadora

## 1.4 Preparação da amostra

### 1.4.1 Descontaminação do cabelo e extração

Para eliminar o excesso de sujeira e compostos depositados que poderiam influenciar a análise por possível contaminação externa, as amostras de cabelo foram lavadas consecutivamente com metanol, água DI e diclorometano durante 15 min com agitação. Posteriormente procedeu-se à secagem à temperatura ambiente e ao corte em fragmentos de aproximadamente 1 mm. Foram pesados para tubos de vidro 50 mg de cabelo. Os tubos foram fechados após a adição de 2 mL de metanol para proceder à etapa de extração. Após agitação num *vortex-mixer* os tubos foram deixados num banho a 65 °C durante a noite. Seguidamente as amostras foram centrifugadas durante 15 minutos a 3500 rpm e o extrato metanólico foi transferido para novos tubos de vidro. Finalmente, os extratos foram evaporados até à secura sob um fluxo de azoto após adição de 10 µL da solução de trabalho de padrões internos. Foram ressuspensos com 500 µL de tampão fosfato antes de se proceder à etapa de *clean-up* com a MEPS.

### 1.4.2 Processo de *Clean-up*

Os parâmetros que influenciam o processo de *clean-up* foram previamente otimizados com recurso a *design of experiments* (DOE) e as condições finais foram as que se descrevem à continuação. O cartucho foi acondicionado com cinco ciclos de 250 µL de metanol e quatro ciclos de 250 µL de água DI, e foram utilizados 15 ciclos de aspiração/rejeição de 150 µL da amostra. Os interferentes endógenos foram removidos do adsorvente por lavagem com 50 µL de ácido acético a 0,1% em água DI e 50 µL de metanol a 10%. A eluição dos analitos foi realizada com 100 µL de 3% de hidróxido de amónia em metanol. O adsorvente foi lavado e reconstituído com cinco ciclos de 250 µL de metanol e quatro ciclos de 250 µL de água DI. Os extratos eluídos foram secos sob corrente de azoto, dissolvidos em 50 µL de metanol e uma alíquota de 2 µL foi injetada no sistema GC-MS/MS.

## 2 Resultados e Discussão

### 2.1 Otimização das condições cromatográficas e espectrométricas

A identificação dos compostos pretendidos é necessária para o desenvolvimento de um método analítico. Neste sentido, as condições cromatográficas têm de estar definidas, e com base na literatura [139] as condições finais são as descritas na seção de material e métodos.

Depois de definidas as condições cromatográficas, os padrões dos analitos em estudo (KET e NK) foram injetados separadamente no sistema cromatográfico de gases em modo SCAN (Figura 2) para identificar os tempos de retenção e os iões que caracterizam a estrutura molecular dos compostos.

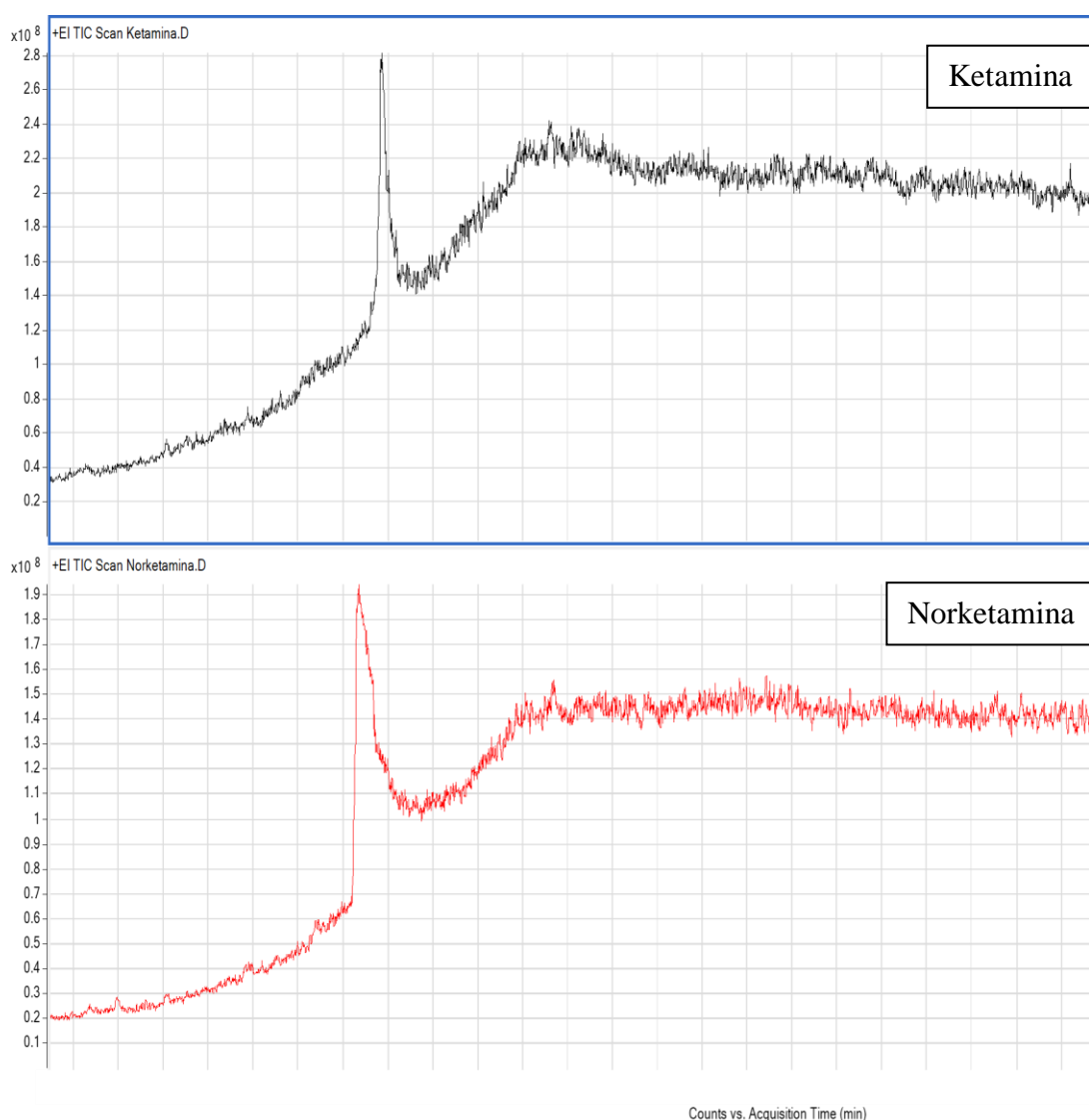


Figura 2 - Cromatograma em modo SCAN da KET e NK a uma concentração de 100 µg/mL

No modo SCAN todas as massas dos analitos são analisadas num intervalo de razões  $m/z$  de 50 a 500. O espectro obtido no modo SCAN foi comparado com o espectro existente na literatura para identificar os compostos. Depois de se realizar o SCAN dos compostos, são escolhidos os íões com maior  $m/z$  e com mais abundância, ou seja, maior intensidade de sinal, para se proceder à escolha do *product ion* (PI). As figuras 3 e 4 mostram os íões precursores escolhidos através do espectro de massa em modo SCAN.

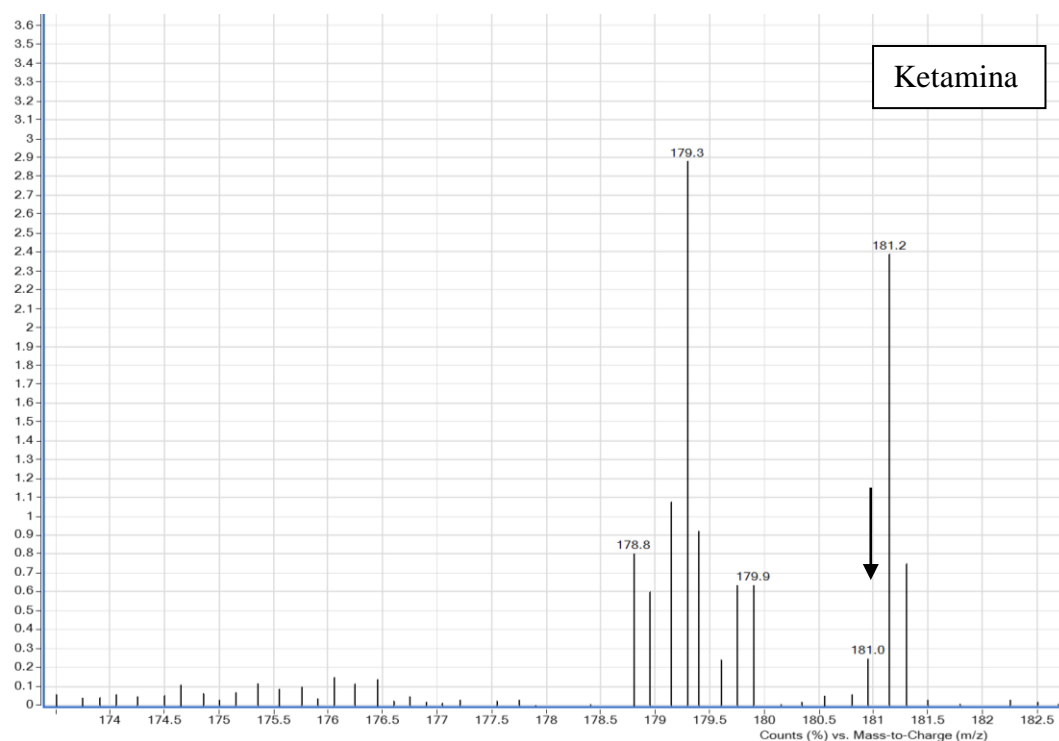


Figura 3 - Espectro de massa da KET a uma concentração de 100 ug/mL em modo SCAN

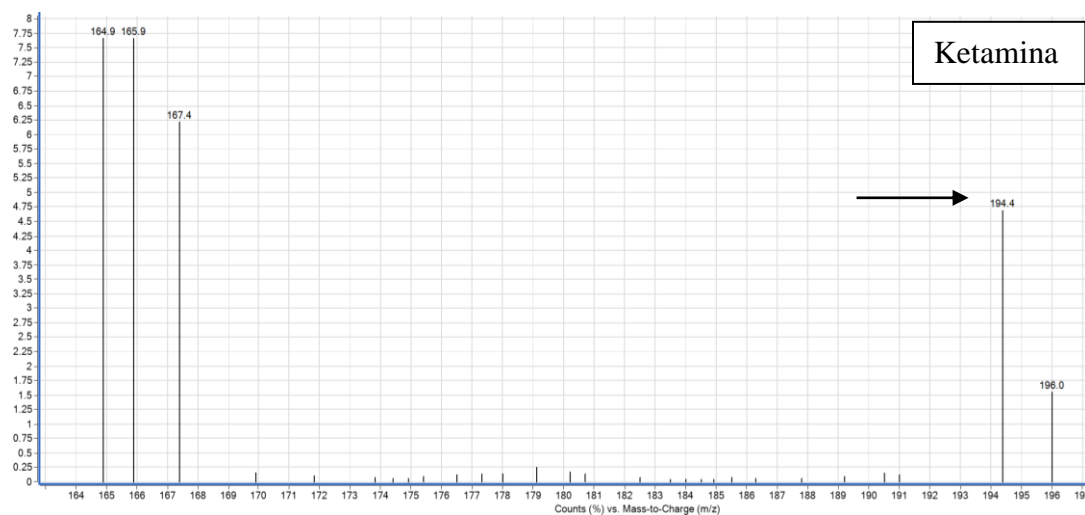


Figura 4 - Espectro de massa da NK a uma concentração de 100 ug/mL em modo SCAN

O PI é a formação de novos iões a partir da fragmentação de um ião precursor. O PI foi realizado mediante a aplicação de diferentes energias de colisão (5,10,15 e 20 eV). A figura 5 mostra o cromatograma dos iões precursores (iões pai) da KET e NK. Nas figuras 6 e 7 são apresentados os espectros de massa para o PI do ião 181.0 (KET) e do ião 194.4 (NK).

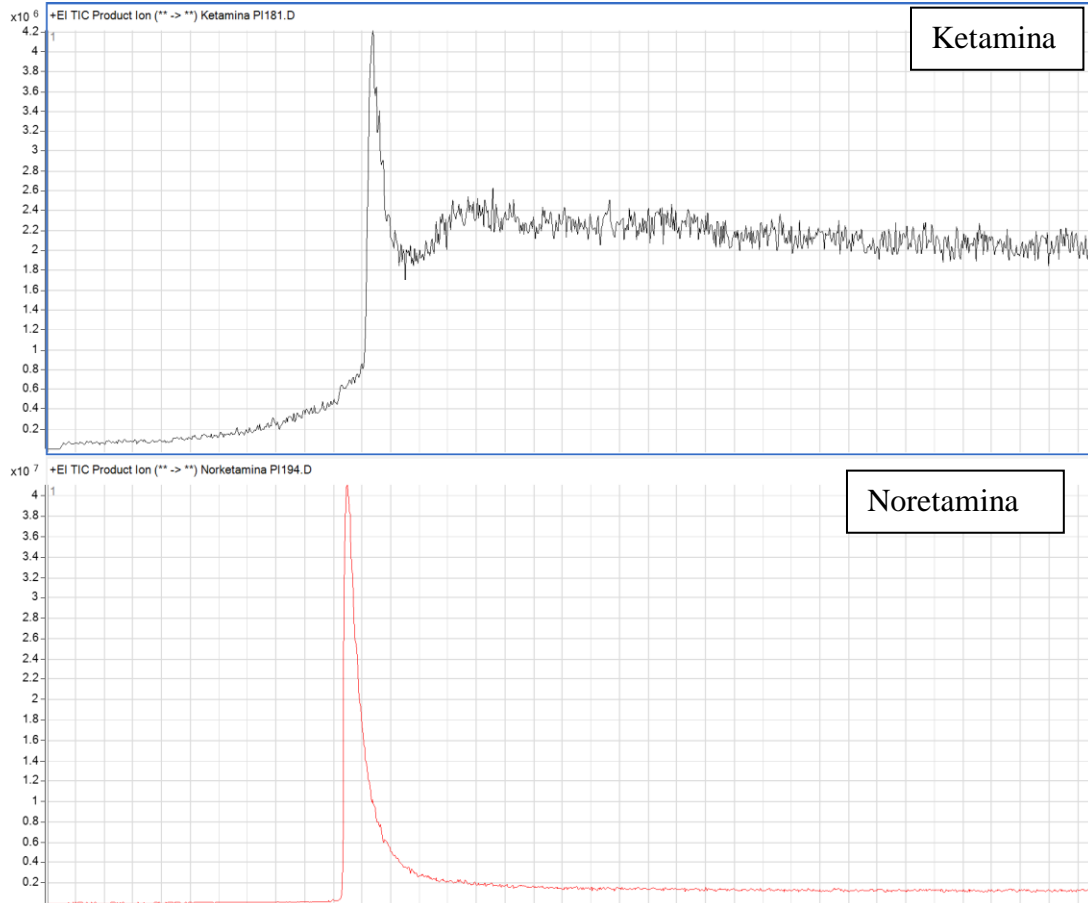


Figura 5 - Cromatograma dos iões pais da KET e NK a uma concentração de 10 ug/mL e 100 ug/mL, respetivamente

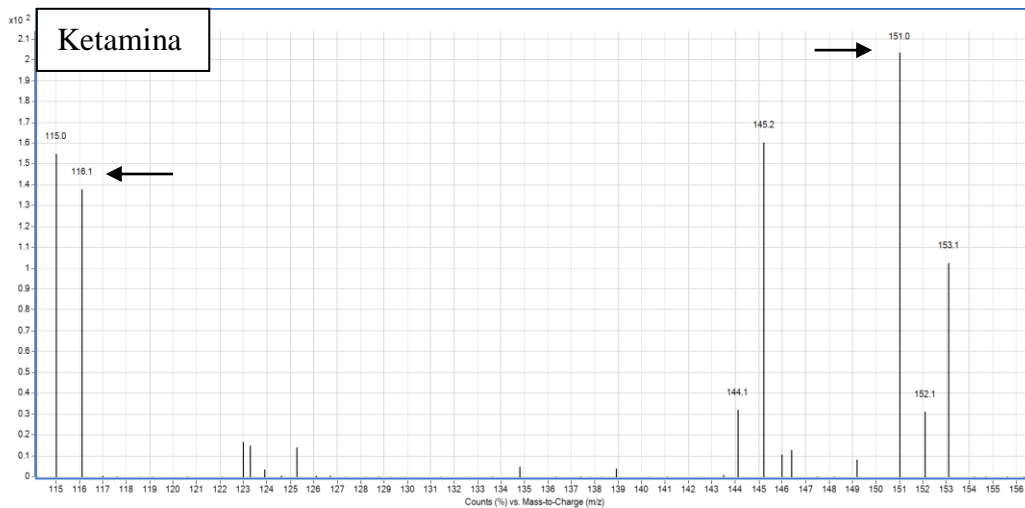


Figura 6 -Espectro de massa do PI do ião 181 da KET a uma concentração de 10 ug/mL

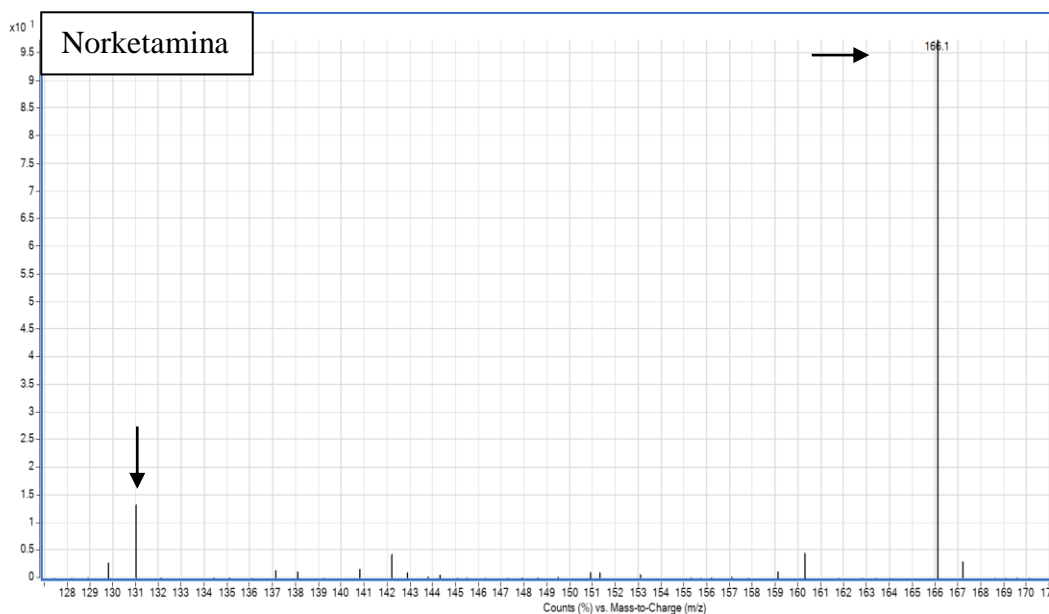


Figura 7 - Espectro de massa do PI do ião 194.4 da NK a uma concentração de 100 ug/mL

Esta fragmentação originou transições que representam o melhor sinal cromatográfico, com o mínimo de interferência e sem a contribuição de outros analitos. Entre todas as transições escolhem-se duas diferentes, uma será designada de transição quantificadora e outra de transição qualificadora. Para os padrões internos KET-d4 e NK-d4 foi feito também o SCAN e o PI, mas para este é suficiente escolher apenas uma transição (tabela 2). Depois de escolhidas as transições criou-se o método em modo MRM. Este modo de fragmentação permite identificar vários analitos numa única análise, pois os iões são novamente fragmentados originando iões filhos o que proporciona uma maior seletividade no processo de identificação.

O modo de MRM só é possível de ser aplicado devido à espectrometria de massa em tandem ou também designada como triplo quadrupolo ou espectrometria de massa sequencial (Figura 8). Este detetor é composto por uma 1) fonte de iões, no qual ocorre a ionização dos analitos, 2) um analisador, que faz a separação dos iões e o 3) detetor que faz a geração de sinais elétricos que são mensuráveis.

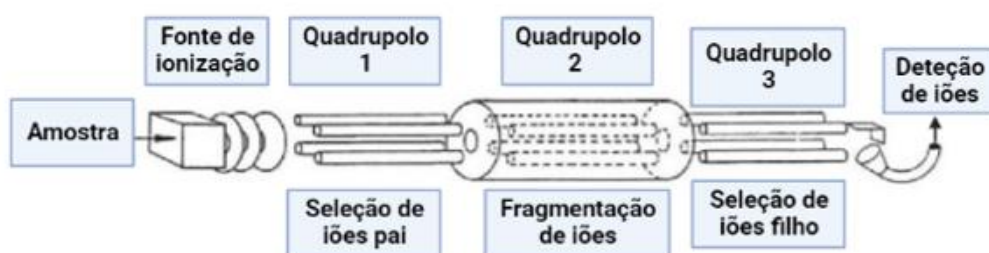


Figura 8 - Esquema de um espectrómetro de massa triplo quadrupolo <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Adaptado de <https://what-when-how.com/proteomics/quadrupole-mass-analyzers-theoretical-and-practical-considerations-proteomics/>

É uma técnica que ao invés de utilizar apenas um analisador de massa para separar os iões da mesma razão por carga ( $m/z$ ) gerados na fonte de ionização, utiliza dois ou mais estágios de análise de massa, quadrupolos. O compartimento do quadrupolo 1 funciona como um filtro de massa, usado para isolar o ião precursor. A fragmentação ocorre no quadrupolo 2, designado por “falso quadrupolo”, pois apenas fragmenta os iões pai (precursor) em iões filho. No quadrupolo 3, tal como no 1, vai ocorrer a leitura das massas, mas neste caso a dos iões filho. Depois são selecionados os iões filho com melhor  $m/z$  e abundância para se escolherem as melhores transições para os compostos (Figura 9), aumentando assim a sensibilidade e seletividade do método analítico.

No final, o MRM ainda pode ser otimizado de modo a aumentar a sensibilidade aumentando o tempo de deteção de cada ião filho (*dwell time*).

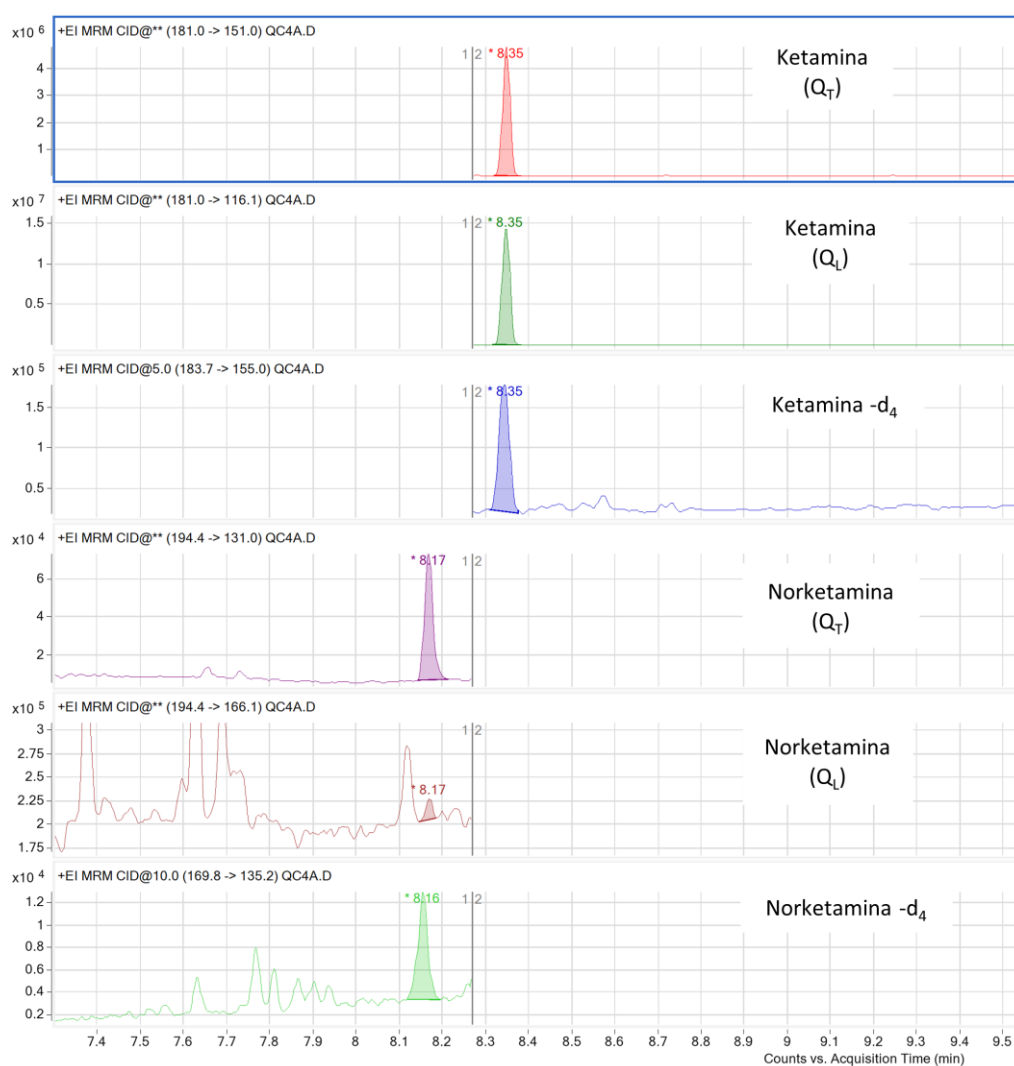


Figura 9 - Cromatograma das transições quantificadoras (QT) e qualificadoras (QL) da KET e NK e respetivos PI (KET- $d_4$  e NK- $d_4$ )

## 2.2 Otimização do processo de MEPS

Como referido anteriormente, a MEPS envolve quatro passos, razão pela qual é necessário otimizar que solventes serão utilizados, bem como os seus volumes e o número de aspirações. Esta otimização irá encontrar a melhor combinação de fatores para maximizar a eficiência do processo. As bases das condições da MEPS foram retiradas da literatura, nomeadamente os solventes utilizados [47]. Contudo, foi necessário otimizar o procedimento e para tal recorreu-se a uma ferramenta estatística, o DOE. O DOE permite analisar simultaneamente múltiplos fatores, obter informação entre as interações dos mesmos e avaliar rapidamente que fatores podem ter um efeito significativo na MEPS. Assim, foi aplicado um desenho fatorial completo de dois níveis ( $2^k$ ) com um ponto central ( $n = 3$ ) para uma avaliação precisa dos três fatores que foram analisados. Os fatores estudados foram: o número de aspirações da amostra, o número de lavagens da amostra e o número de eluições (Tabela 3). Cada fator foi avaliado a dois níveis (baixo e alto): número de aspirações (10 e  $20 \times 150 \mu\text{L}$ ), número de lavagens (1 e  $3 \times 50 \mu\text{L}$ ), e número de ciclos de eluição (1 e  $3 \times 100 \mu\text{L}$ ). Para proceder a este estudo foram fortificadas amostras branco de cabelo à concentração de 10 ng/mg e os IS só foram adicionados após o procedimento MEPS, para permitir a comparação direta dos rácios das áreas dos picos obtidos com cada uma das diferentes condições testadas (desta forma, o IS não é afetado pelas condições de extração, e a sua utilidade é apenas compensar os erros instrumentais).

Tabela 3 - Matriz de desenho, fatores experimentais da MEPS e rácios da área dos picos obtidos

Ordem de execução	Ponto Central	Blocos	Fatores experimentais			Resposta (rácio da área do pico) da KET	Resposta (rácio da área do pico) da NK
			Número de aspirações	Número de lavagens (x 50uL)	Número de eluições (x 100uL)		
1	1	1	20	3	1	1,288	1,296
2	0	1	15	2	2	1,238	1,248
3	1	1	20	3	3	4,476	1,527
4	1	1	10	1	1	10,439	1,237
5	1	1	10	3	3	0,938	0,059
6	0	1	15	2	2	1,055	1,393
7	0	1	15	2	2	1,035	1,011
8	1	1	20	1	3	6,799	1,258
9	1	1	20	1	1	16,030	0,867
10	1	1	10	1	3	22,512	1,341
11	1	1	10	3	1	3,141	1,278

Para iniciar a otimização do MEPS com auxílio do DOE, primeiro foi necessário criar uma matriz de desenho como indicado na tabela 3, e a partir da resposta obtida da KET e da

NK procedeu-se a avaliar a análise fatorial (Figura 10). Esta análise mostrou quais os fatores experimentais mais relevantes no processo de MEPS.

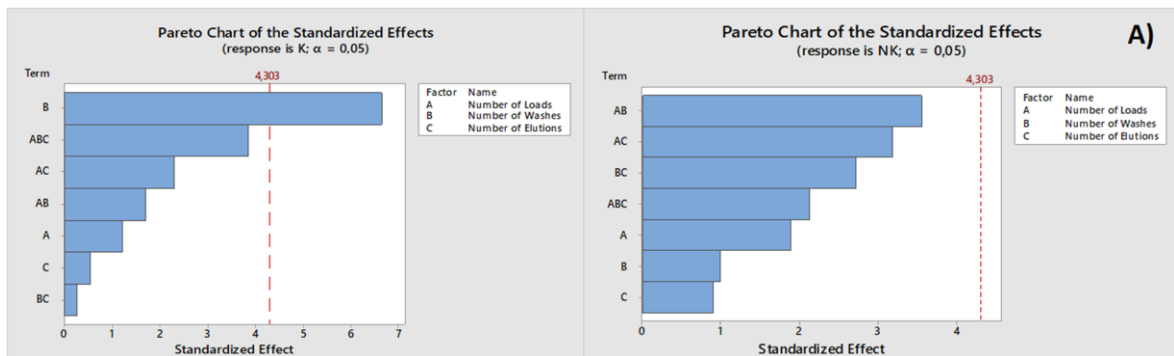


Figura 10 - Gráficos de Pareto obtidos para a KET e NK

Pela análise da figura 10 podemos verificar que na análise fatorial da KET o número de lavagens da amostra foi o fator significativo, ou seja, o número de lavagens foi o fator que teve mais influência no processo de *clean-up* por MEPS. No caso da NK não houve nenhum fator significativo. Assim sendo, efetuou-se também a análise dos principais fatores para a KET e a NK (Figura 11).

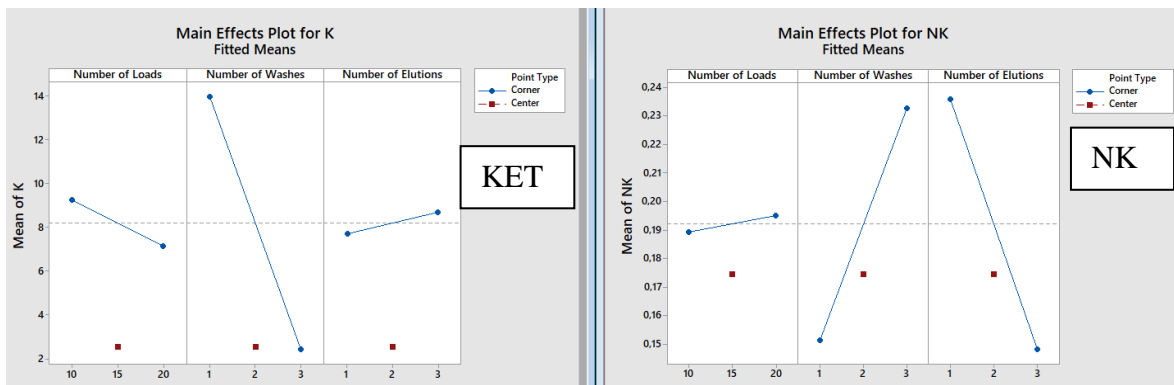


Figura 11 - Principais fatores para a KET e NK

Ao comparar estes dois gráficos pode-se verificar que o número de lavagens foi um fator importante para a KET, enquanto para a NK importaram os números de lavagens e o de eluições. No caso da KET foi obtida uma melhor resposta com uma lavagem enquanto para a NK foram três lavagens. Relativamente ao número de eluições, na KET obteve-se melhor resposta com três eluições e na NK uma eluição. Quanto ao número de aspirações, no caso da KET foi obtida melhor resposta com dez aspirações e para a NK vinte aspirações, mas este fator não apresentou influência significativa em ambos os analitos. Tendo em conta esta análise procedeu-se à otimização dos fatores experimentais (Figura12).

		Nº de aspirações	Nº de lavagens	Nº de eluições
Optimal	High	20,0	3,0	3,0
D: 0,6971	Cur	10,0	1,0	3,0
Predict	Low	10,0	1,0	1,0

Figura 12 - Otimização dos fatores experimentais

Pela análise dos resultados da figura 12, as condições finais foram: 10 aspirações de 150  $\mu\text{L}$ , 1 lavagem de 50  $\mu\text{L}$  e 1 ciclo de eluição de 100  $\mu\text{L}$ . Foram escolhidas 10 aspirações de 150  $\mu\text{L}$  em vez de 20 pelo facto de este fator não ter grande influência para ambos os compostos e sendo assim ao escolher apenas 10 aspirações tornou a execução da MEPS mais rápida. No número de lavagens, o único fator significativo obtido, foi escolhido um. Relativamente ao número de eluições foi escolhido também um, uma vez que este fator não teve muita influência em nenhum dos compostos sendo que no caso da NK a resposta aumentou apesar de não ter significado estatístico.

### 2.3 Estudo da influência da hidrólise no cabelo e estudo da influência da ressuspensão após hidrólise

Neste trabalho foi utilizada uma hidrólise metanólica e uma ressuspensão do extrato evaporado com 500  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato. Estes resultados foram previamente otimizados. Assim foram realizados ensaios tendo em conta diferentes processos de hidrólise descritos na literatura [140,141].

Inicialmente preparou-se uma *pool* de cabelo branco ao qual se fortificou com KET vendida comercialmente (concentração final de 2 mg/mg de cabelo). Para permitir a incorporação dentro do cabelo procederam-se a efetuar diversas agitações (5h/dia durante 15 dias).

Após este tempo, o cabelo foi lavado como descrito anteriormente e os solventes de lavagem foram analisados para garantir que a KET não se encontrava depositada externamente.

Após esta etapa de incorporação da KET, foram experimentados dois tipos de hidrólise: uma com metanol e outra com HCl 0,5 M. Na hidrólise com metanol (65°C *overnight*) experimentou-se também ressuspender o extrato com 2 soluções diferentes, uma com 2 % ácido fórmico em água e outra de tampão fosfato 0,1 M (pH= 6).

Foram assim realizados 3 ensaios (n=3): hidrólise com HCl, hidrólise com metanol e ressuspensão com 2 % de ácido fórmico (hidrólise metanólica 1\*) e hidrólise com metanol e ressuspensão com tampão fosfato (hidrólise metanólica 2\*\*). Pela análise das seguintes figuras (Figuras 13 e 14) podemos verificar que a hidrólise com metanol e ressuspensão com tampão fosfato foi o processo que mostrou ter mais sinal para a KET e NK.

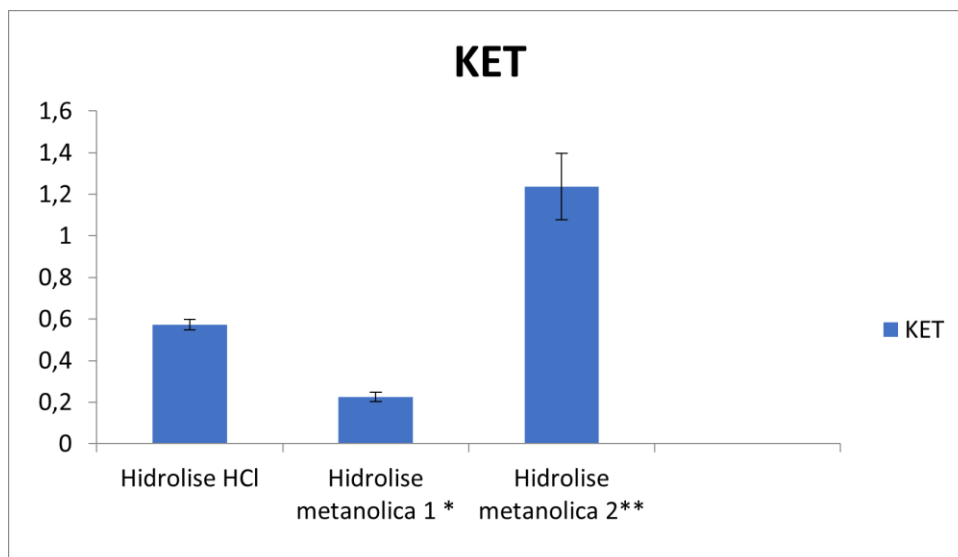


Figura 13 - Resultados relativos ao processo de hidrólise para a KET

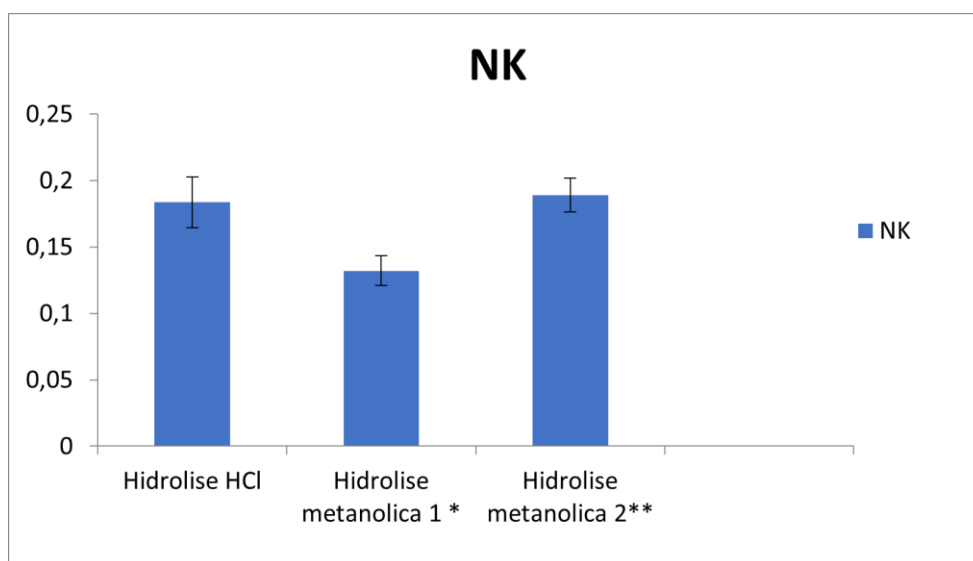


Figura 14 - Resultados relativos ao processo de hidrólise para a NK

Ao comparar os sinais obtidos podemos verificar que o pico obtido na hidrólise com metanol e ressuspensão com tampão foi superior para ambos os compostos.

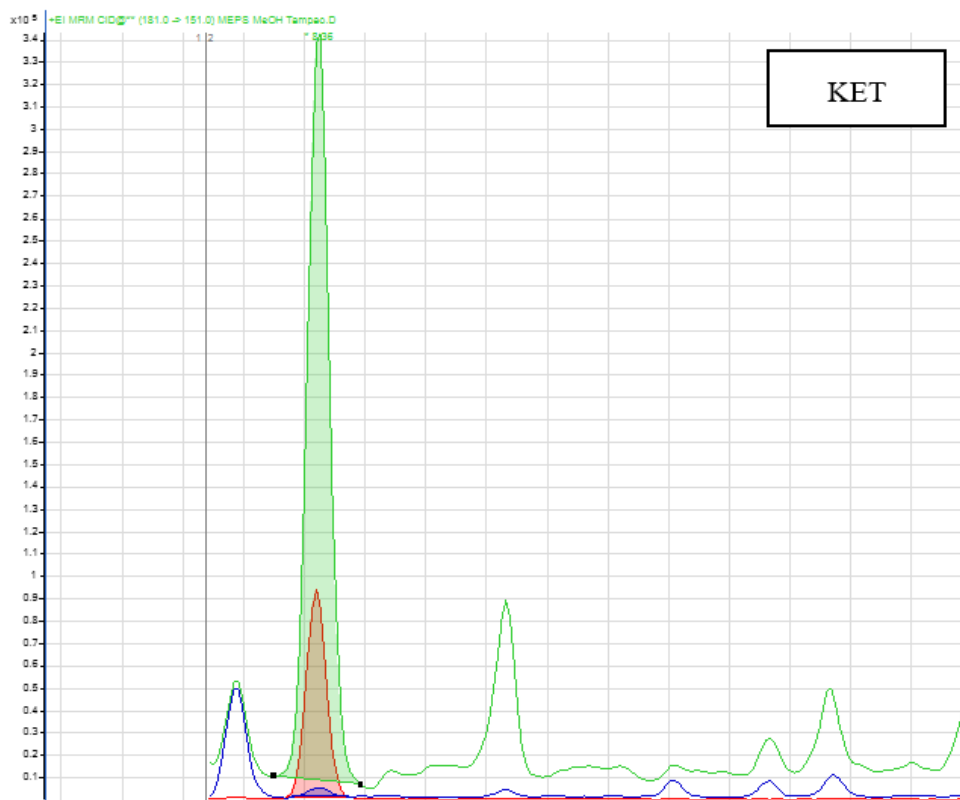


Figura 15 - Cromatograma dos sinais sobrepostos das diferentes hidrólises para a KET. (Verde – Hidrólise com metanol e ressuspensão com tampão fosfato; Vermelho – Hidrólise com HCl e de cor azul – Hidrólise com metanol e ressuspensão com 2% ácido fórmico)

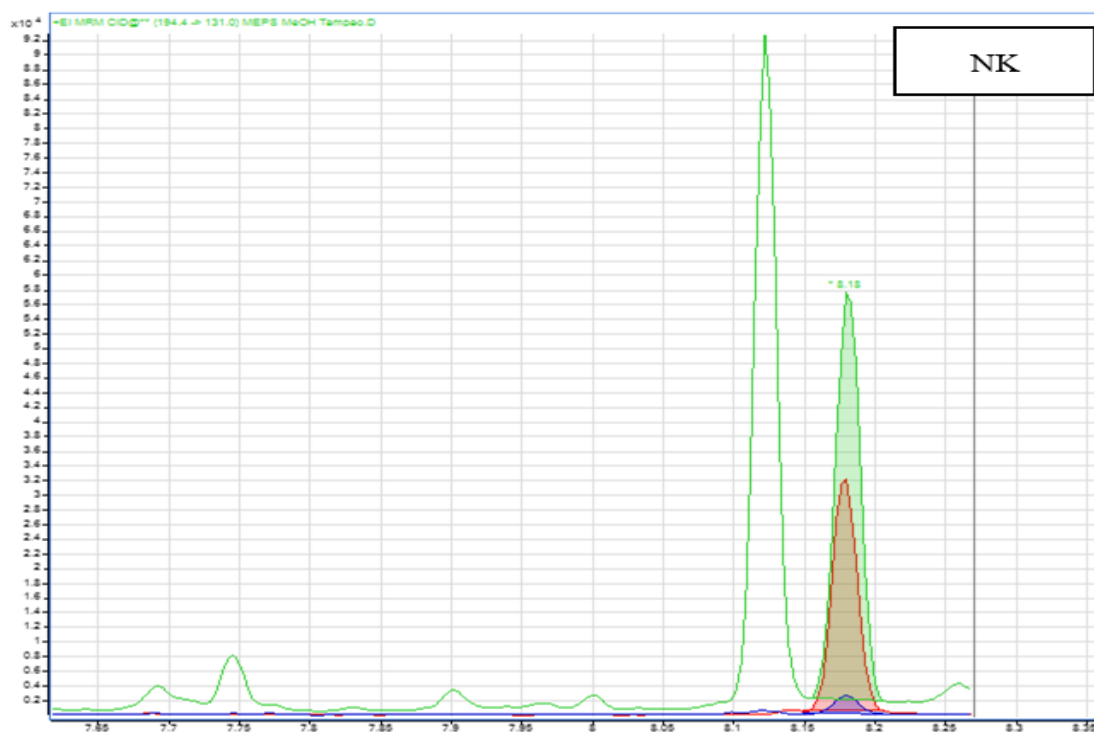


Figura 16 - Cromatograma dos sinais sobrepostos das diferentes hidrólises para a NK (Verde – Hidrólise com metanol e ressuspensão com tampão fosfato; Vermelho – Hidrólise com HCl e de cor azul – Hidrólise com metanol e ressuspensão com 2% ácido fórmico)

## 2.4 Limites de detecção

O limite de detecção (LOD) é a concentração mínima de analito visivelmente distinto de um branco e não tem de ser necessariamente quantificada. Uma das definições mais aceites para o LOD é o mais pequeno sinal que é possível distinguir do sinal de uma amostra branco relacionando este com o desvio-padrão obtido [29]. O LOD de uma técnica analítica pode ser determinado por 3 processos: (A) avaliação visual, (B) relação sinal/ruído e o (C) método baseado em parâmetros da curva de calibração. O primeiro (A) baseia-se na adição de quantidades conhecidas de analito a uma matriz isenta do analito, de forma que seja possível distinguir o sinal analítico e o ruído da linha de base, estabelecendo-se assim o LOD através da menor quantidade que é possível visualizar, ou seja detetar. Este procedimento também pode ser realizado introduzindo parâmetros no processo de integração do instrumento analítico. A relação sinal/ruído (B) só pode ser aplicada nos casos em o instrumento exibe uma linha de base. Esta relação é obtida por comparação dos sinais apresentados por amostras com baixas concentrações conhecidas, com o sinal apresentado pela matriz isenta do composto de interesse. A concentração mínima para a qual a substância pode ser detetada é assim estabelecida, sendo geralmente aceite uma proporção de 3:1 Nos métodos bioanalíticos, os brancos da matriz são frequentemente caracterizados por picos interferentes, capazes de alterar a avaliação da linha de base, pelo que este tipo de determinação do LOD não é, geralmente, o mais apropriado. Para além disso, esta avaliação é baseada na altura do pico, e o sinal recomendado para a quantificação do analito é a área do pico. O LOD pode ainda ser determinado com base na curva de calibração e as respetivas medidas de dispersão [142–145].

Para o cálculo do LOD, foram fortificadas amostras branco com os analitos de estudo à concentração de 0,01 e de 0,05 ng/mg (n=10). Por comparação dos cromatogramas de amostras branco (Figura 17) (n=6) e das amostras fortificadas (Figura 18) foi possível verificar se seria possível dar uma confirmação qualitativa da KET e NK. Os valores de LOD foram de 0,01 e de 0,05 ng/mg para a KET e NK, respetivamente.

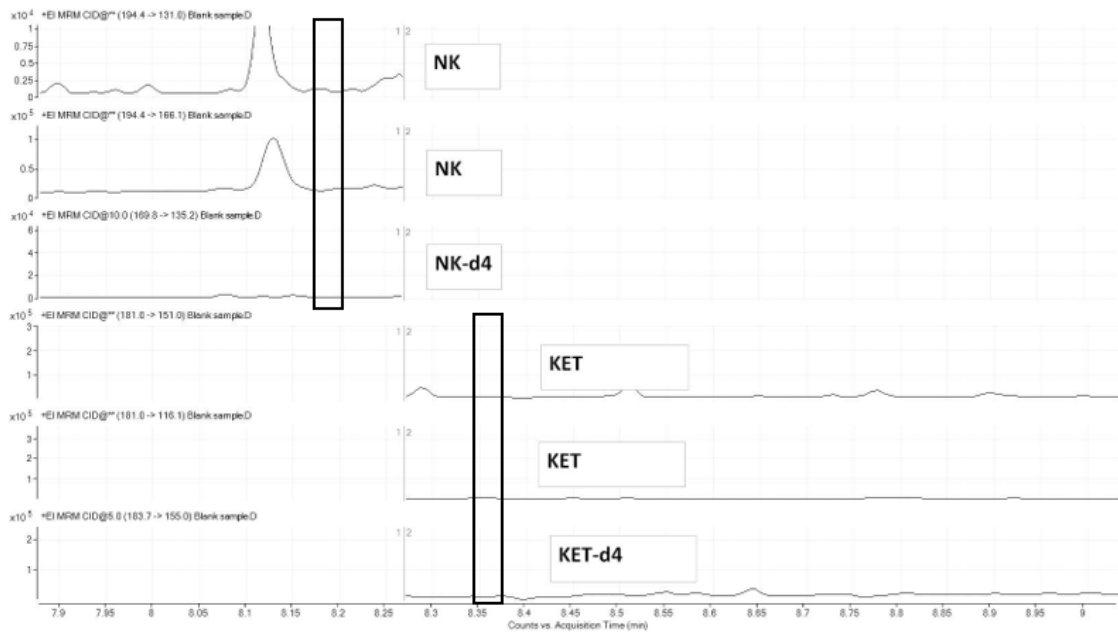


Figura 17 - Cromatograma de uma amostra branco

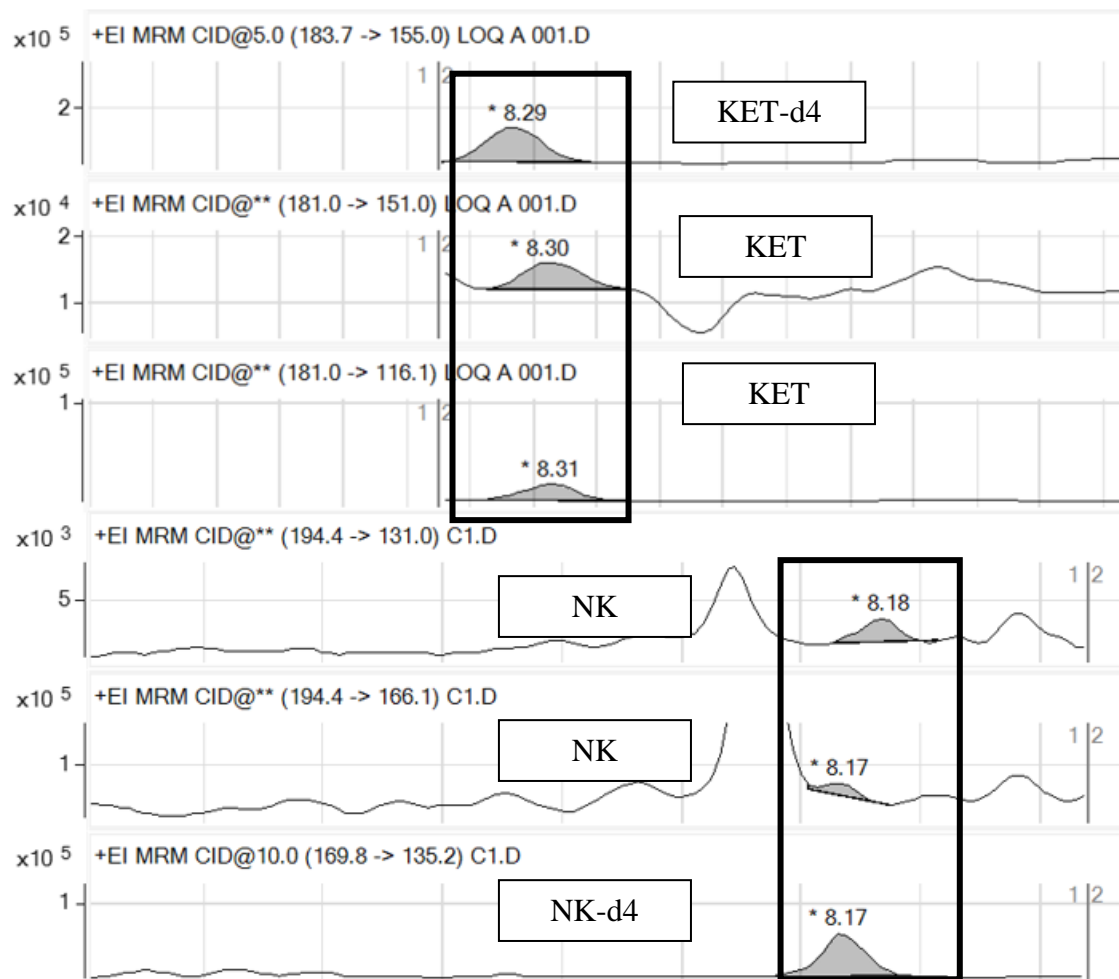


Figura 18 - Cromatograma de uma amostra fortificada à concentração do LODs

## 2.5 Recuperações

A recuperação reflete o quão eficaz é uma extração de um método analítico. O ideal é obter resultados perto de 100 %, mas se o método for consistente, reprodutível e preciso, as recuperações podem ser mais baixas. Para avaliar a recuperação do procedimento de limpeza, foi feita uma comparação entre as amostras extraídas (fortificadas antes do MEPS, n = 3) com as amostras não extraídas - que representaram uma recuperação a 100% (fortificadas após o procedimento MEPS, n = 3). Foram estudados quatro níveis de concentração (0,05, 0,2, 1 e 10 ng/mg). Os IS só foram adicionados após o procedimento MEPS a ambos os grupos de amostras. As recuperações foram calculadas por comparação das áreas relativas dos picos obtidos nas amostras extraídas, com as obtidas para as amostras não extraídas. Os resultados obtidos foram considerados satisfatórios (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultados da recuperação para a KET e NK

Analito	Concentração (ng/mg) *			
	0,05	0,2	1	10
KET	39,06 ± 5,31	46,98 ± 1,19	51,47 ± 4,14	60,63 ± 3,33
NK	42,8 ± 1,92	38,09 ± 2,55	32,19 ± 4,34	43,32 ± 5,00

\* média ± desvio padrão

Embora os valores das recuperações sejam inferiores a 50%, os LODs obtidos foram de 0,01 para a KET e de 0,05 ng/mg para a NK, sendo o método proposto um método sensível. Até à data, a MEPS não tem sido utilizada para determinar os compostos em estudo em amostras de cabelo. Como tal procedeu-se à comparação dos resultados com outras técnicas de microextração. Gentili et al. [146] utilizaram a microextração em fase sólida em modo *headspace* (HS-SPME) e obtiveram uma recuperação absoluta de 97% para KET, contudo foi obtido um limite de quantificação (LOQ) de 1,77 ng/mg. Num outro trabalho, Merola et al. [147] obtiveram uma recuperação absoluta inferior para KET (13,0 %). Ambos os trabalhos utilizaram GC-MS como técnica de análise. Meng et al. [148] obtiveram recuperações relativas entre 93,3 - 95,2% (KET) e 90,1 - 95,8% (NK) usando a microextração em fase sólida em modo imersão direta (DI-SPME) e LC-MS/MS.

Tabela 5 - Recuperações obtidas utilizando SPE como procedimento de clean-up em amostras de cabelo

<b>Analito</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>Método</b>	<b>Referência</b>
KET	102,8 – 104,5	LC-MS/MS	[149]
NK	96,4 – 99,9	LC-MS/MS	
KET	72,7 +/- 4,6	GC/MS	[150]
NK	71,7 +/- 3,8	GC/MS	
KET	83,6 – 90,3	GC/NCI-MS	[151]
NK	80,4 – 83,8	GC/NCI-MS	
KET	89,0	LC/turbo ion spray-MS/MS	[152]
KET	87,2 – 98,2	LC-MS/MS	[153]

Podemos verificar que as recuperações obtidas com recurso da SPE, independentemente do método instrumental usado, foram bastante superiores. Isto deve-se ao facto de que na SPE toda a amostra utilizada passa através do adsorvente de extração, ficando uma maior percentagem de compostos retidos. Contudo, na literatura existente, as recuperações de MEPS em cabelo não costumam ser muito elevadas, muito provavelmente devido à complexidade da matriz e também depende do composto em estudo. A título de exemplo, Rosado et al. [140] obtiveram recuperações baixas (22,34 – 35,65%) para a morfina. Apesar da técnica de SPE ter maiores percentagens de recuperação, a utilização de MEPS tem diversas vantagens desde o ponto de vista da química verde (menor consumo de solventes orgânicos) e ainda a possibilidade da reutilização do adsorbente de extração.

### 3 Conclusões

Neste trabalho, foi desenvolvido e otimizado um método analítico para a determinação de KET e o seu metabolito, NK, em amostras de cabelo através da utilização de uma técnica miniaturizada, a MEPS.

A MEPS revelou ser uma técnica simples e rápida, que utiliza pequenas quantidades de solventes orgânicos e que pode ser automatizada. A acoplação da espectrometria de massa em tandem à cromatografia de gases foi essencial para a identificação inequívoca dos compostos em estudo. O facto de os compostos em causa não precisarem de derivatização para serem injetados é uma grande vantagem pois poupa-se muito tempo na execução do método.

Diferentes parâmetros instrumentais assim como os fatores que influencia o procedimento de MEPS foram otimizados. A identificação de ambos compostos foi realizada com sucesso, obtendo-se recuperações entre 32 a 60% e LODs de 0,01 e 0,05 ng/mg.

É importante salientar que este é o primeiro método analítico desenvolvido para a determinação de KET e NK em amostras de cabelo com recurso ao MEPS e GC-MS/MS. Os resultados desta dissertação encontram-se publicados no *Journal of Analytical Toxicology* 2022 (<https://doi.org/10.1093/jat/bkac075>)

## Referências

- [1] Observatório Europeu de Droga e da Toxicodpendência, Relatório Europeu sobre drogas 2021 : tendências e evoluções, 2021. [http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/11364/20191724\\_TDAT19001PTN\\_PDF.pdf](http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/11364/20191724_TDAT19001PTN_PDF.pdf). (accessed August 10, 2022)
- [2] D. Luethi, M.E. Liechti, Designer drugs: mechanism of action and adverse effects, *Arch. Toxicol.* 2020 944. 94 (2020) 1085–1133. <https://doi.org/10.1007/S00204-020-02693-7>.
- [3] A. Peacock, R. Bruno, N. Gisev, L. Degenhardt, W. Hall, R. Sedefov, J. White, K. V. Thomas, M. Farrell, P. Griffiths, New psychoactive substances: challenges for drug surveillance, control, and public health responses, *Lancet.* 394 (2019) 1668–1684. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32231-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32231-7).
- [4] C. Miliano, G. Serpelloni, C. Rimondo, M. Mereu, M. Marti, M.A. De Luca, Neuropharmacology of New psychoactive substances (NPS): Focus on the rewarding and reinforcing properties of cannabimimetics and amphetamine-like stimulants, *Front. Neurosci.* 10 (2016) 153. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2016.00153/BIBTEX>.
- [5] D.K. Tracy, D.M. Wood, D. Baumeister, Novel psychoactive substances: types, mechanisms of action, and effects, *BMJ.* 356 (2017) i6848. <https://doi.org/10.1136/bmj.i6848>.
- [6] A. Shafi, A.J. Berry, H. Sumnall, D.M. Wood, D.K. Tracy, New psychoactive substances: a review and updates, *Ther. Adv. Psychopharmacol.* 10 (2020). <https://doi.org/10.1177/2045125320967197>.
- [7] M.H.Y. Tang, T.C. Li, C.K. Lai, Y.K. Chong, C.K. Ching, T.W.L. Mak, Emergence of new psychoactive substance 2-fluorodeschloroketamine: Toxicology and urinary analysis in a cluster of patients exposed to ketamine and multiple analogues, *Forensic Sci. Int.* 312 (2020) 110327. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110327>.
- [8] A. Batisse, C. Eiden, H. Peyriere, S. Djeddar, Use of new psychoactive substances to mimic prescription drugs: The trend in France, *Neurotoxicology.* 79 (2020) 20–24. <https://doi.org/10.1016/J.NEURO.2020.03.015>.
- [9] A. O’Hagan, S. McCormack, To what extent has the United Kingdom law on psychoactive substances been successful?, *Forensic Res. Criminol. Int. J.* 7 (2019) 176–183. <https://doi.org/10.15406/FRCIJ.2019.07.00284>.
- [10] C. Soussan, A. Kjellgren, The users of Novel Psychoactive Substances: Online survey

- about their characteristics, attitudes and motivations, *Int. J. Drug Policy.* 32 (2016) 77–84. <https://doi.org/10.1016/J.DRUGPO.2016.03.007>.
- [11] A. Salomone, G. Gazzilli, D. Di Corcia, E. Gerace, M. Vincenti, Determination of cathinones and other stimulant, psychedelic, and dissociative designer drugs in real hair samples, *Anal Bioanal Chem.* (2016) 2035–2042. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9247-4>.
- [12] M.H. Baumann, J.S. Partilla, K.R. Lehner, Psychoactive “bath salts”: Not so soothing, *Eur. J. Pharmacol.* 698 (2013) 1–5. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2012.11.020>.
- [13] S. Elliott, Cat and mouse: The analytical toxicology of designer drugs, *Bioanalysis.* 3 (2011) 249–251. <https://doi.org/10.4155/bio.10.206>.
- [14] L.A. Nisbet, F.M. Wylie, B.K. Logan, K.S. Scott, Gas Chromatography-Mass Spectrometry Method for the Quantitative Identification of 23 New Psychoactive Substances in Blood and Urine, *J. Anal. Toxicol.* 43 (2019) 346–352. <https://doi.org/10.1093/JAT/BKY109>.
- [15] I. Al-Banaa, L. Hawkins, S.L. Hill, D.J. Lupton, G. Jackson, E.A. Sandilands, S.M. Bradberry, J.P. Thompson, S. Rushton, S.H.L. Thomas, Effect of the UK Psychoactive Substances Act 2016 on episodes of toxicity related to new psychoactive substances as reported to the National Poisons Information Service. A time series analysis, *Int. J. Drug Policy.* 77 (2020). <https://doi.org/10.1016/J.DRUGPO.2020.102672>.
- [16] R. Rinaldi, G. Bersani, E. Marinelli, S. Zaami, The rise of new psychoactive substances and psychiatric implications: A wide-ranging, multifaceted challenge that needs far-reaching common legislative strategies, *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.* 35 (2020) e2727. <https://doi.org/10.1002/HUP.2727>.
- [17] United Nations Office on Drugs and Crime, The challenge of new psychoactive substances Global SMART Programme 2013, (2013) 1–222.
- [18] Serviço de Intervenção nos Comportamentos Aditivos e nas Dependências, IV Inquérito nacional ao consumo de substâncias psicoativas na população geral (INPG) – 2016/17, (2017). [https://www.sicad.pt/BK/EstatisticaInvestigacao/InformacaoEstatistica/ConsumosProblemas/Documents/Infografia\\_Consumos\\_RA\\_Droga\\_2020.pdf](https://www.sicad.pt/BK/EstatisticaInvestigacao/InformacaoEstatistica/ConsumosProblemas/Documents/Infografia_Consumos_RA_Droga_2020.pdf) (accessed August 10, 2022).
- [19] J.H. Ho, P.I. Dargan, Arylcyclohexamines (Ketamine, Phencyclidine, and Analogues) BT - Critical Care Toxicology, in: J. Brent, K. Burkhart, P. Dargan, B. Hatten, B. Megarbane, R. Palmer (Eds.), Springer International Publishing, Cham, (2016) 1–46. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-20790-2\\_124-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-20790-2_124-1).

- [20] F. Zapata, J.M. Matey, G. Montalvo, C. García-Ruiz, Chemical classification of new psychoactive substances (NPS), *Microchem. J.* 163 (2021). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105877>.
- [21] A.Y. Simão, M. Antunes, E. Cabral, P. Oliveira, L.M. Rosendo, A.T. Brinca, E. Alves, H. Marques, T. Rosado, L.A. Passarinha, M. Andraus, M. Barroso, E. Gallardo, An Update on the Implications of New Psychoactive Substances in Public Health, *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 19 (2022). <https://doi.org/10.3390/ijerph19084869>.
- [22] A.S. Vargas, D. Caramelo, A.Y. Simão, S. Soares, J. Gonçalves, T. Rosado, M. Antunes, M. Barroso, E. Gallardo, Ketamine and Other Phencyclidine Analogues: A Review of Their Use as Drugs of Abuse, Toxicological Aspects and Bioanalytical Approaches, in: Leland A. McBride (Ed.), *Ketamine Hist. Uses Heal. Eff.*, 1st ed., Nova Science Publishers, New York, USA, (2020) 1–111.
- [23] M.W. Crumb, C. Bryant, T.J. Atkinson, Emerging Trends in Pain Medication Management: Back to the Future: A Focus on Ketamine, *Am. J. Med.* 131 (2018) 883–886. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2018.02.037>.
- [24] J. Rhee, J. Lee, J. Kim, M. Jang, I. Shi, S. Lee, Determination of ketamine and norketamine in hair and evaluation of polydrug use in ketamine abusers using hair analysis in Korea, *J. Anal. Toxicol.* (2020) 1–32. <https://doi.org/10.1093/jat/bkaa166>
- [25] J. Kamp, K. Jonkman, M. van Velzen, L. Aarts, M. Niesters, A. Dahan, E. Olofsen, Pharmacokinetics of ketamine and its major metabolites norketamine, hydroxynorketamine, and dehydronorketamine: a model-based analysis, *Br. J. Anaesth.* 125 (2020) 750–761. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bja.2020.06.067>.
- [26] O. Corazza, S. Assi, F. Schifano, From “Special K” to “Special M”: The Evolution of the Recreational Use of Ketamine and Methoxetamine, *CNS Neurosci. Ther.* 19 (2013) 454–460. <https://doi.org/10.1111/cns.12063>.
- [27] G. Mion, T. Villeveille, Ketamine Pharmacology: An Update (Pharmacodynamics and Molecular Aspects, Recent Findings), *CNS Neurosci. Ther.* 19 (2013) 370–380. <https://doi.org/10.1111/cns.12099>.
- [28] E. Kim, J. Lee, S. Choi, M. Lim, H. Chung, Analysis of ketamine and norketamine in urine by automatic solid-phase extraction (SPE) and positive ion chemical ionization–gas chromatography–mass spectrometry (PCI–GC–MS), *Forensic Sci. Int.* 174 (2008) 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2007.04.217>.
- [29] N. Harun, R.A. Anderson, E.I. Miller, Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Screening Method and a Liquid Chromatography-Tandem

- Mass Spectrometry Confirmation Method for the Identification and Quantification of Ketamine and Norketamine in Urine Samples from Malaysia, *J. Anal. Toxicol.* 33 (2009) 310–321. <https://doi.org/10.1093/jat/33.6.310>.
- [30] H. Lee, J. Lee, S. Lin, P. Chen, B. Chen, Simultaneous determination of HFBA-derivatized amphetamines and ketamines in urine by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 35 (2011) 162–169. <https://doi.org/10.1093/anatox/35.3.162>.
- [31] J.M. Matey, M.D. Moreno de Simon, C. García-Ruiz, G. Montalvo, A validated GC–MS method for ketamine and norketamine in hair and its use in authentic cases, *Forensic Sci. Int.* 301 (2019) 447–454. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.04.039>.
- [32] P. Xiang, M. Shen, X. Zhuo, Hair analysis for ketamine and its metabolites, *Forensic Sci. Int.* 162 (2006) 131–134. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.05.046>.
- [33] K.Y. Zhu, K.W. Leung, A.K.L. Ting, Z.C.F. Wong, Q. Fu, W.Y.Y. Ng, R.C.Y. Choi, T.T.X. Dong, T. Wang, D.T.W. Lau, K.W.K. Tsim, The establishment of a highly sensitive method in detecting ketamine and norketamine simultaneously in human hairs by HPLC-Chip–MS/MS, *Forensic Sci. Int.* 208 (2011) 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.10.028>.
- [34] H. Morris, J. Wallach, From PCP to MXE: a comprehensive review of the non-medical use of dissociative drugs, *Drug Test. Anal.* 6 (2014) 614–632. <https://doi.org/10.1002/DTA.1620>.
- [35] F.I. Carroll, A.H. Lewin, S.W. Mascarella, H.H. Seltzman, P.A. Reddy, Designer drugs: A medicinal chemistry perspective, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1248 (2012) 18–38. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06199.x>.
- [36] C.-Y. Chen, M.-R. Lee, F.-C. Cheng, G.-J. Wu, Determination of ketamine and metabolites in urine by liquid chromatography–mass spectrometry, *Talanta.* 72 (2007) 1217–1222. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.01.016>.
- [37] S.-L. Chou, M.-H. Yang, Y.-C. Ling, Y.-S. Giang, Gas chromatography-isotope dilution mass spectrometry preceded by liquid–liquid extraction and chemical derivatization for the determination of ketamine and norketamine in urine, *J. Chromatogr. B.* 799 (2004) 37–50. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.10.009>.
- [38] D. Favretto, S. Vogliardi, M. Tucci, I. Simoncello, R. El Mazloum, R. Snenghi, Occupational exposure to ketamine detected by hair analysis: a retrospective and prospective toxicological study, *Forensic Sci. Int.* 265 (2016) 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.03.010>.
- [39] M.-K. Huang, C. Liu, J.-H. Li, S.-D. Huang, Quantitative detection of ketamine,

- norketamine, and dehydronorketamine in urine using chemical derivatization followed by gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. B.* 820 (2005) 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.03.004>.
- [40] Y. Jin, S. Kyu, K. Min, I. Jae, K. Moon, Simultaneous determination of psychotropic phenylalkylamine derivatives in human hair by gas chromatography/mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 1705–1720. <https://doi.org/10.1002/RCM.3010>.
- [41] J.Y. Kim, S.H. Shin, M.K. In, Determination of amphetamine-type stimulants, ketamine and metabolites in fingernails by gas chromatography–mass spectrometry, *Forensic Sci. Int.* 194 (2010) 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.10.023>.
- [42] P. Zanos, R. Moaddel, P.J. Morris, L.M. Riggs, J.N. Highland, P. Georgiou, E.F.R. Pereira, E.X. Albuquerque, C.J. Thomas, C.A. Zarate, T.D. Gould, Ketamine and Ketamine Metabolite Pharmacology: Insights into Therapeutic Mechanisms, *Pharmacol. Rev.* 70 (2018) 621 LP – 660. <https://doi.org/10.1124/pr.117.015198>.
- [43] M.B. Kaufman, Pharmaceutical approval update PT, *Pharm. Approv. Updat. P T.* 44 (2019) 251–254.
- [44] Y. Yanagihara, S. Kariya, M. Ohtani, K. Uchino, T. Aoyama, Y. Yamamura, T. Iga, Involvement of CYP2B6 in N-demethylation of ketamine in human liver microsomes, *Drug Metab. Dispos.* 29 (2001) 887–890.
- [45] H.-P. Jen, Y.-C. Tsai, H.-L. Su, Y.-Z. Hsieh, On-line preconcentration and determination of ketamine and norketamine by micellar electrokinetic chromatography: Complementary method to gas chromatography/mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1111 (2006) 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.05.019>.
- [46] V.W.M. Lee, J.Y.K. Cheng, S.T.C. Cheung, Y. Wong, D.W.M. Sin, The first international proficiency test on ketamine and norketamine in hair, *Forensic Sci. Int.* 219 (2012) 272–277. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2012.01.017>.
- [47] I. Moreno, M. Barroso, A. Martinho, A. Cruz, E. Gallardo, Determination of ketamine and its major metabolite, norketamine, in urine and plasma samples using microextraction by packed sorbent and gas chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B.* 1004 (2015) 67–78. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2015.09.032>.
- [48] A.V. de Bairros, R. Lanaro, R.M. de Almeida, M. Yonamine, Determination of ketamine, norketamine and dehydronorketamine in urine by hollow-fiber liquid-phase microextraction using an essential oil as supported liquid membrane, *Forensic Sci. Int.* 243 (2014) 47–54.

- <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.04.016>.
- [49] N. Harun, R.A. Anderson, P.A.G. Cormack, Analysis of ketamine and norketamine in hair samples using molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE) and liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 2449–2459. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3404-6>.
- [50] M.C. Parkin, S.C. Turfus, N.W. Smith, J.M. Halket, R.A. Braithwaite, S.P. Elliott, M.D. Osselton, D.A. Cowan, A.T. Kicman, Detection of ketamine and its metabolites in urine by ultra high pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B.* 876 (2008) 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.09.036>.
- [51] K. Lian, P. Zhang, L. Niu, S. Bi, S. Liu, L. Jiang, W. Kang, A novel derivatization approach for determination of ketamine in urine and plasma by gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1264 (2012) 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.09.058>.
- [52] H.R. Lin, H.L. Lin, S.F. Lee, C. Liu, A.C. Lua, A Fast Screening Procedure for Ketamine and Metabolites in Urine Samples with Tandem Mass Spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 34 (2010) 149–154. <https://doi.org/10.1093/jat/34.3.149>.
- [53] S. Inagaki, H. Makino, T. Fukushima, J.Z. Mina, T. Toyo'okaa, Rapid detection of ketamine and norketamine in rat hair using micropulverized extraction and ultra-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry, *Biomed. Chromatogr.* 23 (2009) 1245–1250. <https://doi.org/10.1002/BMC.1256>.
- [54] I.A. Larabi, F. Zerizer, A. Ameline, I. Etting, D. Joseph, P. Kintz, J.C. Alvarez, Metabolic profiling of deschloro-N-ethyl-ketamine and identification of new target metabolites in urine and hair using human liver microsomes and high-resolution accurate mass spectrometry, *Drug Test. Anal.* 13 (2021) 1108–1117. <https://doi.org/10.1002/dta.3007>.
- [55] M. Bäckberg, O. Beck, A. Helander, Phencyclidine analog use in Sweden—intoxication cases involving 3-MeO-PCP and 4-MeO-PCP from the STRIDA project, *Clin. Toxicol.* 53 (2015) 856–864. <https://doi.org/10.3109/15563650.2015.1079325>.
- [56] E. Bakota, C. Arndt, A.A. Romoser, S.K. Wilson, Fatal Intoxication Involving 3-MeO-PCP: A Case Report and Validated Method, *J. Anal. Toxicol.* 40 (2016) 504–510. <https://doi.org/10.1093/jat/bkw056>.
- [57] S. Chiappini, H. Claridge, J.M. Corkery, C. Goodair, B. Loi, F. Schifano, Methoxetamine-related deaths in the UK: an overview, *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.* 30 (2015) 244–248. <https://doi.org/10.1002/HUP.2422>.
- [58] S. Thornton, D. Lisbon, T. Lin, R. Gerona, Beyond Ketamine and Phencyclidine:

- Analytically Confirmed Use of Multiple Novel Arylcyclohexylamines, *J. Psychoactive Drugs*. 49 (2017) 289–293. <https://doi.org/10.1080/02791072.2017.1333660>.
- [59] República Portuguesa, Portaria n.º 154/2013, de 17 de abril, (2013). [https://www.infarmed.pt/documents/15786/1070504/070-C\\_Port\\_154\\_2013.pdf](https://www.infarmed.pt/documents/15786/1070504/070-C_Port_154_2013.pdf) (accessed July 25, 2022).
- [60] J.M. Malinovsky, F. Servin, A. Cozian, J.Y. Lepage, M. Pinaud, Ketamine and norketamine plasma concentrations after i.v., nasal and rectal administration in children, *Br. J. Anaesth.* 77 (1996) 203–207. <https://doi.org/10.1093/bja/77.2.203>.
- [61] C. Andrade, Ketamine for Depression, 4: In What Dose, at What Rate, by What Route, for How Long, and at What Frequency?, *J. Clin. Psychiatry*. 78 (2017) 10106. <https://doi.org/10.4088/JCP.17F11738>.
- [62] J.A. Clements, W.S. Nimmo, I.S. Grant, Bioavailability, Pharmacokinetics, and Analgesic Activity of Ketamine in Humans, *J. Pharm. Sci.* 71 (1982) 539–542. <https://doi.org/10.1002/jps.2600710516>.
- [63] F. Weber, H. Wulf, M. Gruber, R. Biallas, S-ketamine and s-norketamine plasma concentrations after nasal and i.v. administration in anesthetized children, *Pediatr. Anesth.* 14 (2004) 983–988. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9592.2004.01358.X>.
- [64] L. Félix, L. Antunes, S. Campos, C. Venâncio, A.M. Coimbra, Chapter 62 - Recreational Use of Ketamine and Its Interaction with NMDA Receptors, in: V.R.B.T.-N. of D.A. and S.M. Preedy (Ed.), Academic Press, San Diego, 2016: pp. 672–680. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800212-4.00062-5>.
- [65] S. Sassano-Higgins, D. Baron, G. Juarez, N. Esmaili, M. Gold, A REVIEW OF KETAMINE ABUSE AND DIVERSION, *Depress. Anxiety*. 33 (2016) 718–727. <https://doi.org/10.1002/da.22536>.
- [66] K. Wolff, Ketamine: The pharmacokinetics and pharmacodynamics in misusing populations (2017) 177–193.
- [67] B. Sinner, B.M. Graf, Ketamine BT - Modern Anesthetics, in: J. Schüttler, H. Schwilden (Eds.), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg (2008) 313–333. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-74806-9\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-540-74806-9_15).
- [68] I.S. Grant, W.S. Nimmo, J.A. Clements, Pharmacokinetics and analgesic effects of I.M. and oral ketamine, *BJA Br. J. Anaesth.* 53 (1981) 805–810. <https://doi.org/10.1093/bja/53.8.805>.
- [69] S. Şekerçi, A. Dönmez, Y. Ateş, F. Ökten, Oral ketamine premedication in children (placebo controlled double-blind study), *Eur. J. Anaesthesiol.* 13 (1996) 606–611. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2346.1996.00058.x>.
- [70] C. Chong, S.A. Schug, M. Page-Sharp, B. Jenkins, K.F. Ilett, Development of a

- Sublingual/Oral Formulation of Ketamine for Use in Neuropathic Pain, *Clin. Drug Investig.* 29 (2009) 317–324. <https://doi.org/10.2165/00044011-200929050-00004>.
- [71] P. Rolan, S. Lim, V. Sunderland, Y. Liu, V. Molnar, The absolute bioavailability of racemic ketamine from a novel sublingual formulation, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 77 (2014) 1011–1016. <https://doi.org/10.1111/bcp.12264>.
- [72] Y. Yanagihara, M. Ohtani, S. Kariya, K. Uchino, T. Hiraishi, N. Ashizawa, T. Aoyama, Y. Yamamura, Y. Yamada, T. Iga, Plasma concentration profiles of ketamine and norketamine after administration of various ketamine preparations to healthy Japanese volunteers, *Biopharm. Drug Dispos.* 24 (2003) 37–43. <https://doi.org/10.1002/BDD.336>.
- [73] H.V. Curran, C. Morgan, Cognitive, dissociative and psychotogenic effects of ketamine in recreational users on the night of drug use and 3 days later, *Addiction.* 95 (2000) 575–590. <https://doi.org/10.1046/j.1360-0443.2000.9545759.x>.
- [74] J.P. Jantzen, K. Erdmann, D. Hilley, A.M. Klein, [Comparative study of analgesia and plasma level following rectal, intramuscular and intravenous administration of ketamine], *Anaesthesist.* 34 (1985) 346–351. <http://europepmc.org/abstract/MED/4037284>.
- [75] J. Wieber, R. Gugler, J.H. Hengstmann, H.J. Dengler, Pharmacokinetics of ketamine in man, *Anaesthesist.* 24 (1975) 260–263. <http://europepmc.org/abstract/MED/1155748>.
- [76] P.G. Dayton, R.L. Stiller, D.R. Cook, J.M. Perel, The binding of ketamine to plasma proteins: Emphasis on human plasma, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 24 (1983) 825–831. <https://doi.org/10.1007/BF00607095>.
- [77] M.A. Peltoniemi, T.I. Saari, N.M. Hagelberg, K. Laine, K.J. Kurkinen, P.J. Neuvonen, K.T. Olkkola, Rifampicin has a Profound Effect on the Pharmacokinetics of Oral S-Ketamine and Less on Intravenous S-Ketamine, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 111 (2012) 325–332. <https://doi.org/10.1111/J.1742-7843.2012.00908.X>.
- [78] M.A. Peltoniemi, N.M. Hagelberg, K.T. Olkkola, T.I. Saari, Ketamine: A Review of Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in Anesthesia and Pain Therapy, *Clin. Pharmacokinet.* 55 (2016) 1059–1077. <https://doi.org/10.1007/s40262-016-0383-6>.
- [79] F.A. Myers, M.H. Bluth, W.W. Cheung, Ketamine: A Cause of Urinary Tract Dysfunction, *Clin. Lab. Med.* 36 (2016) 721–744. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cll.2016.07.008>.
- [80] P. Adamowicz, M. Kala, Urinary Excretion Rates of Ketamine and Norketamine Following Therapeutic Ketamine Administration: Method and Detection Window

- Considerations, *J. Anal. Toxicol.* 29 (2005) 376–382.  
<https://doi.org/10.1093/jat/29.5.376>.
- [81] P.F. White, J. Schüttler, A. Shafer, D.R. Stanski, Y. Horai, A.J. Trevor, Comparative pharmacology of the ketamine isomers: studies in volunteers, *BJA Br. J. Anaesth.* 57 (1985) 197–203. <https://doi.org/10.1093/bja/57.2.197>.
- [82] E.F. Domino, D.S. Warner, Taming the Ketamine Tiger, *Anesthesiology.* 113 (2010) 678–684. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3181ed09a2>.
- [83] N.M. Hagelberg, M.A. Peltoniemi, T.I. Saari, K.J. Kurkinen, K. Laine, P.J. Neuvonen, K.T. Olkkola, Clarithromycin, a potent inhibitor of CYP3A, greatly increases exposure to oral S-ketamine, *Eur. J. Pain.* 14 (2010) 625–629. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2009.10.003>.
- [84] N.P. Franks, W.R. Lieb, Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia, *Nature.* 367 (1994) 607–614. <https://doi.org/10.1038/367607a0>.
- [85] A.B. Davidsen, M. Mardal, N.B. Holm, A.K. Andreasen, S.S. Johansen, C. Noble, P. Dalsgaard, K. Linnet, Ketamine analogues: Comparative toxicokinetic in vitro–in vivo extrapolation and quantification of 2-fluorodeschloroketamine in forensic blood and hair samples, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 180 (2020) 113049. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.113049>.
- [86] J. Sleigh, M. Harvey, L. Voss, B. Denny, Ketamine – More mechanisms of action than just NMDA blockade, *Trends Anaesth. Crit. Care.* 4 (2014) 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.tacc.2014.03.002>.
- [87] C. Kraus, D. Wasserman, I.D. Henter, E. Acevedo-Diaz, B. Kadriu, C.A. Zarate, The influence of ketamine on drug discovery in depression, *Drug Discov. Today.* 24 (2019) 2033–2043. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.07.007>.
- [88] O.K. Sial, E.M. Parise, L.F. Parise, T. Gnecco, C.A. Bolaños-Guzmán, Ketamine: The final frontier or another depressing end?, *Behav. Brain Res.* 383 (2020) 112508. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112508>.
- [89] R. Kohrs, M.E. Durieux, Ketamine: Teaching an Old Drug New Tricks, *Anesth. Analg.* 87 (1998).
- [90] C.J.A. Morgan, H.V. Curran, Ketamine use: a review, *Addiction.* 107 (2012) 27–38. <https://doi.org/10.1111/J.1360-0443.2011.03576.X>.
- [91] G. Ivani, C. Vercellino, F. Tonetti, Ketamine: a new look to an old drug, *Minerva Anesthesiol.* 69 (2003) 468–471.
- [92] S.M. Stahl, Mechanism of action of ketamine, *CNS Spectr.* 18 (2013) 171–174. <https://doi.org/DOI:10.1017/S109285291300045X>.
- [93] N. Li, B. Lee, R.-J. Liu, M. Banasr, J.M. Dwyer, M. Iwata, X.-Y. Li, G. Aghajanian, R.S. Duman, mTOR-Dependent Synapse Formation Underlies the Rapid

- Antidepressant Effects of NMDA Antagonists, *Science* (80-. ). 329 (2010) 959–964. <https://doi.org/10.1126/science.1190287>.
- [94] C. Stein, Opioid Receptors, *Annu. Rev. Med.* 67 (2016) 433–451. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-062613-093100>.
- [95] G. Bokor, P.D. Anderson, Ketamine: An Update on Its Abuse, *J. Pharm. Pract.* 27 (2014) 582–586. <https://doi.org/10.1177/0897190014525754>.
- [96] V.J. Orhurhu, R. Vashisht, L.E. Claus, S.P. Cohen, Ketamine Toxicity, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), Beth Israel Deaconess Medical Center, 2019.
- [97] R. Pérez-Esparza, L.F. Kobayashi-Romero, A.M. García-Mendoza, R.M. Lamas-Aguilar, A. Fonseca-Perezamador, Promises and concerns regarding the use of ketamine and esketamine in the treatment of depression., *Acta Psychiatr. Scand.* 140 (2019) 182–183. <https://doi.org/10.1111/acps.13063>.
- [98] J. Muller, S. Pentyala, J. Dilger, S. Pentyala, Ketamine enantiomers in the rapid and sustained antidepressant effects, *Ther. Adv. Psychopharmacol.* 6 (2016) 185–192. <https://doi.org/10.1177/2045125316631267>.
- [99] Z. Ates-Alagoz, A. Adejare, NMDA Receptor Antagonists for Treatment of Depression, *Pharm.* . 6 (2013) 480–499. <https://doi.org/10.3390/ph6040480>.
- [100] C.G. Parsons, W. Danysz, G. Quack, Glutamate in CNS disorders as a target for drug development: an update, *Drug News & Perspect.* 11 (1998) 523–569. <https://doi.org/10.1358/dnp.1998.11.9.863689>.
- [101] E.S. Schwenk, E.R. Viscusi, A. Buvanendran, R.W. Hurley, A.D. Wasan, S. Narouze, A. Bhatia, F.N. Davis, W.M. Hooten, S.P. Cohen, Consensus Guidelines on the Use of Intravenous Ketamine Infusions for Acute Pain Management From the American Society of Regional Anesthesia and Pain Medicine, the American Academy of Pain Medicine, and the American Society of Anesthesiologists, *Reg. Anesth. & Pain Med.* 43 (2018) 456 LP – 466. <https://doi.org/10.1097/AAP.0000000000000806>.
- [102] R.F. Bell, E.A. Kalso, Ketamine for pain management., *Pain Reports.* 3 (2018) e674. <https://doi.org/10.1097/PR9.0000000000000674>.
- [103] W. Lu, L. Wang, C. Wo, J. Yao, Ketamine attenuates osteoarthritis of the knee via modulation of inflammatory responses in a rabbit model, *Mol Med Rep.* 13 (2016) 5013–5020. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5164>.
- [104] O. Dale, A.A. Somogyi, Y. Li, T. Sullivan, Y. Shavit, Does Intraoperative Ketamine Attenuate Inflammatory Reactivity Following Surgery? A Systematic Review and Meta-Analysis, *Anesth. Analg.* 115 (2012).
- [105] F. Liriano, C. Hatten, T.L. Schwartz, Ketamine as treatment for post-traumatic stress disorder: a review., *Drugs Context.* 8 (2019).

- <https://doi.org/10.7573/dic.212305>.
- [106] E.A. Rabiner, Imaging of striatal dopamine release elicited with NMDA antagonists: is there anything there to be seen?, *J. Psychopharmacol.* 21 (2007) 253–258. <https://doi.org/10.1177/0269881107077767>.
- [107] R. Jalil, S. Gupta, Illicit ketamine and its bladder consequences: is it irreversible?, *BMJ Case Rep.* 2012 (2012) bcr2012007244. <https://doi.org/10.1136/bcr-2012-007244>.
- [108] H.R. Pal, N. Berry, R. Kumar, R. Ray, Ketamine Dependence, *Anaesth. Intensive Care.* 30 (2002) 382–384. <https://doi.org/10.1177/0310057X0203000323>.
- [109] W. Zhu, Z. Ding, Y. Zhang, J. Shi, K. Hashimoto, L. Lu, Risks Associated with Misuse of Ketamine as a Rapid-Acting Antidepressant, *Neurosci. Bull.* 32 (2016) 557–564. <https://doi.org/10.1007/s12264-016-0081-2>.
- [110] X. Wang, Y. Chen, X. Zhou, F. Liu, T. Zhang, C. Zhang, Effects of Propofol and Ketamine as Combined Anesthesia for Electroconvulsive Therapy in Patients With Depressive Disorder, *J. ECT.* 28 (2012).
- [111] D.A. Haas, D.G. Harper, Ketamine: a review of its pharmacologic properties and use in ambulatory anesthesia., *Anesth. Prog.* 39 (1992) 61–68.
- [112] J. Bonaventura, S. Lam, M. Carlton, M.A. Boehm, J.L. Gomez, O. Solís, M. Sánchez-Soto, P.J. Morris, I. Fredriksson, C.J. Thomas, D.R. Sibley, Y. Shaham, C.A. Zarate, M. Michaelides, Pharmacological and behavioral divergence of ketamine enantiomers: implications for abuse liability, *Mol. Psychiatry.* 26 (2021) 6704–6722. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01093-2>.
- [113] S.R. Edwards, L.E. Mather, Tissue uptake of ketamine and norketamine enantiomers in the rat Indirect evidence for extrahepatic metabolic inversion, *Life Sci.* 69 (2001) 2051–2066. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(01\)01287-5](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)01287-5).
- [114] Y. Wang, R. Jiang, Z. Wu, L. Zhou, J. Xu, C. Huang, L. Yang, B. Zhu, E. Yan, C. Liu, C. Yang, Gut microbiota is involved in the antidepressant-like effect of (S)-norketamine in an inflammation model of depression, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 207 (2021) 173226. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2021.173226>.
- [115] M.V. Hernando, J.C. Moore, R.A. Howie, R.A. Castledine, S.L. Bourne, G.N. Jenkins, P. Licence, M. Poliakoff, M.W. George, High Yielding Continuous-Flow Synthesis of Norketamine, *Org. Process Res. Dev.* 26 (2022) 1145–1151. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.1c00407>.
- [116] E. Han, N. Ji Kwon, L.Y. Feng, J.H. Li, H. Chung, Illegal use patterns, side effects, and analytical methods of ketamine, *Forensic Sci. Int.* 268 (2016) 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.09.001>.
- [117] J.-H. Li, B. Vicknasingam, Y. Cheung, Wang Zhou, A. Wibowo Nurhidayat, D.C. Des

- Jarlais, R. Schottenfeld, To use or not to use: an update on licit and illicit ketamine use, (2011). <https://doi.org/10.2147/SAR.S15458>.
- [118] K. Hashimoto, C. Yang, Is (S)-norketamine an alternative antidepressant for esketamine?, *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 269 (2019) 867–868. <https://doi.org/10.1007/s00406-018-0922-2>.
- [119] C. Yang, S. Kobayashi, K. Nakao, C. Dong, M. Han, Y. Qu, Q. Ren, J. Zhang, M. Ma, H. Toki, J. Yamaguchi, S. Chaki, Y. Shirayama, K. Nakazawa, T. Manabe, K. Hashimoto, AMPA receptor activation-independent antidepressant actions of ketamine metabolite (S)-norketamine, *Biol. Psychiatry.* 84 (2018) 591–600. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.05.007>.
- [120] K. Hashimoto, Rapid-acting antidepressant ketamine, its metabolites and other candidates: A historical overview and future perspective, *Psychiatry Clin. Neurosci.* 73 (2019) 613–627. <https://doi.org/10.1111/pcn.12902>.
- [121] C. Ferreira, C. Paulino, A. Quintas, Extraction Procedures for Hair Forensic Toxicological Analysis: A Mini-Review, *Chem. Res. Toxicol.* 32 (2019) 2367–2381. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00301>.
- [122] M. Usman, A. Naseer, Y. Baig, T. Jamshaid, M. Shahwar, S. Khurshuid, Forensic toxicological analysis of hair: a review, *Egypt. J. Forensic Sci.* 9 (2019) 17. <https://doi.org/10.1186/s41935-019-0119-5>.
- [123] H. Khajuria, B.P. Nayak, Hair: A bio-marker for detection of drugs of abuse., *Asian J. Psychiatr.* 30 (2017) 208–209. <https://doi.org/10.1016/j.ajp.2017.10.017>.
- [124] P. Kintz, Hair Analysis in Forensic Toxicology: An Updated Review with a Special Focus on Pitfalls., *Curr. Pharm. Des.* 23 (2017) 5480–5486. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170929155628>.
- [125] P. Kintz, Hair analysis in forensic toxicology, *Wires Forensic Sci.* 1 (2019) e1196. <https://doi.org/10.1002/wfs2.1196>.
- [126] P. Xiang, M. Shen, O.H. Drummer, Review: Drug concentrations in hair and their relevance in drug facilitated crimes, *J. Forensic Leg. Med.* 36 (2015) 126–135. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2015.09.009>.
- [127] H. Khajuria, B.P. Nayak, A. Badiye, Toxicological hair analysis: Pre-analytical, analytical and interpretive aspects, *Med. Sci. Law.* 58 (2018) 137–146. <https://doi.org/10.1177/0025802418768305>.
- [128] M. Barroso, E. Gallardo, Hair analysis for forensic applications: is the future bright?, *Bioanalysis.* 6 (2013) 1–3. <https://doi.org/10.4155/bio.13.291>.
- [129] T. Rosado, M. Barroso, D.N. Vieira, E. Gallardo, Trends in microextraction approaches for handling human hair extracts - A review, *Anal. Chim. Acta.* 1185 (2021) 338792. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338792>.

- [130] G.A.A. Cooper, R. Kronstrand, P. Kintz, Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair, *Forensic Sci. Int.* 218 (2012) 20–24. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.10.024>.
- [131] L. Yang, R. Said, M. Abdel-Rehim, Sorbent, device, matrix and application in microextraction by packed sorbent (MEPS): A review, *J. Chromatogr. B.* 1043 (2017) 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.10.044>.
- [132] M. Abdel-Rehim, S. Pedersen-Bjergaard, A. Abdel-Rehim, R. Lucena, M.M. Moein, S. Cárdenas, M. Miró, Microextraction approaches for bioanalytical applications: An overview, *J. Chromatogr. A.* 1616 (2020) 460790. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460790>.
- [133] M. Abdel-Rehim, Microextraction by packed sorbent (MEPS): A tutorial, *Anal. Chim. Acta.* 701 (2011) 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.05.037>.
- [134] M. Abdel-Rehim, Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 2569–2580. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.09.053>.
- [135] M. Abdel-Rehim, Z. Altun, L. Blomberg, 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, *J. Mass Spectrom.* 39 (2004) 1488–1493. <https://doi.org/10.1002/jms.731>.
- [136] M.M. Moein, A. Abdel-Rehim, M. Abdel-Rehim, Microextraction by packed sorbent (MEPS), *TrAC Trends Anal. Chem.* 67 (2015) 34–44. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.12.003>.
- [137] L.M. Rosendo, T. Rosado, P. Oliveira, A.Y. Simão, C. Margalho, S. Costa, L.A. Passarinha, M. Barroso, E. Gallardo, The Determination of Cannabinoids in Urine Samples Using Microextraction by Packed Sorbent and Gas Chromatography-Mass Spectrometry., *Molecules.* 27 (2022). <https://doi.org/10.3390/molecules27175503>.
- [138] A.Y. Simão, C. Monteiro, H. Marques, T. Rosado, C. Margalho, M. Barroso, M. Andraus, E. Gallardo, Analysis of opiates in urine using microextraction by packed sorbent and gas Chromatography- Tandem mass spectrometry., *J. Chromatogr. B, Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1207 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123361>.
- [139] F. dos Santos, Determinação de novas substâncias psicoativas em fluido oral, University of Beira Interior, 2015. <https://ubibliorum.ubi.pt/handle/10400.6/6003>.
- [140] T. Rosado, M. Barroso, D.N. Vieira, E. Gallardo, Determination of Selected Opiates in Hair Samples Using Microextraction by Packed Sorbent: A New Approach for

- Sample Clean-up, *J. Anal. Toxicol.* 43 (2019) 465–476. <https://doi.org/10.1093/jat/bkz029>.
- [141] T. Rosado, E. Gallardo, D.N. Vieira, M. Barroso, New miniaturized clean-up procedure for hair samples by means of microextraction by packed sorbent: determination of cocaine and metabolites, *Anal. Bioanal. Chem.* 412 (2020) 7963–7976. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02929-6>.
- [142] R. Boqué, Y. Vander Heyden, The limit of detection, (2009).
- [143] D.A. Armbruster, T. Pry, Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation., *Clin. Biochem. Rev.* 29 Suppl 1 (2008) S49–52.
- [144] E. Bernal, X. Guo, Limit of Detection and Limit of Quantification Determination in Gas Chromatography, IntechOpen, Rijeka, (2014) 3. <https://doi.org/10.5772/57341>.
- [145] Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX), Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology, *J. Anal. Toxicol.* 37 (2013) 452–474. <https://doi.org/10.1093/jat/bkto54>.
- [146] S. Gentili, M. Cornetta, T. Macchia, Rapid screening procedure based on headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for the detection of many recreational drugs in hair., *J. Chromatogr. B, Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 801 (2004) 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.11.034>.
- [147] G. Merola, S. Gentili, F. Tagliaro, T. Macchia, Determination of different recreational drugs in hair by HS-SPME and GC/MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 2987–2995. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3882-6>.
- [148] L. Meng, Y. Dai, C. Chen, J. Zhang, Determination of amphetamines, ketamine and their metabolites in hair with high-speed grinding and solid-phase microextraction followed by LC-MS., *Forensic Sci. Res.* 6 (2021) 273–280. <https://doi.org/10.1080/20961790.2020.1838403>.
- [149] A.S. Barreto, V.F. Brant, E. Spinelli, S. V Rodrigues, Validation of a SPE-LC–MS/MS method for the determination of ketamine and norketamine in micropulverized hair after a single IV dose, *J. Chromatogr. B.* 1033–1034 (2016) 200–209. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.08.027>.
- [150] Y.H. Wu, K.L. Lin, S.C. Chen, Y.Z. Chang, Simultaneous quantitative determination of amphetamines, ketamine, opiates and metabolites in human hair by gas chromatography/mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (2008) 887–897. <https://doi.org/10.1002/rcm.3409>.
- [151] Y.H. Wu, K. Lin, S.C. Chen, Y.Z. Chang, Integration of GC/EI-MS and GC/NCI-MS for simultaneous quantitative determination of opiates, amphetamines, MDMA,

- ketamine, and metabolites in human hair, *J. Chromatogr. B.* 870 (2008) 192–202. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.06.017>.
- [152] M. Sergi, S. Napoletano, C. Montesano, R. Iofrida, R. Curini, D. Compagnone, Pressurized-liquid extraction for determination of illicit drugs in hair by LC-MS-MS., *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 725–735. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6072-x>.
- [153] E. Lendoiro, Ó. Quintela, A. de Castro, A. Cruz, M. López-Rivadulla, M. Concheiro, Target screening and confirmation of 35 licit and illicit drugs and metabolites in hair by LC-MSMS, *Forensic Sci. Int.* 217 (2012) 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.11.006>.

## Anexos

No decorrer desta dissertação foi realizado outro trabalho de investigação à parte, intitulado de “Desenvolvimento e validação para a determinação de canabinóides em flores secas”. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e validação de um método analítico para a determinação de canabinóides (Ácido  $\Delta$ 9-tetra-hidrocanabinólico (THCA),  $\Delta$ 8-tetra-hidrocanabinol (8-THC), Canabinol (CBN), Canabidiol (CBD), Ácido canabidiólico (CBDA), Canabigerol (CBG), Ácido Canabigerólico (CBGA), Ácido Canabicroménico (CBCA) e  $\Delta$ 9-tetra-hidrocanabinol (THC)) em flores secas por cromatografia líquida de elevada eficiência acoplada a um detector de fotodiodos (modelo 1290 Agilent Technologies (Soquímica, Portugal). A coluna utilizada foi de fase reversa Cortes Shield RP18 4,6x150mm, 2,7-Micron (Waters) e respetiva precoluna.

Não sendo este o objetivo principal desta dissertação são descritos a continuação a componente experimental bem como os resultados obtidos. Relativamente às condições cromatográficas após otimização as condições finais são as que se descrevem:

- Composição da Fase Móvel: ácido trifluoroacético 0,1% + acetonitrilo (41:59; v/v)
- Fluxo: 1 mL/min
- Temperatura da coluna: 35°C
- Temperatura do amostrador: 4°C
- Volume de injeção: 20 $\mu$ L
- Comprimento de onda: 228 nm (Application Note, Waters)

Na tabela seguinte (Tabela 1) encontram-se resumidos os diferentes tempos de retenção para os compostos em estudo.

**Tabela 1.** Tempos de retenção obtidos para os compostos em estudo com 59% de ACN na fase móvel.

Proporção e de fase móvel 59% ACN e 41% Ácido trifluoroacético 0,1%		
<b>Analito</b>	<b>Tr (min)</b>	<b>RESOLUÇÃO obtida à concentração de 6.3 ug/mL</b>
CBD	11,95	11,91
CBDA	13	1,05
CBG	13,88	0,88
CBN	17,66	3,78
CBGA	19,17	1,51
THC	20,85	1,68
8-THC	22,57	1,72
THCA-A	32,71	10,14
CBCA	43,81	11,1
KETOPROFENO (padrão interno- IS)	2,07	

## VALIDAÇÃO

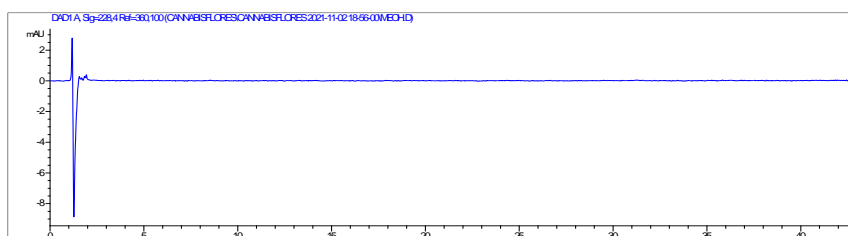
De forma a demonstrar a utilidade e reprodutibilidade do método desenvolvido, procedeu-se à sua validação de acordo com os critérios de validação dos métodos bioanalíticos apresentados pela *Food and Drug Administration* (<https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>) e pela *European Medicines Agency* ([https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf)). Escolheram-se estas duas *guidelines* uma vez que a Farmacopeia Alemã (Parte oficial, 24.4.2018 B5, Publicado quarta-feira, 24 de abril de 2018) não indica concretamente como se procede à validação e quais os valores permitidos em cada parâmetro. Para isso, foram avaliados os parâmetros de especificidade, linearidade, limite de deteção, limite de quantificação, reprodutibilidade, repetibilidade, exatidão, recuperação e estabilidade para os analitos em estudo (em amostra de flores secas).

### 1. Especificidade

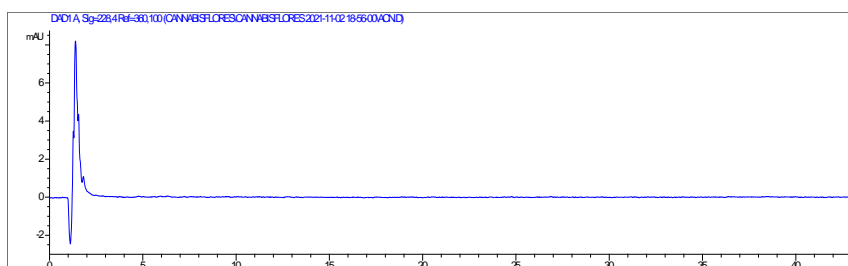
A especificidade é caracterizada pela capacidade de identificar e diferenciar os analitos de interesse na presença de outros componentes na amostra, como metabolitos, xenobióticos, outros fármacos em uso concomitante, produtos de decomposição ou componentes

endógenos da matriz. O método foi considerado específico uma vez que a resposta obtida no cromatograma do branco de reagente (metanol e fase móvel; Figura 1) tem um sinal inferior a 20% comparado com o sinal dos analitos (100µg/mL; Figura 2) e um sinal inferior a 5% para o padrão interno (Figura 2). Foi também comparada com amostras de flores secas previamente extraídas.

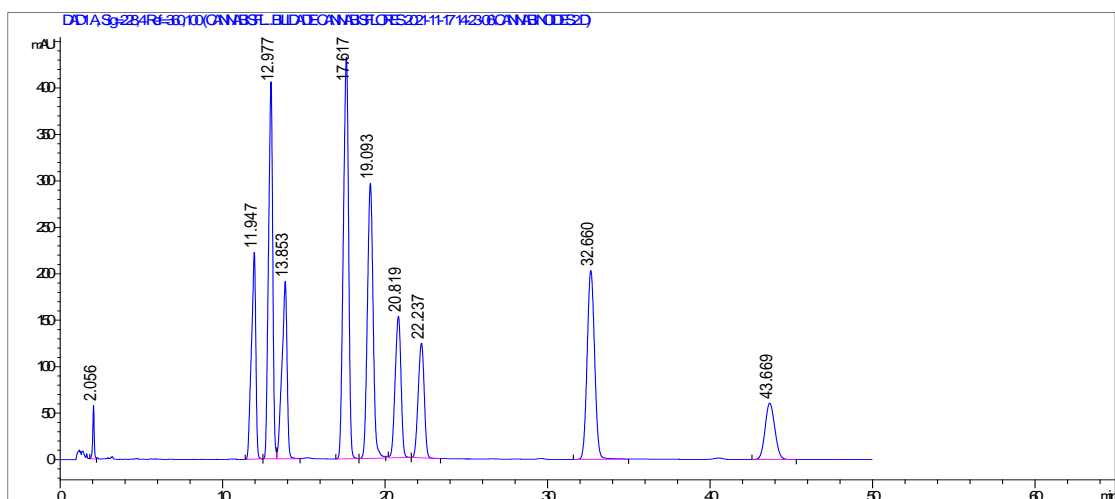
## MeOH



## ACN



**Figura 1.** Cromatogramas relativos a uma injeção de branco de reagente (Metanol e ACN).



**Figura 2.** Cromatograma relativo aos analitos em estudo à concentração de 100 µg/mL.

## 2. Linearidade e curva de calibração

Foi estudada a linearidade (n=5) utilizando concentrações crescentes de cada analito. Pode também ser definida como a função que descreve a resposta do detetor numa determinada gama de concentrações, tendo como finalidade prever a concentração do analito numa amostra de concentração desconhecida. Para que este parâmetro seja aceite, os valores obtidos para cada concentração (erro relativo médio ou BIAS) devem estar incluídos entre  $\pm 15\%$  da concentração teórica, exceto para o LLOQ em que a variação pode ser até  $\pm 20\%$ . Para cada analito foram utilizados como mínimo seis calibradores distribuídos uniformemente numa gama de concentrações entre 0,4 a 100  $\mu\text{g/mL}$  para todos os compostos em estudo exceto para o CBN que foi de 0,1 a 100  $\mu\text{g/mL}$ , para o THCA que foi de 0,4 a 250  $\mu\text{g/mL}$  e para o CBCA que foi de 0,8 to 100  $\mu\text{g/mL}$ . Foram preparados um mínimo de Quality Control Samples (QCs), cada um em triplicado (n=3), em concentrações baixas, intermédias e altas. Os QCs permitem validar cada corrida individualmente para que se possam os utilizar os dados recolhidos, mas também permitiram avaliar a robustez do método. Foram estudados 4 QCs para todos os compostos de estudo exceto, tendo em conta o intervalo de linearidade, para o CBN e THCA onde foram estudados 5 e para o CBCA onde foram estudados 3. Valores de BIAS para LLOQ inferior a  $\pm 20\%$  e inferior a  $\pm 15\%$  para os restantes pontos da reta de calibração foram considerados como critérios de aceitação (Tabela 2).

**Tabela 2.** Dados relacionados com o estudo da linearidade

CBD				dia 1	dia 2	dia 3	dia 4	dia 5	média	Desvio padrão
Intervalo de linearidade (µg/mL)	Ponderação	LOD/LLOQ (µg/mL)	Ordenada na origem							
0,4-100	1/x	0,4	Declive	0,0014	0,0010	-0,0086	-0,0123	-0,0106	-0,0058	0,0065
			R <sup>2</sup>	0,1185	0,0938	0,0918	0,1504	0,1483	0,1206	0,0283
				0,9995	0,9984	0,9990	0,9990	0,9989	0,9990	0,0004
CBDA				dia 1	dia 2	dia 3	dia 4	dia 5	média	Desvio padrão
Intervalo de linearidade (µg/mL)	Ponderação	LOD/LLOQ (µg/mL)	Ordenada na origem							
0,4-100	1/x	0,4	Declive	0,0070	-0,0067	-0,0144	-0,0211	-0,0197	-0,0110	0,0115
			R <sup>2</sup>	0,1994	0,1618	0,1540	0,2298	0,2311	0,1952	0,0364
				0,9988	0,9986	0,9980	0,9989	0,9989	0,9986	0,0004
CBG				dia 1	dia 2	dia 3	dia 4	dia 5	média	Desvio padrão
Intervalo de linearidade (µg/mL)	Ponderação	LOD/LLOQ (µg/mL)	Ordenada na origem							
0,4-100	1/x	0,4	Declive	0,0027	-0,0025	-0,0110	-0,0138	-0,0133	-0,0076	0,0073
			R <sup>2</sup>	0,1095	0,0927	0,0903	0,1503	0,1561	0,1198	0,0315
				0,9992	0,9985	0,9985	0,9990	0,9944	0,9979	0,0020
CBN				dia 1	dia 2	dia 3	dia 4	dia 5	média	Desvio padrão
Intervalo de linearidade (µg/mL)	Ponderação	LOD/LLOQ (µg/mL)	Ordenada na origem							
0,1-100	1/x	0,1	Declive	0,0091	-0,0016	-0,0098	-0,0111	-0,0163	-0,0059	0,0099
			R <sup>2</sup>	0,2718	0,2052	0,2064	0,3451	0,3605	0,2778	0,0738
				0,9990	0,9972	0,9983	0,9990	0,9986	0,9984	0,0007
CBGA				dia 1	dia 2	dia 3	dia 4	dia 5	média	Desvio padrão
Intervalo de linearidade (µg/mL)	Ponderação	LOD/LLOQ (µg/mL)	Ordenada na origem							
0,4-100	1/x	0,4	Declive	0,0071	-0,0092	-0,0200	-0,0254	-0,0234	-0,0142	0,0134
			R <sup>2</sup>	0,1997	0,1658	0,1600	0,2312	0,2361	0,1986	0,0355
				0,9987	0,9986	0,9984	0,9987	0,9991	0,9987	0,0003
THC				dia 1	dia 2	dia 3	dia 4	dia 5	média	Desvio padrão
Intervalo de linearidade (µg/mL)	Ponderação	LOD/LLOQ (µg/mL)	Ordenada na origem							
0,4-100	1/x	0,4	Declive	0,0060	0,0044	-0,0107	-0,0131	-0,0162	-0,0059	0,0104
			R <sup>2</sup>	0,1043	0,0836	0,0858	0,1411	0,1445	0,1119	0,0294
				0,9989	0,9982	0,9986	0,9989	0,9993	0,9988	0,0004
8-THC				dia 1	dia 2	dia 3	dia 4	dia 5	média	Desvio padrão
Intervalo de linearidade (µg/mL)	Ponderação	LOD/LLOQ (µg/mL)	Ordenada na origem							
0,4-100	1/x	0,4	Declive	0,0012	-0,0028	-0,0091	-0,0079	-0,0116	-0,0059	0,0104
			R <sup>2</sup>	0,0929	0,0754	0,0736	0,1202	0,1255	0,1119	0,0294
				0,9996	0,9985	0,9987	0,9990	0,9990	0,9988	0,0004
THCA				dia 1	dia 2	dia 3	dia 4	dia 5	média	Desvio padrão
Intervalo de linearidade (µg/mL)	Ponderação	LOD/LLOQ (µg/mL)	Ordenada na origem							
0,4-250	1/x	0,4	Declive	0,0229	0,0179	-0,0603	0,0177	0,0198	-0,0060	0,0052
			R <sup>2</sup>	0,1671	0,1441	0,1549	0,1970	0,2059	0,0975	0,0244
				0,9966	0,9993	0,9980	0,9937	0,9957	0,9989	0,0004
CBCA				dia 1	dia 2	dia 3	dia 4	dia 5	média	Desvio padrão
Intervalo de linearidade (µg/mL)	Ponderação	LOD/LLOQ (µg/mL)	Ordenada na origem							
0,4-100	1/x	0,4	Declive	0,0015	-0,0018	-0,0153	-0,0104	-0,0197	0,0036	0,0358
			R <sup>2</sup>	0,0694	0,0541	0,0538	0,0803	0,0845	0,1738	0,0267
				0,999338	0,998144	0,998759	0,99903	0,998461	0,9967	0,0021

### 3. Limites de deteção e quantificação

De acordo com a definição apresentada pela FDA, o limite de deteção (LOD) é a concentração mais baixa de analito que se consegue detetar pelo método bioanalítico utilizado com sinal, pelo menos, três vezes superior ao sinal de ruído. A concentração mínima de analito quantificável que apresente os critérios de precisão e exatidão adequados, ou seja, que apresente coeficiente de variação (CV) inferior a 20% e BIAS entre  $\pm 20\%$ , define-se como limite inferior de quantificação (LLOQ). O LOD foi avaliado experimentalmente até obter um sinal ruído 3,3 vezes superior ao sinal obtido no branco de reagentes. Foi avaliado o CV após a análise de 6 injeções independentes. O valor do

LOD foi considerado igual ao do LLOQ. Os valores dos limites foram de 0,1 µg/mL para o CBN, 0,8 µg/mL para o CBCA e 0,4 µg/mL para os restantes compostos.

#### 4. Precisão e exatidão

A exatidão descreve o grau de proximidade entre as médias dos resultados obtidos com o método e o verdadeiro valor de concentração dos analitos na amostra, sendo expressa através dos valores do *BIAS*. Estes devem estar compreendidos entre  $\pm 15\%$  do valor nominal, ou  $\pm 20\%$  se for o LLOQ. A precisão expressa o grau de concordância entre medições individuais de um analito, quando o procedimento é aplicado de forma repetida a múltiplas alíquotas de um único volume homogéneo da matriz. Este parâmetro é avaliado através do CV. Os valores de CV devem ser inferiores a 15% para todas as concentrações exceto para o LLOQ que deve ser de 20%.

No decorrer da validação foram estudadas a precisão intradia (repetibilidade), precisão interdia (reprodutibilidade) e ainda a precisão intermédia. A precisão intradia avalia a repetibilidade dos resultados do método sob as mesmas condições de preparação (por exemplo dia, equipamento e laboratório, operador). A precisão interdia, ou reprodutibilidade, envolve a variação de certas condições previamente definidas, tais como: diferentes dias, analistas ou equipamentos. A precisão intermédia permite avaliar se o método é afetado pelo analista, material utilizado, reagentes ou laboratório, isto é a robustez. Para isso, realizaram-se trinta e seis réplicas de cada QC em dias diferentes e por analistas diferentes. Na tabela 3 apresentam-se os dados relativos à precisão intradia para todos os compostos de estudo.

**Tabela 3.** Dados relativos à precisão e exatidão intradia para todos os compostos de estudo.

#### CBD

C (µg/mL)	A Comp	A IS	AR	Cal (ug/mL)	BIAS
0,4	17,7	353,5	0,050071	0,414534	3,6%
0,4	16,4	362	0,045304	0,38285	-4,3%
0,4	17,9	379,7	0,047142	0,39507	-1,2%
0,4	16,9	365,1	0,046289	0,389395	-2,7%
0,4	17,4	365,5	0,047606	0,398152	-0,5%
Média	17,26	365,16	0,047282	0,396	
SD	0,610737	9,453465	0,001789	0,011891	
CV	3,5%	2,6%	3,8%	3,0%	
C (µg/mL)	A Comp	A IS	AR	Cal (ug/mL)	BIAS
1	49,5	383,5	0,129074	0,939657	-6,0%
1	54,6	389,5	0,14018	1,013473	1,3%

1	47,3	394,8	0,119807	0,878062	-12,2%
1	51,7	373	0,138606	1,003012	0,3%
1	43,6	358,5	0,121618	0,890095	-11,0%
Média	49,34	379,86	0,129857	0,94486	
SD	4,194401	14,4282	0,009389	0,062405	
CV	8,5%	3,8%	7,2%	<b>6,6%</b>	
<b>C (µg/mL)</b>	<b>A Comp</b>	<b>A IS</b>	<b>AR</b>	<b>Cal (ug/mL)</b>	<b>BIAS</b>
50	2590	379,4	6,826568	45,45675	-9,1%
50	2517,1	341,6	7,36856	49,05928	-1,9%
50	2522	347,3	7,261733	48,34922	-3,3%
50	2158,2	306,2	7,048334	46,93079	-6,1%
50	2933,7	396,1	7,406463	49,31121	-1,4%
Média	2544,2	354,12	7,182332	47,82145	
SD	275,6951	35,00353	0,242767	1,613631	
CV	10,8%	9,9%	3,4%	<b>3,4%</b>	
<b>C (µg/mL)</b>	<b>A Comp</b>	<b>A IS</b>	<b>AR</b>	<b>Cal (ug/mL)</b>	<b>BIAS</b>
100	4951,8	348	14,22931	94,66151	-5,3%
100	4961,2	350,3	14,16272	94,21888	-5,8%
100	4699,6	272,6	17,23991	114,6725	14,7%
100	4513	270,5	16,68392	110,9769	11,0%
100	4748,6	324,7	14,62458	97,28878	-2,7%
Média	4774,84	313,22	15,38809	102,3637	
SD	187,7197	39,34256	1,460794	9,709648	
CV	3,9%	12,6%	9,5%	<b>9,5%</b>	

#### CBCA

<b>C (µg/mL)</b>	<b>A Comp</b>	<b>A IS</b>	<b>AR</b>	<b>Cal (ug/mL)</b>	<b>BIAS</b>
0,4	29,1	353,5	0,08232	0,450244	12,6%
0,4	26,7	362	0,073757	0,412978	3,2%
0,4	28,8	379,7	0,075849	0,422084	5,5%
0,4	28,8	365,1	0,078882	0,435285	8,8%
0,4	28,3	365,5	0,077428	0,428956	7,2%
Média	28,34	365,16	0,077647	0,429909	
SD	0,960729	9,453465	0,003232	0,014064	
CV	3,4%	2,6%	4,2%	<b>3,3%</b>	
<b>C (µg/mL)</b>	<b>A Comp</b>	<b>A IS</b>	<b>AR</b>	<b>Cal (ug/mL)</b>	<b>BIAS</b>
1	86,2	383,5	0,224772	1,07021	7,0%
1	93,9	389,5	0,241078	1,141178	14,1%
1	81,2	394,8	0,205674	0,987094	-1,3%
1	83,3	373	0,223324	1,063911	6,4%
1	66,6	358,5	0,185774	0,900488	-10,0%
Média	82,24	379,86	0,216124	1,032576	

SD	9,980631	14,4282	0,021093	0,091799	
CV	12,1%	3,8%	9,8%	<b>8,9%</b>	
<b>C (µg/mL)</b>	<b>A Comp</b>	<b>A IS</b>	<b>AR</b>	<b>Cal (ug/mL)</b>	<b>BIAS</b>
50	3956	379,4	10,42699	45,47132	-9,1%
50	3845,4	341,6	11,25703	49,08372	-1,8%
50	3852,8	347,3	11,09358	48,37238	-3,3%
50	3301	306,2	10,78054	47,00999	-6,0%
50	4485,1	396,1	11,32315	49,3715	-1,3%
Média	3888,06	354,12	10,97626	47,86178	
SD	420,9439	35,00353	0,371797	1,618099	
CV	10,8%	9,9%	3,4%	<b>3,4%</b>	
<b>C (µg/mL)</b>	<b>A Comp</b>	<b>A IS</b>	<b>AR</b>	<b>Cal (ug/mL)</b>	<b>BIAS</b>
100	7578,6	348	21,77759	94,87029	-5,1%
100	7590,3	350,3	21,668	94,39335	-5,6%
100	7195,4	272,6	26,39545	114,9677	15,0%
100	6845,2	270,5	25,30573	110,2251	10,2%
100	7265,9	324,7	22,37727	97,48018	-2,5%
Média	7295,08	313,22	23,50481	102,3873	
SD	308,5118	39,34256	2,192467	9,541842	
CV	4,2%	12,6%	9,3%	<b>9,3%</b>	

#### CBG

<b>C (µg/mL)</b>	<b>A Comp</b>	<b>A IS</b>	<b>AR</b>	<b>Cal (ug/mL)</b>	<b>BIAS</b>
0,4	17	353,5	0,048091	0,411561	2,9%
0,4	16,5	362	0,04558	0,394861	-1,3%
0,4	16,6	379,7	0,043719	0,382479	-4,4%
0,4	19,3	365,1	0,052862	0,443304	10,8%
0,4	19,3	365,5	0,052804	0,442919	10,7%
Média	17,74	365,16	0,048611	0,415025	
SD	1,436315	9,453465	0,004155	0,027639	
CV	8,1%	2,6%	8,5%	<b>6,7%</b>	
<b>C (µg/mL)</b>	<b>A Comp</b>	<b>A IS</b>	<b>AR</b>	<b>Cal (ug/mL)</b>	<b>BIAS</b>
1	48,8	383,5	0,127249	0,93814	-6,2%
1	53,3	389,5	0,136842	1,001956	0,2%
1	46,5	394,8	0,117781	0,875158	-12,5%
1	51,3	373	0,137534	1,006555	0,7%
1	42,5	358,5	0,11855	0,880269	-12,0%
Média	48,48	379,86	0,127591	0,940416	
SD	4,212125	14,4282	0,00952	0,06333	
CV	8,7%	3,8%	7,5%	<b>6,7%</b>	
<b>C (µg/mL)</b>	<b>A Comp</b>	<b>A IS</b>	<b>AR</b>	<b>Cal (ug/mL)</b>	<b>BIAS</b>
50	2580,5	379,4	6,801529	45,33686	-9,3%

50	2516,1	341,6	7,365632	49,0894	-1,8%
50	2519,7	347,3	7,255111	48,35419	-3,3%
50	2158,9	306,2	7,050621	46,99387	-6,0%
50	2932,4	396,1	7,403181	49,33918	-1,3%
Média	2541,52	354,12	7,175215	47,8227	
SD	274,6939	35,00353	0,249888	1,662307	
CV	10,8%	9,9%	3,5%	<b>3,5%</b>	
<b>C (µg/mL)</b>	<b>A Comp</b>	<b>A IS</b>	<b>AR</b>	<b>Cal (ug/mL)</b>	<b>BIAS</b>
100	4955	348	14,23851	94,80921	-5,2%
100	4963,2	350,3	14,16843	94,34303	-5,7%
100	4483,4	272,6	16,44681	109,4993	9,5%
100	4219,3	270,5	15,59815	103,8539	3,9%
100	4749,2	324,7	14,62642	97,38973	-2,6%
Média	4674,02	313,22	15,01566	99,97903	
SD	320,6763	39,34256	0,982441	6,535404	
CV	6,9%	12,6%	6,5%	<b>6,5%</b>	

#### CBN

<b>C (µg/mL)</b>	<b>A Comp</b>	<b>A IS</b>	<b>AR</b>	<b>Cal (ug/mL)</b>	<b>BIAS</b>
0,1	10,2	352,6	0,028928	0,11595	16,0%
0,1	9,7	354,8	0,027339	0,111347	11,3%
0,1	9,5	338	0,028107	0,11357	13,6%
0,1	9,1	358,3	0,025398	0,10572	5,7%
0,1	8,4	337,4	0,024896	0,104267	4,3%
Média	9,38	348,22	0,026934	0,110171	
SD	0,676018	9,818452	0,001734	0,005025	
CV	7,2%	2,8%	6,4%	<b>4,6%</b>	
<b>C (µg/mL)</b>	<b>A Comp</b>	<b>A IS</b>	<b>AR</b>	<b>Cal (ug/mL)</b>	<b>BIAS</b>
0,4	41	353,5	0,115983	0,368236	-7,9%
0,4	38,3	362	0,105801	0,338729	-15,3%
0,4	40,2	379,7	0,105873	0,338937	-15,3%
0,4	39,5	365,1	0,10819	0,34565	-13,6%
0,4	41,5	365,5	0,113543	0,361165	-9,7%
Média	40,1	365,16	0,109878	0,350544	
SD	1,262933	9,453465	0,004643	0,013454	
CV	3,1%	2,6%	4,2%	<b>3,8%</b>	
<b>C (µg/mL)</b>	<b>A Comp</b>	<b>A IS</b>	<b>AR</b>	<b>Cal (ug/mL)</b>	<b>BIAS</b>
1	113,9	383,5	0,297001	0,892827	-10,7%
1	126,9	389,5	0,325802	0,976292	-2,4%
1	112,7	394,8	0,285461	0,859383	-14,1%
1	116	373	0,310992	0,933372	-6,7%
1	104,6	358,5	0,291771	0,87767	-12,2%

Média	114,82	379,86	0,302206	0,907909	
SD	8,017294	14,4282	0,016205	0,046961	
CV	7,0%	3,8%	5,4%	<b>5,2%</b>	
<b>C (µg/mL)</b>	<b>A Comp</b>	<b>A IS</b>	<b>AR</b>	<b>Cal (ug/mL)</b>	<b>BIAS</b>
50	5957	379,4	15,70111	45,53393	-8,9%
50	5780,2	341,6	16,92096	49,06907	-1,9%
50	5802,5	347,3	16,70746	48,45034	-3,1%
50	4957,7	306,2	16,19105	46,95379	-6,1%
50	6740,1	396,1	17,01616	49,34495	-1,3%
Média	5847,5	354,12	16,50735	47,87042	
SD	633,8421	35,00353	0,552285	1,600522	
CV	10,8%	9,9%	3,3%	<b>3,3%</b>	
<b>C (µg/mL)</b>	<b>A Comp</b>	<b>A IS</b>	<b>AR</b>	<b>Cal (ug/mL)</b>	<b>BIAS</b>
100	11377	348	32,69253	94,77508	-5,2%
100	11393	350,3	32,52355	94,28539	-5,7%
100	10835,1	272,6	39,74725	115,2197	15,2%
100	10652,8	270,5	39,38189	114,1608	14,2%
100	10903,6	324,7	33,58054	97,34853	-2,7%
Média	11032,3	313,22	35,58515	103,1579	
SD	334,8113	39,34256	3,657095	10,59826	
CV	3,0%	12,6%	10,3%	<b>10,3%</b>	

#### CBGA

<b>C (µg/mL)</b>	<b>A Comp</b>	<b>A IS</b>	<b>AR</b>	<b>Cal (ug/mL)</b>	<b>BIAS</b>
0,4	28,7	353,5	0,081188	0,461187	15,3%
0,4	27,6	362	0,076243	0,439799	9,9%
0,4	28,4	379,7	0,074796	0,43354	8,4%
0,4	26,4	365,1	0,072309	0,422783	5,7%
0,4	27,9	365,5	0,076334	0,440191	10,0%
Média	27,8	365,16	0,076174	0,4395	
SD	0,891628	9,453465	0,003241	0,014017	
CV	3,2%	2,6%	4,3%	<b>3,2%</b>	
<b>C (µg/mL)</b>	<b>A Comp</b>	<b>A IS</b>	<b>AR</b>	<b>Cal (ug/mL)</b>	<b>BIAS</b>
1	84,4	383,5	0,220078	1,061916	6,2%
1	92,1	389,5	0,236457	1,132757	13,3%
1	83,7	394,8	0,212006	1,027002	2,7%
1	83,2	373	0,223056	1,074797	7,5%
1	61,2	358,5	0,170711	0,848394	-15,2%
Média	80,92	379,86	0,212462	1,028973	
SD	11,6072	14,4282	0,024947	0,107899	
CV	14,3%	3,8%	11,7%	<b>10,5%</b>	
<b>C (µg/mL)</b>	<b>A Comp</b>	<b>A IS</b>	<b>AR</b>	<b>Cal (ug/mL)</b>	<b>BIAS</b>

50	3993,8	379,4	10,52662	45,63986	-8,7%
50	3883,6	341,6	11,36885	49,28268	-1,4%
50	3888,1	347,3	11,19522	48,53169	-2,9%
50	3319	306,2	10,83932	46,99235	-6,0%
50	4522,1	396,1	11,41656	49,48903	-1,0%
Média	3921,32	354,12	11,06932	47,98712	
SD	427,6405	35,00353	0,378672	1,637834	
CV	10,9%	9,9%	3,4%	<b>3,4%</b>	
<b>C (µg/mL)</b>	<b>A Comp</b>	<b>A IS</b>	<b>AR</b>	<b>Cal (ug/mL)</b>	<b>BIAS</b>
100	7654,2	348	21,99483	95,24224	-4,8%
100	7637,1	350,3	21,8016	94,40648	-5,6%
100	7090,7	272,6	26,01137	112,6146	12,6%
100	6977,5	270,5	25,79482	111,678	11,7%
100	7342,1	324,7	22,61195	97,91142	-2,1%
Média	7340,32	313,22	23,64291	102,3706	
SD	308,444	39,34256	2,086254	9,023484	
CV	4,2%	12,6%	8,8%	<b>8,8%</b>	

#### THC

<b>C (µg/mL)</b>	<b>A Comp</b>	<b>A IS</b>	<b>AR</b>	<b>Cal (ug/mL)</b>	<b>BIAS</b>
0,4	16,8	353,5	0,047525	0,430017	7,5%
0,4	15	362	0,041436	0,38686	-3,3%
0,4	16,6	379,7	0,043719	0,403038	0,8%
0,4	18	365,1	0,049302	0,442612	10,7%
0,4	15,4	365,5	0,042134	0,391805	-2,0%
Média	16,36	365,16	0,044823	0,410866	
SD	1,19499	9,453465	0,003438	0,02437	
CV	7,3%	2,6%	7,7%	<b>5,9%</b>	
<b>C (µg/mL)</b>	<b>A Comp</b>	<b>A IS</b>	<b>AR</b>	<b>Cal (ug/mL)</b>	<b>BIAS</b>
1	45,6	383,5	0,118905	0,936001	-6,4%
1	49,1	389,5	0,126059	0,986714	-1,3%
1	42,4	394,8	0,107396	0,854421	-14,6%
1	43,6	373	0,11689	0,921719	-7,8%
1	38,6	358,5	0,107671	0,856368	-14,4%
Média	43,86	379,86	0,115384	0,911045	
SD	3,884327	14,4282	0,007936	0,056255	
CV	8,9%	3,8%	6,9%	<b>6,2%</b>	
<b>C (µg/mL)</b>	<b>A Comp</b>	<b>A IS</b>	<b>AR</b>	<b>Cal (ug/mL)</b>	<b>BIAS</b>
50	2471,2	379,4	6,513442	46,26425	-7,5%
50	2400,2	341,6	7,026347	49,90001	-0,2%
50	2405	347,3	6,924849	49,18054	-1,6%
50	2017	306,2	6,587198	46,78707	-6,4%

50	2799	396,1	7,066397	50,18392	0,4%
Média	2418,48	354,12	6,823647	48,46316	
SD	278,0634	35,00353	0,256121	1,815536	
CV	11,5%	9,9%	3,8%	3,7%	
<b>C (µg/mL)</b>	<b>A Comp</b>	<b>A IS</b>	<b>AR</b>	<b>Cal (ug/mL)</b>	<b>BIAS</b>
100	4715,7	348	13,55086	96,14962	-3,9%
100	4638,5	350,3	13,24151	93,95673	-6,0%
100	4270	272,6	15,66398	111,1286	11,1%
100	4401,6	270,5	16,27209	115,4393	15,4%
100	4523	324,7	13,92978	98,83562	-1,2%
Média	4509,76	313,22	14,53164	103,102	
SD	179,1257	39,34256	1,350921	9,576123	
CV	4,0%	12,6%	9,3%	9,3%	

### 8-THC

<b>C (µg/mL)</b>	<b>A Comp</b>	<b>A IS</b>	<b>AR</b>	<b>Cal (ug/mL)</b>	<b>BIAS</b>
0,4	13,7	353,5	0,038755	0,388504	-2,9%
0,4	13	362	0,035912	0,364838	-8,8%
0,4	15,2	379,7	0,040032	0,399125	-0,2%
0,4	15,7	365,1	0,043002	0,423845	6,0%
0,4	13,6	365,5	0,037209	0,375638	-6,1%
Média	14,24	365,16	0,038982	0,39039	
SD	1,150217	9,453465	0,002733	0,022746	
CV	8,1%	2,6%	7,0%	5,8%	
<b>C (µg/mL)</b>	<b>A Comp</b>	<b>A IS</b>	<b>AR</b>	<b>Cal (ug/mL)</b>	<b>BIAS</b>
1	41,1	383,5	0,107171	0,957865	-4,2%
1	42,5	389,5	0,109114	0,974039	-2,6%
1	38	394,8	0,096251	0,866992	-13,3%
1	37,6	373	0,100804	0,904882	-9,5%
1	33,7	358,5	0,094003	0,84828	-15,2%
Média	38,58	379,86	0,101469	0,910411	
SD	3,421549	14,4282	0,006602	0,054947	
CV	8,9%	3,8%	6,5%	6,0%	
<b>C (µg/mL)</b>	<b>A Comp</b>	<b>A IS</b>	<b>AR</b>	<b>Cal (ug/mL)</b>	<b>BIAS</b>
50	2103,8	379,4	5,545071	46,21266	-7,6%
50	2038,6	341,6	5,967799	49,73065	-0,5%
50	2047,6	347,3	5,895767	49,1312	-1,7%
50	1711,8	306,2	5,590464	46,59043	-6,8%
50	2377,8	396,1	6,00303	50,02384	0,0%
Média	2055,92	354,12	5,800426	48,33776	
SD	237,0058	35,00353	0,216473	1,801511	
CV	11,5%	9,9%	3,7%	3,7%	

<b>C (µg/mL)</b>	<b>A Comp</b>	<b>A IS</b>	<b>AR</b>	<b>Cal (ug/mL)</b>	<b>BIAS</b>
100	4013,7	348	11,53362	96,05003	-3,9%
100	3939,1	350,3	11,24493	93,64753	-6,4%
100	3677,4	272,6	13,4901	112,332	12,3%
100	3690,3	270,5	13,64251	113,6005	13,6%
100	3849	324,7	11,85402	98,71642	-1,3%
Média	3833,9	313,22	12,35304	102,8693	
SD	148,9432	39,34256	1,129603	9,400677	
CV	3,9%	12,6%	9,1%	<b>9,1%</b>	

#### THCA

<b>C (µg/mL)</b>	<b>A Comp</b>	<b>A IS</b>	<b>AR</b>	<b>Cal (ug/mL)</b>	<b>BIAS</b>
0,4	30,7	353,5	0,086846	0,350776	-12,3%
0,4	32,4	362	0,089503	0,364262	-8,9%
0,4	33,4	379,7	0,087964	0,356452	-10,9%
0,4	30,7	365,1	0,084087	0,336771	-15,8%
0,4	31	365,5	0,084815	0,34047	-14,9%
Média	31,64	365,16	0,086643	0,349746	-0,12563
SD	1,209545	9,453465	0,002227	0,011304	0,02826
CV	3,8%	2,6%	2,6%	3,2%	-22,5%
<b>C (µg/mL)</b>	<b>A Comp</b>	<b>A IS</b>	<b>AR</b>	<b>Cal (ug/mL)</b>	<b>BIAS</b>
1	76,1	383,5	0,198435	0,917153	-8,3%
1	83,9	389,5	0,215404	1,003279	0,3%
1	76	394,8	0,192503	0,88704	-11,3%
1	73,5	373	0,197051	0,910125	-9,0%
1	68,9	358,5	0,19219	0,885452	-11,5%
Média	75,68	379,86	0,199117	0,92061	
SD	5,444447	14,4282	0,00951	0,048268	
CV	7,2%	3,8%	4,8%	<b>5,2%</b>	
<b>C (µg/mL)</b>	<b>A Comp</b>	<b>A IS</b>	<b>AR</b>	<b>Cal (ug/mL)</b>	<b>BIAS</b>
50	3690,5	379,4	9,727201	49,28068	-1,4%
50	3574	341,6	10,46253	53,01286	6,0%
50	3590	347,3	10,33688	52,37514	4,8%
50	3060,2	306,2	9,994121	50,63544	1,3%
50	4174,3	396,1	10,5385	53,39845	6,8%
Média	3617,8	354,12	10,21185	51,74051	
SD	396,4173	35,00353	0,341857	1,735105	
CV	11,0%	9,9%	3,3%	<b>3,4%</b>	
<b>C (µg/mL)</b>	<b>A Comp</b>	<b>A IS</b>	<b>AR</b>	<b>Cal (ug/mL)</b>	<b>BIAS</b>
100	7059,2	348	20,28506	102,8674	2,9%
100	7075,9	350,3	20,19954	102,4334	2,4%
100	6117,5	272,6	22,44131	113,8115	13,8%

100	6016,4	270,5	22,24177	112,7988	12,8%
100	6765,8	324,7	20,83708	105,6692	5,7%
Média	6606,96	313,22	21,20095	107,516	
SD	509,4085	39,34256	1,0719	5,440457	
CV	7,7%	12,6%	5,1%	<b>5,1%</b>	
<b>C (µg/mL)</b>	<b>A Comp</b>	<b>A IS</b>	<b>AR</b>	<b>Cal (ug/mL)</b>	<b>BIAS</b>
250	15724,5	376,3	41,78714	212,0018	-15,2%
250	15717,2	374,7	41,94609	212,8086	-14,9%
250	19163,9	392,8	48,78793	247,5346	-1,0%
250	19294,2	388,6	49,65054	251,9127	0,8%
250	15500,7	345	44,92957	227,9513	-8,8%
Média	17080,1	375,48	45,42025	230,4418	
SD	1964,314	18,7245	3,699551	18,77718	
CV	11,5%	5,0%	8,1%	<b>8,1%</b>	

#### CBCA

<b>C (µg/mL)</b>	<b>A Comp</b>	<b>A IS</b>	<b>AR</b>	<b>Cal (ug/mL)</b>	<b>BIAS</b>
1	29,2	383,5	0,076141	1,078617	7,9%
1	30,4	389,5	0,078049	1,102384	10,2%
1	29,8	394,8	0,075481	1,070401	7,0%
1	28,5	373	0,076408	1,081939	8,2%
1	20,1	358,5	0,056067	0,828563	-17,1%
Média	27,6	379,86	0,072429	1,032381	
SD	4,25147	14,4282	0,009195	0,114544	
CV	15,4%	3,8%	12,7%	<b>11,1%</b>	
<b>C (µg/mL)</b>	<b>A Comp</b>	<b>A IS</b>	<b>AR</b>	<b>Cal (ug/mL)</b>	<b>BIAS</b>
50	1365,2	379,4	3,598313	44,95321	-10,1%
50	1332,3	341,6	3,900176	48,71342	-2,6%
50	1330,5	347,3	3,830982	47,85149	-4,3%
50	1146	306,2	3,742652	46,75119	-6,5%
50	1551,8	396,1	3,917698	48,93168	-2,1%
Média	1345,16	354,12	3,797964	47,4402	
SD	144,1758	35,00353	0,131143	1,633601	
CV	10,7%	9,9%	3,5%	<b>3,4%</b>	
<b>C (µg/mL)</b>	<b>A Comp</b>	<b>A IS</b>	<b>AR</b>	<b>Cal (ug/mL)</b>	<b>BIAS</b>
100	2632	348	7,563218	94,34279	-5,7%
100	2640,6	350,3	7,53811	94,03003	-6,0%
100	2377,6	272,6	8,721937	108,7766	8,8%
100	2340,3	270,5	8,651756	107,9024	7,9%
100	2528	324,7	7,785648	97,11353	-2,9%
Média	2503,7	313,22	8,052134	100,4331	
SD	139,9944	39,34256	0,587889	7,323154	

CV	5,6%	12,6%	7,3%	7,3%	
----	------	-------	------	------	--

Acomp: área composto; AIS: área padrão interno; AR: área relativa; C: Concentração; Cal: Concentração calculada; CV: Coeficiente de variação; SD: desvio padrão.

Nas tabelas 4 e 5 apresentam-se os dados relativos à precisão interdia e intermedia, respectivamente, para os compostos em estudo.

**Tabela 4.** Dados relativos à precisão e exatidão interdia (n=5).

### CBD

Concentração(µg/mL)	concentração calculada (µg/mL)						Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	Bias (%)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média			
0,4	0,39	0,42	0,45	0,40	0,40	0,41	0,022695	5,52	2,77
0,8	0,81	0,68	0,81	0,85	0,83	0,80	0,068681	8,63	-0,56
1,6	1,42	1,44	1,57	1,78	1,76	1,60	0,171433	10,74	-0,28
3,1	3,16	3,20	3,00	2,72	2,71	2,96	0,233306	7,89	-4,60
6,3	6,01	7,16	5,56	5,69	5,88	6,06	0,637786	10,53	-3,83
12,5	13,15	12,56	11,55	11,97	11,95	12,24	0,625986	5,12	-2,10
25	25,77	25,22	25,45	24,84	24,68	25,19	0,445624	1,77	0,76
50	50,12	47,60	51,00	50,03	47,89	49,33	1,498231	3,04	-1,34
100	98,77	101,33	100,22	101,33	100,75	100,48	1,060107	1,06	0,48

### CBDA

Concentração (µg/mL)	concentração calculada (µg/mL)						Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	Bias (%)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média			
0,4	0,37	0,40	0,45	0,41	0,42	0,409049	0,028149	6,88	2,26
0,8	0,80	0,71	0,84	0,84	0,85	0,809786	0,05871	7,25	1,22
1,6	1,43	1,48	1,58	1,78	1,79	1,610048	0,16685	10,36	0,63
3,1	3,19	3,20	2,66	2,72	2,73	2,900874	0,272668	9,40	-6,42
6,3	6,21	7,06	5,64	5,64	5,81	6,070682	0,59805	9,85	-3,64
12,5	13,21	12,52	11,81	11,90	11,93	12,27168	0,593952	4,84	-1,83
25	26,21	25,19	26,01	24,77	24,75	25,3865	0,685738	2,70	1,55
50	51,04	47,53	52,36	50,07	50,07	50,21447	1,771308	3,53	0,43
100	97,14	101,53	98,27	101,48	102,48	100,1815	2,327763	2,32	0,18

**CBG**

Concentração (µg/mL)	concentração calculada (µg/mL)					Média	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	Bias (%)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5				
0,4	0,36	0,39	0,47	0,42	0,43	0,41	0,04	9,62	3,15
0,8	0,78	0,71	0,85	0,85	0,89	0,81	0,07	8,72	1,78
1,6	1,50	1,47	1,59	1,73	1,75	1,61	0,13	8,11	0,42
3,1	3,20	3,22	2,65	2,72	2,73	2,90	0,28	9,71	-6,31
6,3	6,24	7,16	5,52	5,64	5,87	6,09	0,66	10,81	-3,40
12,5	13,39	12,55	11,58	11,92	11,92	12,27	0,72	5,83	-1,83
25	25,81	25,32	25,50	24,79	30,43	26,37	2,30	8,72	5,48
50	50,52	47,57	51,00	50,06	50,26	49,88	1,34	2,68	-0,24
100	97,81	101,23	100,45	101,47	103,04	100,80	1,92	1,90	0,80

**CBN**

Concentração (µg/mL)	concentração calculada (µg/mL)					Média	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	Bias (%)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5				
0,1	0,11	0,08	0,10	0,11	0,11	0,10	0,01	12,21	2,62
0,2	0,17	0,19	0,21	0,21	0,20	0,20	0,02	8,73	-2,07
0,4	0,38	0,37	0,42	0,35	0,36	0,38	0,02	6,62	-6,18
0,8	0,81	0,72	0,82	0,79	0,80	0,79	0,04	4,86	-1,56
1,6	1,46	1,53	1,52	1,77	1,79	1,61	0,16	9,63	0,78
3,1	3,20	3,36	2,67	2,67	2,75	2,93	0,33	11,15	-5,48
6,3	6,13	7,51	5,61	5,70	5,91	6,17	0,78	12,58	-2,01
12,5	13,33	13,19	11,75	11,95	12,61	12,56	0,71	5,67	0,51
25	26,08	26,54	26,03	24,81	25,71	25,84	0,64	2,49	3,34
50	50,84	50,03	52,05	50,03	51,01	50,79	0,84	1,65	1,59
100	97,40	96,37	98,73	101,51	107,41	100,29	4,43	4,41	0,29

**CBGA**

Concentração (µg/mL)	concentração calculada (µg/mL)					Média	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	Bias (%)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5				
0,4	0,36	0,40	0,46	0,42	0,43	0,413174	0,034229	8,28	3,29
0,8	0,77	0,71	0,86	0,85	0,87	0,811467	0,068349	8,42	1,43
1,6	1,46	1,48	1,57	1,78	1,80	1,617307	0,159761	9,88	1,08
3,1	3,26	3,21	2,65	2,69	2,76	2,913049	0,295743	10,15	-6,03
6,3	6,31	6,97	5,54	5,58	5,85	6,049491	0,597353	9,87	-3,98
12,5	13,19	12,43	11,66	11,90	12,34	12,30426	0,588826	4,79	-1,57
25	26,34	25,15	25,65	24,52	25,83	25,49792	0,692822	2,72	1,99
50	51,02	47,51	51,65	50,33	50,85	50,27041	1,613403	3,21	0,54
100	96,90	101,75	99,58	101,54	103,21	100,5961	2,437784	2,42	0,60

## THC

Concentração (µg/mL)	concentração calculada (µg/mL)						Média	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	Bias (%)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5					
0,4	0,37	0,37	0,46	0,41	0,43	0,408694	0,042519	10,40	2,17	
0,8	0,79	0,67	0,85	0,83	0,84	0,794483	0,075563	9,51	-0,69	
1,6	1,45	1,48	1,54	1,78	1,59	1,56609	0,131158	8,37	-2,12	
3,1	3,23	3,30	2,79	2,69	2,72	2,944526	0,293407	9,96	-5,02	
6,3	6,19	7,21	5,46	5,65	6,02	6,106308	0,683048	11,19	-3,07	
12,5	13,32	12,84	11,66	12,16	12,41	12,4803	0,635135	5,09	-0,16	
25	26,05	26,39	25,60	24,38	25,72	25,63041	0,76394	2,98	2,52	
50	50,98	49,93	51,04	50,80	50,92	50,73279	0,458337	0,90	1,47	
100	97,23	97,42	100,21	100,90	103,64	99,88129	2,661727	2,66	-0,12	

## 8-THC

Concentração (µg/mL)	concentração calculada (µg/mL)						Média	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	Bias (%)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5					
0,4	0,38	0,38	0,47	0,41	0,45	0,417928	0,037326	8,93	4,48	
0,8	0,81	0,74	0,84	0,82	0,78	0,79852	0,039317	4,92	-0,18	
1,6	1,44	1,47	1,58	1,80	1,69	1,595215	0,150181	9,41	-0,30	
3,1	3,19	3,22	2,65	2,68	2,75	2,897193	0,279645	9,65	-6,54	
6,3	6,16	7,09	5,55	5,72	6,23	6,148691	0,600264	9,76	-2,40	
12,5	13,11	12,35	11,72	12,05	12,14	12,27353	0,52148	4,25	-1,81	
25	25,78	25,17	25,44	24,67	27,11	25,63388	0,918504	3,58	2,54	
50	49,91	47,55	50,98	50,71	52,25	50,28125	1,743263	3,47	0,56	
100	98,84	101,63	100,38	100,75	104,86	101,2933	2,234149	2,21	1,29	

## THCA

Concentração (µg/mL)	concentração calculada (µg/mL)						Média	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	Bias (%)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5					
0,4	0,32	0,36	0,47	0,32	0,34	0,362932	0,061753	17,02	-9,27	
0,8	0,72	0,79	0,87	0,74	0,85	0,795561	0,067455	8,48	-0,55	
1,6	1,39	1,42	1,73	1,77	1,71	1,605477	0,185022	11,52	0,34	
3,1	3,28	3,25	2,93	2,83	3,00	3,057308	0,196775	6,44	-1,38	
6,3	6,42	7,09	5,35	6,06	6,93	6,367483	0,701197	11,01	1,07	
12,5	13,98	12,56	10,91	12,75	12,97	12,63234	1,11064	8,79	1,06	
25	27,60	25,16	23,43	26,62	27,80	26,12103	1,830132	7,01	4,48	
50	54,19	47,76	47,02	54,04	55,24	51,65019	3,926541	7,60	3,30	
100	103,28	102,37	99,83	110,70	113,85	106,0048	5,966785	5,63	6,00	
250	238,44	248,86	257,07	233,78	247,32	245,0941	9,151781	3,73	-1,96	

**CBCA**

Concentração (µg/mL)	concentração calculada (µg/mL)						Média	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	Bias (%)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5					
0,8	0,80	0,68	0,89	0,91	0,86	0,829291	0,092062	11,10	3,66	
1,6	1,48	1,50	1,71	1,67	1,68	1,609217	0,110352	6,86	0,58	
3,1	3,04	3,24	2,80	2,76	2,81	2,929349	0,206949	7,06	-5,50	
6,3	6,11	7,31	5,58	5,80	5,93	6,145703	0,676577	11,01	-2,45	
12,5	13,11	12,38	11,68	11,86	11,87	12,17782	0,581277	4,77	-2,58	
25	26,05	24,93	25,47	24,73	25,85	25,40511	0,570415	2,25	1,62	
50	50,34	47,72	50,90	49,83	52,39	50,23647	1,703807	3,39	0,47	
100	98,30	101,46	100,18	101,66	107,38	101,7961	3,398452	3,34	1,80	

**Tabela 5.** Dados relativos à precisão intermédia.**CBD**

Concentração (µg/mL)	concentração calculada (µg/mL)						Média	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	Bias (%)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5					
0,4	0,35	0,34	0,45	0,37	0,36	0,38	0,045131444	12,03	-6,21	
1	0,87	0,99	1,11	0,86	0,86	0,94	0,109911914	11,70	-6,09	
10	8,76	9,38	9,63	8,56	8,56	8,98	0,495218356	5,52	-10,23	
100	99,55	102,69	104,79	86,98	86,75	96,15	8,680331096	9,03	-3,85	

**CBDA**

Concentração (µg/mL)	concentração calculada (µg/mL)						Média	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	Bias (%)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5					
0,4	0,34	0,37	0,44	0,40	0,40	0,39	0,038773744	9,94	-2,47	
1	0,92	1,03	1,14	0,86	0,87	0,96	0,120424919	12,49	-3,58	
10	8,86	9,45	9,80	8,52	8,58	9,04	0,562424565	6,22	-9,60	
100	103,11	102,43	107,84	100,21	100,21	102,76	3,126417448	3,04	2,76	

**CBG**

Concentração (µg/mL)	concentração calculada (µg/mL)						Média	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	Bias (%)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5					
0,4	0,37	0,38	0,47	0,38	0,40	0,40	0,040646734	10,13	0,28	
1	0,90	1,02	1,13	0,85	0,89	0,96	0,11439663	11,94	-4,15	
10	9,99	9,40	9,63	8,56	9,28	9,37	0,529349	5,65	-6,29	
100	106,19	102,43	105,32	87,63	91,93	98,70	8,401342733	8,51	-1,30	

## CBN

Concentração(µg/mL)	concentração calculada (µg/mL)					Média	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	Bias (%)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5				
0,1	0,09	0,11	0,11	0,11	0,10	0,11	0,008350923	7,79	7,24
0,4	0,35	0,37	0,44	0,34	0,36	0,37	0,037073173	9,96	-6,96
1	0,99	1,06	1,11	0,85	0,88	0,98	0,112175178	11,49	-2,40
10	8,97	9,90	9,78	8,54	8,80	9,20	0,608861569	6,62	-8,02
100	103,93	107,51	107,16	107,16	98,60	104,87	3,795017898	3,62	4,87

## CBGA

Concentração(µg/mL)	concentração calculada (µg/mL)					Média	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	Bias (%)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5				
0,4	0,34	0,37	0,45	0,41	0,44	0,40	0,048463571	12,00	0,99
1	0,97	1,01	1,11	0,88	0,97	0,99	0,083369868	8,42	-0,94
10	9,31	9,34	9,65	8,54	10,08	9,38	0,567725642	6,05	-6,15
100	105,17	102,23	106,46	98,20	98,71	102,15	3,713010275	3,63	2,15

## THC

Concentração(µg/mL)	concentração calculada (µg/mL)					Média	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	Bias (%)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5				
0,4	0,34	0,34	0,47	0,37	0,39	0,38	0,054101222	14,16	-4,50
1	0,93	1,14	1,14	0,86	0,86	0,99	0,144685824	14,67	-1,39
10	9,53	9,61	9,48	8,65	8,85	9,22	0,443364193	4,81	-7,78
100	108,10	106,61	104,89	86,52	87,48	98,72	10,76341095	10,90	-1,28

## 8-THC

Concentração(µg/mL)	concentração calculada (µg/mL)					Média	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	Bias (%)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5				
0,4	0,35	0,37	0,45	0,36	0,38	0,38	0,040955586	10,74	-4,63
1	0,91	0,93	1,10	0,87	0,90	0,94	0,093734543	9,95	-5,77
10	8,71	9,23	9,53	8,57	8,57	8,92	0,434952615	4,88	-10,78
100	99,58	102,12	105,21	85,85	89,33	96,42	8,393500825	8,71	-3,58

## THCA

Concentração(µg/mL)	concentração calculada (µg/mL)					Média	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	Bias (%)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5				
0,4	0,35	0,36	0,48	0,34	0,42	0,39	0,059979341	15,51	-3,30
1	0,87	0,94	1,10	0,85	0,92	0,94	0,096868163	10,35	-6,40
10	8,84	9,25	9,06	9,08	9,27	9,10	0,173911369	1,91	-9,00
100	106,05	103,35	96,77	103,99	105,02	103,03	3,651105906	3,54	3,03
250	217,26	256,58	222,11	270,36	266,53	246,57	25,10844533	10,18	-1,37

## CBCA

Concentração( $\mu\text{g/mL}$ )	concentração calculada ( $\mu\text{g/mL}$ )					Média	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	Bias (%)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5				
1	0,82	1,03	1,16	0,90	0,98	0,98	0,130128823	13,30	-2,18
10	8,35	9,53	9,75	8,54	10,01	9,24	0,740907124	8,02	-7,65
100	98,64	104,54	105,84	98,77	101,34	101,83	3,287415477	3,23	1,83

### 5. Recuperação

A recuperação de um método analítico, ou rendimento de extração, descreve a relação em percentagem entre a resposta obtida pelo detetor na análise de uma quantidade de analito adicionado e extraído da matriz e a resposta obtida para a quantidade de analito teoricamente presente na matriz, servindo desta forma para avaliar a eficiência de extração de um método analítico.

O padrão interno foi adicionado após processo de extração. Os valores de recuperação obtidos não têm necessariamente de ser 100% para serem aceites, desde que demonstrem reprodutibilidade, precisão e consistência. Para o cálculo deste parâmetro foram fortificadas, com os analitos alvo de estudo, amostras de flores secas a 3 concentrações (baixa, média e alta). Cada uma destas concentrações foi analisada em triplicado. As recuperações médias se situaram entre 70-99%.

### 6. Estabilidade

A estabilidade do analito deve ser estudada em diferentes condições e em intervalos de tempo iguais ou superiores aos que serão aplicados às amostras reais em estudo. Estes estudos servem para garantir que não existem variações significativas de concentração durante o processo de recolha, transporte, armazenamento e análise da amostra. Serão utilizados os mesmos critérios que no estudo da precisão e exatidão, isto é, as variações de concentração foram inferiores a 15% ( $CV \leq 15\%$ ) para todas as concentrações em estudo e os valores de Bias situaram-se em  $\pm 15\%$  da concentração nominal. Propõe-se o estudo da estabilidade em amostra processada será avaliada considerando um período de 18h (*overnight*), à temperatura ambiente e em presença de luz. As amostras serão posteriormente extraídas de acordo com o método descrito e injetadas no sistema cromatográfico. Foi também avaliada a estabilidade em amostras processadas deixadas no injetor a 4°C durante 24°C. Os extratos serão injetados após as condições indicadas

anteriormente e compradas com amostras extraídas e analisadas no próprio dia. Esta estabilidade envolve 6 análises independentes. Os resultados relativamente a esta estabilidade são apresentados na tabela 6.

**Tabela 6.** Estudo da estabilidade em amostras processadas a temperatura ambiente e a 4°C.

<b>ESTABILIDADE THCA</b>					
	<b>ÁREA</b>	<b>ÁREA Is</b>	<b>AR</b>	<b>média AR</b>	<b>% PÉRDIDA</b>
Média extração fresca	26395,0	328,0	80,5		
amostrador 4°C	26060	333,7	78,0941	78,5	2,5
amostrador 4°C	27024	342,9	78,8101		
tambiente 18H 25°C	24420	336,2	72,6353	71,1	11,7
tambiente 18H 25°C	24777	356,6	69,4812		

<b>ESTABILIDADE THC</b>					
	<b>ÁREA</b>	<b>ÁREA Is</b>	<b>AR</b>	<b>média AR</b>	<b>% PÉRDIDA</b>
Média extração fresca	399,0	328,0	1,2		
amostrador 4°C	390,9	333,7	1,1714	1,2	2,8
amostrador 4°C	409,1	342,9	1,1931		
tambiente 18H 25°C	448,8	336,2	1,3349	1,3	-8,3
tambiente 18H 25°C	463,6	356,6	1,3001		

<b>ESTABILIDADE 8-THC</b>					
	<b>ÁREA</b>	<b>ÁREA Is</b>	<b>AR</b>	<b>média AR</b>	<b>% PÉRDIDA</b>
Média extração fresca	55,8	328,0	0,2		
amostrador 4°C	55,9	333,7	0,1675	0,2	2,0
amostrador 4°C	56,9	342,9	0,1659		
tambiente 18H 25°C	50,8	336,2	0,1511	0,1	15,7
tambiente 18H 25°C	48,4	356,6	0,1357		

<b>ESTABILIDADE CBD</b>					
	<b>ÁREA</b>	<b>ÁREA Is</b>	<b>AR</b>	<b>média AR</b>	<b>% PÉRDIDA</b>
Média extração fresca	95,4	328,0	0,3		
amostrador 4°C	99,6	333,7	0,2985	0,3	-2,9
amostrador 4°C	102,9	342,9	0,3001		
tambiente 18H 25°C	67,9	336,2	0,2020	0,2	31,0
tambiente 18H 25°C	71,1	356,6	0,1994		

<b>ESTABILIDADE CBN</b>					
	<b>ÁREA</b>	<b>ÁREA Is</b>	<b>AR</b>	<b>média AR</b>	<b>% PÉRDIDA</b>
Média extração fresca	26,9	358,5	0,076		
amostrador 4°C	24,4	333,7	0,0731	0,078	-3,2
amostrador 4°C	28,4	342,9	0,0828		
tambiente 18H 25°C	31,2	336,2	0,0928	0,1	-16,4
tambiente 18H 25°C	29,6	356,6	0,0830		

<b>ESTABILIDADE CBCA</b>					
	<b>ÁREA</b>	<b>ÁREA Is</b>	<b>AR</b>	<b>média AR</b>	<b>% PÉRDIDA</b>
Média extração fresca	78,7	328,0	0,2		
amostrador 4°C	77,3	333,7	0,2316	0,2	2,9
amostrador 4°C	80,3	342,9	0,2342		
tambiente 18H 25°C	62,5	336,2	0,1859	0,2	21,5
tambiente 18H 25°C	68	356,6	0,1907		

<b>ESTABILIDADE CBGA</b>					
	<b>ÁREA</b>	<b>ÁREA Is</b>	<b>AR</b>	<b>média AR</b>	<b>% PÉRDIDA</b>
Média extração fresca	511,7	328,0	1,560		
amostrador 4°C	491	333,7	1,4714	1,484	4,8
amostrador 4°C	513,4	342,9	1,4972		
tambiente 18H 25°C	418,9	336,2	1,2460	1,2	21,2
tambiente 18H 25°C	432,3	356,6	1,2123		

<b>ESTABILIDADE CBDA</b>					
	<b>ÁREA</b>	<b>ÁREA Is</b>	<b>AR</b>	<b>média AR</b>	<b>% PÉRDIDA</b>
Média extração fresca	68,6	328,0	0,209		
amostrador 4°C	67,2	333,7	0,2014	0,201	4,0
amostrador 4°C	68,6	342,9	0,2001		
tambiente 18H 25°C	60,3	336,2	0,1794	0,2	15,2
tambiente 18H 25°C	62,5	356,6	0,1753		

<b>ESTABILIDADE CBG</b>					
	<b>ÁREA</b>	<b>ÁREA Is</b>	<b>AR</b>	<b>média AR</b>	<b>% PÉRDIDA</b>
Média extração fresca	54,1	328,0	0,2		
amostrador 4°C	52,5	333,7	0,1573	0,2	3,1
amostrador 4°C	55,6	342,9	0,1621		
tambiente 18H 25°C	43,9	336,2	0,1306	0,1	21,0
tambiente 18H 25°C	46,4	356,6	0,1301		

AR: area relativa

## 7. Aplicação do procedimento de extração

Um mínimo de 0,5 g de flores secas foi moído de forma a garantir a amostra homogeneidade. As flores moídas foram extraídas por pesagem de 500,0 mg para um tubo de 50 mL (tubo falcon) ao qual foram adicionados 20 mL de etanol a 96% e agitados durante 15 minutos e seguidamente centrifugados. O excedente transparente é transvazado para um balão volumétrico de 50 mL. O resíduo foi igualmente tratado 2 vezes com 12,5 mL de etanol a 96 % de cada vez. As soluções orgânicas foram reunidas e complementadas com etanol a 96 % até atingir 50,0 mL. Esta solução foi filtrada através de um filtro de membrana de celulose com 0,22 µm de porosidade nominal. Dado o sinal obtido foi necessário proceder à uma diluição 1:10 usando como solvente a ACN. 100 µL do filtrado foram transferidos para um vial e foram adicionados 10µL de IS à concentração de 100 µg/mL. Este procedimento encontra-se descrito na Farmacopeia alemã (Boletim Federal, Parte oficial, 24.4.2018 B5, publicado quarta-feira, 24 de abril de 2018). A título de exemplo se apresentam os resultados de uma das amostras de flores secas analisadas (Tabela 7).

**Tabela 7.** Concentração de canabinoides presentes numa amostra

Composto	Concentração ug/g	teor (%)
CBD	981,3	0,10
CBDA	409,7	0,04
CBG	593,41	0,06
CBN	151,6	0,02
CBGA	3113,2	0,31
THC	4716,9	0,47
8-THC	723,6	0,07
THCA	194835,7	19,48
CBCA	1373,6	0,14

**Teor THC (THC+ THCA) com extração ACN (%) 20,0**