



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

**Determinação de novas substâncias psicoativas
em fluido oral**
(Versão após defesa)

Fabiana Cristina Vilaça dos Santos

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

Orientadora: Prof^a. Doutora Maria Eugénia Gallardo Alba
Co-orientador: Mestre Tiago Alexandre Pires Rosado

Covilhã, junho de 2015

Dedicatória

Dedico esta vitória às pessoas que estiveram sempre ao meu lado. Dedico a todas as pessoas que me fizeram acreditar que tudo isto fosse possível! É com muito orgulho que dedico o fruto do meu trabalho aos meus pais, aos melhores pais, que acreditam sempre em mim e no meu empenho em todas as circunstâncias.

“Não deseje que as coisas sejam mais fáceis - deseje ser mais forte”
Jim Rohn

Agradecimentos

No final deste ano, não poderia deixar de agradecer a várias pessoas que sem o seu contributo nada disto seria possível. Hoje tenho orgulho de todo este percurso!

À professora Eugénia Gallardo pela oportunidade que me deu, por acreditar sempre em mim e por me fazer acreditar que tudo na vida é possível. Um grande obrigado por tudo!

Ao Tiago, por toda a disponibilidade na resolução das minhas dúvidas, por toda a compreensão e principalmente pela amizade.

Ao Centro Hospitalar Cova da Beira, departamento de psiquiatria, em especial ao Dr. Vítor Oliveira, diretor do departamento, que prontamente se disponibilizou a ajudar na recolha da amostra real de Trazodona que se tornou numa mais-valia na validação do método analítico das piperazinas.

Aos meus “super colegas” de laboratório com quem dividi tantas dúvidas e tantos medos, mas com quem somei muitas alegrias, sem eles não me teria conseguido manter com um sorriso mesmo apesar das dificuldades. Um obrigado especial aos David’s, à Catarina e à Fátima.

Às minhas amigas com quem partilhei tantos receios, mas também muitas alegrias. Obrigada por todo o carinho e amizade. Em especial, tenho de agradecer à Su, à Joana, à Maria, à Tatiana e à Vanessa, que sempre estiveram lá quando eu mais precisava.

À “minha família” que quando chegava a casa me dava o aconchego que tanto precisava. Mesmo sendo a família que escolhi, não se safaram nada mal! Obrigada por todo o apoio e principalmente por cada segundo de gargalhada!

À minha Dani, que mesmo estando longe nesta etapa, me apoiou e sempre me fez crer que eu era capaz de superar todas as dificuldades. O teu apoio foi imprescindível. És uma grande amiga. Um grande obrigado por fazeres parte da minha vida!

Aos meus pais que sempre acreditaram em mim e nunca me deixaram desistir, para mim, eles são o melhor entre os melhores.

Por último, mas não menos importante, um agradecimento especial ao Carlos, por tudo! Por ter caminhado comigo quando eu não conseguia dar um passo sozinha, por ter depositado em mim toda a confiança. Sem ti, certamente, não seria capaz de ter alcançado esta etapa. Obrigada por fazeres parte da minha vida!

Resumo

As novas substâncias psicoativas são uma problemática, pois não apresentam regulamentação específica que proíba o seu consumo. São consideradas drogas emergentes e legais, pois a sua estrutura é modificada em laboratório a partir de drogas já existentes. A metoxetamina (MXE), estruturalmente semelhante à ketamina e fenciclidina inclui-se neste grupo desde 2010 e as piperazinas sendo semelhantes à cocaína e às anfetaminas estão presentes no mercado das drogas desde 2000. Assim, é necessário o desenvolvimento de novos métodos que requeiram menos tempo, menos recursos e que garantam a identificação inequívoca das substâncias, como é o caso da cromatografia acoplada a espectrometria de massa em tandem (GC-MS/MS), utilizada para a quantificação da MXE, e a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS/MS), utilizada para a quantificação das piperazinas. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um método analítico para a determinação de MXE usando GC-MS/MS e para as piperazinas 1-benzilpiperazina (BZP), 1-(3-trifluozonetilpfenil) piperazina (TFMPP), 1-3 clorofenilpiperazina (mCPP) e 1-4 metoxifenilpiperazina (MeOPP) usando LC-MS/MS. A matriz selecionada para a execução deste trabalho foi o fluido oral (FO), uma vez que, é uma boa matriz alternativa pela fácil recolha e pela mesma não ser invasiva. Recorreu-se ao uso da microextração em seringa empacotada (MEPS), uma técnica de extração que apresenta baixo consumo de solventes e recorre-se ao uso de baixos volumes de amostra. Ambas as metodologias foram validadas segundo as *guidelines* internacionais da *Food and Drug Administration* (FDA) e da *International Conference on Harmonization* (ICH). Foi obtida linearidade para o intervalo de concentrações de 10 (limite inferior de quantificação-LLOQ) até 600 ng/mL para a MXE; 0,01 (LLOQ e LOD: limite de deteção) a 80 ng/mL para TFMPP, 5 (LLOQ e LOD) a 80 ng/mL para MeOPP e BZP e de 1 (LLOQ e LOD) a 80 ng/mL para mCPP. O LOD para a MXE foi de 1 ng/mL. Em todos os casos, os coeficientes de determinação (R^2) foram superiores a 0,99. Tanto a precisão (intra- e interdia) como a exatidão situaram-se dentro dos valores definidos pelas *guidelines* (coeficientes de variação inferiores a 15% e erros relativos médios de $\pm 15\%$). As recuperações apresentadas para os compostos situaram-se entre os 27% para MXE, 60% para BZP, 40% para MeOPP, 30% mCPP e 26% para o TFMPP. Finalmente, os métodos desenvolvidos foram aplicados a amostras reais o que constitui uma mais-valia no desenvolvimento de qualquer desenvolvimento analítico. Salienta-se que este foi o primeiro estudo no qual se quantificou MXE e piperazinas com recurso à MEPS em amostras de FO.

Palavras-chave

Metoxetamina, Piperazinas, fluido oral, MEPS, GC-MS/MS, LC-MS/MS

Abstract

The new psychoactive substances are a problematic since no specific regulation exist that prohibits its consumption. These are considered emerging and legal drugs, since its structure is modified in laboratory from already existing drugs. Methoxetamine (MXE) a compound structurally similar to ketamine and phenylcyclidine is included in this group since the year 2010, the piperazines similar to cocaine and amphetamines are present in the drug market since the year 2000. Therefore, the development of new analytical methods requiring less resources and time that guarantee unequivocal identification of the substances becomes necessary, as is the case of gas chromatography coupled to *tandem* mass spectrometry (GC-MS/MS, used for the quantification of MXE) and Liquid chromatography coupled to *tandem* mass spectrometry (LC-MS/MS, used for the quantification of piperazines). The objective of this work was to develop an analytical method for the determination of MXE using GC-MS/MS and for the piperazines 1-benzylpiperazine (BZP), 1-(3-trifluoromethylphenyl) piperazine (TFMPP), 1-3 chlorophenylpiperazine (mCPP), 1-4 methoxyphenylpiperazine (MeOPP) using LC-MS/MS. The biological specimen selected for this work was oral fluid since it is a good alternative specimen for its easy and non-invasive collection. Both methodologies were validated according to international guidelines of the Food and Drug Administration (FDA) and International Conference on Harmonization (ICH). Microextraction in packed syringe (MEPS) was used, an extraction technique that requires a low solvent use and low sample volumes. Linearity was obtained for the concentration interval of 10 (lower limit of quantification-LLOQ) to 600 ng/mL for MXE, 0.01 (LLOQ and LOD: limit of detection) to 80 ng/mL for TFMPP, 5 (LLOQ and LOD) to 80 ng/mL for MeOPP and BZP and from 1 (LLOQ and LOD to 80 ng/mL for mCPP. The LOD for MXE was 1 ng/mL. In all cases the determination coefficient (R^2) was superior to 0.99. Both precision (intra- and interday) and accuracy were situated within the values defined by the guidelines (coefficient of variation below 15% and mean relative error within $\pm 15\%$). The recovery of the compounds was within 27% for MXE, 60% for BZP, 40% for MeOPP, 30% for mCPP and 26% for TFMPP. The developed methods were applied to authentic samples which presents an advantage in the development of any analytical method. It is important to point out that this is the first study described in literature where MXE and piperazines are analysed in oral fluid using MEPS.

Keywords

Methoxetamine, Piperazines, oral fluid, MEPS, GC-MS/MS, LC-MS/MS

Índice

Dedicatória	iii
Agradecimentos	vii
Resumo	ix
Abstract	xi
Lista de Figuras	xvii
Lista de Tabelas	xix
Lista de Gráficos	xxi
Lista de Acrônimos	xxiii
Justificação tema	xxv
Objetivos	xxvii
Capítulo 1- Revisão Bibliográfica	
1. Substâncias Psicoativas	1
1.1. Metoxetamina (MXE)	4
1.1.1. Estrutura Química	5
1.1.2. Propriedades Físico-Químicas	5
1.1.3. Mecanismo de Ação	6
1.1.4. Toxicocinética	6
1.1.5. Modo de Consumo	6
1.1.6. Efeitos Tóxicos	6
1.1.7. Tratamento	7
1.1.8. Curiosidades	7
1.1.9. Análise em amostras biológicas	7
1.2. Piperazinas	8
1.2.1. N-benzylpiperazina (BZP)	10
1.2.1.1. Mecanismo de Ação	10
1.2.1.2. Toxicocinética	11
1.2.1.3. Efeitos Tóxicos	11
1.2.1.4. Tratamento	11
1.2.2. 1-(4-metoxifenil)piperazina (MeOPP)	11
1.2.2.1. Mecanismo de Ação	12
1.2.2.2. Toxicocinética	12
1.2.2.3. Efeitos Tóxicos	12
1.2.3. 1-(3-clorofenil)piperazina (mCPP)	12
1.2.3.1. Mecanismo de Ação	13
1.2.3.2. Toxicocinética	13
1.2.3.3. Efeitos Tóxicos	13

1.2.4. 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina (TFMPP)	13
1.2.4.1. Mecanismo de Ação	14
1.2.4.2. Toxicocinética	14
1.2.5. Análise em amostras biológicas	14
1.2.6. Legislação	15
2. Fluido Oral (FO)	16
3. Microextração em seringa empacotada (MEPS)	17
3.1. Tipos de sorbentes	18
3.2. Procedimento de Extração	19
3.2.1. Acondicionamento	19
3.2.2. Passagem da amostra	19
3.2.3. Lavagem	20
3.2.4. Eluição	20
3.2.5. Reutilização do dispositivo	20
4. Cromatografia Gasosa (GC) e Cromatografia Líquida (LC)	21
4.1. Fontes de ionização em GC	21
4.2. Fontes de ionização em LC	22
5. Espectrometria de Massa em Tandem	23
5.1. Modos aquisição	24
Capítulo 2- Parte Experimental	
1. Materiais e Métodos	25
1.1. Reagentes	25
1.2. Padrões Analíticos	25
1.3. Instrumentação	26
1.4. Preparação de Soluções	26
1.4.1. Soluções de Padrões Analíticos	26
i) MXE	26
ii) Piperazinas	27
1.4.2. Outras Soluções	27
1.5. Matriz Biológica	28
1.6. Preparação da Amostra	29
1.7. Processo de Extração	29
i) MXE	29
ii) Piperazinas	30
1.8. Sistema Cromatográfico	30
i) MXE	30
ii) Piperazinas	30
1.9. Condições Cromatográficas	30
i) MXE	30
ii) Piperazinas	31

Capítulo 3- Resultados e Discussão

1. Otimização parâmetros cromatográficos	33
i) MXE	33
ii) Piperazinas	33
2. Otimização da Técnica de Precipitação	35
3. Otimização do Processo de Extração	37
i) MXE	37
ii) Piperazinas	37
4. Procedimento de Extração	38
i) MXE	39
ii) Piperazinas	41
5. Desenho Experimental (DOE)	43
i) MXE	43
ii) Piperazinas	46
6. Resposta Otimizada	50
i) MXE: Avaliação univariada para o número de <i>strokes</i> e volume de eluição	50
ii) Piperazinas: Avaliação univariada para o número de <i>strokes</i>	51
7. Validação	53
7.1. Seletividade e Especificidade	53
7.2. Linearidade/Curva de Calibração	58
i) MXE	59
ii) Piperazinas	60
7.3. Limite de detecção e quantificação	61
i) MXE	61
ii) Piperazinas	63
7.4. Precisão e exatidão (inter- e intradia)	65
i) MXE	65
ii) Piperazinas	66
7.5. Estabilidade	68
7.5.1. Estabilidade de amostras processadas	68
i) MXE	69
ii) Piperazinas	69
7.5.2. Estabilidade congelação/descongelação	70
i) MXE	70
ii) Piperazinas	71
7.5.3. Estabilidade de curta duração	71
i) MXE	72
ii) Piperazinas	72

7.6. Recuperação	73
i) MXE	74
ii) Piperazinas	74
7.7. Arrastamento/ <i>carry-over</i>	75
7.8. Supressão Iónica (efeito matriz)	77
8. Aplicação do método a amostras reais	78
Conclusão	79
Referências Bibliográficas	81
Apresentação em congressos no âmbito da dissertação	89
Anexos	91
Anexos da MXE	
Anexo 1- SCAN da MXE a 50 µg/mL	91
Anexo 2- SCAN da Norketamina-d4 a 100 µg/mL	91
Anexo 3- Exemplo de <i>Product Ion</i> realizado para o ião com m/z 189.7	92
Anexo 4- Exemplo de um cromatograma em MRM a 600 ng/mL com transições quantificadora e qualitativas	93
Anexo 5- Análise estatística para técnicas extração da MXE	93
Anexo 6- Matriz do DOE da MXE	97
Anexo 7- Análise estatística da análise univariada em relação ao número de <i>strokes</i>	98
Anexo 8 Análise estatística da análise univariada em relação ao volume de eluição	99
Anexos das Piperazinas	
Anexo 9- Sinal da BZP, MeOPP, mCPP e TFMPP a 100 ng/mL	100
Anexo 10- Análise estatística das técnicas	101
Anexo 11- Análise estatística da análise univariada em relação ao número de <i>strokes</i>	109
Anexo 12- Matriz do DOE	112
Anexo 13- Cromatograma relativo injeção de anfetaminas a 100ng/mL sem extração	114

Lista de Figuras

Figura 1 - Emergência global das NSP até Dezembro de 2013.

Figura 2 - Estrutura química da MXE (a), ketamina (b) e PCP (c).

Figura 3 - Estrutura química das piperazinas.

Figura 4 - Apresentação das piperazinas em estudo.

Figura 5 - Estrutura química de 1-benzilpiperazina (BZP).

Figura 6 - Estrutura química de 1-(4-metoxifenil) piperazina (MeOPP).

Figura 7 - Estrutura química de 1-(3-clorofenil) piperazina (mCPP).

Figura 8 - Estrutura química de 1-(3-trifluorometilfenil) piperazina (TFMPP).

Figura 9 - Seringa de MEPS (250 µL) (a) e dispositivo cilíndrico (BIN - *Barrel Insert and Needle Assembly*) (b).

Figura 10 - Procedimento de extração na coluna de MEPS.

Figura 11 - Fonte de ionização por impacto eletrônico e do quadrupolo associados ao GC.

Figura 12 - Ionização por eletropulverização (modo positivo).

Figura 13 - Modos de operação em MS/MS.

Figura 14 - Exemplo de um cromatogramas de Seletividade da MXE (sem adição de composto ou padrão interno).

Figura 15 - Cromatograma com a amostra fortificada com MXE a 10ng/mL.

Figura 16 - Exemplo de cromatogramas de Seletividade das piperazinas (amostra extraída não fortificada).

Figura 17 - Cromatograma de Piperazinas com a amostra fortificada a 5ng/mL.

Figura 18 - Cromatograma sem extração de cocaína, Ketamina, anfetaminas, opiáceos, THC e derivados a 100 ng/mL.

Figura 19 - Cromatograma sem extração de cocaína, anfetaminas, opiáceos, THC e derivados a 100 ng/mL.

Figura 20 - Exemplo de um Cromatograma de LOD (1ng/mL).

Figura 21 - Exemplo de um Cromatograma de LLOQ (10 ng/mL).

Figura 22 - Exemplo de Cromatogramas de LOD e LLOQ para BZP e MeOPP, mCPP e TFMP.

Figura 23 - Cromatograma de *carry-over* para MXE.

Figura 24 - Cromatograma de *carry-over* para as Piperazinas.

Figura 25 - Cromatograma da amostra real (concentração de mCPP de 31,52 ng/mL).

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Revisão das metodologias analíticas que visam a determinação de MXE em amostras biológicas.

Tabela 2 - Revisão das metodologias analíticas que visam a determinação de piperazinas em amostras biológicas.

Tabela 3 - Parâmetros otimizados do método desenvolvido em GC-MS/MS da MXE e do padrão interno.

Tabela 4 - Piperazinas com as respectivas transições (m/z) e tempos de retenção (min).

Tabela 5 - Descrição do processo de otimização das condições cromatográficas realizadas em LC-MS/MS.

Tabela 6 - Resultados obtidos para as técnicas de precipitação (n=3).

Tabela 7 - Resumo das 9 técnicas aplicadas em MEPS com as diferentes soluções de acondicionamento, lavagem e eluição.

Tabela 8 - Resultados da avaliação das 9 técnicas aplicadas em MEPS para MXE em termos de áreas relativas (n=3).

Tabela 9 - Resumo das 8 técnicas aplicadas com recurso à MEPS para a deteção de piperazinas.

Tabela 10 - Resultados das áreas relativas de BZP, MeOPP, mCPP e TFMPP para as 8 técnicas aplicadas usando MEPS (n=3).

Tabela 11 - Intervalos máximos de tolerância permitidos para as abundâncias relativas dos iões, monitorizados em modo MRM e expressos em percentagem (%) (WADA).

Tabela 12 - Resumo da linearidade para a MXE.

Tabela 13 - Resumo da linearidade para os compostos em estudo.

Tabela 14 - Limite de Quantificação e deteção da MXE.

Tabela 15 - Limites de Quantificação e de deteção de cada analito.

Tabela 16 - Precisão interdia e exatidão (n=5).

Tabela 17 - Precisão intradia e exatidão (n=6).

Tabela 18 - Precisão interdia e exatidão (n=5)

Tabela 19 - Precisão intradia e exatidão (n=6).

Tabela 20 - Estabilidade da MXE em amostras processadas.

Tabela 21 - Estabilidade das piperazinas em amostras processadas.

Tabela 22 - Ciclos de congelamento/descongelamento da MXE.

Tabela 23 - Ciclos de congelamento/descongelamento das piperazinas.

Tabela 24 - Estabilidade de curta duração da MXE.

Tabela 25 - Estabilidade de curta duração das piperazinas.

Tabela 26 - Recuperação (%) da MXE a 3 níveis de concentração (30, 250 e 500 ng/mL).

Tabela 27 - Recuperação (%) das piperazinas, calculada a 3 níveis de concentração para BZP, MeOPP, mCPP e a 4 níveis de concentração para TFMPP.

Tabela 28 - Resultados relativos ao efeito matriz (n=6).

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Número e principais grupos de novas substâncias notificadas ao mecanismo de alerta rápido da UE entre 2005 e 2013.

Gráfico 2 - Número de NSP a nível global.

Gráfico 3 - Técnicas de precipitação (média da área relativa \pm DP).

Gráfico 4 - Resposta da MXE em termos de área relativa para cada técnica de MEPS.

Gráfico 5 - Resposta da BZP, MeOPP, mCPP e TFMPP em termos de área relativa para cada técnica de MEPS com o respetivo SD.

Gráfico 6 - Diagrama de Pareto da MXE.

Gráfico 7 - Efeitos principais para a MXE.

Gráfico 8 - Interações dos vários parâmetros para a MXE.

Gráfico 9 - Diagrama de Pareto da BZP(a) MeOPP(b) mCPP(c) e TFMPP(d).

Gráfico 10 - Efeitos principais para a BZP(a), MeOPP (b), mCPP (c) e TFMPP (d).

Gráfico 11 - Interações dos vários parâmetros para a BZP.

Gráfico 12 - Interações dos vários parâmetros para a MeOPP.

Gráfico 13 - Interações dos vários parâmetros para a mCPP.

Gráfico 14 - Interações dos vários parâmetros para a TFMPP.

Gráfico 15 - Univariada para o número de *strokes* (15, 20 e 25) com o respetivo SD.

Gráfico 16 - Univariada para o volume de eluição (250, 500 e 1000 μ L) com o respetivo SD.

Gráfico 17 - Avaliação univariada para o número de *strokes* (n=3) para as piperazinas objeto de estudo (resultados expressos como área relativa).

Lista de Acrónimos

AMT	α -metil-triptamina
APCI	Ionização química à Pressão Atmosférica
API	Ionização à Pressão Atmosférica
APPI	Fotoionização à Pressão Atmosférica
BIAS	Erro relativo médio
BIN	<i>Barrel Insert and Needle Assembly</i>
BZP	1-benzilpiperazina
CV	Coefficiente de variação
DOE	Desenho experimental
DP	Desvio padrão
EI	Ionização por impacto eletrónico
ESI	Ionização por Eletropulverização
GC	Cromatografia Gasosa
FDA	<i>Food and drug Administration</i>
FO	Fluido Oral
GC	Cromatografia Gasosa
GC-MS/MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa em tandem
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
IQ	Ionização Química
LC	Cromatografia líquida
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem
LLE	Extração líquido-líquido
LLOQ	Limite inferior de Quantificação
LOD	Limite de Detecção
M ₁	Modo misto octilsilano-permutador catiónico forte
MBDB	N-metil-1-(1,3-benzodioxol-5-il)-2-butanamina
mCPP	1-3 clorofenilpiperazina
MDMA	metilenodioximetanfetamina
MeOPP	1-4 metoxifenilpiperazina
MEPS	Microextração em seringa empacotada
MRM	Monitorização de reação múltipla
MS	Espectrometria de massa
MS/MS	Espectrometria de massa em tandem
MXE	Metoxetamina
MXP	Metoxfenidina
NMDA	N-metil-D-aspartato

NSP	Novas substâncias psicoativas
oCPP	1-(2-clorofenilpiperazina)
OEDT	Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência
PCP	Fenciclidina
PI	Padrão interno
Q1	Quadrupolo 1
Q2	Quadrupolo 2
Q3	Quadrupolo 3
R²	Coefficiente de determinação
RSM	Superfície de resposta
SCAN	Modo de varrimento contínuo (do inglês, <i>scanning</i>)
SD	Desvio Padrão
SIM	Monitorização de iões selecionados
SNC	Sistema Nervoso Central
SPE	Extração em fase sólida
TFMPP	1-(3-trifluorometilfenil)piperazina
UE	União Europeia
UNODC	Gabinete das Nações Unidas para drogas e crime (do inglês, <i>United Nations office on drugs and crime</i>)
UPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de fotodiodos
WADA	<i>World Anti-Doping Agency</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

Justificação do tema

Desde os anos 90, o mercado ilícito de drogas recreativas mudou significativamente. Nos últimos anos, uma série de novas drogas conhecidas como *smart drugs* ou *legal highs*, têm ganho popularidade. Estas drogas, também denominadas de novas substâncias psicoativas (NSP) são uma problemática pois estão associadas a problemas sociais e de saúde pública. Este tipo de substâncias são produzidas em laboratório de forma a serem consideradas legais e não apresentam uma regulamentação específica que proíba o seu consumo.

Dentro destas substâncias, fazem parte as escolhidas para a realização da presente dissertação: Metoxetamina (MXE) e as piperazinas, nomeadamente a 1-benzilpiperazina (BZP), 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina (TFMPP), 1-3 clorofenilpiperazina(mCPP), 1-4 metoxifenilpiperazina (MeOPP).

Em 2013, foram notificadas 81 NSP através do sistema de alerta rápido da União Europeia, o que indicia, que as mesmas, estão constantemente a ser introduzidas no mercado. Deste modo, são necessários métodos específicos que permitam a identificação de cada substância de forma a avaliar o seu consumo bem como os efeitos para a saúde. Muitas vezes, os compostos piperazínicos provocam intoxicações ou mesmo morte, aquando do aparecimento destas situações a nível hospitalar, sendo que existe uma enorme falta de confirmação laboratorial.

O desenvolvimento de novos métodos que exijam menos tempo, menos recursos e que garantam a identificação inequívoca das substâncias tem sido um desafio para a maior parte dos laboratórios de toxicologia. Ao aliar isso, ao uso de matrizes alternativas como é o caso do fluido oral, onde a recolha da amostra é fácil e não invasiva, é possível desenvolver novos métodos onde os custos e tempo associados à análise são miniaturizados e ao mesmo tempo são confiáveis e de fácil execução.

A microextração em seringa empacotada foi a técnica de extração selecionada para a execução do presente trabalho dado que apresenta como vantagens: baixo consumo de solventes orgânicos, tempo de extração reduzido, baixo volume de amostra comparativamente a outras técnicas (extração em fase sólida). Para além disso é uma técnica que pode ser automatizada.

A utilização da cromatografia gasosa ou líquida acoplada à espectrometria de massa constitui uma mais-valia no que se refere à deteção inequívoca destas substâncias.

Com este projeto pretende-se preencher uma lacuna na área das análises toxicológicas uma vez que até a data não existem métodos analíticos que doseiem metoxetamina e piperazinas em amostras de fluido oral com recurso à microextração em seringa empacotada.

Objetivos

O objetivo deste trabalho experimental prende-se com a otimização e desenvolvimento de novas metodologias analíticas para a deteção e quantificação de metoxetamina (MXE) e piperazinas em amostras de fluido oral, com recurso, à análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa em tandem (GC-MS/MS) e à cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS) respetivamente. A técnica de extração utilizada foi a microextração em seringa empacotada.

Para a realização deste trabalho foram estabelecidas as seguintes tarefas:

- Otimização de uma metodologia cromatográfica para a deteção de novas substâncias psicoativas (MXE e piperazinas).
- Otimização de uma técnica de preparação de amostra para a determinação de novas substâncias psicoativas (MXE e piperazinas) e posterior validação segundo as *guidelines* da *Food and drug Administration* (FDA) e da *International Conference on Harmonisation* (ICH).
- Sempre que possível, aplicação da metodologia desenvolvida a amostras reais.

Capítulo 1

Revisão Bibliográfica

1. SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS

O Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência (OEDT) faz referência às novas substâncias psicoativas (NSP) como um novo estupefaciente ou psicotrópico, em estado puro ou em preparação (OEDT, 2014). A Comunidade Europeia, em 2005, solidificou que as NSP não constam nas tabelas das Convenções das Nações Unidas contudo, podem constituir uma ameaça para a saúde pública comparável às drogas ilícitas (King e Kicman, 2011).

As NSP são muitas vezes divulgadas e vendidas como alternativas legais, dado que parte da sua estrutura molecular é modificada em laboratório com o propósito de simular os efeitos de drogas ilícitas mais conhecidas (Wohlfarth, *et al.*, 2010; Armenta, *et al.*, 2010; Elie, *et al.*, 2012). Estas substâncias, contêm novas drogas com propriedades psicoativas análogas a substâncias já reguladas pelas leis internacionais, drogas essas, consideradas ilegais. Deste modo, a sua venda torna-se possível de forma legal até à inserção dos compostos nas tabelas das substâncias controladas por legislação específica a nível nacional e internacional (Elie, *et al.*, 2012). Assim, o termo “novas” não indicia uma nova invenção mas sim uma substância que se tornou recentemente disponível no mercado (Armenta, *et al.*, 2014).

As NSP são conhecidas por termos como *designer drugs*, *legal highs*, *party pills*, *herbal highs*, *bath salts* e *research chemicals* (Armenta, *et al.*, 2014). O mercado destas drogas diferencia-se pela rapidez à qual os fornecedores contornam a legislação com estratégias de *marketing* sofisticadas (desodorizantes, essências naturais, fertilizantes e sais de banho), oferecendo novas alternativas a produtos proibidos (EMCDDA, 2011).

O consumo destas substâncias está vulgarizado em todo o mundo e é na última década que tem tido um destaque proeminente (figura 1 e gráfico 1) com a introdução no mercado das *head/smart shops* e pela Internet, as quais vendem uma parafernália de drogas (gráfico 2) (UNODC, 2014 b; Smith, *et al.*, 2014). É ainda de salientar que, a faixa etária que mais consome este tipo de substâncias são os jovens (Mustata, *et al.*, 2009).



Figura 1) Emergência global das NSP até Dezembro de 2013.
(adaptado de UNDDC, 2014 a)

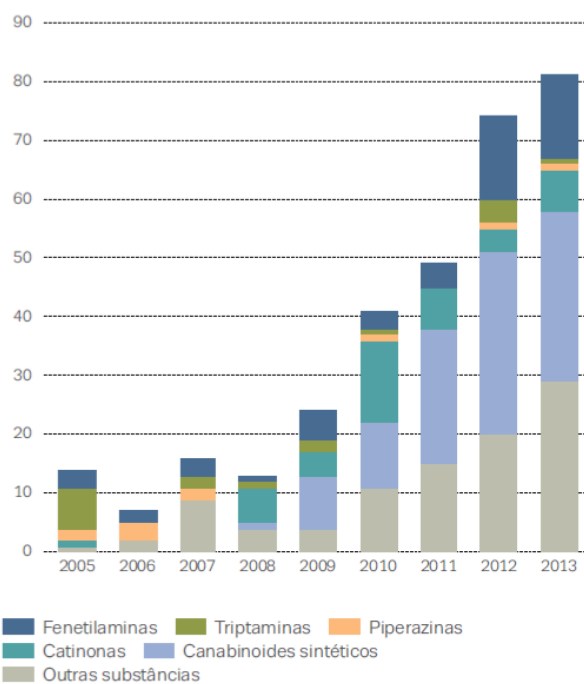


Gráfico 1) Número e principais grupos de novas substâncias notificadas ao mecanismo de alerta rápido da UE entre 2005 e 2013.
(fonte: OEDT, 2014)

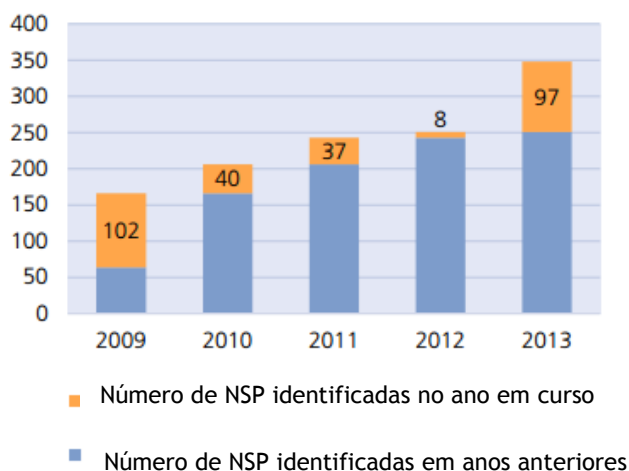


Gráfico 2) Número de NSP a nível global.
(adaptado de UNDDC, 2014 b)

A sua utilização como drogas de abuso é apoiada pelos efeitos psicotrópicos: capacidade de comunicação aumentada, autoconhecimento e empatia, distinguindo-se deste modo, das substâncias estimulantes e alucinogénias, que originam estados de agitação, euforia e alucinações visuais e auditivas (Bulcão, *et al.*, 2012).

As *designer drugs* apareceram no mercado de forma sequencial. As primeiras a surgir eram drogas derivadas da heroína. Seguidamente, surgiram os derivados das feniletilaminas (2-metil-amino-3,4-metileno-dioxi-propiofenona, N-metil-1-(1,3-benzodioxol-5-il)-2-butanamina (MBDB) e a 2,5-dimetoxi-4-iodo-feniletilamina (2C-I)). Dos derivados da triptamina, pode salientar-se a α -metil-triptamina (AMT), 5-metoxi-N,N-di-isopropil-triptamina (5-MeO-DIPT) e a 5-metoxi- α -metil-triptamina (5-MeO-AMT). Recentemente, pode-se destacar o aparecimento de NSP derivadas da piperazina (1-(4-metoxifenil)-piperazina (MeOPP), 11-(3-trifluorometilfenil)piperazina (TFMPP), 1-(3-clorofenil)-piperazina (mCPP) e 1-benzilpiperazina (BZP)), e os derivados de canabinóides (canabicicloexanol, 1-pentil-3-(1-naftoil)indol (JWH-018), 1-naftoil(1-butilindolil)metanona (JWH-073) e 2,3-hidroxicicloexil-5-(2-metiloctanil)-fenol (CP 47,497)) (Bulcão, *et al.*, 2012).

O sistema de alerta rápido da União Europeia (UE), já foi informado de 350 substâncias, 81 das quais foram notificadas em 2013, significando que o mesmo está sob pressão crescente dada a quantidade de substâncias introduzidas no mercado (OEDT, 2014).

As possibilidades de alterar as estruturas de produtos químicos, são vultosas, pelo que, o número de NSP está a aumentar continuamente representando sérios desafios na avaliação do risco e na tomada de medidas apropriadas para o seu controlo. Os métodos analíticos mais comumente empregados para a identificação e análise de NSP incluem as cromatografias gasosa (CG) e líquida (LC) muitas vezes, acopladas a espetrometria de massa (MS). Ambos os

métodos, apresentam características de separação e de identificação de potenciais compostos, pela comparação dos espectros de MS resultantes com as bibliotecas já existentes (Armenta, *et al.*, 2014).

As substâncias recentemente sujeitas a controlo, colocam novos desafios aos legisladores, pois, rapidamente são modificadas numa vasta variedade de produtos disponíveis (OEDT 2014).

Atualmente, existe uma quantidade ínfima de dados disponíveis, sobre a toxicidade em seres humanos. No que diz respeito, a métodos de identificação e deteção, vários métodos têm sido desenvolvidos por químicos analíticos e forenses (Armenta, *et al.*, 2014; Castro A., *et al.*, 2014).

1.1. METOXETAMINA (MXE)

Em 2010, foi detetada pela primeira vez Metoxetamina (MXE), em produtos recreativos comercializadas como "drogas legais", aparecendo assim uma nova substância, que está disponível, cada vez mais, na Internet (Adamowicz e Zuba, 2015). Em 2012, foi considerada uma potencial droga de interesse na área toxicológica (Abe, *et al.*, 2013). Segundo o OEDT, já foram notificados ao Sistema de Alerta Rápido 24 países, maioritariamente da UE, onde foi detetado o seu consumo. Para além disso, foram detetadas 20 mortes e 110 intoxicações não fatais associadas à sua utilização (OEDT, 2014).

As suas vendas não são atualmente controladas por lei na maioria dos países Europeus, EUA e Canadá, contudo, no Reino Unido importar ou vender esta substância é considerado legal ao contrário de possuir e consumir (Wiergowski, *et al.*, 2014; Adamowicz e Zuba, 2015).

1.1.1. Estrutura Química

A MXE, segundo a IUPAC, 2-(3-metoxifenil)-2-(etilamino) ciclo-hexanona, é considerada como um produto de desenho racional pois, exibe estrutura muito semelhante com a ketamina e a fenciclidina (PCP), consideradas drogas de abuso (Adamowicz e Zuba, 2015) (Figura 2). Foi mesmo relatado que a sua denominação se deve à contração de metoxi e ketamina (EMCDDA, 2014).

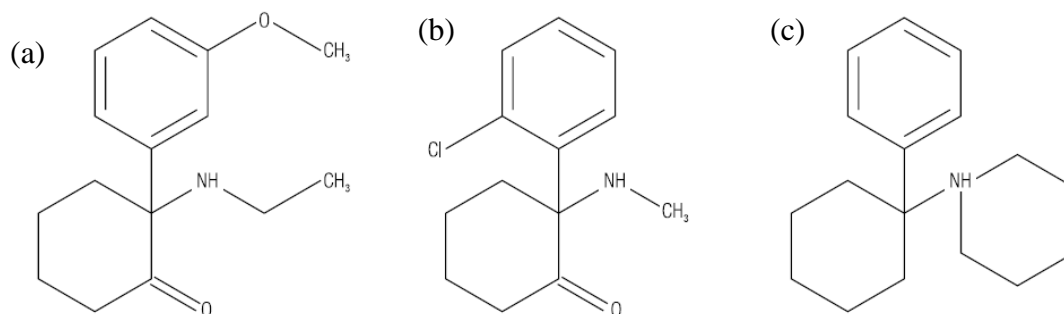


Figura 2) Estrutura química da MXE (a), ketamina (b) e PCP (c).

(fonte: Wiergowski, *et al.*, 2014)

As diferenças entre a ketamina e a MXE sugerem que a MXE apresenta propriedades menos analgésicas (substituição do radical 2-cloro no anel fenil da ketamina por um grupo 3-metoxi) e maior duração de efeitos (o grupo N-metil na amina foi substituído por um grupo N-etil) (Adamowicz e Zuba, 2015).

As divergências em relação à PCP conferem à MXE maior potência, aumentando a tendência para induzir náuseas (remoção do anel de piperidina e a substituição por um grupo etil-amina) e aumenta a afinidade para o recetor opióide μ que elimina ou, pelo menos, reduz os efeitos de alteração do humor (substituição do radical 3-metoxi pelo anel fenil) (Adamowicz e Zuba, 2015).

1.1.2. Propriedades Físico-Químicas

A MXE é considerada como uma arilciclohexilamina, que se apresenta maioritariamente, sob a forma de pó branco cristalino, contudo também está disponível na forma de comprimidos, cápsulas e em líquido (EMCDDA, 2014).

Dada a novidade desta molécula quiral, as suas propriedades físico-químicas ainda não foram descritas (EMCDDA, 2014).

1.1.3. Mecanismo de Ação

A MXE surgiu recentemente no mercado das drogas, motivo pelo qual se desconhece a sua toxicocinética (Imbert, *et al.*, 2014), mecanismo de ação ou propriedades farmacológicas (Wierowski, *et al.*, 2014), em seres humanos, pelo que hoje em dia, como consequência da sua emergência no mercado das drogas, é empregada na investigação científica de forma a entender a sua farmacologia e toxicologia (EMCDDA, 2014).

Estudos *in vitro* sugerem que a MXE tem afinidade para o recetor de NMDA (N-metil-D-aspartato), e que exerce os seus efeitos pela inibição da recaptção da dopamina, análogo ao que acontece com a ketamina. No entanto, ao contrário da ketamina também tem afinidade para o transportador da serotonina (EMCDDA, 2014 ; Wierowski, *et al.*, 2014).

O potencial de interações com medicamentos, inibidores ou indutores, ou mesmo outras drogas, ainda não foi descrito, contudo é de salientar que o uso de ketamina com outros depressores do Sistema Nervoso Central (SNC) (por exemplo, álcool) pode potenciar a depressão do SNC e/ou aumentar o risco de desenvolvimento de depressão respiratória (EMCDDA, 2014).

1.1.4. Toxicocinética

Atualmente, não existem estudos que avaliem os parâmetros toxicocinéticos como a absorção, distribuição ou excreção (EMCDDA, 2014). Contudo, existem estudos que revelam que a MXE é uma substância mais lipofílica que a ketamina, apresentando um tempo de semi-vida superior (Abe, *et al.*, 2013).

1.1.5. Modo Consumo

A MXE é consumida por inalação, injeção intravenosa ou intramuscular e aplicação sublingual, dependendo da forma como é consumida. Após o consumo, começam a surgir os seus efeitos entre 10 a 20 minutos podendo manter-se cerca de 1 a 3 horas, dependendo da via de administração (Wierowski, *et al.*, 2014). Normalmente, os efeitos começam a surgir entre 30-90 minutos quando inalado e 5 minutos após a injeção intramuscular. De acordo com os consumidores, as doses consumidas variam entre 10-200 mg (EMCDDA, 2014).

1.1.6. Efeitos Tóxicos

Consumidores relatam que se sentem eufóricos e com alucinações (sintomas semelhantes aos observados com o consumo de ketamina). Podem também ser observados sintomas como: tonturas, náuseas, taquicardia, nistagmo, vômitos, ansiedade, diarreia e reações de pânico (Wierowski, *et al.*, 2014).

Recentemente foi relatado na Suécia, um óbito envolvendo esta droga, onde o indivíduo apresentou uma concentração de MXE no sangue de 8,6 mg/L em associação ao consumo de canabinóides em níveis terapêuticos (Imbert, *et al.*, 2014).

A nível experimental em ratos, Imbert e colaboradores em 2014, relatam danos no trato urinário dado que exibem alterações histológicas nos rins e na bexiga após exposição crônica (Imbert, *et al.*, 2014).

1.1.7. Tratamento

O tratamento da intoxicação é sintomático e os procedimentos são semelhantes aos utilizados em caso de intoxicação por ketamina ou PCP. Os casos de intoxicação aguda descritos até à data, foram associados ao aparecimento de hipertermia, contudo não se sabe ao certo a relação deste sintoma com a substância (Wierowski, *et al.*, 2014).

1.1.8. Curiosidades

A MXE, está a começar a ser regulamentada em diversos países, contudo já existe uma alternativa para a sua substituição, a Metoxfenidina (MXP). A MXP foi comercializada em 2013, com uma estrutura química não semelhante à MXE. É um antagonista de NMDA que tem como efeitos secundários agudos hipertensão e convulsões. Está relatada, também, a perda de memória a longo prazo e dormência nos membros (Hout e Hearne, 2015).

1.1.9. Análise em amostras biológicas

A MXE apesar de considerada relativamente recente já foi alvo de vários estudos nos quais foi analisada por diferentes técnicas cromatográficas acopladas a diferentes detetores.

A pesquisa foi efetuada na base de dados pública *Pubmed* (base de dados bibliográficos da *National Library of Medicine*), limitada a artigos científicos publicados entre 2000 e 2015. Foram utilizadas as seguintes palavras-chave: “*methoxetamine*” “*quantification*” e “*chromatography*”. A tabela 1, resume as principais características dos trabalhos que obedeceram a estes critérios de seleção, úteis à posterior contextualização dos resultados obtidos neste trabalho. Nesta tabela, apresentam-se os estudos realizados com este composto, bem como as técnicas de extração, métodos de deteção, matriz, LOD (limite de deteção) e LLOQ (limite de quantificação).

Se observarmos com atenção, não existem muitos métodos onde a sua quantificação exerça um papel principal, mas sim, a sua deteção que é bem evidenciada na literatura em casos de intoxicação. É ainda de referir que, por a MXE ser um composto recente, os estudos que evidenciam a sua quantificação em diversas matrizes biológicas, são residuais.

Tabela 1) Revisão das metodologias analíticas que visam a determinação de MXE em amostras biológicas.

Técnica de extração	Método de detecção (fonte q.a.)	Matriz (volume q.a)	LOD	LLOQ	Referência
Online*	LC-MS/MS (eletrospray)	Plasma (100 µL)	1ng/mL	2ng/mL	Abe, <i>et al.</i> , 2013
s.e.	GC-MS LC-MS/MS (turboionspray)	Soro e urina cabelo	2 µg/L 0,5 pg/mg	10 µg/L 0,5 pg/mg	Imbert, <i>et al.</i> , 2014
SPE	LC-MS/MS	sangue (1 mL)	0,5 ng/mL	1 ng/mL	Elían e Hackett, 2014
s.e.	LC-MS/MS (eletrospray)	Urina (50 µL)	0,5 ng/mL	0,5 ng/mL	Saffar, <i>et al.</i> , 2013

* *turbulent flow online extraction*

q.a. quando aplicável; SPE (Extração em fase sólida); GC-MS (Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa); LC-MS/MS (Cromatografia líquida-espetrometria de massa em tandem); s.e. (sem extração).

1.2. PIPERAZINAS

As piperazinas foram desenvolvidas, inicialmente, como anti-helmínticos (Rosenbaum, *et al.*, 2012), no entanto desde 2000, o principal fim é o seu uso recreativo, fazendo assim parte do mercado das drogas (Arbo, *et al.*, 2012). Podem ser divididas em duas classes: as benzilpeperazinas, como a N-benzilpiperazina (BZP); e em fenilpiperazinas como 1-(3-clorofenil)piperazina (mCPP), 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina (TFMPP), e 1 (4-etoxifenil) piperazina (MeOPP) (Arbo, *et al.*, 2012).

As piperazinas apresentam-se como uma estrutura heterocíclica hexagonal, que contém no anel saturado dois átomos de azoto em posições opostas (figura 3) (Gee e Schep, 2013).

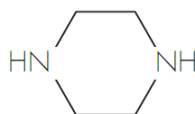


Figura 3) Estrutura química das piperazinas.
(adaptado de Arbo, *et al.*, 2012)

A estrutura heterocíclica hexagonal, presente na figura 3, está presente em alguns fármacos, de destacar: ciclizina, sildenafil (Viagra®), ciprofloxacina e outras fluorquinolonas (Escada, 2007).

Entre as drogas emergentes, são as piperazinas que constituem uma alternativa para as anfetaminas ou a cocaína, uma vez que mimetizam os seus efeitos estimulantes. Assim, os consumidores consideram estes derivados, como o principal ingrediente do “ecstasy legal”. É ainda de destacar que, estas substâncias têm sido alvo de apreensões e já causaram várias fatalidades. As piperazinas estão entre as drogas mais comuns e são compradas principalmente a partir de *sites* de fornecedores de Internet, sob a forma de comprimidos. O gráfico 1, revela a incidência destes compostos no consumo de drogas (Staack, *et al.*, 2013; Castro, *et al.*, 2014).

Derivados de piperazinas apareceram no mercado, comercializados sob o nome de “Rapture”, “Frenzy”, “A2”, “Bliss”, “Charge”, “Herbal ecstasy”, “Legal X” e “Legal E”. Geralmente, são consumidas como cápsulas, comprimidos, mas também podem existir sob a forma de pó, líquido ou como um adulterante da metilenodioximetanfetamina (MDMA) e da cocaína (Arbo, *et al.*, 2012).

Os comprimidos podem possuir várias cores, formas e mesmo tamanhos. Para além disso, podem ser impressos com logótipos, como por exemplo “Chanel” ou “Smiley” (figura 4) de forma a tornarem-se mais apelativos aos consumidores (Escada, 2007).



Figura 4) Apresentação das piperazinas em estudo.

(fonte: Escada, 2007)

O primeiro abuso documentado de um derivado de piperazina ocorreu com a BZP em 1996 nos EUA (Austin e Monasterio, 2004). Em setembro de 2004, foi detetada uma droga idêntica nas ruas da Suécia e da Holanda, 1-(3-clorofenil) piperazina (mCPP) que, foi posteriormente encontrado em 26 membros da UE e na Noruega. Estima-se que em 2006, cerca de 823 mil comprimidos de mCPP foram apreendidos na UE (Arbo, *et al.*, 2012).

De forma resumida serão descritas, as principais características bem como a toxicocinética, mecanismo de ação e efeitos das piperazinas, objeto de estudo.

1.2.1. N-benzilpiperazina (BZP)

A BZP (figura 5) surgiu no mercado como um estimulante natural e legal com indicações que aumentava a energia, vitalidade e capacidade mental, conquistando por isso um certo prestígio. Atualmente, é considerada uma droga que pode ser consumida concomitantemente com o etanol, TFMPP, MDMA, cannabis, e/ou outros estimulantes, atuando ao nível do aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial (Johnstone, *et al.*, 2007; Rosenbaum, *et al.*, 2012; Vale, 2012).

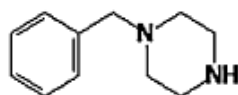


Figura 5) Estrutura química de 1-benzilpiperazina (BZP).
(adaptado de Arbo, *et al.*, 2012)

1.2.1.1. Mecanismo de ação

A BZP exerce efeitos serotoninérgicos provocados pela inibição da recaptação e do transporte de serotonina. Para além disso, aumenta a libertação de catecolaminas, como é o caso da dopamina, a partir de terminações nervosas simpáticas. Esta amplificação pode levar a uma desregulação dos recetores pré-sinápticos de forma semelhante às drogas de abuso como é o caso da cocaína e das anfetaminas (Vale, 2012; Johnstone, *et al.*, 2007; Rosenbaum, *et al.*, 2012).

1.2.1.2. Toxicocinética

Os consumidores relatam que a dose é cerca de 75 a 150 mg e o efeito resultante dura 6 a 8 h. É rapidamente absorvida após administração por via oral e o seu metabolismo ocorre predominantemente no fígado (Gee e Schep, 2013). É de referir que esta piperazina, é pouco metabolizada, pelo que é maioritariamente excretada por via urinária sob forma inalterada (Rosenbaum, *et al.*, 2012).

É uma piperazina, cuja toxicocinética não está totalmente compreendida havendo por isso poucos dados tanto em humanos como em animais. O seu metabolismo foi estudado em ratos e de acordo com os metabolitos identificados, tem sido proposto que a BZP sofre hidroxilação e desalquilação em reações de fase I (Monteiro, *et al.*, 2013).

1.2.1.3. Efeitos tóxicos

Os principais efeitos incluem palpitações, ansiedade, tonturas, dor de cabeça, taquicardia, dor no peito, hipertensão arterial, agitação, confusão e desconforto gastrointestinal, incluindo náuseas, vômitos e dor abdominal. Por vezes e, dependendo da dose, os consumidores podem apresentar efeitos mais extremos como hipertermia, convulsões, e insuficiência respiratória (Vale, 2012).

1.2.1.4. Tratamento

O tratamento realizado é essencialmente ao nível de suporte, onde sintomas como agitação e convulsões podem ser tratados com benzodiazepinas (Rosenbaum, *et al.*, 2012).

1.2.2) 1-(4-metoxifenil) piperazina (MeOPP)

A MeOPP (figura 6) é sintetizada através da substituição do grupo 4-metoxi. É de salientar que existe pouca informação acerca desta piperazina (Stack e Maurer, 2003).

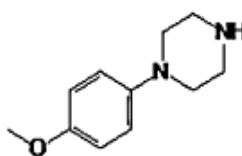


Figura 6) Estrutura química de 1-(4-metoxifenil) piperazina (MeOPP)
(adaptado de Arbo, *et al.*, 2012).

1.2.2.1. Mecanismo de ação

Para MeOPP o mecanismo de ação ainda não está descrito. Pensa-se que possivelmente atue de um modo semelhante a outras fenilpiperazinas. Sabe-se que é metabolizada em grande extensão, contudo, ao contrário de outras piperazinas a via metabólica com mais relevância é a O-desmetilação do grupo metoxil do anel aromático (Gee e Schep, 2013; Escada, 2007).

1.2.2.2. Toxicocinética

A MeOPP, na maioria das vezes é ingerida sob a forma de comprimidos ou pó sendo por isso o consumo oral a via de administração mais usual. Consumidores quantificam a dose típica para consumo entre 50 a 500 mg, dose superior a outras piperazinas (Who¹, 2012). Existem poucos dados acerca da farmacocinética, no entanto, dada a sua semelhança estrutural, pode-se supor que os seus efeitos estejam na mesma linha que anfetaminas. O seu metabolismo ocorre predominantemente a nível hepático, como acontece com a BZP (Stack e Maurer, 2003; Gee e Schep, 2013).

1.2.2.3. Efeitos tóxicos

Após administração começam a surgir náuseas, para além dos efeitos estimulantes e alucinogénios relatados (Who, 2012).

1.2.3) 1-(3-clorofenil) piperazina (mCPP)

A 1-(3-clorofenil)piperazina (mCPP), figura 7, é vulgarmente conhecida como “X4” e foi identificada pela primeira vez em 2004 na Suécia (Larano, *et al.*, 2010).

A maioria destes compostos, está sob a forma de comprimidos com aspeto idêntico aos do *ecstasy*. É de salientar que esta piperazina, por vezes é ingerida com outras drogas (por exemplo o TFMP ou MDMA) (Larano, *et al.*, 2010).

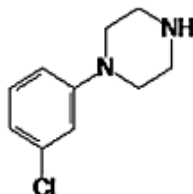


Figura 7) Estrutura química de 1-(3-clorofenil) piperazina (mCPP).
(adaptado de Arbo, *et al.*, 2012)

¹ World Health Organization

1.2.3.1. Mecanismo de ação

O mecanismo de ação, caracteriza-se pela capacidade de ligação aos recetores de serotonina levando a um aumento da mesma no SNC e, pela afinidade para o recetor adrenérgico. Também está descrita, libertação de dopamina, ainda que ligeira (Gee e Schep, 2013; Escada, 2007).

1.2.3.2. Toxicocinética

A mCPP é a piperazina que melhor está caracterizada. É um metabolito ativo de alguns fármacos antidepressivos, comercializados em Portugal, como é o caso da trazadona (Larano, *et al.*, 2010).

O consumo desta substância é maioritariamente sob a forma de comprimidos, com características muito semelhantes aos comprimidos de *ectasy*. A quantidade varia entre 22 a 80 mg (Larano, *et al.*, 2010). Estudos revelam que após esta administração o tempo de semi-vida de eliminação da substância varia de 2,6 a 6,1 horas (Who, 2012).

O metabolismo da mCPP ocorre predominantemente no fígado, análogo ao que acontece com outras piperazinas, mencionadas anteriormente. Na fase I da biotransformação, são formados metabolitos por hidroxilação do anel para formar 4-OH-1-(3-clorofenil) piperazina, e por degradação do radical piperazina para formar N-(3-clorofenil)-1,2-etanodiamina, 3-chlorobenzenamina, 4-amino-2-clorofenol e 4-[(2-aminoetil)amino]-2-clorofenol. Na fase II foram identificados análogos de sulfato (Gee e Schep, 2013).

1.2.3.3. Efeitos tóxicos

Os efeitos apresentados incluem ansiedade, náuseas, tonturas, ataques de pânico e enxaquecas (Gee e Schep, 2013).

1.2.4) 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina (TFMPP)

A TFMPP (figura 8) é na maior parte das vezes consumida concomitantemente com a BZP na proporção de 2:1 induzindo efeitos semelhantes com os produzidos ao MDMA (Arbo, *et al.*, 2015).

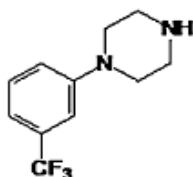


Figura 8) Estrutura química de 1-(3-trifluorometilfenil) piperazina (TFMPP).

(adaptado de Arbo, *et al.*, 2012)

1.2.4.1. Mecanismo de ação

Estudos têm demonstrado que a TFMPP atua sobre o transportador de serotonina, libertando a mesma de um modo semelhante ao MDMA e a outras anfetaminas (Rosenbaum, *et al.*, 2012). Contudo ao invés da BZP, a TFMPP não possui propriedades dopaminérgicas ou adrenérgicas e impede a recaptação de dopamina (Gee e Schep, 2013).

1.2.4.2. Toxicocinética

A TFMPP quando administrada por via oral, é rapidamente absorvida e largamente metabolizada no organismo sendo posteriormente excretada na urina sob a forma de metabolito, 4-hidroxi-TFMPP. Para além disso, à semelhança das outras piperazinas, o seu metabolismo ocorre predominantemente a nível hepático (Rosenbaum, *et al.*, 2012; Gee e Schep, 2013; Moreno, *et al.*, 2012b).

A sua distribuição, indicia a suscetibilidade a atravessar a barreira hematoencefálica pois são encontradas concentrações máximas após administração por via intravenosa num curto espaço de tempo (aproximadamente 5 minutos) (Gee e Schep, 2013).

1.2.5. Análise de piperazinas em amostras biológicas

As piperazinas apesar de serem compostos relativamente recentes já foram alvo de vários estudos nos quais foram analisadas por diferentes técnicas cromatográficas acopladas a diversos detetores.

Na tabela 2, apresentam-se alguns estudos realizados com as piperazinas do presente trabalho, bem como as técnicas de extração, métodos de deteção, matriz, LOD (limite de deteção) e LLOQ (limite de quantificação). Esta pesquisa foi efetuada na base de dados da *U.S. National Library of Medicine, National Institutes of Health* (PubMed) utilizando as palavras-chave: “piperazines”, “quantification”, “chromatography” centrado-se nos analitos em estudo neste trabalho e em artigos publicados entre 2000 e 2015.

Tabela 2) Revisão das metodologias analíticas que visam a determinação de piperazinas em amostras biológicas.

Analito	Técnica de extração	Método de deteção (fonte q.a)	Matriz (quantidade q.a.)	LOD (ng/mL)	LLOQ (ng/mL)	Referência
BZP	SPE	LC-MS/MS (API)	Cabelo (20 mg)	-	-	Bassindale e Berezowski, 2011
BZP, TFMPP, mCPP	s.e.	LC-MS (ESI)	Urina (1 mL)	8,3 (BZP) 6,5 (TFMPP) e 29 (mCPP)	30 exceto para mCPP 96	Bell, <i>et al.</i> , 2011
MeOPP	LLE	GC-MS (EI)	Urina de rato (5 mL)	50	-	Staak, <i>et al.</i> , 2003
BZP, MeOPP, mCPP, TFMPP	SPE	LC-MS/MS (ESI)	Plasma (1mL)	5; 2,5;1;5 respetivamente	-	Wohlfarth, <i>et al.</i> , 2010
TFMPP	SPE	HPLC-FLD	Plasma (20µL)	4,6	15,2	Wada, <i>et al</i> 2011
MeOPP, mCPP, TFMPP	MEPS	UPLC-DAD	Urina (100µL)	-	0,5	Moreno, <i>et al.</i> , 2012a

q.a. quando aplicável; LLE (Extração líquido-líquido); SPE (Extração em fase sólida); GC-MS (Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa); UPLC-DAD (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-Detector *Diode-Array*) mCPP (1-(3-clorofenil)-piperazina); MeOPP (1-(4-metoxifenil)-piperazina); MEPS (Microextração em Seringa Empacotada) ; TFMPP (1-(3-trifluorometilfenil)-piperazina); HPLC-FLD (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-Detector Fluorescência); ESI (Ionização por eletropulverização); API (Ionização à pressão atmosférica) EI (ionização por Impacto eletrónico); s.e. (sem extração).

1.2.6. Legislação

As piperazinas não são abrangidas por qualquer legislação ou controlo internacional, contudo alguns países estão a introduzir medidas de controlo interno, como é o caso de Portugal, onde a BZP está sujeita às medidas aplicadas às substâncias psicotrópicas e aos estupefacientes encontrando-se sob regulamentação da Lei n.º 18/2009 de 11 de Maio, que procede à alteração do Decreto-Lei n.º 15/93, de 22 de Janeiro (Procuradoria-Geral; Monteiro, *et al.*, 2013).

2. FLUIDO ORAL (FO)

Análises qualitativas e quantitativas pressupõem o recurso a materiais biológicos convencionais, tais como plasma, urina, sangue, ou soro. No entanto, recentemente tem-se apostado em matrizes alternativas com interesse na toxicologia clínica e forense, de onde se dá principal destaque ao fluido oral (FO) (Woźniakiewicz, *et al.*, 2014).

O uso desta matriz, foi empregado pela primeira vez em 1970, com fins de monitorização terapêutica, desde então, e com o avanço da tecnologia no que se refere ao desenvolvimento de equipamentos analíticos de alta sensibilidade, tem-se recorrido ao uso da mesma por ser considerada uma excelente matriz para diagnóstico (Almoharib, *et al.*, 2014; Gallardo, *et al.*, 2009).

FO é uma excelente matriz do ponto de vista toxicológico, (Gallardo, *et al.*, 2009), constituído maioritariamente por água (> 99%) todavia, ainda existe uma pequena percentagem, cerca de 1%, que contém glicoproteínas, enzimas, e componentes antibacterianos (Abdel-Rehim A., e Abdel-Rehim M., 2014). É de mencionar que o pH do FO é de 6,7 e que a maioria das drogas passam para esta matriz, através de difusão passiva (Woźniakiewicz, *et al.*, 2014).

Os termos FO e saliva são muitas vezes utilizados de forma permutável para designar a mesma amostra biológica. Todavia, o FO é uma mistura de fluidos (incluindo saliva) libertada por três grandes glândulas salivares: parótida, sublingual e submandibular, presentes na cavidade bucal. Estas glândulas e as secreções da via naso-faríngea contribuem para a produção desta matriz. Um ser humano saudável produz cerca de 500-1500 mL por dia de FO (Woźniakiewicz, *et al.*, 2014; Montesano, *et al.*, 2015; Gallardo, *et al.*, 2009).

Esta matriz apresenta inúmeras vantagens inerentes à sua utilização como: amostra não invasiva e de fácil recolha com potencial interesse na deteção de drogas de abuso no âmbito rodoviário (Gallardo, *et al.*, 2009). Para, além disso, a concentração proteica é menor, o que reduz a ligação da droga às proteínas (Abdel-Rehim A., e Abdel-Rehim M., 2014). Todo o processo pode ser facilmente controlado, pelo que a sua deturpação é considerada residual (Gallardo, *et al.*, 2009).

As desvantagens intrínsecas à sua utilização estão relacionadas com a quantidade de recolha não só afetada por uma série de variáveis fisiológicas como a viscosidade e o pH como pode variar com o estado emocional, com a gravidez, com uso de fármacos ou com alterações hormonais relacionadas com a menopausa (Gallardo, *et al.*, 2009; Montesano, *et al.*, 2015). A droga pode, ainda estar presente nesta matriz em concentrações relativamente baixas, em comparação a outras matrizes de diagnóstico. Os estudos

apresentados nesta matriz ainda são escassos o que leva à utilização de métodos analíticos precisos e sensíveis (Woźniakiewicz, *et al.*, 2014; Montesano, *et al.*, 2015).

O FO pode ser recolhido através da inserção de um dispositivo apropriado na boca durante alguns minutos, e, em seguida é colocada uma solução tamponada, que pode interferir na concentração dos analitos quando presentes em baixas concentrações. Outro método de recolha comumente utilizado é o *spitting*, que para além de ser um método passivo, acarreta menos custos e reflete com maior precisão as concentrações reais do analito (Montesano, *et al.*, 2015).

3. MICROEXTRAÇÃO EM SERINGA EMPACOTADA (MEPS)

A microextração em seringa empacotada (MEPS) é uma técnica de extração recentemente desenvolvida por Abdel-Rehim em 2004, nos laboratórios da Astra Zeneca, Suécia. É um método muito promissor para a extração de drogas e metabolitos de amostras biológicas (Nováková e Vičková, 2009).

O procedimento desta técnica de extração é realizado com recurso a uma seringa (100-250 μL) e a um dispositivo cilíndrico (BIN - *Barrel Insert and Needle Assembly*), (figura 9) onde se insere o sorbente (1-4 mg) que retém os analitos (Pereira, *et al.*, 2014).



Figura 9) Seringa de MEPS (250 μL) (a) e dispositivo cilíndrico (BIN - *Barrel Insert and Needle Assembly*) (b)².

Esta técnica é muito equivalente à extração em fase sólida (SPE), afirma-se mesmo que é uma miniaturização da mesma dado que, o volume de amostra é bastante inferior (10 a 250 μL) (Abdel-Rehim, 2011), apresentando a mesma ordem de grandeza de recuperação e sensibilidade (Abdel-Rehim, 2004).

² Adaptado da empresa que comercializa o dispositivo (*SGE Analytical Science*)

A apresentação da MEPS, comercialmente disponível, recorre ao uso dos mesmos solventes e colunas de SPE convencionais, sendo que o sorbente na MEPS está integrado numa seringa de manipulação o que permite combinar várias etapas tais como a extração e a injeção totalmente automatizadas com um dispositivo de injeção de Cromatografia Gasosa (GC) ou Cromatografia Líquida (LC) (Abdel-Rehim, 2011).

As diferenças apresentadas pelas técnicas SPE e MEPS, são que enquanto o cartucho de SPE é de uso único, na MEPS o sorbente de extração pode ser reutilizado até mais de 100 vezes com amostras de plasma ou urina e mais de 400 vezes para as amostras de água. O tempo de manipulação também difere sendo que em MEPS é menor (1-2 minutos) quando comparado como SPE (15-20 minutos) (Abdel-Rehim, 2004).

Esta técnica apresenta algumas vantagens em relação à SPE, algumas delas inumeradas anteriormente como a possibilidade da reutilização do sorbente, menos tempo dispendido, e pela hipótese de automatização do processo. A MEPS pode ainda, ser utilizada para matrizes complexas como acontece com a SPE.

As desvantagens prendem-se com a possibilidade de formação de bolhas durante a manipulação do dispositivo e, com a velocidade de movimento do pistão que tem de ser homogênea ao longo da extração. Se a velocidade é demasiado elevada, não permite a adsorção do analito levando a resultados de recuperação enganosos. O sorbente pode ainda, ficar obstruído e inutilizável se amostras forem viscosas ou demasiado concentradas e se passarem no sorbente sem uma prévia diluição. A MEPS, também não é uma técnica adequada para o processamento de grandes volumes de amostras, porque como a seringa só tem capacidade de 100-250 μL , para volumes superiores teria de se fazer passar muitas vezes a amostra, tornando assim o processo moroso mesmo que automatizado. Além disso, a capacidade de reutilização do sorbente também ficaria afetada, uma das principais vantagens da MEPS (Nováková e Vičková, 2009; Pereira, *et al.*, 2014).

3.1. Tipos de sorbentes

A escolha correta do sorbente sugere o correto desempenho analítico de toda a metodologia dado que os sorbentes, definem o mecanismo e a interação dos analitos para a fase estacionária (hidrofóbica, polar e iónica). Em MEPS, o material adsorvente mais utilizado para o enchimento ou revestimento é a sílica (colunas C_2 , C_8 , C_{18} e M_1 : troca catiónica) (Nováková e Vičková, 2009) que introduzem as propriedades hidrofóbicas proporcionais ao grupo alquil. No entanto, também existem adsorventes poliméricos, que têm por base o polímero divinilbenzeno (DVB) ou o carbono grafitico poroso com baixa área de superfície específica mas com elevada resistência mecânica e térmica, bem como com capacidade de adsorção, elevada (Pereira, *et al.*, 2014).

3.2. Procedimento de Extração

O procedimento de extração (figura 10) compreende várias etapas das quais resulta o acondicionamento dos solventes, passagem da amostra pela coluna, lavagem de possíveis interferentes e eluição do analito de interesse. Todas estas etapas, são realizadas num único dispositivo (Pereira, *et al.*, 2014).

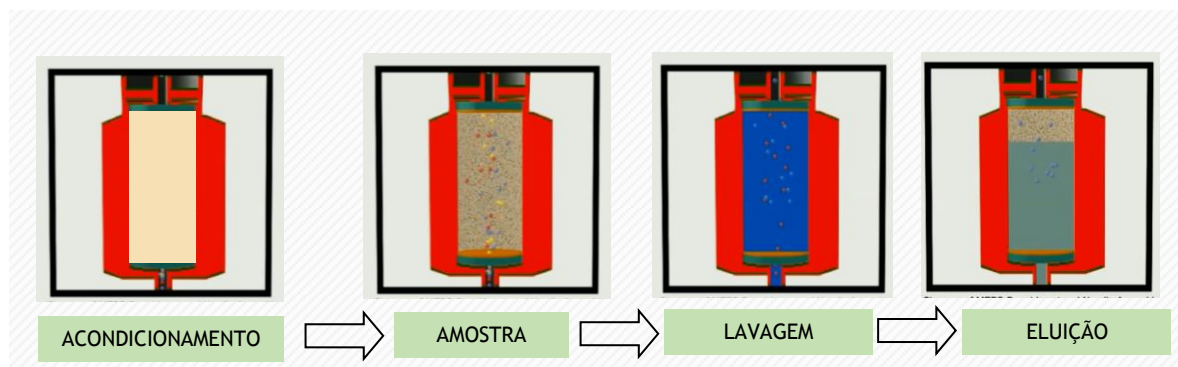


Figura 10) Procedimento de extração na coluna de MEPS³

3.2.1. Acondicionamento

O acondicionamento é essencial para garantir que estão reunidas as condições necessárias para a passagem da amostra. Assim, os compostos aderem mais facilmente ao sorbente. Neste seguimento a solução normalmente utilizada é o metanol que favorece a ativação dos grupos ligantes do sorbente (Simpson, 2000).

3.2.2. Passagem da amostra

A viscosidade da amostra é um fator em ter em linha de conta, dado que, posteriormente poderá causar a oclusão da coluna, assim, é necessário proceder-se à diluição das amostras antes que estas passem pela coluna de MEPS (Abdel-Rehim, 2004). A diluição pode ser efetuada com água pura ou ácido fórmico a 0,1% em água (diluição 1:25 em sangue e 1:5 em plasma). Pode ainda ser inserido um passo de centrifugação onde as macropartículas desnecessárias são removidas (Abdel-Rehim, 2011).

³Adaptado (SGE Analytical Science) empresa que comercializa dispositivo, disponível em <http://www.sge.com/documents/applications-information/technical-articles/meps-> (consultado a 20 novembro de 2014)

A amostra é aspirada através do suporte sólido o que faz com que os analitos fiquem adsorvidos ao mesmo (figura 10) para posteriormente serem quantificados (Nováková e Vičková, 2009). A recuperação dos analitos, é influenciada com o número de ciclos de aspiração (normalmente 1-10 ciclos de aspiração/ejeção), ou *strokes*, sendo que, o seu maior número, induz inevitavelmente maior recuperação dos analitos. A velocidade de aspiração da amostra através do adsorvente pode ir desde 10 a 20 mL/s de forma a obter uma melhor interação entre o analito e o adsorvente (Abdel-Rehim, 2004).

3.2.3. Lavagem

Neste passo são eluídos possíveis componentes da matriz e preferencialmente mantidos os analitos imobilizados no adsorvente (figura 10). Os componentes são eluídos com o uso de um pequeno volume (50-100 µL) de água com 5-10% de solvente orgânico (normalmente metanol, isopropanol ou acetonitrilo). No caso de um adsorvente de troca iônica, para bases deve-se ter um solvente de lavagem ligeiramente ácido e vice-versa (Abdel-Rehim, 2004).

3.2.4. Eluição

Este solvente deve ser capaz de deslocar os analitos do adsorvente num pequeno volume (20-50 µL) e deverá ser volátil e miscível com o solvente da amostra e a fase móvel (quando usado diretamente em LC). Normalmente é usado um solvente orgânico (metanol, isopropanol e acetonitrilo), puro ou misturado com soluções ácidas ou básicas (0,1-3%) (Abdel-Rehim, 2011).

3.2.5. Reutilização do dispositivo

As características do adsorvente fazem com que seja possível limpá-lo facilmente com o propósito de uma posterior reutilização (Pereira, *et al.*, 2014). Este passo é fundamental e para além da reutilização do adsorvente da coluna de MEPS tem como objetivo diminuir ou eliminar possíveis efeitos de *carry-over*. São recomendadas duas soluções de lavagem. A primeira solução deve ser um solvente orgânico (metanol, isopropanol ou acetonitrilo) com uma pequena percentagem de ácido ou base. A segunda, pode ser uma solução metanólica de baixa percentagem, normalmente 5%, ou simplesmente água (Abdel-Rehim, 2011).

4. CROMATOGRAFIA GASOSA (GC) E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA (LC)

No presente trabalho, como técnicas analíticas serão utilizadas a cromatografia gasosa (GC), para o doseamento de MXE e a cromatografia líquida (LC) para o doseamento das piperazinas, acopladas à espectrometria de massa. Ambas as técnicas são amplamente conhecidas desde a sua invenção com múltiplos usos nas mais diferentes vertentes das análises, por esse motivo não serão descritas nesta introdução. No entanto, o seu acoplamento à espectrometria de massa foi um acontecimento mais recente que tem levado aos seus descobridores ser premiados com o Nobel da Química (Kruve, *et al.*, 2015). Nas seguintes linhas, será descrito de forma resumida as fontes de ionização mais comumente utilizadas em GC e LC bem como uma pequena introdução sobre a espectrometria de massa para que seja mais fácil compreender as potencialidades desta técnica instrumental.

4.1. Fontes de Ionização em GC

A geração de um grupo de iões específicos de cada analito a partir de uma molécula requer energia. Assim, podem ser encontrados dois tipos de fontes de ionização em GC: a ionização por impacto electrónico (EI) e a ionização química (IQ), sendo que a primeira é a mais utilizada (Neves e Freitas, 1996).

A EI é o modo de ionização pelo qual a amostra é introduzida na câmara de ionização que se encontra sob vácuo. O feixe de electrões produzido pelo filamento de luz atravessa a amostra provocando a sua ionização, por ação de um eléctrodo com potencial positivo (normalmente 70 V). No final à formação de fragmentos de iões (figura 11) (Neves e Freitas, 1996).

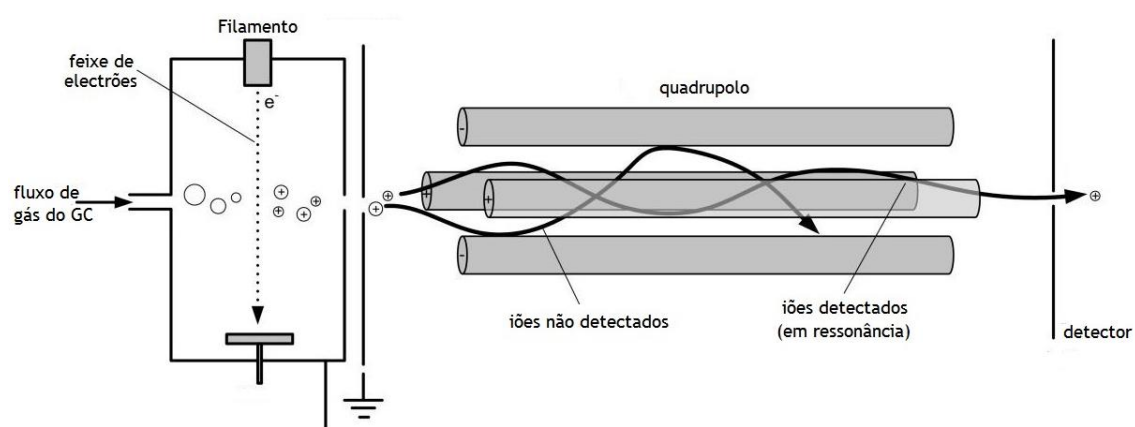


Figura 11) Fonte de ionização por impacto electrónico e do quadrupolo associados ao GC.

(Fonte: Santos, 2014)

A IQ, introduzida em 1966, exibe um gás na fonte iônica a uma pressão comparativamente elevada (1 Torr), oposto da EI que tem um filamento e que opera a pressões mais baixas. O feixe de elétrons gera íons que ionizam as moléculas do gás por colisão com as moléculas do composto, o que leva à ionização das moléculas do composto (Neves e Freitas, 1996).

4.2. Fontes de Ionização em LC

Durante muito tempo, o acoplamento da cromatografia líquida à espectrometria de massa, foi dificultado pela transferência de moléculas de analito da fase líquida para a fase gasosa como íons, o que foi superado pelas fontes de ionização à pressão atmosférica (API) (Kruve, *et al.*, 2015).

As fontes API, cobrem uma ampla gama de analitos e polaridade de solventes. As mais comuns são eletropulverização (ESI), fotoionização à pressão atmosférica (APPI) e a ionização química à pressão atmosférica (APCI). Em todas elas, é aplicável o modo de ionização positivo e negativo, apesar do primeiro ser mais comum. Os íons positivos são comumente formados como moléculas de analito protonadas $[M+H]^+$ e como adutos com cátions (normalmente sódio ou potássio). O modo de ionização negativa, é comum ocorrer por desprotonação das moléculas do analito $[M-H]^-$ (Kruve, *et al.*, 2015).

As fontes API apresentam são consideradas ímpares pois, são capazes de produzir íons em fase gasosa com pouca ou nenhuma decomposição espontânea de analitos, o que as torna únicas. Estas fontes quando combinadas os espectrómetros de massa que fornecem sensibilidade ao método, fornecem um procedimento sensível na determinação de analitos mesmo em amostras complexas (Kruve, *et al.*, 2015).

O mecanismo inerente da ESI (figura 12) é a aplicação de um potencial elétrico elevado onde ocorre a formação de pequenas gotículas que *à posteriori*, sofrem evaporação e repulsão iônica. O gás de cortina aplicado é otimizado de forma a que, os íons de interesse cheguem ao detetor para serem quantificados (Quintela, *et al.*, 2005).

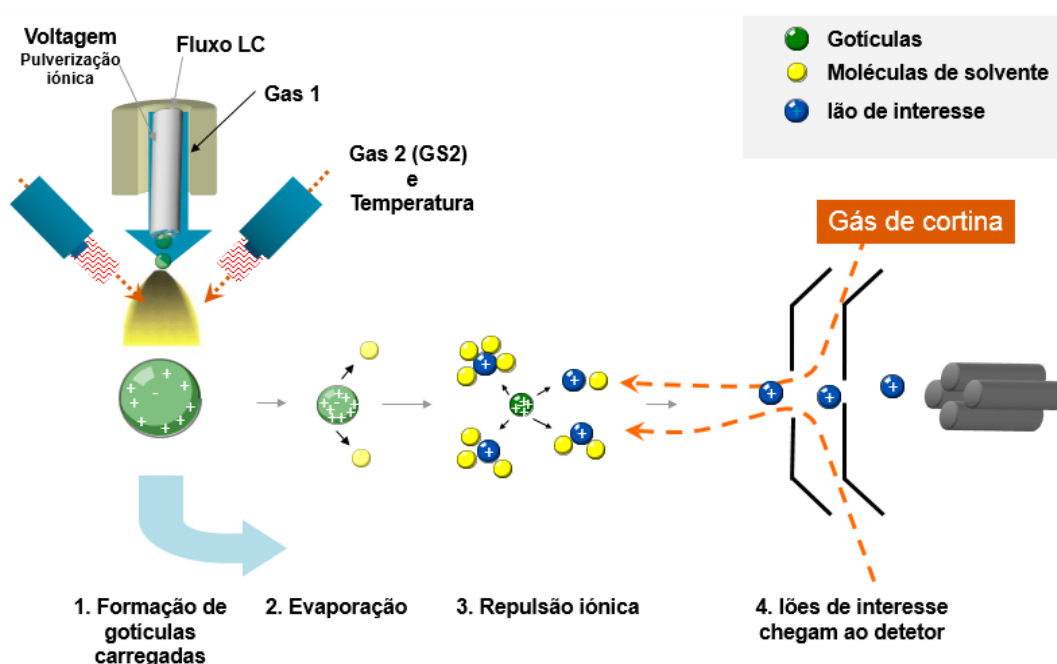


Figura 12) Ionização por eletropulverização (modo positivo)⁴.

5. Espectrometria de Massa em Tandem

A cromatografia separa componentes de misturas, porém, não possui capacidade analítica, a não ser que se associe a um sistema de detecção que distingue inequivocamente a substância analisada, como é o caso da espectrometria de massas, onde os íons gerados na fonte de ionização são separados segundo as suas razões m/z , resultando num padrão característico de cada analito, o espectro de massa. É ainda de salientar, que este detector mede a abundância de cada íon. Assim, esta fusão, constitui uma ferramenta analítica poderosa aliada a um processo altamente específico (Neves e Freitas, 1996; Krueve, *et al.*, 2015).

A espectrometria de massa em tandem, MS/MS, em relação a métodos de espectrometria convencionais, MS, têm tido maior visibilidade pois permite a identificação do analito de forma a que o número de falsos positivos seja menor, permitindo resultados mais fiáveis. A sensibilidade destes detectores permite, por isso, determinar analitos mesmo quando presentes em concentrações baixas e/ou em matrizes complexas (Krueve, *et al.*, 2015).

⁴ Adaptado do manual do equipamento

5.1. Modos de aquisição

O acoplamento de MS/MS gera vários benefícios porque permite a análise por diferentes formas, tal como sugere a figura 13.

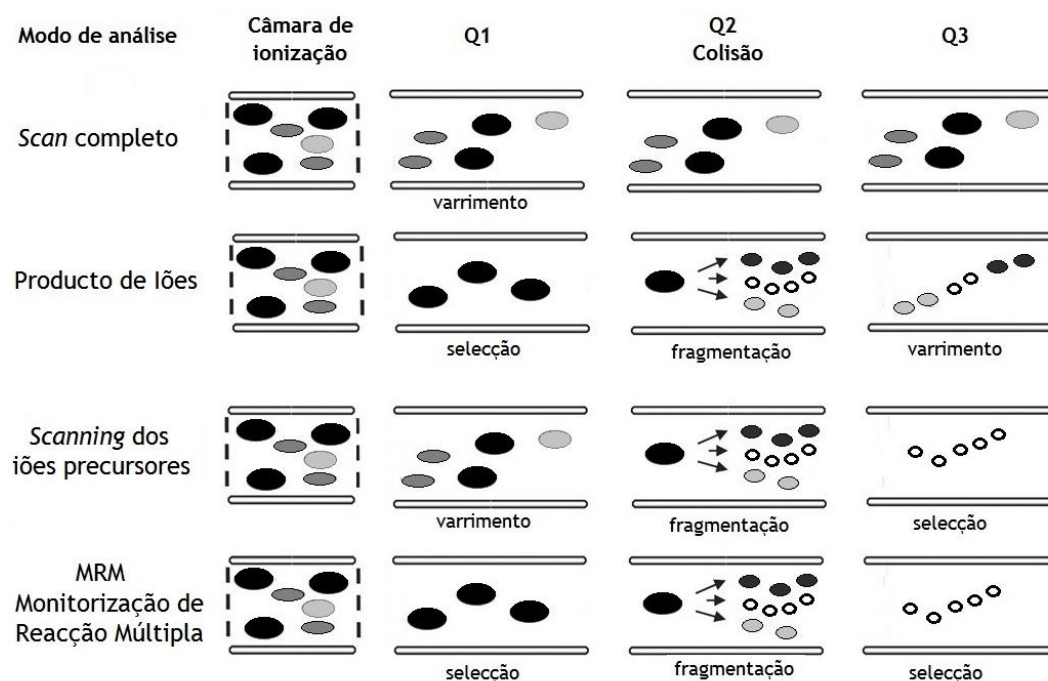


Figura 13) Modos de operação em MS/MS.

(fonte: Santos, 2014)

SCAN, corresponde a um varrimento de massas num determinado intervalo, definido pelo operador, permitindo avaliar os fragmentos de iões característicos de um determinado analito. Este passo acontece no primeiro quadrupolo (Q1) (Neves Freitas, 1996).

Produto de iões (Product Ion), a fragmentação de um ião precursor pode existir em paralelo com um varrimento, de forma a seleccionar as transições do analito em estudo. Este processo envolve os 3 quadrupolos: Q1 selecciona um ião precursor que é à posteriori fragmentado em Q2 (segundo quadrupolo). Por fim, no 3º quadrupolo (Q3), é realizado o varrimento (Santos, 2014).

Monitorização de iões seleccionados (SIM), é o modo pelo qual o espectrómetro de massa está definido para pesquisar numa determinada gama de massas muito reduzida, sendo que, quando menor for essa gama mais sensível será o ensaio. O resultado não são espectros de massa, mas sim um gráfico de corrente de iões resultantes (Neves e Freitas, 1996).

Monitorização de reacção múltipla (MRM), modo no qual os iões precursores são medidos e posteriormente são quantificados. Elevados níveis de sensibilidade e seletividade são próprios deste modo de operação (Kruve, *et al.*, 2015).

Capítulo 2

Parte Experimental

1. Material e Métodos

1.1. Reagentes

- Metanol LiChrosolv® (HPLC grade), VWR International (Carnaxide, Portugal);
- Acetato de etilo (*analytical grade*), VWR International (Carnaxide, Portugal);
- Água desionizada Milli-Q;
- Acetonitrilo PROLABO® (HPLC grade), VWR International (Carnaxide, Portugal);
- Dihidrogenofosfato de sódio (NaH₂PO₄), Sigma-Aldrich (Sintra, Portugal);
- Metanol LC-MS grade, Fisher Chemical, Enzymatic (Carnaxide, Portugal);
- Água LC-MS grade, Fisher Chemical, Enzymatic (Carnaxide, Portugal);
- Acetonitrilo LC-MS grade, Panreac, Enzymatic (Carnaxide, Portugal);
- Ácido Fórmico LC-MS grade, Sigma-Aldrich (Sintra, Portugal);
- Propan-2-ol LC-MS grade, Fisher Chemical, Enzymatic (Carnaxide, Portugal).

1.2. Padrões Analíticos

Os padrões dos compostos em estudo, Metoxetamina (MXE), 1-benzilpiperazina (BZP), 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina (TFMPP), 1-3 clorofenilpiperazina (mCPP), 1-4 metoxifenilpiperazina (MeOPP) foram adquiridos à Sigma-Aldrich (Sintra, Portugal). Os padrões internos (PI) Norketamina-d4 e 1-(2-clorofenilpiperazina) (oCPP) foram adquiridos à Sigma-Aldrich (Sintra, Portugal) e foram selecionados de forma a monitorizar todo o processo extrativo. Com características análogas aos compostos em estudo, garantia que não estão presentes na amostra a analisar e com concentração conhecida apresentam uma mais-valia na verificação do processo de manipulação da amostra durante a sua análise.

Os compostos MXE e Norketamina-d4 foram adquiridos em solução metanólica á concentração de 1mg/mL.

1.3. Instrumentação

- Placa de agitação magnética ASINCRO, J.P. Selecta (ILC, Porto, Portugal);
- Medidor de pH Orion Star A211 Benchtop Meters - Thermo, Fisher Chemical, (Carnaxide, Portugal);
- Sistema de purificação de água Milli-Q Advantage A10[®], Interface (Amadora, Portugal);
- Câmara de refrigeração (a 4 °C), Dagard Ibérica (Odivelas, Portugal);
- Vórtex mixer 230V, Labnet International (VWR Internaional, Carnaxide, Portugal);
- Balança analítica da Sartorius S.A. - modelo CP225 (Lisboa, Portugal);
- Micropipetas automáticas Gilson, volumes máximos 20, 200 e 1000 µL (VWR International, Carnaxide, Portugal);
- Centrifuga Heraeus Multifuge IS-R, Thermo Scientific (Osterode, Alemanha);
- Sistema de ultra-som da Elma - modelo Transonic 460/H, VWR Internacional (Carnaxide, Portugal);
- Coluna MEPS M₁ da SGE - Analytical Science (ILC, Porto, Portugal);
- Seringa de MEPS, 250µL da SGE - Analytical Science (ILC, Porto, Portugal).

1.4. Preparação de soluções

1.4.1. Soluções de padrões analíticos:

i. **MXE**

Soluções de trabalho: foram preparadas a partir das soluções-mãe, a 1 mg/mL, por diluições sucessivas em metanol.

A solução de MXE foi preparada a 3 concentrações: 2,5 µg/mL, 250 ng/mL e 25 ng/mL.

A solução de Norketamina-d4 foi preparada à concentração de 1 µg/mL e a 200 ng/mL.

Os volumes foram aferidos com metanol e todas as soluções foram guardadas a 4 °C e ao abrigo da luz.

ii. Piperazinas

Soluções de trabalho: foram preparadas a partir das soluções adquiridas à Sigma-Aldrich. Primeiramente preparou-se uma solução a 1mg/mL e, por diluições sucessivas em metanol, prepararam-se as soluções de trabalho a uma concentração de 500; 125; 2,5 e 0,25 ng/mL. Foi preparada uma mistura de piperazinas de modo a monitorizar o erro associado. Para isso, foi preparada uma mistura de BZP, TFMPP e mCPP à mesma concentração: 500; 125; 2,5 e 0,25 ng/mL.

oCPP foi preparado a uma concentração de 25 ng/mL.

Todas as soluções foram preparadas em metanol e guardadas a 4 °C e ao abrigo da luz.

1.4.2. Outras soluções

Solução 25 mM tampão fosfato pH 2,5: para um volume final de 1L pesaram-se 3,449 g de dihidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4) e diluíram-se em água Milli-Q. Acertou-se a solução a pH 2,5 e transferiu-se a mesma para um balão volumétrico de 1 L, sendo o respetivo volume aferido com água Milli-Q.

Solução 0,25% de Hidróxido de amónia em metanol: para um volume final de 500mL mediram-se 1,25 mL de hidróxido de amónia e aferiu-se o balão volumétrico com metanol. Homogeneizou-se a solução.

Solução 1% de Hidróxido de amónia em Acetonitrilo: Metanol (1:1): para um volume final de 500 mL mediram-se 5 mL de hidróxido de amónia e transferiu-se posteriormente para um balão volumétrico de 500 mL, sendo o respetivo volume aferido com uma solução de acetonitrilo metanol (1:1).

Solução 1% de Ácido fórmico em 10% de Propan-2-ol/água: para um volume final de 500 mL mediram-se 5 mL de ácido fórmico e transferiu-se posteriormente para um balão volumétrico de 500 mL, sendo o respetivo volume aferido com uma solução de 10% de Propan-2-ol/água Milli-Q.

Solução 0,1% de Ácido fórmico em água: para um volume final de 500 mL mediram-se 500 µL de ácido fórmico e diluíram-se em água, transferindo-se posteriormente para um balão volumétrico de 500 mL, sendo o respetivo volume aferido com água à escala MS.

Solução 0,1% de Ácido fórmico em Acetonitrilo: para um volume final de 500 mL mediram-se 500 µL de ácido fórmico e diluíram-se em Acetonitrilo, transferindo-se à *posteriori* para um balão volumétrico de 500 mL, sendo o respetivo volume aferido com acetonitrilo. Todas as soluções se encontravam à escala MS.

Solução Propan-2-ol, metanol, acetonitrilo, água (25:25:25:25; v/v): para um volume final de 1L mediram-se 250 mL de Propan-2-ol, metanol, acetonitrilo e água com o auxílio de balões volumétricos de 250 mL. Juntaram-se as soluções e homogeneizou-se a solução. Todas as soluções se encontravam à escala MS.

Solução 20% de Isopropanol em água: para um volume final de 1L mediram-se 200 mL de isopropanol e aferiu-se o balão volumétrico com água à escala MS. Homogeneizou-se a solução.

Solução 2% de Ácido fórmico em água: para um volume final de 500mL mediram-se 10 mL de ácido fórmico e aferiu-se o balão volumétrico com água Milli-Q. Homogeneizou-se a solução.

Solução 1% de Ácido fórmico em água: para um volume final de 500mL mediram-se 5 mL de ácido fórmico e aferiu-se o balão volumétrico com água Milli-Q. Homogeneizou-se a solução.

Solução 3% de Hidróxido de amónia em metanol: para um volume final de 500mL mediram-se 15 mL de hidróxido de amónia e aferiu-se o balão volumétrico com metanol. Homogeneizou-se a solução.

Todas as soluções foram guardadas a 4 °C e ao abrigo da luz.

1.5. Matriz Biológica

A matriz selecionada para a realização deste estudo foi o fluido oral. Este, foi recolhido através de voluntários do *staff* do Centro Investigação em Ciências da Saúde (CICS-UBI), por *spitting*, sendo posteriormente conservado a 4°C até a sua utilização.

1.6. Preparação da Amostra

A preparação da amostra é uma etapa crucial num método bioanalítico dada a complexidade das amostras como é o caso do fluido oral. Assim, é decisivo proceder-se a um pré-tratamento não só para precipitar as proteínas como para diluir a amostra.

Este proceder, também retém interferentes que facilmente poderiam saturar o sorbente, limitando assim a eficiência do MEPS e uma possível reutilização da coluna (Pereira, *et al.*, 2014).

A matriz recolhida foi submetida a um processo de centrifugação 4500rpm a 4°C durante 15 minutos, de onde se retirou o sobrenadante. 250 µL desse sobrenadante foram transferidos para um tubo de falcon onde foi adicionado 1 mL de acetonitrilo (ACN) congelado (-20°C), o que levou à precipitação das proteínas presentes na saliva. Esta mistura foi novamente centrifugada nas mesmas condições e posteriormente foi retirado o sobrenadante para tubos de vidro onde se procedeu à evaporação do acetonitrilo sob corrente de azoto. Foi preparada uma *pool* com todas as amostras de saliva para posterior continuação do trabalho (otimização e validação da processo de extração).

1.7. Procedimento de extração

Após otimização dos parâmetros envolvidos na extração foi realizado um desenho experimental (DOE) com o intuito de otimizar a técnica de extração.

i. MXE

Após submeter 9 técnicas selecionadas a partir da bibliografia ao processo de extração, e depois de otimizar a melhor pelo desenho experimental, chegou-se a uma técnica otimizada para a deteção de piperazinas em amostras de fluido oral. Para o acondicionamento foram utilizados 50 µL de metanol e 50 µL de 0,1% ácido fórmico em água. A amostra foi aspirada 25 vezes com um volume de 150 µL e foi efetuado o passo de lavagem com 50 µL de 0,1% ácido fórmico em água. A eluição foi realizada com 250 µL de 0,25% de hidróxido de amónia em metanol, posteriormente sujeito a uma corrente de azoto, onde o eluato é ressuspensão em 50 µL de metanol. Para a reutilização da coluna de MEPS são utilizadas duas soluções: 4×100 µL de 1% de Hidróxido de amónia em Acetonitrilo: metanol (1:1) e 4×100 µL de 1% de Ácido fórmico em 10% de Propan-2-ol/água.

ii. Piperazinas

Após submeter 8 técnicas selecionadas a partir da bibliografia ao processo de extração, e depois de otimizar a melhor pelo desenho experimental, chegou-se a uma técnica otimizada para a deteção de piperazinas em amostras de fluido oral. Para o acondicionamento são utilizadas duas soluções: 3x250 µL de metanol e 3x250µL de 2% de ácido fórmico em água. A amostra é aspirada 18 vezes com um volume de 150 µL e após isso realiza-se o processo de lavagem com 3x150µL de ácido fórmico em água. O passo de eluição é executado com 3x150µL 3% de Hidróxido de Amónia em metanol, que posteriormente é sujeito a uma corrente de azoto, onde o eluato é ressuspenso em 100 µL de Fase Móvel. A coluna de MEPS, é reutilizada com 5x250µL de metanol e 4x250µL de água.

1.8. Sistema Cromatográfico

i. MXE

A análise cromatográfica foi realizada com recurso a um cromatógrafo de gases, modelo HP7890A, acoplado a um detetor de espectrometria de massa triplo quadrúpolo, modelo 7000B, ambos da Agilent Technologies (Soquímica, Lisboa, Portugal), por sua vez, acoplado ao sistema cromatográfico usou-se um injetor automático modelo MPS 2 (Gerstel, Mülheim ander Ruhr, Alemanha). Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida com 5% de fenilmetilsiloxano (30 m x 250 µm, 0,25 µm (J & W Scientific, Folsom, EUA).

ii. Piperazinas

A análise cromatográfica foi conseguida através de um sistema cromatográfico Waters Acquity UPLC acoplado a um espectrómetro de massa API 5500 QTRAP (ABSciex). Foi utilizada uma coluna ZORBAX C18 2,1x150 mm 1,8 micron (Agilent Technologies, EUA).

1.9. Condições cromatográficas

i. MXE

Com o objetivo de se obter uma eficiência separativa adequada ao estudo em causa, foi estabelecida a temperatura inicial do forno a 100°C durante 0,5 minutos, seguido de um aumento de 20°C por minuto até se atingir a temperatura final de 280 ° C que foi mantida durante 5 minutos. O tempo total de corrida foi de 14,50 minutos. Foi ainda estabelecida a temperatura de 250 ° C no injetor.

O volume de injeção de amostra foi de 2 µL em modo *splitless* e foi utilizado hélio como gás de arraste a um fluxo constante de 0,8 mL/min. Ao nível do espectrómetro de massa estabeleceu-se um fluxo de 1,5 mL/min de hélio e de 2,5 mL/min de azoto na célula de colisão em modo de impacto eletrónico, com uma corrente de trabalho de 35 µA e energia de 70 eV. Os dados foram adquiridos com o sistema a operar em modo MRM com auxílio do programa *MassHunter WorkStation Acquisition Software* (Agilent Technologies). Foram escolhidas as transições que melhor identificavam e caracterizavam a MXE, sendo que no total foram selecionadas 3 transições: duas qualitativas e uma quantificadora (tabela 3). Para a Norketamina-d4 apenas foi utilizada uma transição.

Tabela 3) Parâmetros otimizados do método desenvolvido em GC-MS/MS da MXE e do padrão interno. (encontra-se em negrito a transição quantificadora)

Composto	Transições (m/z)	tr* (min)	Dwell time (ms)	Energia de colisão (eV)
	lão precursor → Produto de ião			
MXE	189,7→189,7		10,0	5
	189,7→146,7	7,96	25,6	15
	189,7→114,8		38,4	20
Norketamina-d4 (PI)	169,8→135,2	7,62	144,7	10

*tr: tempos de retenção

ii. Piperazinas

A separação dos analitos foi conseguida por eluição em gradiente com um fluxo de 0,150 mL/min, utilizando 0,1% ácido fórmico em água linha A e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrilo, linha B. Foi utilizada uma coluna ZORBAX C18 2,1x150 mm 1,8 micron a 35°C. O tempo total de corrida foi de 16 minutos.

A aquisição de dados foi conseguida em modo MRM com ionização por eletropulverização positiva. As condições de ESI foram as seguintes: gás de cortina (25), voltagem (5000 V), temperatura da fonte 500°C, fonte de iões (60 psig) fonte de iões 2 (45 psig). O programa utilizado para a aquisição de dados foi o MultiQuant (versão 2.0.2).

Foram escolhidas as transições que melhor identificavam e caracterizavam cada composto, sendo que no total foram selecionadas 2 transições: uma qualitativa e uma quantificadora (tabela 4). Para o padrão interno apenas foi utilizada uma transição.

Tabela 4) Piperazinas com as respectivas transições (m/z) e tempos de retenção (min).
(encontra-se em negrito a transição quantificadora)

Composto	M ⁵ (g/mol)	pka ⁵ (37°C)	Transições (m/z)	tr* (min)	DP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)
			lão precursor → Produto de ião				
BZP	176,26	9,59	177,159 → 91,3	2,1	51	43	14
			177,159→65,0				
mCPP	196,68	8.64/8.72	197,087 → 154,0	6,0	46	29	26
			197,087→118,0				
TFMPP	230,23	8,66	231,057 → 188,1	6,6	81	33	30
			231,057→119,0				
MeOPP	192,26	9,00	193,262 → 150,0	2,2	41	31	6
			193,262→119,1				
oCPP	233,14	-----	197,072→154,0	5,5	66	31	24

*tr: tempos de retenção

⁵ (Escada, 2007)

Capítulo 3

Resultados e Discussão

1. Otimização dos parâmetros cromatográficos

i. MXE

Com o fim de conhecer as características cromatográficas e espectrométricas, cada um dos compostos em estudo foi injetado no sistema cromatográfico isoladamente. Assim, no caso da MXE injetou-se o composto a uma concentração de 50 µg/mL em modo de varrimento contínuo (*SCAN*) de forma, a saber, o tempo de retenção do mesmo (anexo 1). O mesmo aconteceu para a Norketamina-d4 (anexo2). Seguidamente realizou-se o *Product Ion* para os iões com maior razão de *m/z* e com maior intensidade de sinal (anexo 3). Por fim criou-se o método em MRM com 3 transições: duas qualitativas e uma quantificadora (anexo 4).

No final aperfeiçoaram-se parâmetros como *dwell time* e a rampa onde foi estabelecida uma temperatura inicial do forno a 100°C durante 0,5 minutos, seguido de um aumento de 20°C por minuto, até se atingir uma temperatura final de 280°C, perfazendo um total de 14,50 minutos. Os tempos de retenção obtidos para a MXE e Norketamina-d4 foram respetivamente de 7,96 e 7,62 min.

ii. Piperazinas

Para obter uma eficiência separativa mais eficaz dos compostos injetaram-se os mesmos individualmente a uma concentração de 10 ng/mL por infusão direta. Uma vez que todos os compostos saíam ao mesmo tempo de retenção, tentou-se separar os mesmos alterando algumas das condições cromatográficas, nomeadamente, composição da fase móvel, fluxo e coluna analítica (tabela 5).

Tabela 5) Descrição do processo de otimização das condições cromatográficas realizadas em LC-MS/MS (Redondo, *et al.*, 2013).

Temperatura da coluna (°C)	Coluna	Fluxo (mL/min)	Fase Móvel	Comentários
40	Coluna ZORBAX® C18 2,1x150 mm 1,8 micron	0,20	0,1% de ácido fórmico em água (A) e 0,1% ácido fórmico em acetonitrilo (B) em gradiente: 98% de A até 2min, seguido de um aumento de 10% de A até 5min. Aos 5,5 min foram restabelecidas as condições iniciais	Os compostos saíram todos ao mesmo tempo de retenção.
			Novo gradiente: 90% de A até 3 min, dos 3 aos 3,5 0% de A e aos 3,5 adquirem-se as condições iniciais.	Não saiu o oCPP
			Nova fase móvel: 1mM de formato de amónia em 0,1% ácido fórmico em água (A) e 0,1% ácido fórmico em acetonitrilo (B) em gradiente: 98% de A até 2min, seguido de um aumento de 10% de A até 5min. Aos 5,5 min foram restabelecidas as condições iniciais	Não houve melhoras significativas na separação dos compostos
20				Os compostos saíram com os mesmos tempos de retenção
40	150x2mmL 2µm, 12 nm YMC-UltraPro® C18	0,15	0,1% de ácido fórmico em água (A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrilo (B) em gradiente:98% de A até 2min, seguido de um aumento de 10% de A até 5min. Aos 5,5 min foram restabelecidas as condições iniciais	Sem melhorias na separação dos compostos
	Coluna ZORBAX® C18 2,1x150 mm 1,8 micron		0,1% de ácido fórmico em água (A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrilo (B) em isocrático (75:25)	Não houve melhoras significativas na separação dos compostos
35	Coluna ZORBAX® C18 2,1x150 mm 1,8 micron	0,15	0,1% de ácido fórmico em água (A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrilo (B) em gradiente 98% de A até 2min, seguido de um aumento de 10% de A até 5min. Aos 5,5 min foram restabelecidas as condições iniciais	Os compostos saíram mais separados contudo o oCPP e o mCPP não saíram bem separados
35	Coluna ZORBAX® C18 2,1x150 mm 1,8 micron	0,15	0,1% de ácido fórmico em água (A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrilo (B) em gradiente 98% de A até 2min, seguido de um aumento de 10% de A até 5min. Aos 5,5 min foram restabelecidas as condições iniciais	Compostos separados e bem definidos.

Após este processo de otimização, as condições finais foram:

- Fluxo=0,15mL/min;
- $T_{\text{coluna}}=35^{\circ}\text{C}$;
- Composição da fase móvel: 0,1% de ácido fórmico em água (A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrilo (B);
- Modo de gradiente: Foi estabelecida uma corrida programada de 16 minutos, sendo que nos primeiros 2 minutos se manteve a proporção de 80:20 (A) e (B) respetivamente, aos 2 minutos foi aplicado um gradiente de 50:50 que se manteve até aos 5 minutos, tempo onde se aplicou um segundo gradiente de 40:60 que se manteve até aos 12 minutos. Após este tempo foram readquiridas as condições iniciais para reequilibrar a coluna, estas condições foram mantidas até aos 16 minutos garantindo assim o acondicionamento da coluna para a seguinte análise.
- Coluna ZORBAX® C18 2,1x150 mm 1,8 micron.

Uma vez obtida uma boa separação cromatográfica foram otimizados todos os parâmetros relativos à espetrometria de massa pelo que todos compostos foram injetados a uma concentração de 10ng/mL por infusão direta. A otimização do método em MRM foi realizada automaticamente através do *software Analyst® de ABSCIEX (versão 1.5.1)*.

2. Otimização da Técnica de Precipitação

A técnica de precipitação também foi um dos processos otimizados dada a sua importância em todo o processo de extração. Ao precipitar as proteínas da matriz, o cartucho de extração permite a passagem da amostra um maior número de vezes, tornando assim possível a reutilização da mesma uma vez que se evita a colmatagem.

Como tal, foram testadas três técnicas de precipitação.

Técnica 1:

A amostra biológica recolhida foi sujeita a um processo de centrifugação de 4500rpm a 4°C durante 15 minutos, de onde se retirou o sobrenadante. 500 µL de este sobrenadante foram transferidos para um tubo de falcon onde se adicionou a cada tubo 10 mL de acetonitrilo congelado (20°C), agitou-se vigorosamente durante 1 minuto em vórtex, obtendo-se assim à precipitação das proteínas presentes na saliva. Esta mistura foi novamente centrifugada nas mesmas condições e posteriormente foi retirado o sobrenadante para tubos de vidro onde se procedeu à evaporação do acetonitrilo sob corrente de azoto. Em seguida foram adicionados 500 µL de tampão fosfato pH 2,5 a 25mM.

Técnica 2:

Esta técnica resultou na tentativa de reduzir o volume de acetonitrilo no processo de precipitação (cerca de 5 vezes). O procedimento de precipitação foi semelhante à técnica anterior diferindo unicamente no volume de acetonitrilo usado, neste caso a proporção foi de 1:4 ao invés de 1:20 (técnica 1).

Técnica 3:

A cada 120 μL de fluido oral foram adicionados 40 μL de hidróxido de amônia 25 mM em metanol e 80 μL de água Milli-Q. Esta mistura foi centrifugada a 5500 rpm durante 13 minutos. Em seguida foi retirado o sobrenadante para um tubo de falcon formando assim uma *pool*. (Montesano, *et al.*, 2014).

O estudo foi realizado tendo como analito a MXE, onde a amostra foi previamente precipitada de acordo com as técnicas acima descritas e fortificada a uma concentração de 600 ng/mL. O padrão interno foi adicionado no fim da extração a uma concentração de 20 ng/mL. O ensaio foi realizado em triplicado e os resultados encontram-se expressos na tabela 6 e no gráfico 3, em termos de áreas relativas, bem como o respetivo desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV).

Tabela 6) Resultados obtidos para as técnicas de precipitação (n=3).

Técnicas de Precipitação			
	1	2	3
Área Relativa (média \pm DP)	4,544 \pm 0,221	4,262 \pm 0,031	4,176 \pm 0,327
CV (%)	4,871	0,728	7,832

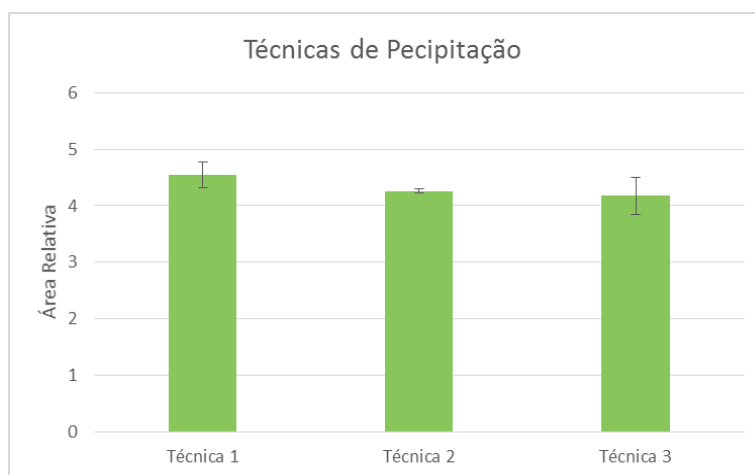


Gráfico 3) Técnicas de precipitação (média da área relativa \pm DP).

A técnica mais apropriada para prosseguir com o procedimento de extração, foi a técnica 2 pois apresenta áreas relativas de composto semelhante às outras técnicas de precipitação e um menor consumo de solvente orgânico (em comparação com técnica 1). Em relação à técnica 3, verificou-se que com este procedimento o sorbente de extração ficava inutilizado após 10 extrações devido a colmatação do mesmo, diminuindo substancialmente o número de análises realizadas quando comparadas com as outras duas técnicas.

3. Otimização do procedimento de extração

i. MXE

Para o estudo de todo o processo de extração a amostra (250 µL) foi fortificada com 60 µL de MXE à concentração de 2,5 µg/mL. As amostras foram diluídas com 7,5 mL de tampão fosfato 25 mM a pH 2,5 (diluição 1:30) de forma facilitar o processo de aspiração.

No caso do PI, foram adicionados 25 µL a uma concentração de 200 ng/mL.

A escolha do tipo de adsorvente de modo misto (M1) e a utilização de um meio ácido para a diluição da amostra prenderam-se essencialmente pelas publicações já efetuadas (Elian e Hackett, 2014), pois ainda não foram realizados estudos que evidenciem a sua constante de acidez.

ii. Piperazinas

Para a otimização do processo de extração a amostra (250 µL) foi fortificada com 25 µL de BZP, MeOPP, mCPP e TFMPP a uma concentração de 1 µg/mL. As amostras foram diluídas com 4 mL de água Milli-Q (diluição 1:16), de forma facilitar o processo de aspiração.

Quanto ao padrão interno, oCPP, foi adicionado um volume de 25 µL a uma concentração de 1µg/mL.

As piperazinas têm uma constante de acidez (pka) entre 8,64-9,59 pelo que foram avaliadas dois tipos de adsorventes: fase reversa (C₁₈) e modo misto M1 (80% C8/20% SCX), contudo foi o adsorvente de modo misto aquele que apresentou melhores resultados, pelo que foi o adsorvente selecionado.

4. Procedimento de extração

Com base na literatura, foram reproduzidos de forma adaptada, alguns dos procedimentos de extração estudados tanto para a MXE (Tabela 7) como para as piperazinas (Tabela 9) com o intuito de obter o procedimento de extração que permitisse obter maiores rendimentos de extração, isto é, extrair maior quantidade de analito. Cada um dos procedimentos foi realizado em triplicado (n=3) e os resultados encontram-se descritos nas figuras 14 e 15, respetivamente.

i. MXE

Tabela 7) Resumo das 9 técnicas aplicadas em MEPS com as diferentes soluções de acondicionamento, lavagem e eluição para a MXE.

<i>Técnica</i>	<i>Acondicionamento</i>	<i>Amostra</i>	<i>Lavagem</i>	<i>Eluição</i>	<i>Reutilização da coluna</i>	<i>Referência Bibliográfica</i>
1	1×250µL de metanol 1×250µL de água Milli-Q	12×150µL	1×100µL de 0,55% Ácido fórmico em água Milli-Q	3×100µL de 1,75% hidróxido de amónia em metanol		Adaptado de Abdel-Rehim, 2011
2	3×50µL de metanol 3×50µL de água Milli-Q	12×150µL	1×100 µL de 30% metanol em água Milli-Q	1x30 µL de 0,5% Ácido fórmico em ACN		Adaptado de Desgrouas C., 2014
3	1×250µL de metanol 1×250µL de água Milli-Q	12×150µL	1×250 µL de água Milli-Q	1x30 µL de metanol		Adaptado de Iwai M., 2013
4	3×100µL de metanol 3×100µL de água Milli-Q	12×150µL	1×100 µL de tampão fosfato pH 2,5 (25 mM)	2×250µL de metanol	4x100 µL de 1% Hidróxido de amónia em	Adaptado de Saracino M.A., 2014
5	2×50µL de metanol 2×50µL de água Milli-Q	12×150µL	2×100µL de 5% metanol em água Milli-Q	3×100µL de 0,2% hidróxido de amónia em 95% metanol água	ACN: MEOH (1:1)	Adaptado de Du W., 2014
6	1×100µL de metanol 1×100µL de 30% metanol	12×150µL	100 µL de 0,1% Ácido fórmico em água Milli-Q	2×25µL de 50 mM de hidróxido de amónia em metanol	4x100 µL de 1% Acido fórmico em	Adaptado de Sergi M., 2013
7	3×250µL de metanol 3×250µL de água Milli-Q	12×150µL	1×250 µL de 1% de ácido acético 1×250 µL de 10% metanol	1x50 µL de 1,75% hidróxido de amónia em metanol	10% de Propan-2-ol	Adaptado de Guerra F., 2013
8	5×50µL de metanol 5×50µL de 0,1% de Ácido fórmico	12×150µL	2×50µL de 0,1% Ácido fórmico em água Milli-Q	4×50µL de metanol, água Mili-Q, hidróxido amónia (95:4:1 v/v/v)		Adaptado de Woźniakiewicz M., 2014
9	1×50µL de metanol 1×50µL de 0,1% de Ácido fórmico	12×150µL	1×100 µL de 0,1% de Ácido fórmico	50 µL 0,2% de hidróxido de amónia em 95% metanol/água		Adaptado de Altun Z., 2004

Tabela 8) Resultados da avaliação das 9 técnicas aplicadas em MEPS para MXE em termos de áreas relativas (n=3).

Técnica	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
Média	5,034	0,309	0,403	1,178	4,683	6,352	7,896	8,339	6,271
DP	0,639	0,037	0,073	0,087	0,091	0,481	2,342	2,828	0,483

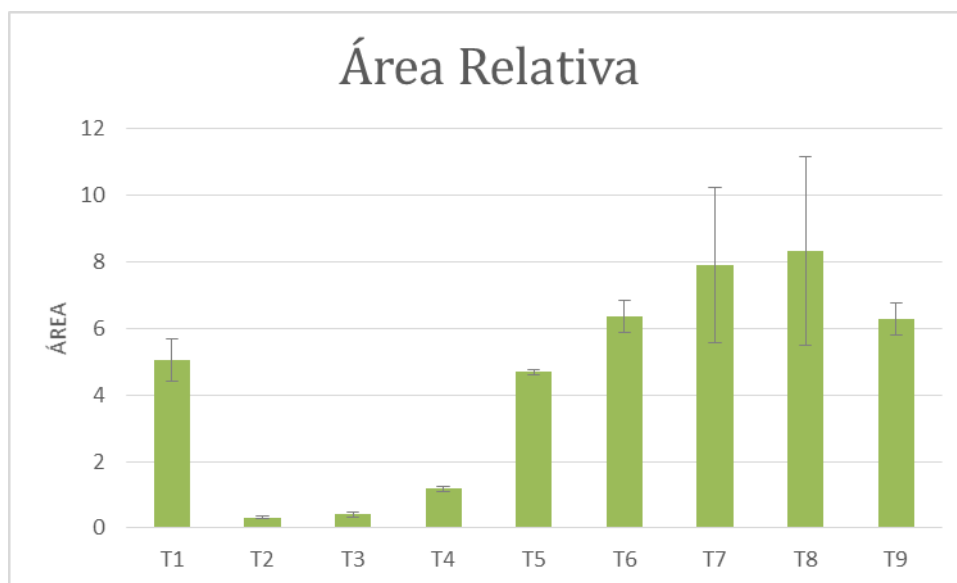


Gráfico 4) Resposta da MXE em termos de área relativa para cada técnica de MEPS.

Para a interpretação dos resultados foi tida em consideração a área relativa (razão entre a área absoluta e a área do PI). As técnicas foram submetidas a uma análise estatística, onde com 95% de confiança se admite se as técnicas apresentam diferença estatística significativa ou não (anexo 5).

Do gráfico 4 podemos concluir que as técnicas 7 e 8 não apresentam reprodutibilidade (elevada dispersão estatística). Para as restantes técnicas com maior sinal (1, 5, 6 e 9) aplicaram-se os testes t e F (anexo 5) onde se prova que não existe diferença estatística entre as mesmas dado que o valor-p é em todos os casos superiores ao nível de significância (α) de 5%. Assim, para prosseguir com o estudo da MXE a técnica selecionada foi a técnica 9 porque para além de ser uma das técnicas que apresentar maior intensidade de sinal, apresenta um desvio padrão aceitável (CV de 7,7%) e a sua execução é relativamente mais rápida em comparação com as outras técnicas.

ii. Piperazinas

Tabela 9) Resumo das 8 técnicas aplicadas com recurso à MEPS para a deteção de piperazinas.

Técnica	Coluna	Acondicionamento	Amostra	Lavagem	Eluição	Reutilização da coluna	Referência
1	C18	1×250 µL de metanol 1×250 µL de água	8×150µL	1×250 µL de 1% ácido acético 1×100 µL de 10% metanol	1×50 µL de 2% de hidróxido de amónia em metanol		Adaptado de Moreno, <i>et al.</i> , 2012b
2	C18	3×250 µL de metanol 3×250 µL de água	8×150µL	1×100 µL de 2% Ácido fórmico em água	2x100 µL de metanol		Adaptado de Moreno <i>et al.</i> , 2013
3	M1	3x250µL de metanol 3x 250µL de 2% ácido fórmico em água	8×150µL	1×250µL de 2% de ácido fórmico em água	2x150 µL de 2% hidróxido de amónia em metanol		Adaptado de Figueirinha, 2014
4	M1	3x150µL de metanol 3x 150µL de 0.1 M tampão fosfato pH 4,6	8×150µL	1x100 µL de 2% ácido acético em água	3x150 µL de 3% de hidróxido de amónia em isopropanol	5x250 µL de metanol	Adaptado de Abdel-Rehim, 2011
5	M1	1×250 µL de metanol 1×250 µL de água	8×150µL	1×250 µL de 1% ácido acético 1×100 µL de 10% metanol	1×50 µL de 2% de hidróxido de amónia em metanol	4x250 µL de água	Adaptado de Moreno, <i>et al.</i> , 2012b
6	M1	3×250µL de metanol 3×250µL de água	8×150µL	1×100 µL de 2% Ácido fórmico em água	2x100 µL de metanol		Adaptado de Moreno <i>et al.</i> , 2013
7	C18	3x250µL de metanol 3x 250µL de 2% ácido fórmico em água	8×150µL	1×250µL de 2% de ácido fórmico em água	2x150 µL de 2% hidróxido de amónia em metanol		Adaptado de Figueirinha, 2014
8	C18	3x150µL de metanol 3x 150µL de 0.1 M tampão fosfato pH 4,6	8×150µL	1x100 µL de 2% ácido acético em água	3x150 µL de 3% de hidróxido de amónia em isopropanol		Adaptado de Abdel-Rehim, 2011

Tabela10) Resultados das áreas relativas de BZP, MeOPP, mCPP e TFMPP para as 8 técnicas aplicadas usando MEPS (n=3).

<i>Áreas relativas dos compostos</i>				
	BZP	MeOPP	mCPP	TFMPP
Técnica1	0,267154	0,008311	0,176914	0,466882
Técnica2	0,02457	0,001374	0,027907	0,099393
Técnica3	0,541351	0,011738	0,231759	0,65784
Técnica4	0,278289	0,012718	0,263907	0,691444
Técnica5	0,343008	0,010323	0,175071	0,502444
Técnica6	0,001254	0,000894	0,024055	0,096047
Técnica7	0,173291	0,005781	0,113654	0,336495
Técnica8	0,410436	0,017108	0,260448	0,640941

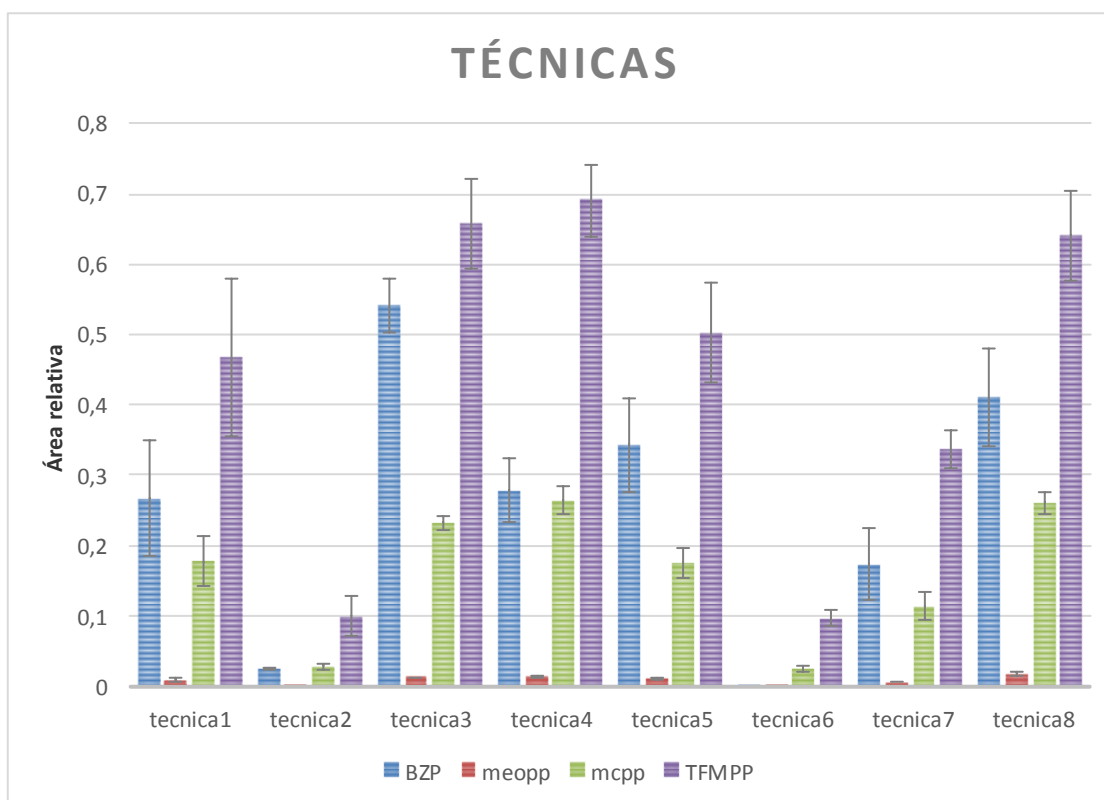


Gráfico 5) Resposta da BZP, MeOPP, mCPP e TFMPP em termos de área relativa para cada técnica de MEPS com o respetivo SD.

Pela análise do gráfico 5 e da tabela 10, podemos concluir que as técnicas 3, 4 e 8 são as que apresentam maior área relativa dos compostos em estudo, todavia é na técnica 3 que a BZP está com destaque, pois apresenta uma área relativa superior. Deste modo, a técnica selecionada para prosseguir com o estudo foi a técnica 3.

Com a análise estatística (anexo 10) confirma-se a escolha da técnica para prosseguir com o estudo das piperazinas, nomeadamente para o caso da BZP. Quanto aos restantes compostos é indiferente a técnica selecionada dado que não existe diferença estatística pois o valor-p é em todos os casos superiores ao nível de significância (α) de 5%.

5. Desenho Experimental (DOE)

O desenho experimental é uma ferramenta estatística preponderante na planificação de um dado processo pois, para além de utilizar um número reduzido de experiências, pode ainda, avaliar a extensão em que as várias variáveis interagem entre si. No final, o resultado é uma resposta otimizada, poupando recursos uma vez que as outras abordagens são em geral mais dispendiosas e demoradas (Costa, *et al.*, 2010). O tratamento de resultados foi efetuado no programa estatístico MINITAB®, versão 17.

i. MXE

Os fatores avaliados durante este estudo foram: número de *strokes*, percentagem de ácido fórmico e o respetivo volume na solução de lavagem, percentagem de hidróxido de amónia e volume utilizados na solução de eluição. Foi feito um desenho fatorial total (2^k) onde K é o número de fatores a variar, tendo como controlo um ponto intermédio ($n=3$). As experiências foram efetuadas pela ordem sugerida pelo MINITAB® minimizando assim possíveis erros sistemáticos (anexo 6).

A resposta obtida foi expressa como áreas relativas, e o padrão interno foi adicionado no fim da extração a uma concentração de 20 ng/mL. Com base nessa resposta, é apresentado em seguida o diagrama de *Pareto* (gráfico 6).

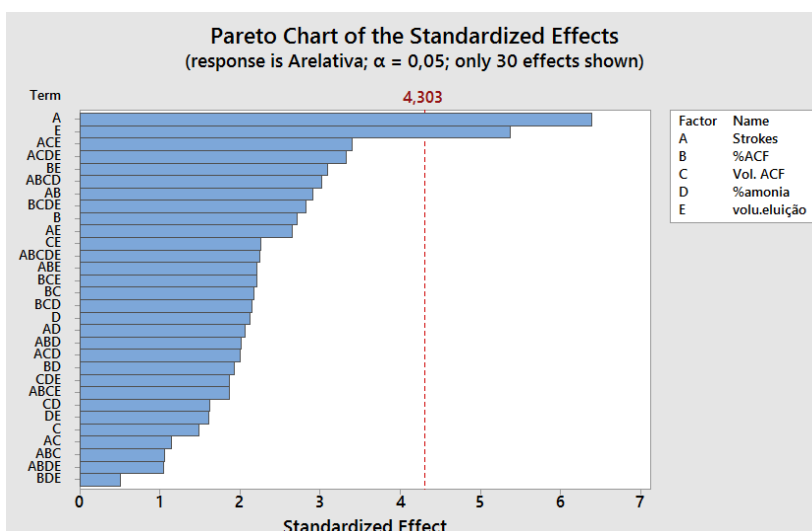


Gráfico 6) Diagrama de Pareto da MXE.

Nos diagramas de Pareto são apresentados os fatores que influenciam a experiência de modo individual ou em associação com outros fatores. Estes são apresentados por ordem decrescente de extensão. Os fatores que ultrapassam a linha traçada (nível de significância de 5%) são considerados estatisticamente significativos assumindo-se assim que têm influência na resposta.

Pela análise do diagrama de Pareto da MXE (gráfico 6) podemos afirmar que o número de *strokes* e o volume de eluição são os fatores que têm maior influência estatística (nível de confiança de 95%). É ainda, de salientar que não existe interação entre fatores o que torna prescindível a metodologia de superfície de resposta.

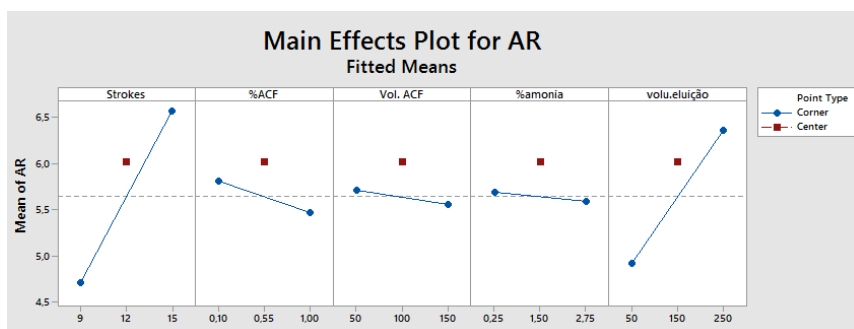


Gráfico 7) Efeitos principais para a MXE.

O gráfico dos efeitos principais, representa não só os efeitos individuais dos parâmetros que influenciam a resposta como a extensão dos mesmos. Tendo em consideração os resultados apresentados no gráfico 7, podemos afirmar que para uma melhor recuperação da MXE terá de se aspirar um número máximo de amostra (15 *strokes*) e eluir com um volume máximo de hidróxido de amónia (250 μL). Quanto aos restantes fatores, percentagem de hidróxido de amónia na solução de eluição e percentagem e volume de ácido fórmico na solução de

lavagem pode concluir-se que não têm significância estatística para a recuperação da MXE pois, a linha dos efeitos médios não apresenta declive acentuado.

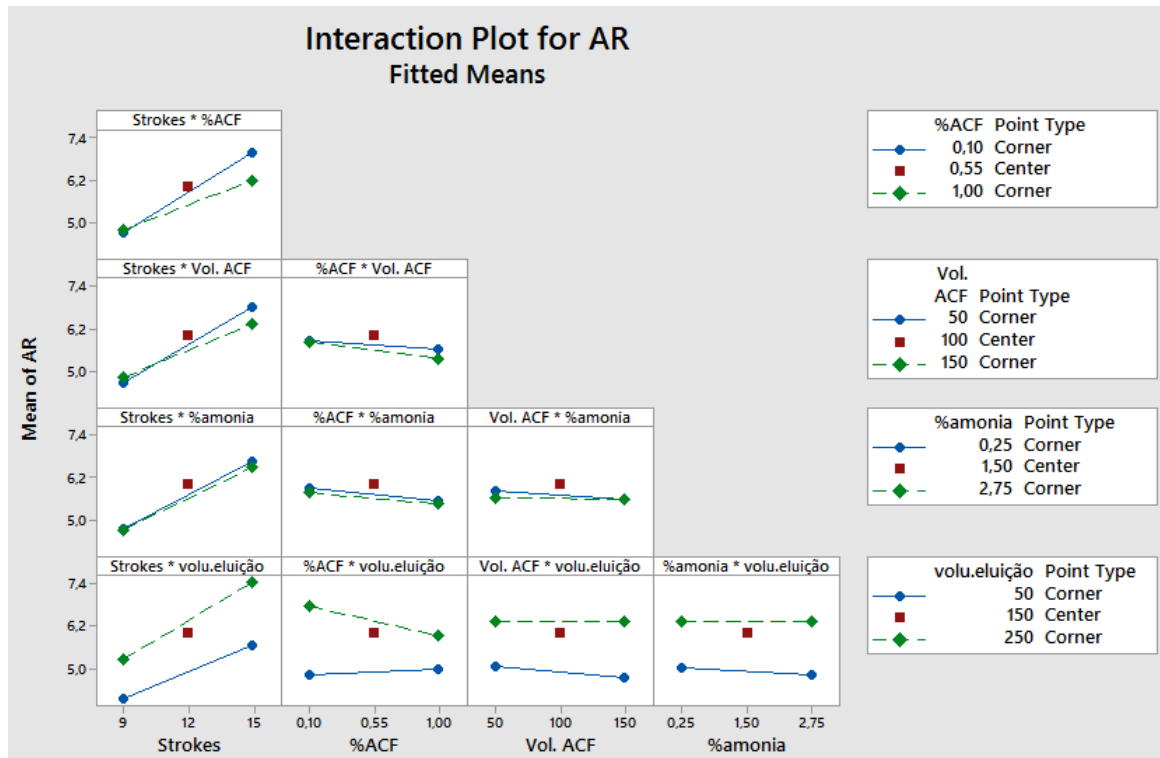


Gráfico 8) Interações dos vários parâmetros para a MXE.

A extensão da interação dos fatores também foi avaliada pelos diagramas *Interaction Plot*. Estes diagramas são uma ferramenta estatística que permite detetar quando duas variáveis independentes têm interação uma com a outra. Quando isso acontece, duas variáveis independentes cruzam-se entre si.

Pela análise do gráfico 8 podemos concluir que não existem duas variáveis que cruzem entre si de forma significativa pelo que a metodologia de superfície de resposta (RSM) não foi aplicada.

ii. Piperazinas

Os fatores avaliados durante este estudo foram: número de *strokes*, percentagem de ácido fórmico e o respetivo volume na solução de lavagem, percentagem de hidróxido de amónia e volume utilizados na solução de eluição. Foi feito um desenho fatorial total (2^k) onde k é o número de fatores a variar, tendo como controlo um ponto intermédio ($n=3$). As experiências foram efetuadas pela ordem sugerida pelo MINITAB® minimizando assim possíveis erros sistemáticos (anexo 12).

A resposta foi obtida como a razão entre a área absoluta do pico de cada composto e a área do pico do padrão interno adicionado no fim da extração. Com base nessa resposta, são apresentados em seguida, os diagramas de *Pareto* (gráfico 9) e os gráficos dos efeitos principais (gráfico 10).

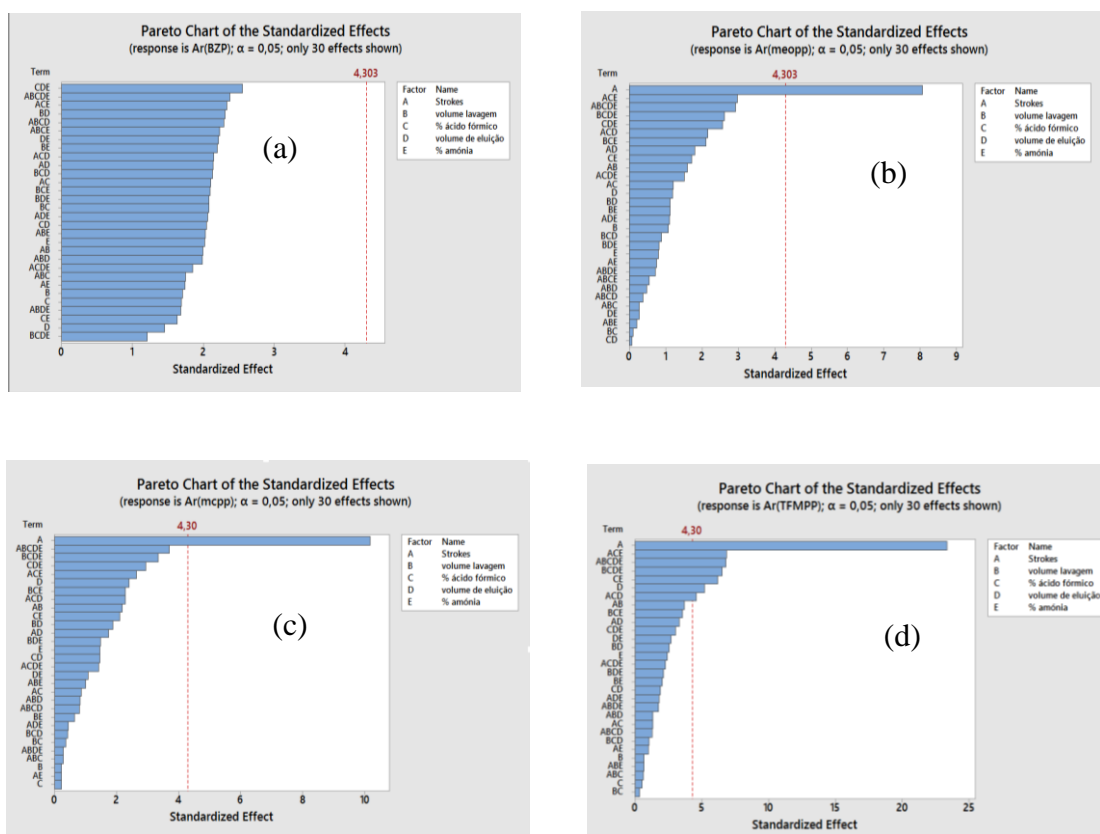


Gráfico 9) Diagrama de Pareto da BZP(a) MeOPP(b) mCPP(c) e TFMPP(d).

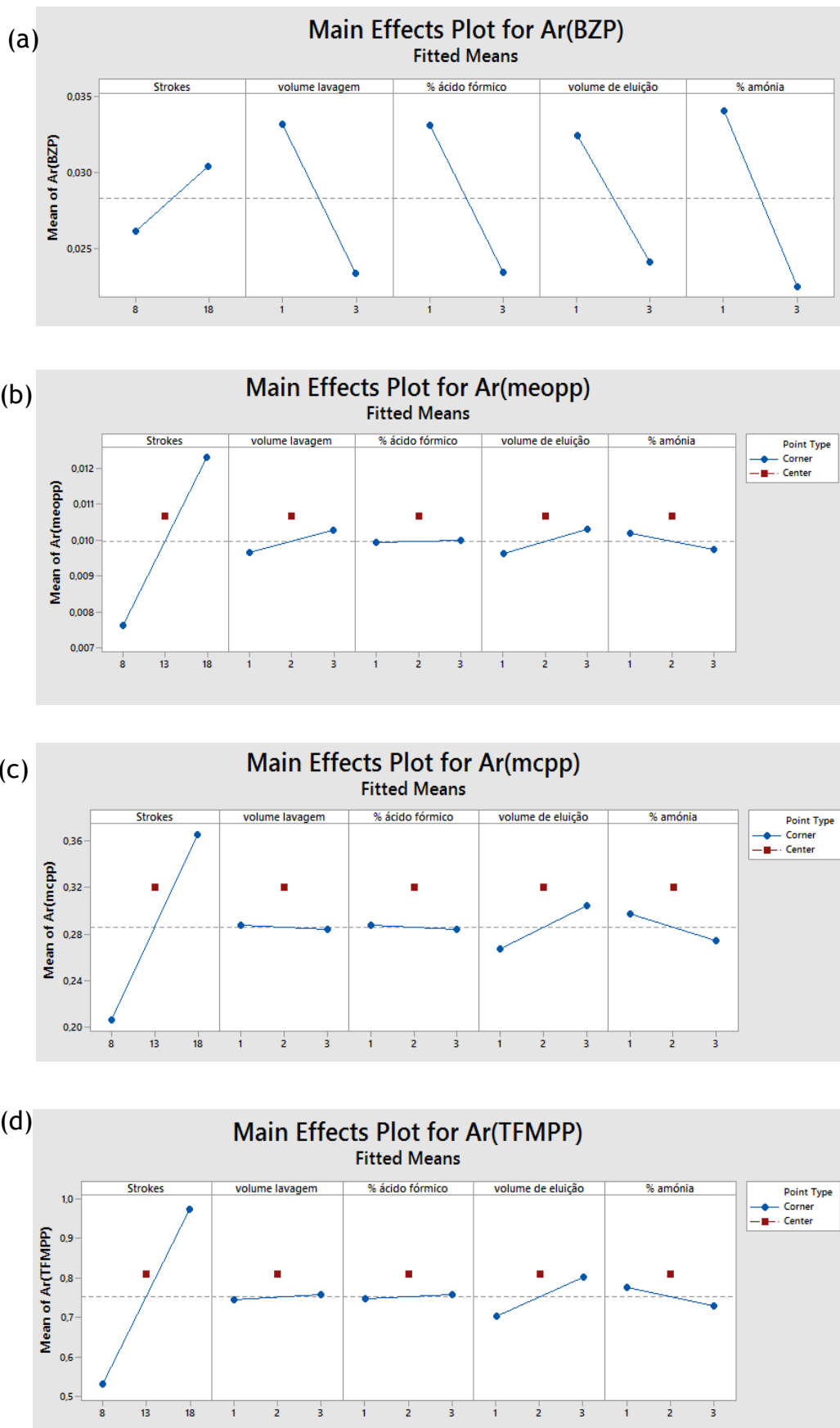


Gráfico 10) Efeitos principais para a BZP(a), MeOPP (b), mCPP (c) e TFMPP (d).

Tendo em consideração os resultados apresentados no gráfico 10, podemos afirmar que para todos os compostos um maior número de *strokes* existe uma melhor recuperação (declive acentuado), o mesmo acontece para menor percentagem de hidróxido de amónia na solução de eluição. Repara-se no facto de que, à exceção da BZP, o volume e a % de ácido fórmico na solução de lavagem e o volume de eluição não apresentam declive acentuado pelo que não são considerados os fatores mais condicionantes em termos da recuperação das piperazinas.

A extensão da interação dos fatores também foi avaliada pelos diagramas *Interaction Plot*, (gráficos 11-14) onde se pode concluir que não existem duas variáveis que cruzem entre si de forma significativa pelo que a metodologia de superfície de resposta (RSM) não foi aplicada.

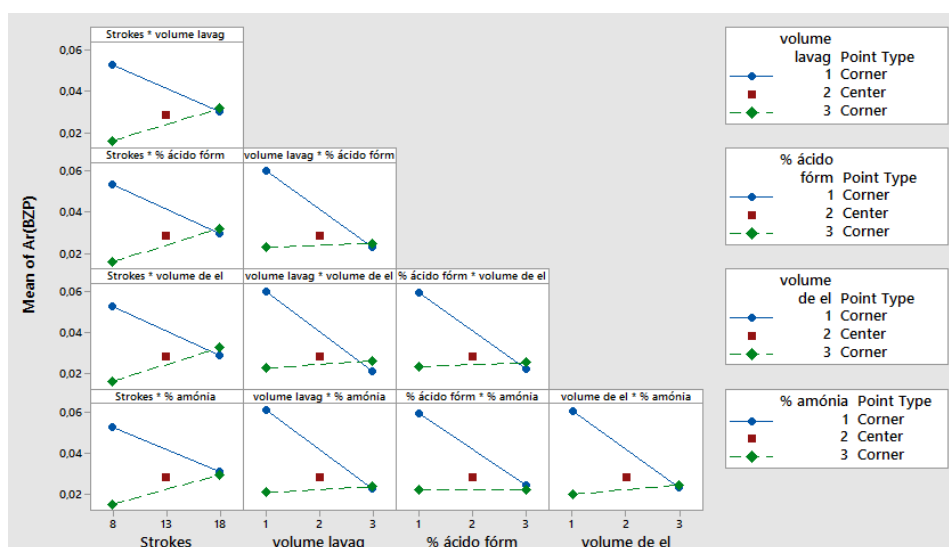


Gráfico 11) Interações dos vários parâmetros para a BZP.

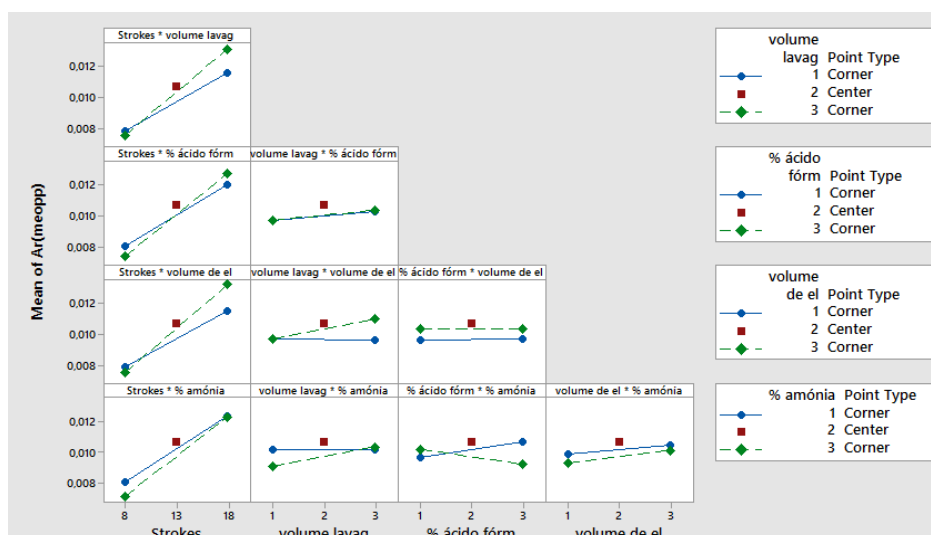


Gráfico 12) Interações dos vários parâmetros para a MeOPP.

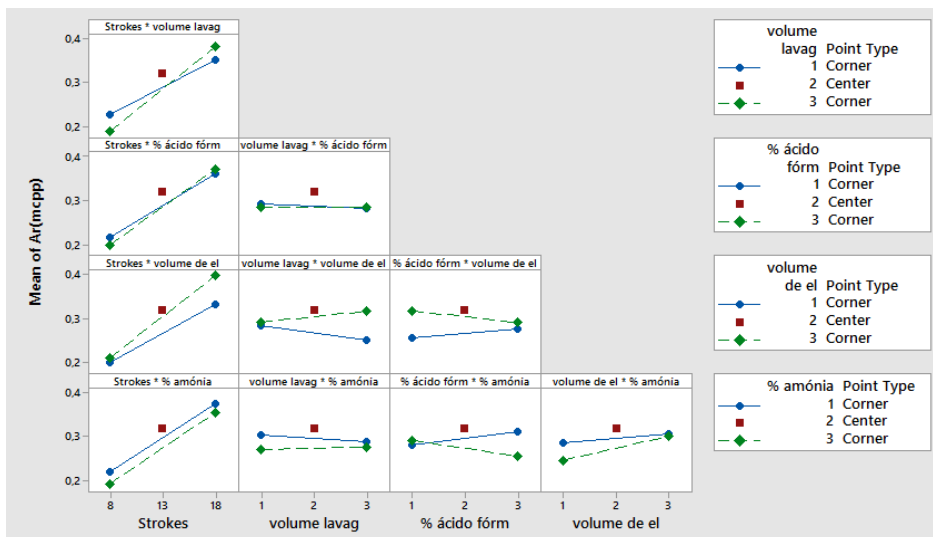


Gráfico 13) Interações dos vários parâmetros para a mCPP.

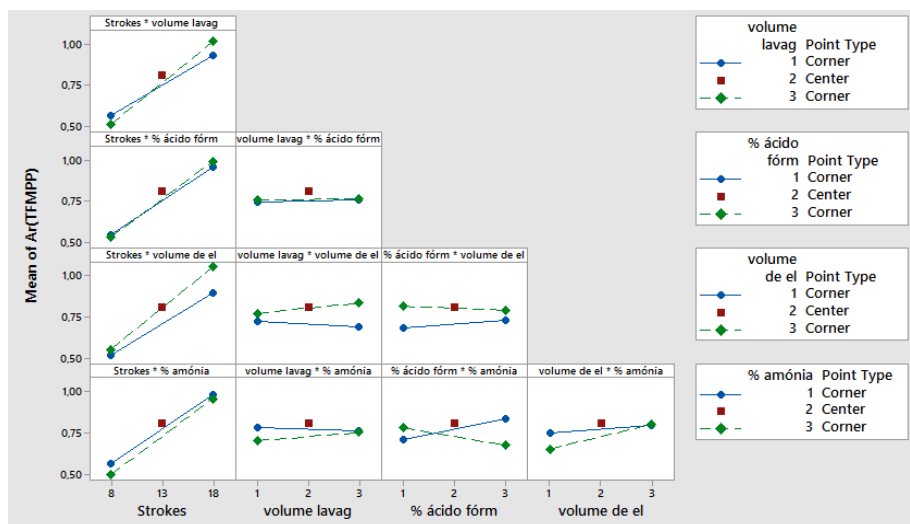


Gráfico 14) Interações dos vários parâmetros para a FMPP.

6. Resposta otimizada

i. MXE: Avaliação univariada para o número de *Strokes* e volume de eluição

É necessário avaliar-se o número de *strokes* e o volume de eluição pela análise de univariada pois são fatores que ultrapassam o nível de significância de 5% (linha vertical) assumindo-se assim que têm influência na recuperação da MXE (gráfico 6).

O número de *strokes* estudado foi de 15, 20 e 25 e o volume de eluição variou entre 250, 500 e 1000 μL . Os restantes fatores mantiveram-se constantes para esta experiência sendo que os valores resultaram da análise dos gráficos resultantes do DOE (gráficos 7 e 8). Foram utilizados 50 μL de metanol e 50 μL de 0,1% ácido fórmico em água para o acondicionamento, 100 μL 0,1% de ácido fórmico em água para a solução de lavagem e 250 μL de 0,25% de hidróxido de amónia em metanol para a eluição.

Os ensaios foram realizados em triplicado ($n=3$) e os resultados encontram-se descritos no gráfico 15.

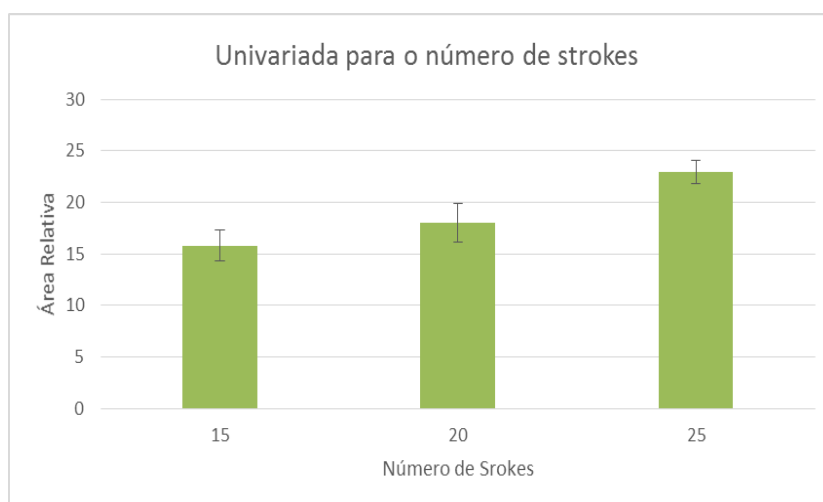


Gráfico 15) Univariada para o número de *strokes* (15, 20 e 25) com o respetivo SD.

Pela análise do gráfico 15, verifica-se que se obtém maior recuperação de analito para um maior número de *strokes*, 25. Como existe significância estatística (anexo 7), o número de *strokes* a efetuar no decorrer do trabalho será de 25, para a obtenção de melhores recuperações.

Para a avaliação univariada do volume de eluição foi realizado um ensaio em triplicado onde o volume de eluição variou entre 250, 500 e 1000 μL . Os restantes fatores mantiveram-se constantes para esta experiência. Para o acondicionamento foram utilizados 50 μL de metanol e 50 μL de 0,1% ácido fórmico em água, a amostra foi aspirada 25 vezes com um volume de 150 μL e para a solução de lavagem foram utilizados 100 μL de 0,1% de ácido fórmico em

água. A eluição foi conseguida com uma solução de 0,25% de hidróxido de amónia em metanol.

O gráfico 16 expressa o resultado da univariada em relação ao volume de eluição.

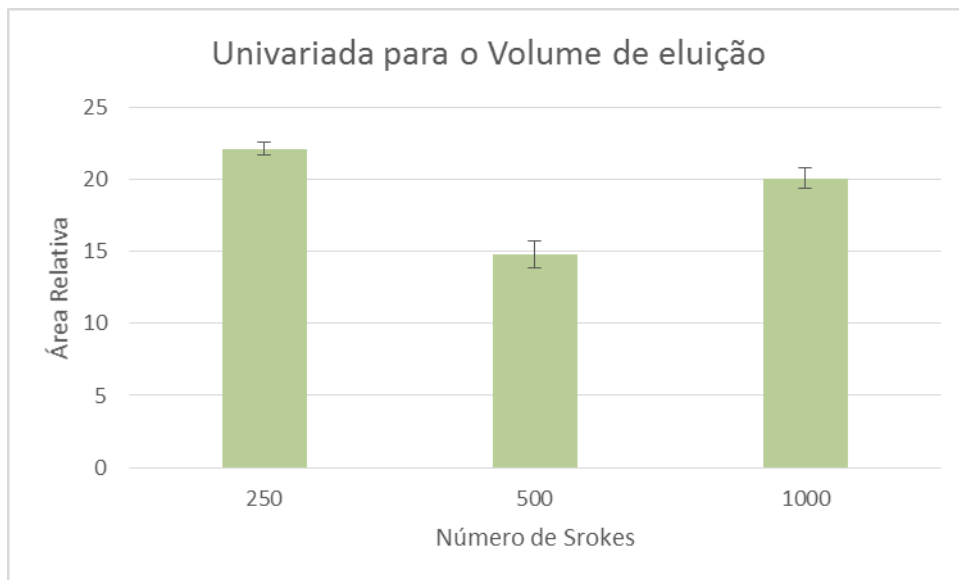


Gráfico 16) Univariada para o volume de eluição (250, 500 e 1000 μ L) com o respetivo SD.

Pela análise do gráfico 16 e após uma análise estatística (anexo 8) verifica-se que o volume para o qual a recuperação do composto é mais acentuada é 250 μ L pelo que é com este volume ao qual a técnica extrativa foi otimizada.

ii. Piperazinas: Avaliação univariada para o número de *Strokes*

Pelos diagramas de pareto (gráfico 9) confirma-se que o número de *strokes* é o único fator que é considerado estatisticamente significativo pois ultrapassa o nível de significância de 5% (linha vertical) assumindo-se assim que têm influência na resposta. Assim, procede-se a uma avaliação univariada para o número de *strokes*.

O número de *strokes* estudado foi de 18, 24 e 30 sendo que os restantes fatores se mantiveram constantes para esta experiência. Os fatores foram selecionados de acordo com os gráficos resultantes do DOE, sendo selecionados os que induzem maior recuperação dos analitos. Deste modo para o acondicionamento foram utilizados 3x250 μ L de metanol e 3x250 μ L de 2% ácido fórmico em água, 3x150 μ L 1% de ácido fórmico em água para a lavagem e 3x150 μ L 3% hidróxido de amónia em metanol para a eluição.

Os ensaios foram realizados em triplicado. Estes resultados encontram-se descritos no gráfico 17.

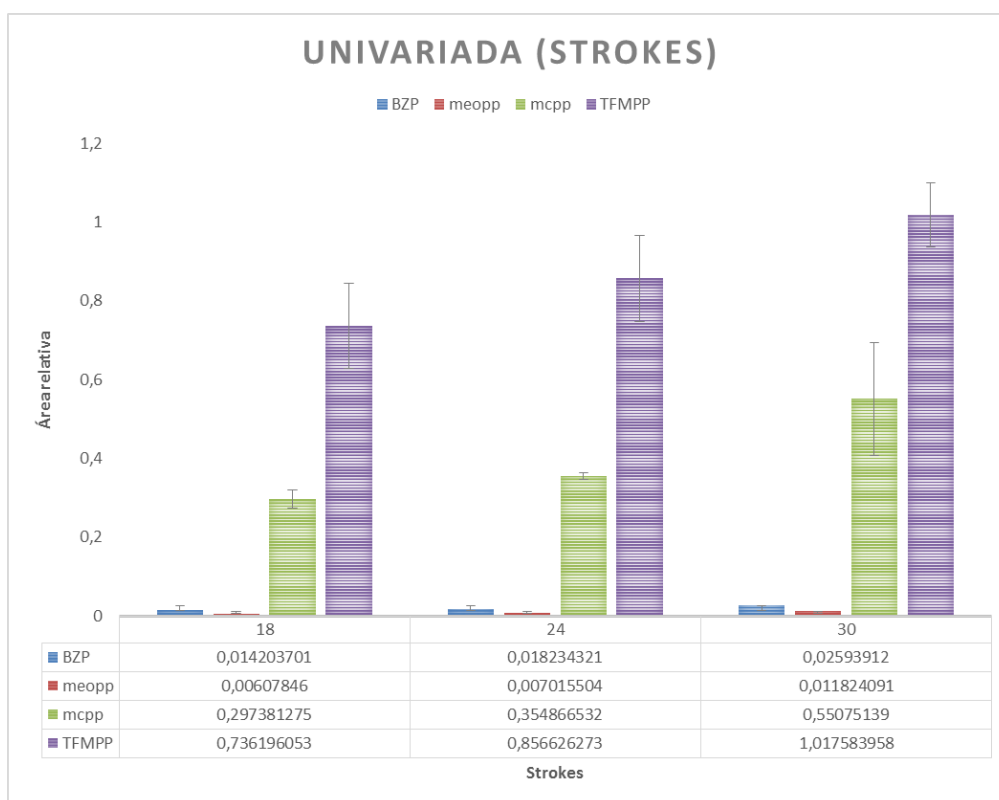


Gráfico 17) Avaliação univariada para o número de *strokes* (n=3) para as piperazinas objeto de estudo. (resultados expressos como área relativa)

Da análise do gráfico 17, pode concluir-se que para 30 *strokes* os compostos apresentam maior sinal, contudo a MeOPP, mCPP e TFMPP não apresentam diferença estatística, pois o valor-p é em todos os casos, superior ao nível de significância (α) de 5% (anexo 11). É de referir que para estes 3 compostos era indiferente estatisticamente realizar 18, 24 ou 30 *strokes*. Optou-se por “sacrificar” um composto, a BZP, em prol de uma técnica mais rápida (cerca de 8 minutos). Assim o número de *strokes* escolhido para o decorrer do trabalho foi de 18.

7. Validação

A validação de um método analítico é um passo crucial para qualquer método analítico dado que demonstra a fiabilidade do mesmo na determinação da concentração de um analito numa matriz biológica específica, garantindo assim a veracidade dos resultados (ICH e FDA).

Os métodos descritos foram validados seguindo as normas da *Food and Drug Administration* (FDA) e da *International Conference on Harmonisation* (ICH) e dos parâmetros avaliados podem-se destacar:

1. Seletividade e Especificidade;
2. Linearidade/curva de calibração;
3. Limites de deteção e quantificação;
4. Precisão e exatidão (inter- e intradia);
5. Estabilidade;
6. Recuperação;
7. Arrastamento (*carry-over*);
8. Supressão iónica (efeito de matriz).

7.1. Seletividade e Especificidade

A seletividade é a capacidade que um método analítico apresenta na diferenciação e quantificação do analito de interesse, na presença de outros componentes na amostra como é o caso dos constituintes endógenos da matriz, metabolitos e medicação concomitante. Assim, garante-se, que não existem interferentes que possam induzir a falsos resultados (FDA e ICH).

A identificação inequívoca do composto na amostra, por GC-MS/MS e LC-MS/MS em modo MRM, pressupõe o reconhecimento de dois iões diagnóstico no fragmentograma. É fundamental monitorizar as suas intensidades relativas e, por isso, é necessário estabelecer quais os critérios de aceitação admitidos para as mesmas. A abundância relativa de um ião diagnóstico, expressa como percentagem da intensidade do ião mais intenso (pico base) é determinada por integração da área do pico cromatográfico selecionado normalizada ao pico base (que corresponde a 100%). Na Tabela 11, encontram-se descritos os intervalos de aceitação permitidos para as abundâncias relativas utilizados na identificação dos compostos em estudo (WADA⁶).

⁶ World Anti-Doping Agency

Tabela 11) Intervalos máximos de tolerância permitidos para as abundâncias relativas dos íões, monitorizados em modo MRM e expressos em percentagem (%) (WADA).

Abundância relativa (% do pico base)	Janela máxima de tolerância permitida
> 50%	±10% (intervalo absoluto)
25% a 50%	±20% (intervalo relativo)
5% a <25%	±5% (intervalo absoluto)
<5%	±50% (intervalo relativo)

Além das abundâncias relativas, os critérios de confirmação qualitativa incluem ainda o tempo de retenção relativo do composto (trR), expresso pela razão entre o tr do composto e o tr do padrão interno (deverá ser inferior ou igual a 1% quando comparado ao trR do mesmo composto numa amostra controlo analisada contemporaneamente). A razão entre o sinal do íão diagnóstico menos intenso e o sinal correspondente ao ruído da linha de base (razão sinal/ruído) deve ser superior a 3:1 (WADA).

Por forma a avaliar a seletividade do método proposto, foram processadas *pools* de amostras em branco (n=10) procedentes do *staff* do laboratório e de diferentes origens, de forma a verificar a existência de alguma interferência, quer devido a componentes endógenos ou outros produtos exógenos contidos na matriz. Além destas amostras branco, ainda foram injetadas várias substâncias como anfetaminas, opiáceos, THC e derivados, e cocaína à concentração de 100 ng/mL, de forma a avaliar a especificidade, capacidade que um método tem de diferenciar o analito de interesse com analitos estruturalmente semelhantes que possam estar presentes na amostra (FDA e ICH).

As amostras foram processadas sem qualquer adição de composto ou padrão interno. Os resultados são apresentados nas figuras 14-17.

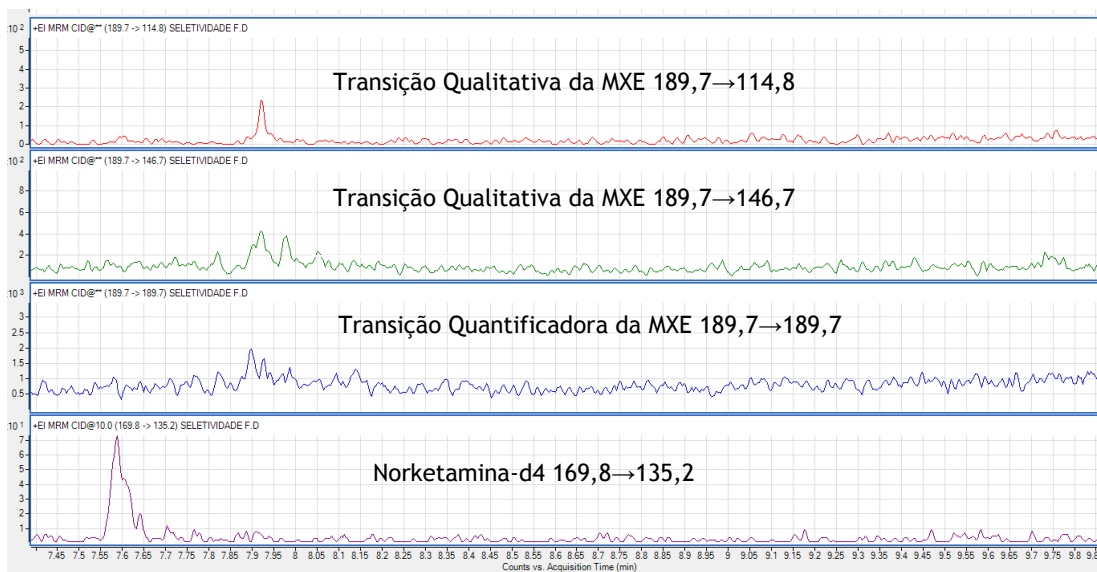


Figura 14) Exemplo de um cromatograma de Seletividade da MXE (sem adição de composto ou padrão interno).

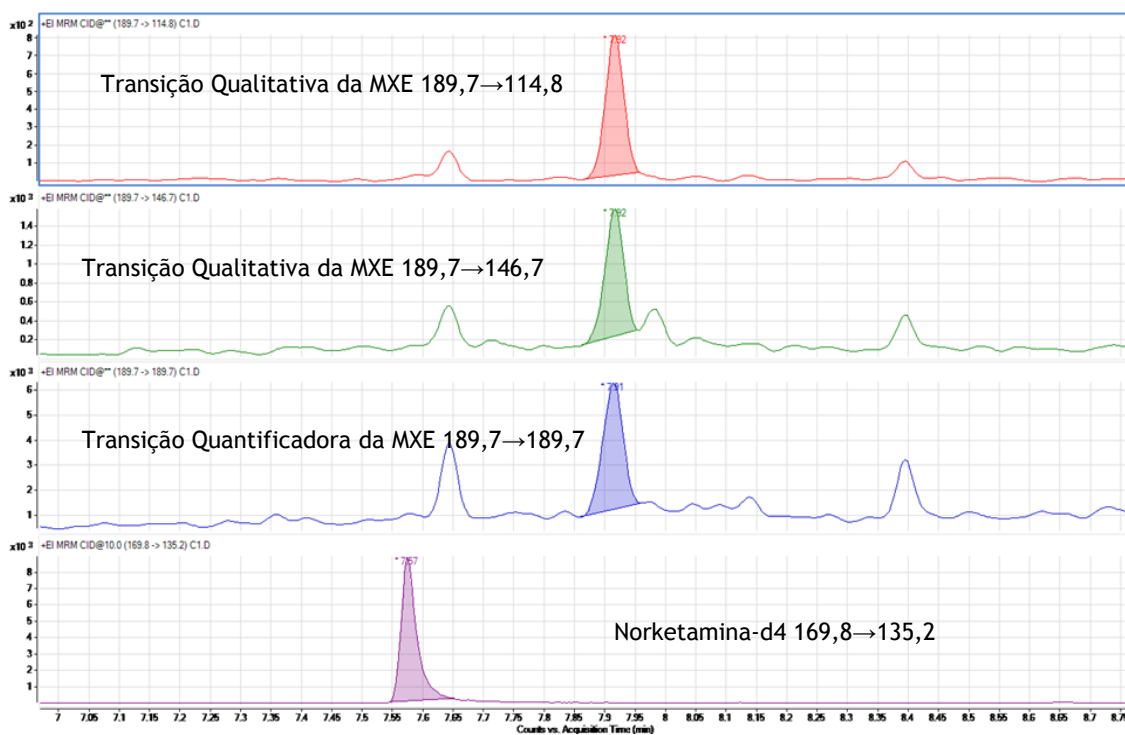


Figura 15) Cromatograma com a amostra fortificada com MXE a 10 ng/mL.

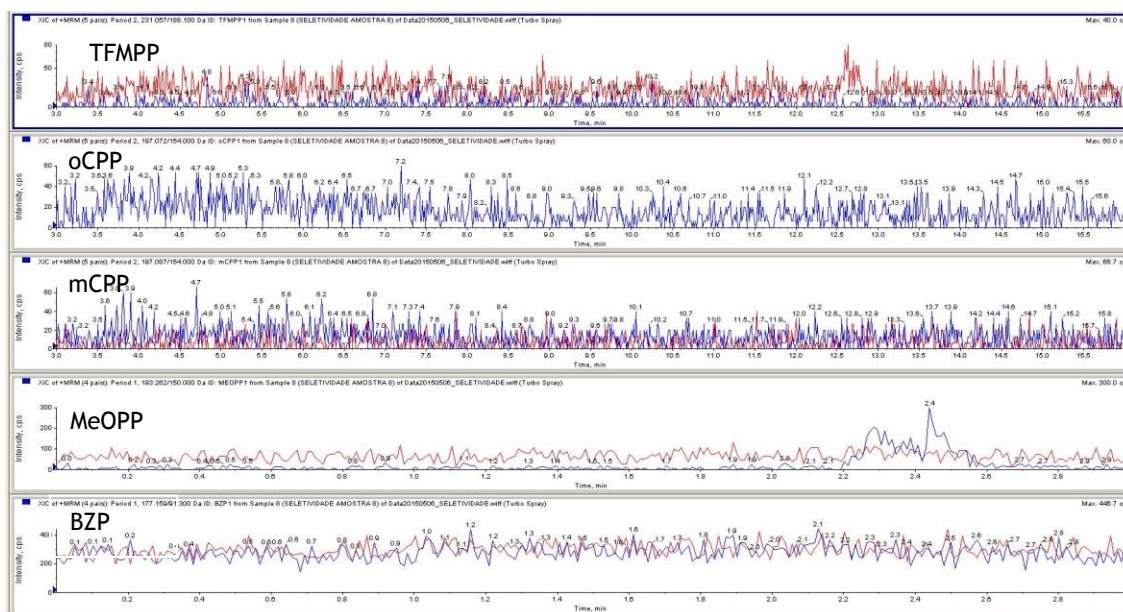


Figura 16) Exemplo de cromatogramas de Seletividade das piperazinas (amostra extraída não fortificada)

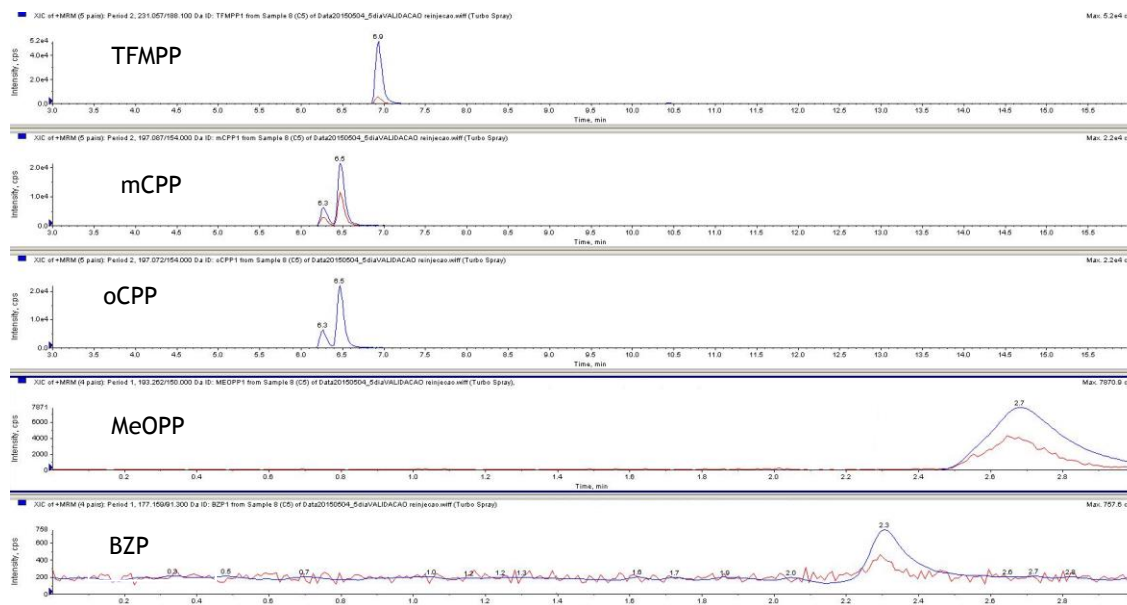


Figura 17) Cromatograma de Piperazinas com a amostra fortificada a 5 ng/mL.

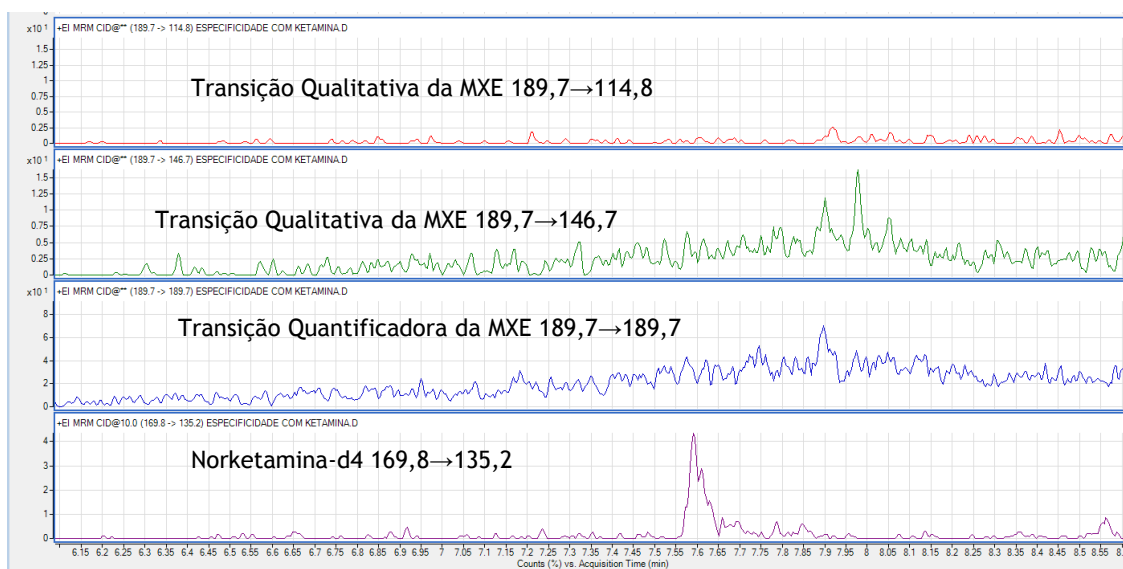


Figura 18) Cromatograma sem extração de cocaína, Ketamina, anfetaminas, opiáceos, THC e derivados a 100 ng/mL.

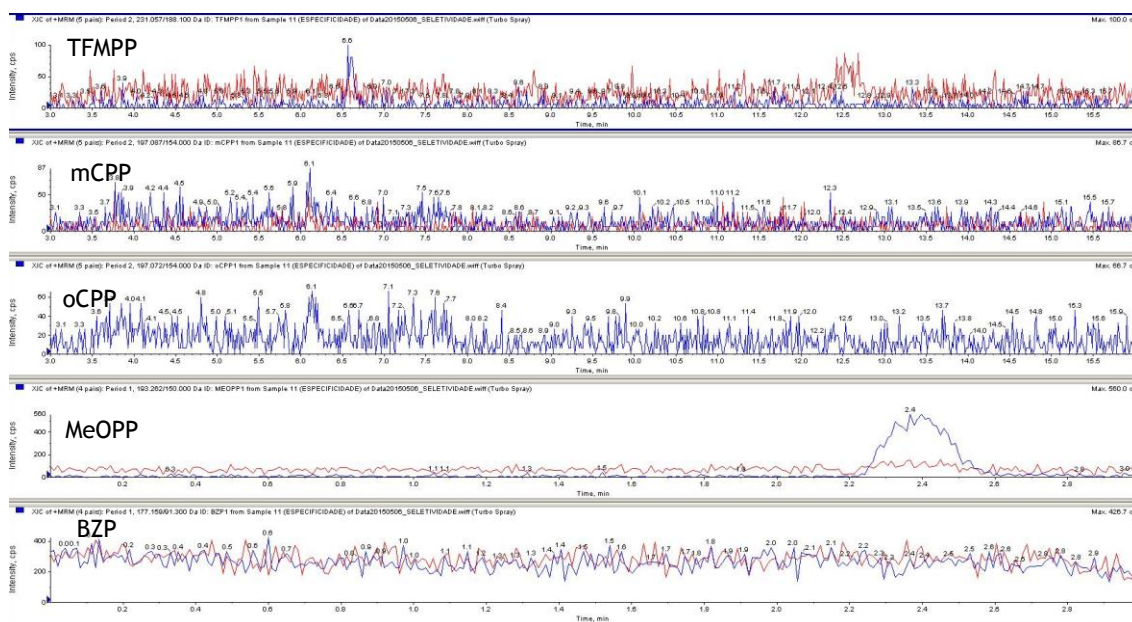


Figura 19) Cromatograma sem extração de cocaína, anfetaminas, opiáceos, THC e derivados a 100 ng/mL.

Quanto à especificidade, avaliando a Figura 18, e por comparação com a figura 15, concluiu-se que o método é específico para a MXE, não aparecendo nenhum sinal nas transições qualificadoras e quantificadora no tempo de retenção da MXE.

Em relação às piperazinas, avaliando a Figura 19, e por comparação com a figura 17, verifica-se que existe um pico na transição da MeOPP que aparece no mesmo tempo de retenção e com as mesmas transições qualitativa e quantificadora (tabela 4), contudo segundo os

critérios da WADA, só é um fator a considerar se o rácio entre a resposta do íão qualificador e quantificador for análoga em ambos os cromatogramas.

Para o calibrador mais baixo da MeOPP (5ng/mL) pode concluir-se que o rácio é de 0,36 (44624/125499) e para o pico que aparece na transição da MeOPP aquando do estudo da especificidade o mesmo rácio apresenta uma ordem de grandeza diferente 0,09 (2143/22799).

Deste modo, pode concluir-se que o método é específico para as piperazinas em estudo. É ainda de salientar que, o pico que aparece na figura 19 é referente a anfetaminas (anexo 13).

7.2. Linearidade/curva de calibração

A linearidade refere a capacidade do método analítico gerar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na gama de concentrações pré-definida. Esta faixa linear é definida como o intervalo entre os limites inferior e superior de quantificação do analito no qual foi possível a determinação com exatidão, precisão e linearidade exigidas pelas *guidelines* (FDA e ICH).

Para estudar a linearidade, é necessário recorrer-se a calibradores, 5 a 8, de concentração conhecida, preparados com prévia fortificação. Estes calibradores têm de estar distribuídos uniformemente incluindo como calibrador mais baixo, o limite inferior de quantificação (LLOQ) (FDA).

Deve ainda, analisar-se um branco (matriz biológica processada sem a presença do composto) e um zero (matriz biológica processada fortificada apenas com PI) (FDA). Este ensaio foi realizado em triplicado e não foram observados sinais ao longo dos cromatogramas da MXE e das piperazinas.

A regressão linear é o modelo mais simples que melhor reflete a relação entre duas variáveis, resposta-concentração, que pode ser escrita como curva de calibração (equação 1) (ICH e FDA).

$$Y=mx+b \text{ (equação 1)}$$

Onde as variáveis correspondem respetivamente a:

y : resposta obtida;

x: concentração do analito;

m: declive da curva de calibração;

b: ordenada na origem da curva de calibração.

O coeficiente de determinação (R^2), também é possível de ser calculado através da equação 1. Este parâmetro deve ser o mais próximo possível de 1, sendo aceitável se for superior a 0,99. Caso isso se verifique, garante-se que existe uma dispersão reduzida do conjunto de pontos (FDA).

Por vezes, quando existe heterocedasticidade nos resultados (variâncias heterógenas entre o calibrador mais baixo e mais alto), pode aplicar-se o uso de fatores de ponderação ou transformações matemáticas, que permitem, que os resultados obtidos tenham uma aproximação o mais real possível entre o modelo e os resultados obtidos (Escada, 2007).

A utilização de ponderações ($1/x$; $1/x^2$; $1/y$; $1/y^2$, $1/x^{0,5}$; $1/y^{0,5}$) foi tida em consideração nos casos onde o modelo de regressão linear, não podia ter sido tomado em linha de conta permitindo, deste modo, minimizar as discrepâncias entre as variâncias dos diferentes pontos que constituem a curva de calibração.

A exatidão das concentrações obtidas foi analisada em termos do erro relativo médio (ERM) ou BIAS (equação 2). Este parâmetro é avaliado em termos de relação entre as concentrações obtidas e as concentrações teóricas.

$$\text{BIAS} = \frac{\text{concentração calculada} - \text{concentração teórica}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Devem ser respeitadas as condições necessárias no desenvolvimento da curva de calibração no LLOQ no que diz respeito ao coeficiente de variação (CV) e ao BIAS, inferior a 20% e $\pm 20\%$ respetivamente. Para os restantes calibradores, o CV deve ser inferior a 15% e o BIAS deve ser $\pm 15\%$ da concentração teórica (FDA E ICH).

i. MXE

A curva de calibração foi avaliada com 7 calibradores uniformemente distribuídos numa gama de concentrações de 10 a 600 ng/mL. Foram também preparadas três amostras controlo, gama baixa (30 ng/mL), gama intermédia (250 ng/mL) e gama alta (500 ng/mL). É de salientar que os critérios de aceitação (R^2 , BIAS e CV) foram preenchidos.

Tabela 12) Resumo da linearidade para a MXE.

Composto	Regressão	Gama de trabalho (ng/mL)	Linearidade		R ² (média± SD)
			Declive (m) (média± SD)	Ordenada na Origem (b) (média± SD)	
MXE	1/x	10-600	0,022±0,004	0,136±0,114	0,996±0,001

Pela análise da tabela 12, verifica-se que o método descrito é linear na gama de trabalho utilizada, tendo sido necessário a aplicação da ponderação 1/x.

ii. Piperazinas

A curva de calibração foi avaliada para os analitos em estudo com 6 a 10 calibradores uniformemente distribuídos. A gama de concentrações variou para cada composto em estudo.

A BZP e a MeOPP foram validadas com 6 calibradores uniformemente distribuídos (5, 10, 20, 30, 60, 80 ng/mL). É de salientar que foram preparadas amostras controlo a três níveis de concentração, gama baixa (7,5 ng/mL), gama intermédia (15 ng/mL) e gama alta (50 ng/mL). Todos os critérios de aceitação (R², BIAS e CV) foram cumpridos. É de referir que no caso da MeOPP teve de se aplicar a ponderação 1/X, ao contrário da BZP, onde não foi necessário a aplicação de ponderações.

A mCPP foi validada com 7 calibradores uniformemente distribuídos (1, 5, 10, 20, 30, 60, 80 ng/mL). O método foi linear na gama de concentrações utilizada, aplicando a ponderação 1/x. Foram ainda, preparadas 4 amostras controlo, duas a gama baixa (2,5 e 7,5 ng/mL), uma a gama intermédia (15 ng/mL) e uma a gama alta (50 ng/mL). Todos os critérios de aceitação (R², BIAS e CV) foram cumpridos.

Finalmente, a TFMP foi validada com 10 calibradores uniformemente distribuídos (0,01; 0,05; 0,1; 1; 5, 10, 20, 30, 60, 80 ng/mL). É de salientar que, o método foi linear na gama de concentrações utilizada, com a aplicação da ponderação 1/x e, que foram, preparadas amostras controlo a seis concentrações, duas a gama baixa (0,03 e 0,5 ng/mL), duas a gama intermédia (2,5 e 7,5 ng/mL) e duas a gama alta (15 e 50 ng/mL). Todos os critérios de aceitação (R², BIAS e CV) foram preenchidos.

Estes resultados encontram-se resumidos na tabela 13.

Tabela 13) Resumo da linearidade para os compostos em estudo.

Composto	Regressão	Gama de trabalho (ng/mL)	Linearidade		R ² (média± SD)
			Declive (m) (média± SD)	Ordenada na Origem (b) (média± SD)	
BZP	Linear	5-80	0,012±0,002	0,065±0,023	0,999±0,001
MeOPP	1/x	5-80	0,333±0,047	1,193±0,533	0,994±0,002
mCPP	1/x	1-80	0,681±0,048	-0,090±0,192	0,995±0,003
TFMPP	1/x	0,01-80	1,666±0,114	0,076±0,024	0,996±0,001

Pela análise da tabela 13, verifica-se que o método descrito é linear na gama de trabalho utilizada para os analitos em estudo, sendo que para a MeOPP, mCPP e TFMPP foi aplicada uma ponderação de 1/x.

7.3. Limites de deteção e quantificação

Define-se como limite de deteção (LOD) a menor concentração de um determinado analito que o método pode diferenciar de forma fiável do ruído de fundo, não sendo necessariamente quantificada como valor exato (FDA).

O limite de quantificação (LLOQ) é a menor concentração de analito numa determinada amostra que pode ser determinado quantitativamente com precisão e exatidão dentro dos critérios anteriormente descritos, CV inferior a 20 % e BIAS ±20 % da concentração teórica (FDA). O LLOQ foi considerado como o calibrador mais baixo das curvas de calibração.

i. MXE

Na tabela 14, apresenta-se o LOD e LLOQ da MXE.

Tabela 14) Limites de Quantificação e Deteção da MXE.

Composto	LLOQ (ng/mL)	LOD (ng/mL)	Concentração teórica (ng/mL) (média ±SD)	CV (%)	BIAS (%)
MXE	10	1	11,26±0,65	5,79	12,63

O LLOQ da MXE (tabela 14) é extremamente satisfatório, tendo em conta o volume de amostra (250 µL) e tendo em consideração os resultados obtidos por outros trabalhos publicados com estes compostos ou equipamentos. O CV e o BIAS encontram-se dentro do estabelecido pelas *guidelines*.

O LOD da MXE foi calculado pelo limite ao qual o sinal da MXE era definido mas não quantificável. Foi realizado um ensaio para um n=10 com CV de 8,59%, para um limite de detecção de 1 ng/mL, pelo que pode ser considerado um limite muito satisfatório no que se refere à detecção da MXE em amostras de saliva.

Nas figuras 20 e 21 estão representados exemplos de cromatogramas para o LOD e LLOQ, respetivamente.

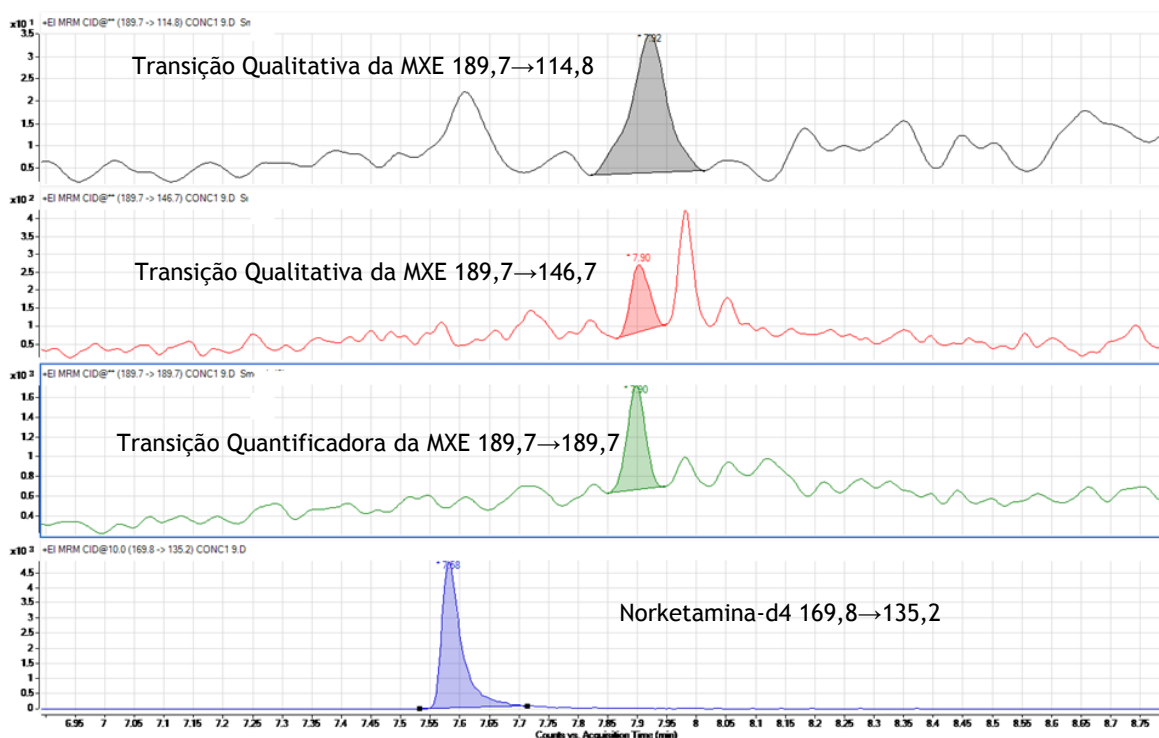


Figura 20) Exemplo de um Cromatograma de LOD (1ng/mL).

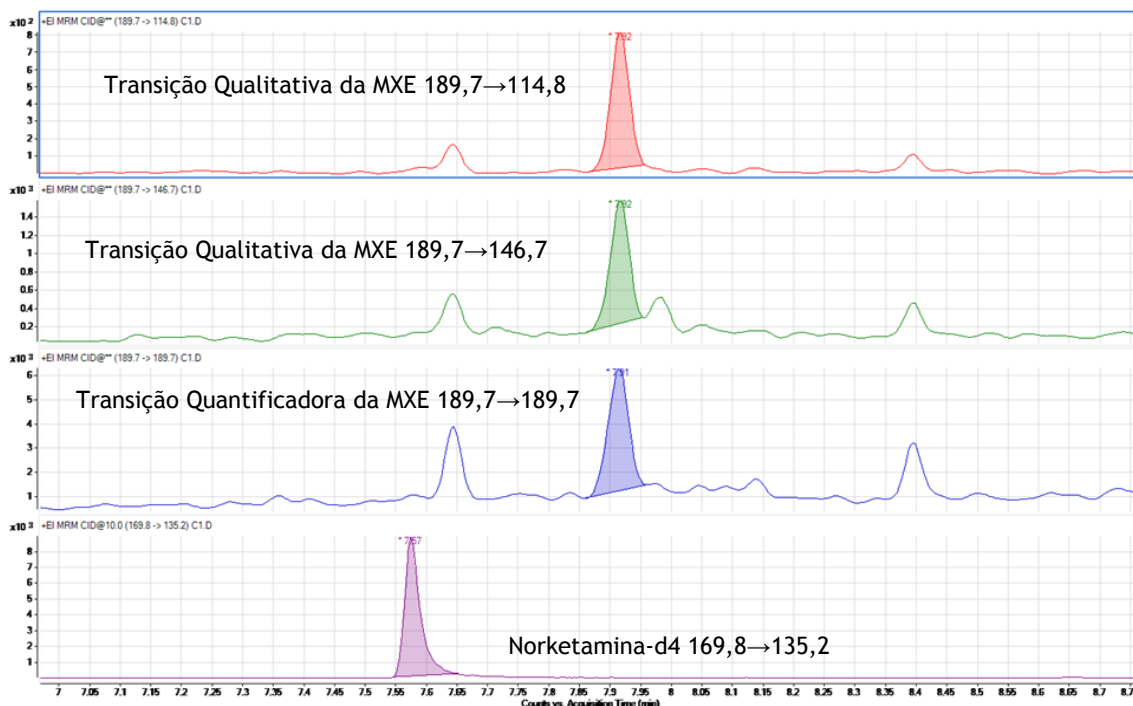


Figura 21) Exemplo de um Cromatograma de LLOQ (10 ng/mL).

ii. Piperazinas

Na tabela 15, apresenta-se os LLOQ e LOD de cada composto em estudo.

Tabela 15) Limites de Quantificação e de detecção de cada analito.

Composto	LLOQ e LOD (ng/mL)	Concentração teórica (ng/mL) (média ±SD)	CV (%)	BIAS (%)
BZP	5	5,28±0,47	8,98	5,51
MeOPP	5	4,77±0,67	14,04	-4,54
mCPP	1	1,09±0,06	5,18	8,71
TFMPP	0,01	0,01±0,01e ⁻¹	5,28	-2,89

Os limites de quantificação dos compostos (tabela 15) são satisfatórios, tendo em conta o reduzido volume de amostra (250 µL) e tendo em consideração os resultados obtidos por outros trabalhos publicados com estes compostos ou equipamentos.

É de notar que os limites de detecção, são iguais aos limites de quantificação porque apesar de os picos apresentarem áreas significativas a concentrações mais baixas os CV nesse caso apresentam uma ordem de grandeza superior a 20% o que impede que o limite de detecção seja inferior ao limite de quantificação.

Nas figuras 22 está representado um cromatograma identificativo do LOD e LLOQ para cada composto.

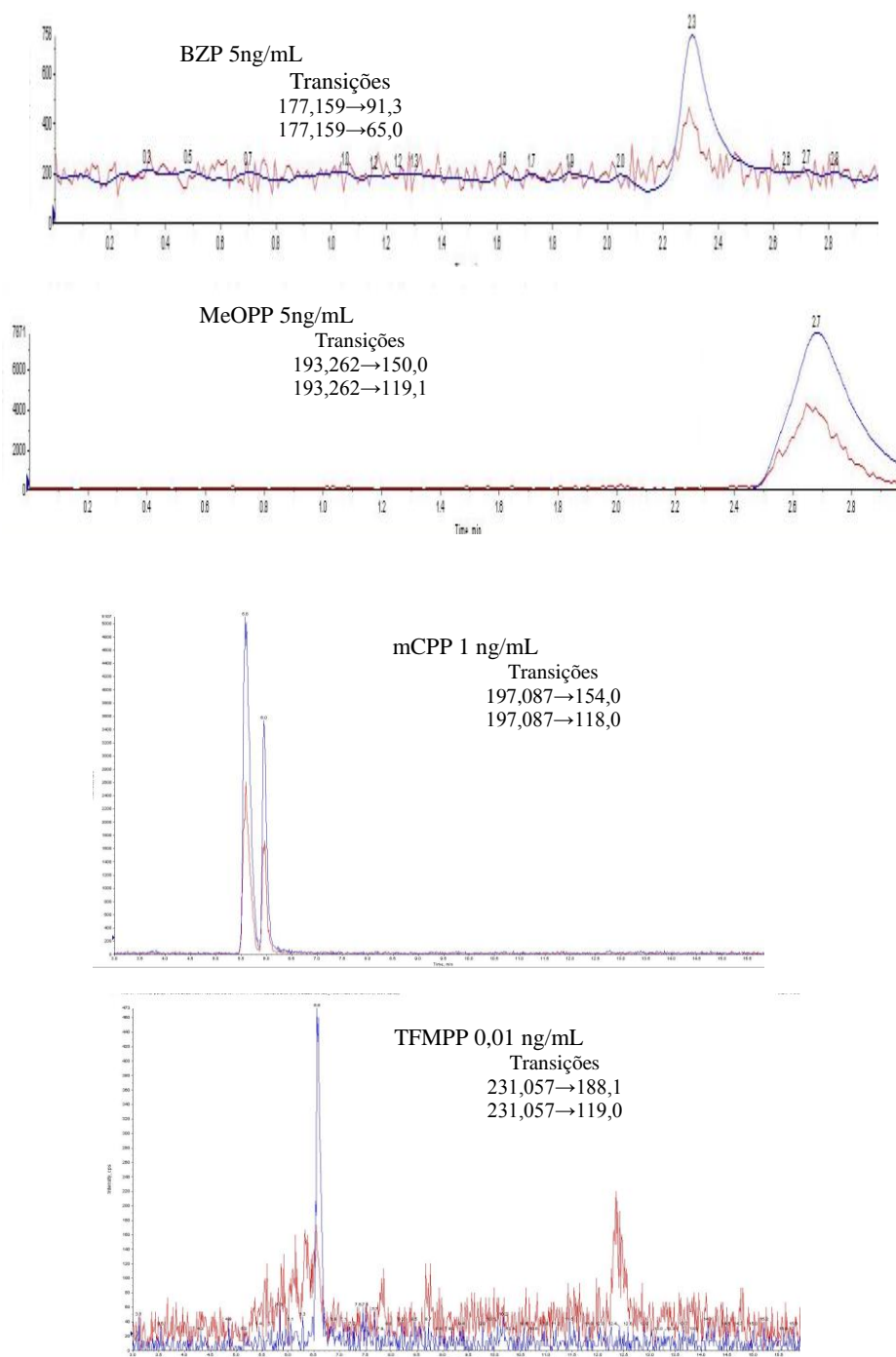


Figura 22) Exemplo de Cromatogramas de LOD e LLOQ para BZP, Meopp, mCPP e TFMPP.

7.4. Precisão e exatidão (inter- e intradia)

A precisão descreve o grau de proximidade do valor determinado experimentalmente com a análise da replicação de amostras contendo concentrações conhecidas de um determinado analito, sendo por vezes denominada de fiabilidade. Este parâmetro é determinado em termos de CV (%) e avalia a dispersão de resultados entre os ensaios independentes (equação 3) (FDA e ICH).

$$CV(\%) = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100 \text{ (Equação 3)}$$

Onde,

- SD: desvio padrão;
- \bar{X} : média.

A precisão não deve exceder um CV superior a 20 % para o LLOQ e para os restantes calibradores o CV deve ser inferior a 15% (FDA).

A precisão envolve a precisão intradia (repetibilidade) e a precisão interdia (reprodutibilidade). A precisão intradia expressa o grau de concordância entre os resultados dado que as condições são as mesmas nos diferentes dias: mesmo analista, local e instrumento num determinado curto espaço de tempo. A precisão interdia avalia a variação de vários fatores inerentes ao método bioanalítico, tais como: diferentes dias de análise, analistas ou equipamentos (FDA).

Este parâmetro deve ser determinado, usando no mínimo 5 determinações por concentração (FDA).

A exatidão é o grau de proximidade entre as médias dos resultados obtidos com a concentração teórica, sendo determinada através da repetição da análise de amostras que contêm quantidades conhecidas de analito. O desvio da média do valor nominal é a medida da exatidão. À semelhança da precisão, a exatidão não deve exceder um CV superior a 20 % para o LLOQ e para os restantes calibradores o CV deve ser inferior a 15% (FDA e ICH).

i. MXE

Para a precisão interdia o estudo foi efetuado na gama de concentrações das amostras fortificadas durante os cinco dias de validação. Foram tidas em consideração as concentrações de 30, 250 e 500 ng/mL aos quais o ensaio foi realizado para n=5. Os resultados apresenta-se na tabela 16.

Tabela 16) Precisão interdia e exatidão (n=5).

Composto	Concentração teórica (ng/mL)	Concentração calculada (média ng/mL \pm SD)	CV (%)	BIAS (%)
MXE	30	29,73 \pm 1,22	4,19	-0,89
	250	244,77 \pm 12,77	5,17	-2,09
	500	515,12 \pm 28,59	5,59	3,02

Para a precisão intradia foram fortificadas amostras de fluido oral com MXE a 3 níveis de concentração: 25, 200 e 600 ng/mL. Foram realizadas 6 réplicas para cada ensaio (n=6) para se proceder ao estudo da precisão no mesmo dia. Os resultados são apresentados na tabela 17.

Tabela 17) Precisão intradia e exatidão (n=6).

Composto	Concentração teórica (ng/mL)	Concentração calculada (média ng/mL \pm SD)	CV (%)	BIAS (%)
MXE	25	25,25 \pm 1,51	5,97	0,98
	200	177,00 \pm 4,67	2,64	-11,50
	600	634,76 \pm 47,71	7,52	5,79

Com a análise das tabelas 16 e 17 pode-se afirmar que tanto a precisão inter- como a precisão intradia estão em conformidade com os critérios de validação seguidos, pois mantiveram-se abaixo dos valores de referência para CV (inferior a 20% no LLOQ e 15% nos restantes calibradores) e para o BIAS (\pm 20% no LLOQ e \pm 15% nos restantes calibradores).

ii. Piperazinas

Para a precisão interdia o estudo foi efetuado na gama de concentrações indicada pela linearidade durante os cinco dias de validação. Para a BZP e MeOPP este parâmetro foi avaliado tendo em consideração 3 níveis de concentração: 7,5; 15 e 50 ng/mL. No caso do mCPP as concentrações foram: 2,5; 7,5; 15 e 50 ng/mL. Para TFMPP foram utilizados 6 níveis de concentração: 0,03; 0,5; 2,5; 7,5; 15 e 50 ng/mL. Para cada uma destas concentrações foram realizadas 5 réplicas (n=5) para se proceder ao estudo da precisão no mesmo dia.

Para a precisão intradia foram fortificadas amostras de fluido oral com os analitos em estudo. Para a BZP e MeOPP foram utilizadas 3 níveis de concentração: 5, 10 e 60 ng/mL. No caso do mCPP foram utilizados 4 níveis de concentração: 1, 5, 10 e 60 ng/mL e para TFMPP foram

utilizados 5: 0,1; 1;5; 10 e 60 ng/mL. Para cada uma destas concentrações foram realizadas 6 réplicas (n=6).

Nas tabelas 18 e 19 apresentam-se os resultados relativos às precisões inter- e intradia respectivamente.

Tabela 18) Precisão interdia e exatidão (n=5)

Composto	Concentração teórica (ng/mL)	Concentração calculada (média ng/mL \pm SD)	CV (%)	BIAS (%)
BZP	7,5	7,50 \pm 0,46	6,16	0,03
	15	14,41 \pm 0,29	1,98	-3,91
	50	50,39 \pm 3,44	6,82	0,79
MeOPP	7,5	7,72 \pm 0,41	5,26	2,89
	15	15,79 \pm 0,50	3,15	5,27
	50	49,72 \pm 2,69	5,41	-0,57
mCPP	2,5	2,61 \pm 0,27	10,37	4,34
	7,5	7,23 \pm 0,40	5,63	-3,56
	15	14,69 \pm 0,65	4,41	-2,07
	50	47,73 \pm 2,83	5,92	-4,55
TFMPP	0,03	0,03 \pm 0,01	6,08	-2,21
	0,5	0,51 \pm 0,04	7,68	1,26
	2,5	2,50 \pm 0,21	8,40	-0,12
	7,5	7,09 \pm 0,60	8,47	-5,49
	15	14,64 \pm 1,27	8,66	-2,42
	50	46,36 \pm 2,99	6,44	-7,28

Tabela 19) Precisão intradia e exatidão (n=6).

Composto	Concentração teórica (ng/mL)	Concentração calculada (média ng/mL \pm SD)	CV (%)	BIAS (%)
BZP	5	5,03 \pm 0,43	8,56	0,63
	10	9,85 \pm 0,85	8,58	-1,51
	80	82,25 \pm 6,73	8,19	2,82
MeOPP	5	4,98 \pm 0,25	5,11	-0,45
	10	9,99 \pm 0,78	7,81	-0,13
	80	83,61 \pm 4,44	5,31	4,52
mCPP	1	1,09 \pm 0,04	3,98	10,93
	5	5,17 \pm 0,30	5,71	3,43
	10	8,99 \pm 0,72	8,04	-10,06
	80	82,84 \pm 4,33	5,22	3,55

	0,01	0,01±9,67e-3	10,68	-3,26
	1	1,08±0,08	7,40	8,35
TFMPP	5	4,99±0,39	7,77	-0,14
	10	9,55±0,63	6,54	-4,47
	80	81,45±4,56	5,59	1,81

Pela análise das tabelas 18 e 19 pode-se afirmar que as precisões inter- e intradia bem como a exatidão se encontram em conformidade com os critérios de validação seguidos, pois mantiveram-se abaixo dos valores de referência para CV (inferior a 20% no LLOQ e 15% nos restantes calibradores) e para o BIAS ($\pm 20\%$ no LLOQ e $\pm 15\%$ nos restantes calibradores) (FDA e ICH).

7.5 Estabilidade

A estabilidade de um determinado analito numa matriz biológica é função das condições de armazenamento e propriedades físicas e químicas da matriz. Assim, são avaliados todos os procedimentos de estabilidade dos analitos durante a colheita e manuseamento. Deve ter-se em consideração possíveis situações que possam ser encontradas durante a manipulação da amostra real e da análise. Para isso, deve avaliar-se a estabilidade em amostras processadas, estabilidade de congelação/descongelação e estabilidade de curta duração (FDA e ICH).

7.5.1. Estabilidade em amostras processadas

A estabilidade de amostras processadas deve ser calculada para o tamanho do lote em função do tempo esperado para validação (FDA e ICH).

Este parâmetro foi estudado em triplicado ($n=3$). Os extratos foram mantidos no injetor automático durante um período de 24 horas e foram reinjetados. Após análise, os resultados foram comparados com os obtidos por análise de amostras preparadas e analisadas no mesmo dia.

i. MXE

A estabilidade em amostras processadas foi avaliada através da análise de amostras que foram previamente fortificadas a 3 níveis de concentração 30, 250 e 500 ng/mL. Os resultados apresentam-se na tabela 20.

Tabela 20) Estabilidade da MXE em amostras processadas.

Composto	Concentração teórica (ng/mL)	Concentração calculada (média ng/mL \pm SD)	CV (%)	BIAS (%)
MXE	30	27,25 \pm 0,81	2,97	-9,18
	250	258,16 \pm 19,59	7,59	3,26
	500	545,54 \pm 21,97	4,03	9,11

Pela análise da tabela 20, pode concluir-se que a MXE é estável durante pelo menos 24 horas após extração, dado que os CV e o BIAS estão dentro dos limites estabelecidos (CV<15% e BIAS \pm 15 %).

ii. Piperazinas

A estabilidade em amostras processadas, foi avaliada através da análise de amostras que foram previamente fortificadas a 7,5; 15 e 50 ng/mL para BZP e MeOPP, a 2,5; 7,5; 15 e 50 ng/mL para a mCPP e 0,03; 0,5; 2,5; 7,5; 15 e 50 ng/mL para a TFMPP. Os resultados apresentam-se na tabela 21.

Tabela 21) Estabilidade das piperazinas em amostras processadas.

Composto	Concentração teórica (ng/mL)	Concentração calculada (média ng/mL \pm SD)	CV (%)	BIAS (%)
BZP	7,5	7,88 \pm 0,39	4,95	-5,12
	15	14,25 \pm 1,68	11,81	-5,04
	50	48,11 \pm 1,08	2,25	-3,78
MeOPP	7,5	7,02 \pm 0,50	7,16	-6,41
	15	14,26 \pm 1,73	12,12	-4,94
	50	54,51 \pm 1,56	2,85	9,03
mCPP	2,5	2,26 \pm 0,01	0,55	-9,44
	7,5	6,70 \pm 0,60	8,78	-10,65
	15	13,58 \pm 0,69	5,11	-9,49
	50	43,77 \pm 1,29	2,95	-12,45

TFMPP	0,03	0,03±0,01	13,87	-3,96
	0,5	0,45±0,02	5,11	-9,54
	2,5	2,38±0,21	8,90	-4,87
	7,5	7,78±0,70	8,96	3,73
	15	15,53±0,93	6,00	3,57
	50	49,37±4,17	8,45	-1,27

Tendo em consideração os resultados obtidos (tabela 21) pode concluir-se que os analitos são estáveis após 24 horas após extração dado que, os CV e o BIAS estão dentro dos limites estabelecidos (CV<15% e BIAS ±15 %).

7.5.2 Estabilidade congelação/descongelação

A estabilidade de congelação/descongelação é avaliada através da análise de amostras que são previamente fortificadas seguidos de 3 ciclos de congelação/descongelação. As amostras são congeladas durante 24 horas, tempo ao qual se procede ao seu descongelamento, repetindo-se este ciclo mais duas vezes. Procede-se à adição do padrão interno bem como da extração das amostras. O resultado desta extração foi comparado com os obtidos em amostras preparadas e analisadas no mesmo dia, em termos de CV e BIAS (FDA e ICH).

Cada um dos ensaios foi realizado em triplicado (n=3).

i) MXE

A estabilidade de congelação/descongelação foi avaliada através da análise de amostras que foram previamente fortificadas a 3 níveis de concentração 30, 250 e 500 ng/mL. O ensaio foi realizado em triplicado (n=3). Os resultados apresentam-se na tabela 22.

Tabela 22) Ciclos de congelação/descongelação da MXE.

Composto	Concentração teórica (ng/mL)	Concentração calculada (média ng/mL ± SD)	CV (%)	BIAS (%)
MXE	30	28,09±1,34	4,76	-6,38
	250	230,00±6,95	3,02	-8,00
	500	507,56±42,46	8,34	1,51

Pela análise da tabela, verifica-se que a MXE é estável quando se procede ao seu congelamento/descongelamento, dado que o CV e o BIAS estão dentro dos limites estipulados (CV<15% e BIAS ±15 %).

ii) Piperazinas

A estabilidade de congelação/descongelação foi avaliada através da análise de amostras que foram previamente fortificadas a 7,5; 15 e 50 ng/mL para BZP e MeOPP, a 2,5; 7,5; 15 e 50 ng/mL para a mCPP e 0,03; 0,5; 2,5; 7,5; 15 e 50 ng/mL para a TFMPP. Os resultados apresentam-se na tabela 23.

Tabela 23) Ciclos de congelação/descongelação das piperazinas.

Composto	Concentração teórica (ng/mL)	Concentração calculada (média ng/mL \pm SD)	CV (%)	BIAS (%)
BZP	7,5	7,12 \pm 0,33	4,64	-5,12
	15	14,45 \pm 1,33	9,23	-3,67
	50	45,16 \pm 2,55	5,64	-6,85
MeOPP	7,5	6,67 \pm 0,26	3,93	-11,03
	15	15,60 \pm 0,49	3,11	4,00
	50	48,71 \pm 1,50	3,04	-2,59
mCPP	2,5	2,61 \pm 0,27	10,18	4,43
	7,5	6,58 \pm 0,26	3,98	-12,25
	15	13,14 \pm 0,69	5,23	-12,40
	50	43,45 \pm 0,99	2,27	-13,11
TFMPP	0,03	0,03 \pm 0,02	6,07	10,03
	0,5	0,46 \pm 0,03	5,40	-8,55
	2,5	2,72 \pm 0,24	8,90	8,88
	7,5	7,75 \pm 0,18	2,35	3,28
	15	14,44 \pm 1,70	11,79	-3,71
	50	45,38 \pm 2,72	6,00	-9,25

Pela análise da tabela 23, verifica-se que os compostos são estáveis quando se procede ao seu congelamento/descongelamento, dado que o CV e o BIAS estão dentro dos limites estipulados (CV<15% e BIAS \pm 15 %).

7.5.3 Estabilidade de curta duração

A estabilidade de curta duração foi avaliada através da análise de amostras que foram previamente fortificadas e deixadas durante 24 horas à temperatura ambiente protegidas da luz. Posteriormente as amostras foram extraídas e analisadas. O resultado desta extração foi comparado com os obtidos em amostras preparadas e analisadas no mesmo dia, em termos de CV e BIAS (FDA e ICH).

i) MXE

A estabilidade de curta duração foi avaliada através da análise de amostras que foram previamente fortificadas a 3 níveis de concentração, 30, 250 e 500 ng/mL. O ensaio foi realizado em triplicado (n=3). O resultado desta extração foi comparado com os obtidos em amostras preparadas e analisadas no mesmo dia, em termos de CV e BIAS (FDA e ICH).

Os resultados obtidos encontram-se na tabela 24, onde se pode constatar que os CV estão abaixo dos 15% e o BIAS no intervalo de $\pm 15\%$, pelo que se pode afirmar que este composto é estável à temperatura ambiente.

Tabela 24) Estabilidade de curta duração da MXE.

Composto	Concentração teórica (ng/mL)	Concentração calculada (média ng/mL \pm SD)	CV (%)	BIAS (%)
MXE	30	28,26 \pm 1,20	4,25	-5,81
	250	266,47 \pm 8,95	3,36	6,59
	500	543,82 \pm 20,11	3,70	8,76

ii) Piperazinas

A estabilidade de curta duração foi avaliada através da análise de amostras que foram previamente fortificadas a 7,5; 15 e 50 ng/mL para BZP e MeOPP, 2,5; 7,5; 15 e 50 ng/mL para a mCPP e 0,03; 0,5; 2,5; 7,5; 15 e 50 ng/mL para a TFMPP.

Foi realizado um ensaio em triplicado (n=3). Os resultados obtidos encontram-se na tabela 25, onde se pode constatar que os CV estão abaixo dos 15% e o BIAS $\pm 15\%$, exceto para a concentração 0,03 ng/mL para o TFMPP, pelo que se pode afirmar que este composto não é estável a baixas concentrações à temperatura ambiente.

Tabela 25) Estabilidade de curta duração das piperazinas.

Composto	Concentração teórica (ng/mL)	Concentração calculada (média ng/mL ± SD)	CV (%)	BIAS (%)
BZP	7,5	7,30±0,69	9,48	-2,73
	15	14,35±1,34	9,31	-4,31
	50	52,98±3,15	5,94	5,97
MeOPP	7,5	7,93±0,96	12,08	5,69
	15	16,41±1,27	7,75	9,42
	50	51,52±8,01	15,56	3,04
mCPP	2,5	2,79±0,08	2,68	11,45
	7,5	7,27±0,85	11,65	-3,06
	15	15,41±1,41	9,62	2,74
	50	54,03±3,73	6,90	8,06
TFMPP	0,03	0,04±0,01	26,88	44,09
	0,5	0,48±0,06	12,36	-3,99
	2,5	2,70±0,29	7,28	7,87
	7,5	7,47±0,70	9,36	-0,36
	15	16,31±0,53	3,26	8,71
	50	52,62±2,34	4,45	5,24

7.6 Recuperação

A recuperação de um analito define-se como a resposta do detetor a uma determinada quantidade de analito sujeito a um processo de extração com a resposta obtida pelo mesmo analito sem passar pelo processo extrativo (equação 4). Deste modo pode-se afirmar que a recuperação refere a eficácia da extração de um método analítico (FDA).

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

A recuperação ideal deveria ser o mais próximo possível de 100%, contudo pode ser mais baixa desde que o método seja reprodutível, preciso e consistente (FDA e ICH).

i. MXE

Para o cálculo da recuperação a x %, as amostras foram fortificadas às concentrações de 30, 250 e 500 ng/mL. Em seguida, as amostras passaram pelo processo extrativo, seguida da adição do padrão interno. Os ensaios foram realizados em triplicado (n=3). Estes resultados foram comparados com o cálculo da recuperação a 100 %, onde as amostras de fluido oral foram extraídas sem prévia fortificação. Os compostos e o padrão interno foram adicionados no final da extração. As concentrações às quais se fortificou foram as mesmas utilizadas no cálculo da recuperação a x %. Os ensaios foram, igualmente realizados em triplicado (n=3).

Os resultados encontram-se na tabela 26.

Tabela 26) Recuperação (%) da MXE a 3 níveis de concentração (30, 250 e 500 ng/mL).

Concentração (ng/mL)	Recuperação (média % ± SD)
	MXE
30	31,0±1,7
250	27,7±1,0
500	23,9±1,4

Pela análise da tabela 26, verifica-se que a apesar da MXE não apresenta recuperações muito elevadas, contudo apresenta resultados concisos dentro do que é esperado tendo em consideração o processo extrativo em MEPS e o reduzido volume de amostra (250 µL).

Não foi possível comparar o método desenvolvido no presente trabalho com outros existentes na literatura, uma vez que até a data não se encontra descrito nenhum método que permita o doseamento de MXE em amostras de fluido oral com recurso a MEPS.

ii. Piperazinas

Para o cálculo da recuperação a x %, as amostras foram fortificadas às concentrações de 0,5; 7,5; 15 e 50 ng/mL. Em seguida, as amostras passaram pelo processo extrativo, seguida da adição do padrão interno. Os ensaios foram realizados em triplicado (n=3). Estes resultados foram comparados com o cálculo da recuperação a 100 %, onde as amostras de fluido oral foram extraídas sem prévia fortificação. Os compostos e o padrão interno foram adicionados no final da extração. As concentrações às quais se fortificou foram as mesmas utilizadas no cálculo da recuperação a x %. Os ensaios foram, igualmente realizados em triplicado (n=3).

Os resultados encontram-se na tabela 27.

Tabela 27) Recuperação (%) das piperazinas, calculada a 3 níveis de concentração para BZP, MeOPP, mCPP e a 4 níveis de concentração para TFMPP.

Concentração (ng/mL)	Recuperação (média % ± SD)			
	BZP	MeOPP	mCPP	TFMPP
0,5				21,8±1,2
7,5	61,4±3,6	49,6±2,9	33,4±2,8	28,1±3,9
15	59,6±3,7	34,2±2,7	26,4±1,2	25,1±0,6
50	54,1±1,6	39,8±2,7	28,8±1,1	28,5±0,6

Pela análise da tabela 27, verifica-se que a maioria dos compostos apresenta recuperações muito aquém dos 100 % mesmo após otimização do procedimento de extração com recurso a análise estatística DOE. Contudo, os valores de LLOQ e LOD, apresentam resultados precisos, consistentes e reprodutíveis.

Para além disso, os resultados apresentam-se dentro do que é esperado tendo em consideração o processo de extração em MEPS.

Não foi possível comparar o método desenvolvido no presente trabalho com outros existentes na literatura, uma vez que até a data não se encontra descrito nenhum método que permita o doseamento de piperazinas em amostras de fluido oral com recurso a MEPS.

7.7. Arrastamento (*carry-over*)

O fenómeno de arrastamento ou *carry-over* também foi avaliado. Como tal, depois da extração do calibrador mais alto para cada um dos compostos em estudo e após a reutilização da coluna, fez-se passar o solvente de eluição. Deste modo, foi averiguado se o analito ficou ou não retido no adsorvente de MEPS, evidenciando assim a exequibilidade do processo de reutilização do dispositivo. Através do cromatograma das Figuras 23 e 24, por comparação com os cromatogramas das figuras 21 e 22 , verifica-se que não existe efeito *carry-over*.

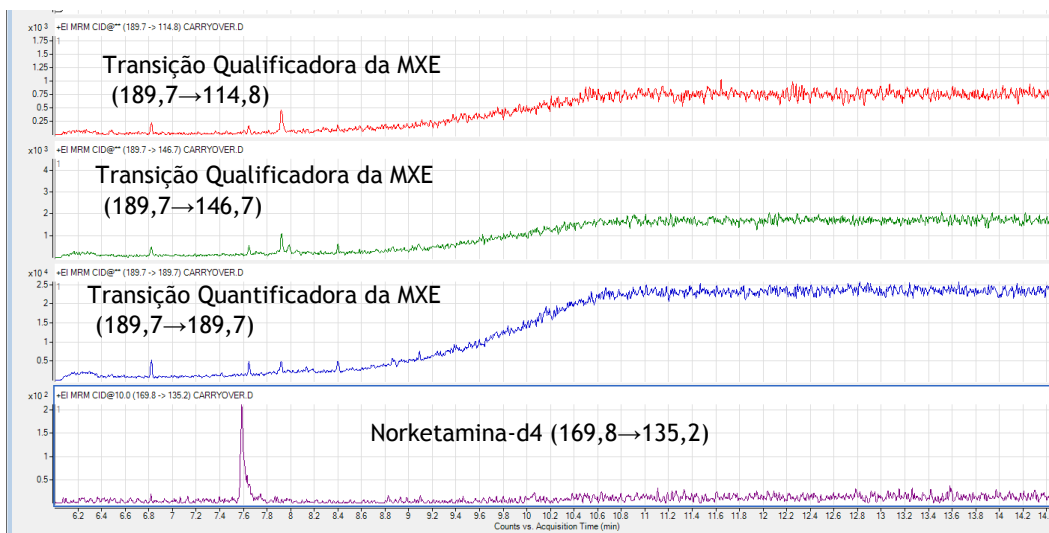


Figura 23) Cromatograma de *carry-over* para MXE.

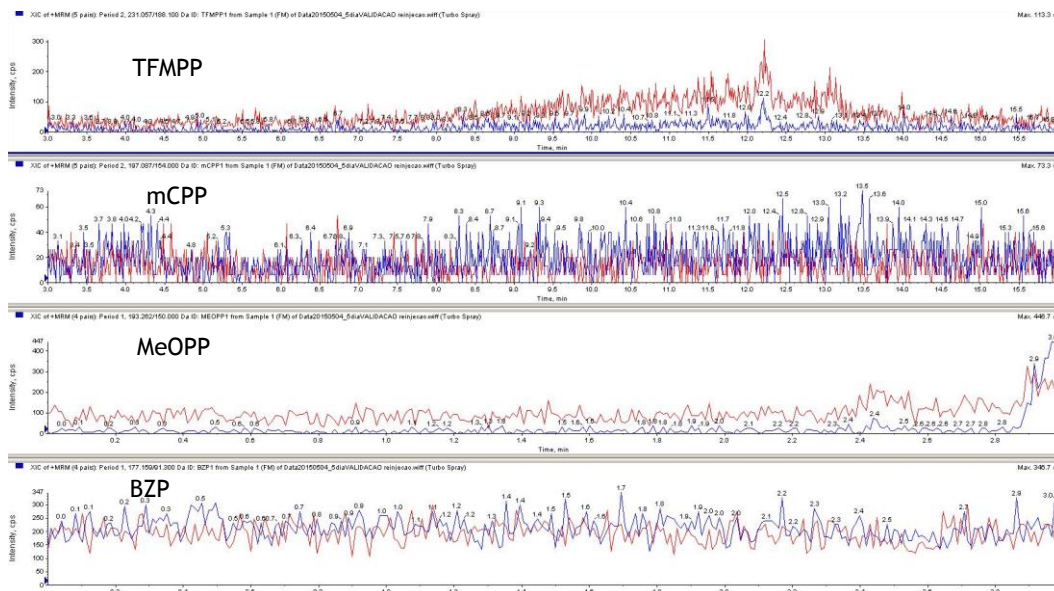


Figura 24) Cromatograma de *carry-over* para as Piperazinas.
(estão representadas as transições qualitativa e quantificadora)

7.8. Supressão Iónica (efeito matriz)

A supressão iónica é uma forma de avaliar o efeito de matriz pelo que é considerado um dos parâmetros primordiais a avaliar num método analítico que recorra a LC-MS/MS. Este parâmetro avalia a eficiência de ionização dos analitos que pode ser alterada por compostos que co-eluem com o analito a analisar, podendo reduzir ou aumentar o sinal do mesmo. Deste modo a deteção e a precisão são afetadas, e resultados de falsos positivos ou negativos são tidos em consideração. Este efeito, quando presente, deve ser preferencialmente eliminado ou reduzido significativamente, caso contrário deve ser ponderado nos cálculos finais (Kruve A., *et al.*, 2015).

As abordagens sugeridas para a eliminação da supressão iónica podem envolver modificações a nível cromatográfico ou instrumentais (Kruve A., *et al.*, 2015).

O efeito matriz foi avaliado segundo o processo descrito por Matuszewski *et al.*, 2003. Para isso foram assim estabelecidos dois sets:

SET A: Foi realizada uma extração (n=6) com a matriz biológica, onde após extração, o solvente de eluição foi fortificado com os compostos de estudo e o padrão interno.

SET B: Apenas se colocou o mesmo volume de fase móvel (250 µL), e se procedeu a fortificação deste solvente com os analitos de estudo e padrão interno (n=6).

O efeito de matriz é portanto o rácio entre as áreas absolutas do Set A com o Set B. Este estudo foi realizado para 7,5 ng/mL.

Tabela 28) Resultados relativos ao efeito matriz (n=6)

Concentração (ng/mL)	Efeito matriz (%)			
	BZP	MeOPP	mCPP	TFMPP
7,5	111,0	80,6	80,1	99,3

Pela análise da tabela 28, verifica-se que os compostos em estudo não apresentam efeito matriz dado que os rácios são próximos aos 100%. Estes valores indiciam que a resposta dos compostos em fase móvel e na matriz biológica é semelhante. Assim pode-se garantir que a eficiência de ionização dos analitos não é alterada e que é garantida a precisão no decorrer das extrações, assegurando deste modo a integridade de todo o processo, levando à obtenção de resultados fiáveis.

8. Aplicação do método a amostras reais

A aplicação do método a amostras reais é fundamental qual processo de validação dado que se pode detetar e quantificar os analitos de interesse, idealmente proveniente de indivíduos que consumam este tipo de substâncias. No entanto, não foi possível verificar-se esta situação para a MXE, já que não foi possível obter uma amostra de um individuo consumidor deste composto. Esta situação é normal uma vez que os casos de intoxicação de MXE passam usualmente despercebidos nos serviços de urgência dos hospitais sendo tratados como casos de intoxicação alcoólica, já que é frequente por parte dos utilizadores destas drogas o policonsumo com bebidas alcoólicas. No caso das piperazinas, também não foi possível detetar estes compostos em amostras de indivíduos consumidores de drogas, no entanto, recorreu-se ao Departamento de Psiquiatria e Saúde Mental do Centro Hospital Cova da Beira, E.P.E. onde se recolheu uma amostra de fluido oral de um individuo com tratamento com trazodona. Este antidepressivo heterocíclico, metaboliza-se a nível hepático originando como principal metabolito (ativo) o mCPP.

A amostra foi quantificada de acordo com o método anteriormente descrito. Na figura 25, apresenta-se o cromatograma da referida amostra sendo que a concentração de mCPP foi de 31,52 ng/mL.

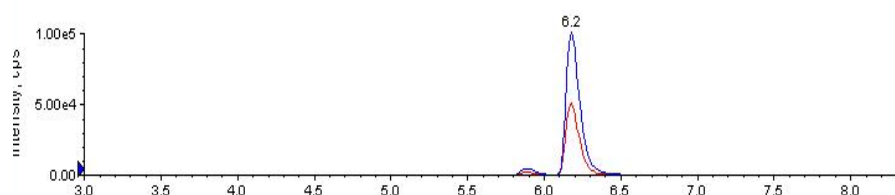


Figura 25) Cromatograma da amostra real (concentração de mCPP de 31,52 ng/mL).

Conclusão

Com a realização deste trabalho foi desenvolvido um método analítico específico, em amostras de saliva, para a determinação de MXE e piperazinas nomeadamente a 1-benzilpiperazina (BZP), 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina (TFMPP), 1-3 clorofenilpiperazina (mCPP) e 1-4 metoxifenilpiperazina (MeOPP).

A microextração em seringa empacotada (MEPS) permitiu atingir recuperações de 27% para MXE, 60% para BZP, 40% para MeOPP, 30% mCPP e 26% para TFMPP. Apesar dos resultados não serem elevados apresentam-se consistentes e reprodutíveis, tendo em conta o volume de amostra utilizado (250 μ L). Conclui-se que esta técnica se apresenta como uma boa alternativa em relação a SPE, pois é uma técnica de fácil e rápida execução, que recorre a um baixo volume de solventes e de amostra e que acima de tudo permite a reutilização do dispositivo economizando assim recursos.

A análise foi conseguida por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS/MS) para a MXE e por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS/MS) para os compostos piperazínicos. Ambas as técnicas permitiram a deteção e quantificação dos analitos em estudo, sendo que em modo MRM, se conseguiu um aumento de seletividade, obtendo-se limites de quantificação (LLOQ) na ordem dos 10 ng/mL para a MXE, de 0,01 ng/mL para TFMPP, 5 ng/mL para MeOPP e BZP e de 1 ng/mL para mCPP. Quanto aos limites de deteção (LOD) foram definidos os mesmos que os LLOQ para os compostos piperazínicos e de 1ng/mL para a MXE.

Todos os parâmetros a nível cromatográfico e extrativo foram criteriosamente otimizados de forma, a obter o máximo de recuperação para cada analito.

A metodologia revelou ser seletiva, precisa, linear e exata para os compostos em estudo dado que se cumpriram todos os parâmetros das *guidelines* de validação de métodos bioanalíticos (FDA e ICH). O procedimento foi linear, para o intervalo de concentrações de 10 até 600 ng/mL para a MXE; 0,01 a 80 ng/mL para TFMPP, 5 a 80 ng/mL para MeOPP e BZP e de 1 a 80 ng/mL para mCPP. Todos os coeficientes de determinação (R^2) foram superiores a 0,99. As precisões intra- e interdia e a exatidão estavam dentro dos valores definidos pelas *guidelines* (CV <20% e BIAS \pm 20% no LLOQ e CV <15% e BIAS \pm 15% para os restantes calibradores).

Conclui-se, que a metodologia proposta é inovadora, no que se refere a técnica de extração e à matriz selecionada para a execução do trabalho. Assim, a mesma está apta a ser aplicada na rotina laboratorial quer na deteção como na quantificação dos analitos de estudo, o que aconteceu no caso das piperazinas dado que a foi analisada uma amostra real.

Referências Bibliográficas

Abdel-Rehim M., (2004) “New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications. Part I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography - mass spectrometry” *Journal of Chromatography B* 801:317-321

Abdel-Rehim M., (2011) “Microextraction by packed sorbent (MEPS): A tutorial” *Analytica Chimica Acta* 701:119-128

Abdel-Rehim A., Abdel-Rehim M., (2014) “Dried saliva spot as a sampling technique for saliva samples” *Biomedical Chromatography* 28:875-877

Abe E., Ricard F., Darrouzain F., Alvarez J. C., (2013) “An automated method for measurement of metoxetamina in human plasma by use of turbulent flow on-line extraction coupled with liquid chromatography and mass spectrometric detection” *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405:239-245

Adamowicz P., e Zuba D., (2015) “Fatal Intoxication with Metoxetamina” *Journal of Forensic Sciences* 60:S1

Almoharib H.S., Almubarak A., Alrowis R., Geevarghese A., Preethanath R. S., Anil S., (2014) “Oral Fluid Based Biomarkers in Periodontal Disease: Part 1. Saliva” *Journal of International Oral Health* 6:95-103

Altun Z., Abdel-Rehim M., Blomberg L.G., (2004) “New trends in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe (MEPS) for LC and GC applications. Part III: Determination and validation of local anaesthetics in human plasma samples using a cation-exchange sorbent, and MEPS-LC-MS-MS” *Journal of Chromatography B* 813:129-135

Arbo M.D., Bastos M.L., Carmo H.F., (2012) “Piperazine compounds a drugs of abuse” *Drug and Alcohol Dependence* 122:174-185

Arbo M.D., Silva R., Barbosa D.J., Silva D., Silva S.P., Teixeira J.P., Bastos M.L., Carmo H., (2015) “In vitro neurotoxicity evaluation of piperazine designer drugs in differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cells” *Journal of Applied Toxicology* DOI 10.1002/jat.3153

Armenta S., Garrigues S., Guardia M., Brassier J., Alcalà M., Blanco M., Perez-Alfonso C., Galipieso N., (2014) “Detection and characterization of emerging psychoactive substances by ion mobility spectrometry” *Drug Testing and Analysis* (DOI: 10.1002/dta.1678)

Bassindale T.A., Berezowski R., (2011) “Quantitative analysis of hair samples for 1-benzylpiperazine (BZP) using high-performance liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry (LC-MS/MS) detection” *Analytical Bioanalytical Chemistry* 401:2013-2017

Bell C., George C., Kicman A.T., Traynor A., (2011) “Development of a rapid LC-MS/MS method for direct urinalysis of designer drugs” *Drug Testing and Analysis* 3:496:504

Bulcão R., Garcia S.C., Limberger R.P., Baierle M., (2012) “*Designer Drugs: Aspectos Biológicos e Analíticos*” *Química Nova* 35: 149-158

Castro A., Lendoiro E., Fernández-Vega H., Steinmeyer S., López-Rivadulla M., Cruz A., (2014) “Liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of selected synthetic cathinones and two piperazines in oral fluid. Cross reactivity study with an on-site immunoassay device” *Journal of Chromatography A* 1374:93-101

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

Desgrouas C., Desbordes M., Dormoi J., Ollivier E., Parzy D., Taudon N., (2014) “Quantitative Analysis of Cepharranthine in plasma based on semiautomatic microextraction by packed sorbent combined with liquid chromatography” *Journal of Analytical Methods in Chemistry*

Du W., Zhao G., Fu Q., Sun M., Zhou H., Chang C., (2014) “Combined microextraction by packed sorbent and high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection for rapid analysis of ractopamine in porcine muscle and urine samples” *Food Chemistry* 145:789-795

Elian A.A., Hackett J., (2014) “A Polydrug Intoxication Involving Methoxetamine in a Drugs and Driving Case” *Journal of Forensic Sciences* 59:854-858

Elie M.P., Elie L.E., Baron M.G., (2012) “Keeping pace with NPS releases: fast GC-MS screening of legal high products” *Drug Testing and Analysis* DOI 10.1002/dta.1434

EMCDDA & EUROPOL (2011) - *EU Drug Markets Report. A strategic analysis*, Luxemburgo: Publications Office of the European Union disponível online em: disponível online em: <http://www.emcdda.europa.eu/publications/implementation-reports/2011> (consultado a 20 de novembro de 2014)

EMCDDA & EUROPOL (2014) Report on the risk assessment of 2-(3-methoxyphenyl)-2-(ethylamino)cyclohexanone (methoxetamine) in the framework of the Council Decision on new psychoactive substances disponível online em:

<http://www.emcdda.europa.eu/publications/risk-assessment/metoxetamina> (consultado a 20 de novembro de 2014)

Escada M.S.C.S., “Métodos de análises de piperazinas em fluidos biológicos” (2007) *in* Tese Mestrado, Universidade de Aveiro

Farajzaden M.A., Nouri N., Khorram P., (2014) “Derivatization and microextraction methods for determination of organic compounds by gas chromatography” *Trends in Analytical Chemistry* 55:14-23

Figueirinha, D.C., “Deteção de opiáceos em sangue post-mortem por cromatografia líquida de alta eficiência com deteção eletroquímica usando microextração em seringa empacotada” (2014) *in* Tese de Mestrado, Universidade da Beira Interior

Gallardo E., Barroso M., Queiroz J.A., (2009) “Current technologies and considerations for drug bioanalysis in oral fluid” *Bioanalysis*, 1:637-667

Gee P., Schep L., (2013) “1-Benzylpiperazine and other Piperazine-based Derivatives” *Novel Psychoactives substances* 8:179-209

Guerra F.A., “Determinação da ketamine e piperazinas por cromatografia gasosa - Espectrometria de massa em tandem em amostras de plasma” (2013) *in* Tese de Mestrado, Universidade da Beira Interior

Guidance for Industry-bioanalytical method validation., U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM) (2001), Disponível online em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf> (consultado a 02/03/2015).

Hout M.C.V.H., Hearne E., (2015) “Word of Mouse”: Indigenous Harm Reduction and Online Consumerism of the Synthetic Compound Methoxphenidine” *Journal of Psychoactive Drugs* 47:1 30-41 DOI: 10.1080/02791072.2014.974002

Imbert L., Boucher A., Delhome G., Cueto T., Boudinaud M., Maublanc J., Dulaurent S., Descotes J., Lachâtre G., Gaulie J.M., (2014) “Analytical Findings of an Acute Intoxication after Inhalation of Methoxetamine” *Journal of Analytical Toxicology Advance* 1:6

Iwai M., Ogawa T., Hahori H., Zaitso K., Ishii A., Suzuki O., Seno H., (2013) “Simple and rapid assay method for simultaneous quantification of urinary nicotine and cotinine using micro-extraction by packed sorbent and gas chromatography-mass spectrometry” *Nagoya Journal of Medical Science* 75:255-261

Johnstone A.C., Lea R.A., Brennan K.A., Schenk S., Kennedy M.A., Fitzmaurice P.S., (2007) “Benzylpiperazine a drug of abuse?” *Journal of Psychopharmacology* 1-7

King L., e Kicman A., (2011) “A Brief History of «New Psychoactive Substances»” *Drug Testing and Analysis* 3:7-8

Kruve A., Rebane R., Kipper K., Oldekop M.L., Evard H., Herodes K., Ravio P., Leito I., (2015) “Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: Part I” *Analytica Chimica Acta* 870: 29-44

Larano R., Costa J.L., Zanolli L.A., Cazenave S.O.S., (2010) “Identificação química da clorofenilpiperazina (cpp) em comprimidos apreendidos” *Química Nova* 33:725-729

Matuszewski B.K., Constanzer M.L., Chavez M., (2003) “Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS” *ANALYTICAL Chemistry* 75:3019-3030

Monteiro M.S., Bastos M.L., Pinho P.G., Carvalho, M., (2013) “Update on 1-benzylpiperazine (BZP) party pills” *Archives of Toxicology* 87:929-947

Montesano C., Simeoni M. C., Curini R., Srgi M., Losterzo C., Compagnone D., (2015) “Screening and Quantification of illicit drugs and metabolites in oral fluid by microextraction on packed sorbent coupled with LC-MS/MS” *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407: 3647-3658

Moreno I.E.D., Fonseca B.M., Magalhães A.R., Geraldés V.S., Queiroz J.A., Barroso M., Costa S., Gallardo E., (2012a) “Rapid determination of piperazine-type stimulants in human urine by microextraction in packed sorbent after method optimization using a multivariate approach” *Journal of Chromatography A* 1222:116- 120

Moreno I.E.D., Fonseca B.M., Barroso M., Costa S., Queiroz J.A., Gallardo E., (2012b) “Determination of piperazine-type stimulants in human urine by means of microextraction in packed sorbent and high performance liquid chromatography-diode array detection” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 61:93-99

Moreno I., Fonseca B., Oppolzer D., Martinho A., Barroso M., Cruz A., Queiroz J.A., Gallardo E., (2013) “Analysis of Salvinorin A in urine using microextraction in packed syringe and GC-MS/MS” *Bioanalysis* 5:661-668.

Mustata C., Torrens M., Pardo R., Pérez C., Farré M., (2009) “Spice drugs: cannabinoids as a new designer drugs” *Adicciones* 21:181-186

Neves H.J.C., Freitas A.M.C., (1996) "Introdução à Cromatografia Gás-Líquido de Alta Resolução" *Dias de Sousa* ISBN 972-96790-0-2

Nováková L., e Vičková H., (2009) "A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation" *Analytica Chimica Acta* 656:8-35

OEDT (Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência). Relatório Anual sobre a Evolução do Fenómeno da Droga na União Europeia-2014, disponível <http://www.emcdda.europa.eu/publications/2015/new-psychoactive-substances> (consultado a 10 outubro de 2014)

Pereira J., Câmara J. S., ColmsjÖc A., Rehim A., (2014) "Microextraction by packed sorbent: an emerging, selective and high-throughput extraction technique in bioanalysis" *Biomedical Chromatography* 28: 839-847

Procuradoria-Geral Distrital de Lisboa Ministério Público, disponível em: http://www.pgdlisboa.pt/pgdl/leis/lei_mostra_articulado.php?nid=1099&tabela=leis&ficha=1&pagina=1 (consultado 10 janeiro de 2015)

Quintela O., Cruz A., Concheiro M., Castro A., López-Rivadulla M., (2005) "Metodología LC-MS. Aspectos generales de la técnica y sus aplicaciones en el campo de la toxicología" *Toxicology* 22: 7-14

Redondo A. H., Schroeck A., Kneubuehl B., Weinmann W., (2013) "Determination of ethyl glucuronide and ethyl sulfate from dried blood spots" *International Journal of Legal Medicine* 127:769-775

Rosenbaum C. D., Carreiro S.P., Babu K.M., (2012) "Here Today, Gone Tomorrow...and Back Again? A Review of Herbal Marijuana Alternatives (K2, Spice), Synthetic Cathinones (Bath Salts), Kratom, Salvia divinorum, Methoxetamine, and Piperazines" *Journal of Medical Toxicology* 8:15-32

Safar A.Y., Stephanson N.N., Beck O., (2013) "Multicomponent LC-MS/MS screening method for detection of new psychoactive drugs, legal highs, in urine- Experience from Swedish population" *Journal of Chromatography B* 930:112-120

Santos C.L., "Determinação de pesticidas organofosforados em amostras biológicas por microextração em seringa empacotada e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa em tandem (MEPS-GC-MS/MS)" (2014) in Tese de Mestrado, Universidade da Beira Interior

Saracino M.A., Lacono C., Somaini L., Gerra G., Ghedini N., Raggi M.A., (2014) “Multi-matrix assay of cortisol, cortisone and corticosterone using a combined MEPS-HPLC procedure” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 88:643-648

Sergi M., Montesano C., Odoardi S., Rocca L.M., Fabrizi G., Compagnone D., Curini R., (2013) “Microextraction by packed sorbent coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry for the rapid and sensitive determination of cannabinoids in oral fluids” *Journal of Chromatography A* 12301:139-146

Simpson N.J.K., (2000) “Solid-phase extraction: principles, techniques, and applications” N. J. K. Simpson. Harbor City, California, Marcel Dekker

Smith C., Roberts S., (2014) “‘Designer drugs’: update on the management of novel psychoactive substance misuse in the acute care setting” *Clinical Medicine* 14: 409-415

Staack R. F., Maurer H. H., “Toxicological detection of the new designer drug 1-(4-methoxyphenyl)piperazine and its metabolites in urine and differentiation from an intake of structurally related medicaments using gas chromatography-mass spectrometry” *Journal of Chromatography B* 798:333-342

United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). The challenge of new psychoactive substances, 2014a. Documento online, disponível em: https://www.unodc.org/documents/scientific/NPS_leaflet_2014_EN.pdf (Consultado a 2 de junho de 2015)

United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). The challenge of new psychoactive substances, 2014b. Documento online, disponível em: http://www.unodc.org/documents/wdr2014/ATS_NPS_2014_web.pdf (Consultado a 2 de junho de 2015)

Vale A., (2012) “Drugs of abuse (amfetamines, BZP, cannabis, cocaine, GHB, LSD)” *Medicine* 40: 84-87

Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)., International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (2005), disponível online em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf (consultado a 2/03/2015)

World Anti-doping Agency (WADA). Identification Criteria for Qualitative Assays Incorporating Column Chromatography and Mass Spectrometry, disponível online em: Disponível em: http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-

Laboratories/Technical_Documents/WADA_TD2010IDCRv1.0_Identification Criteria for Qualitative Assays_May 08 2010_EN.doc.pdf. (consultado a 2/03/2015)

Wada M., Yamahara K., Ikeda R., Kikura-Hanajiri R., Kuroda N., Nakashima K., (2011) "Simultaneous determination of N-benzylpiperazine and 1-(3-trifluoromethylphenyl) piperazine in rat plasma by HPLC-fluorescence detection and its application to monitoring of these drugs" *Biomedical Chromatography* 26:21-5

Wiergowski M., Anand J.S., Krzyżanowski M., Jankowski Z., (2014) "Acute Metoxetamina and Amphetamine poisoning with fatal outcome: A case report" *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* 27:683-690

WHO, Expert Committee on Drug Dependence. 1-(4-methoxyphenyl) piperazine (MeOPP) Pre-Review Report, Junho 2012. 35th Meeting Hammamet, Tunisia. Documento online, disponível em: http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/5.3dMeOPPpre-review.pdf (consultado a 8 de fevereiro de 2015)

Wohlfarth A., Weinmann W., Dresen S., (2010) "LC-MS/MS Screening method for designer amphetamines, tryptamines and piperazines in serum " *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396:2403-2414

Woźniakiewicz M., Wietecha-Postuszny R., Moos A., Wieczorek M., Knihnicki P., Kościelniak P., (2014) "Development of microextraction by packed sorbent for toxicological analysis of tricyclic antidepressant drugs in human oral fluid" *Journal of Chromatography A* 1337:9-16

Apresentações em congressos no âmbito da dissertação

Apresentação oral

Santos F., Rosado T., Gallardo E., "Desenvolvimento de uma metodologia para determinação de metoxetamina em amostras de saliva por GC-MS/MS", IV Encontro Nacional de Pós-Graduação em Ciências Biológicas de 30 de Março a 2 de Abril de 2015, Aveiro, Portugal

Apresentação sob a forma de Poster

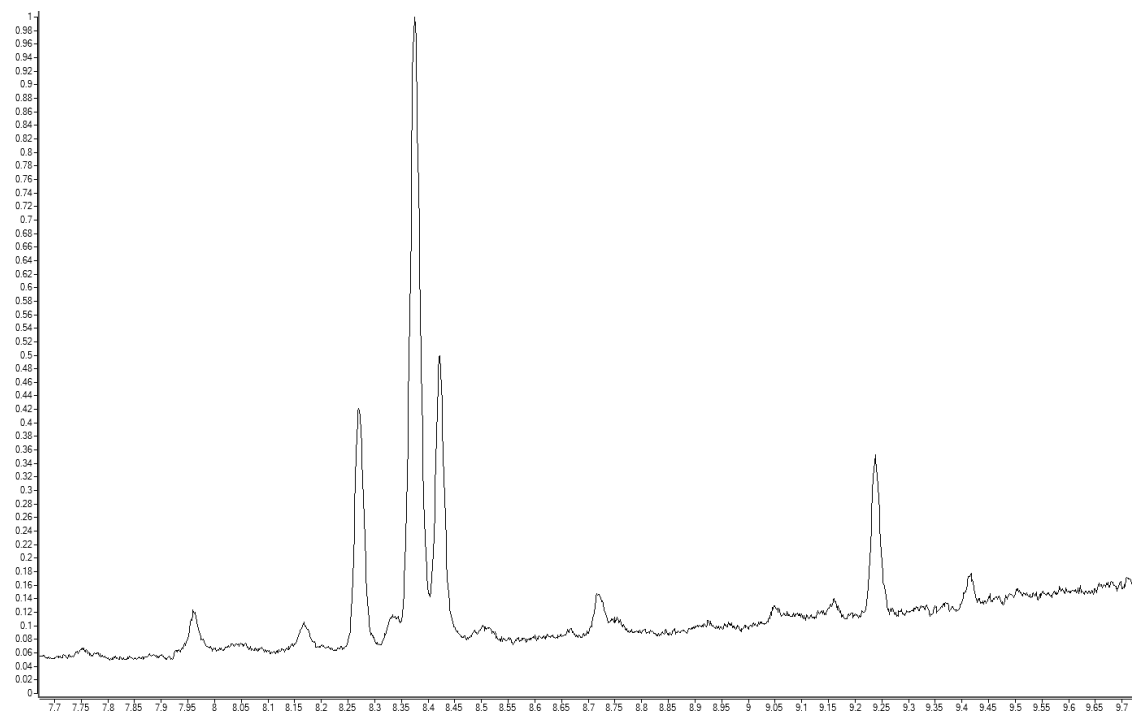
Santos F., Rosado T., Gallardo E., "Quantificação de piperazinas com recurso à microextração em seringa empacotada (MEPS) em amostras de fluido oral", Jornadas de Química e Bioquímica de 6 a 7 de Maio de 2015, Covilhã, Portugal

Apresentação sob a forma de Poster

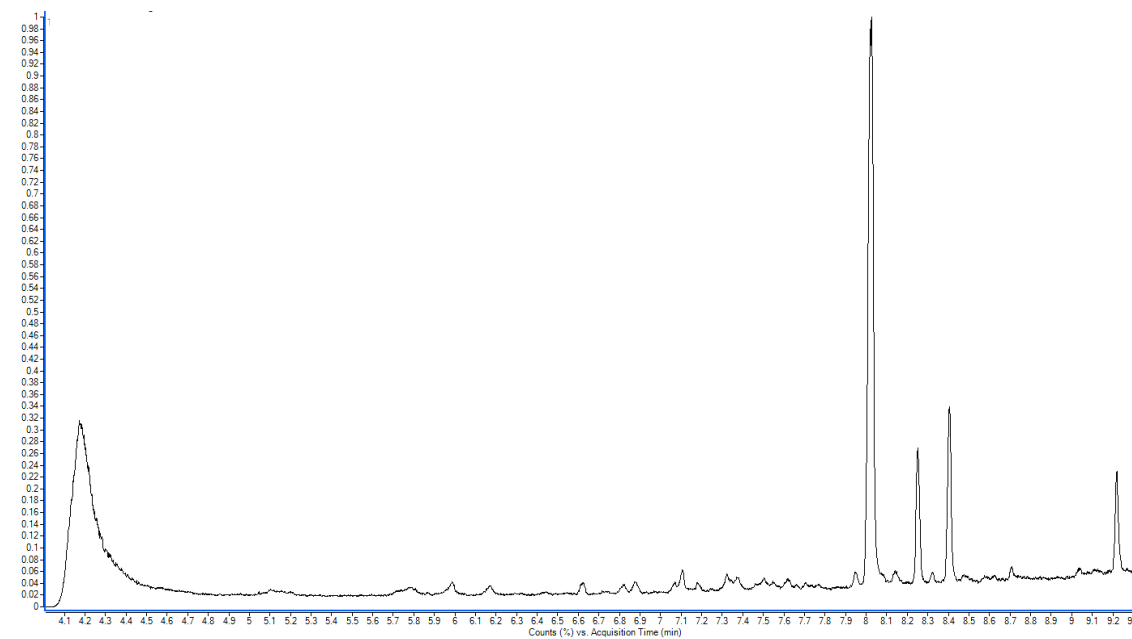
Santos F., Rosado T., Barroso M., Gallardo E., "Determinación de piperacinas en fluido oral por cromatografía líquida-espectrometria de masa en tandem", XXI Congreso Español de Toxicología y V Iberoamericano de 17 a 19 de junho, Espanha (abstract aceite)

Anexos

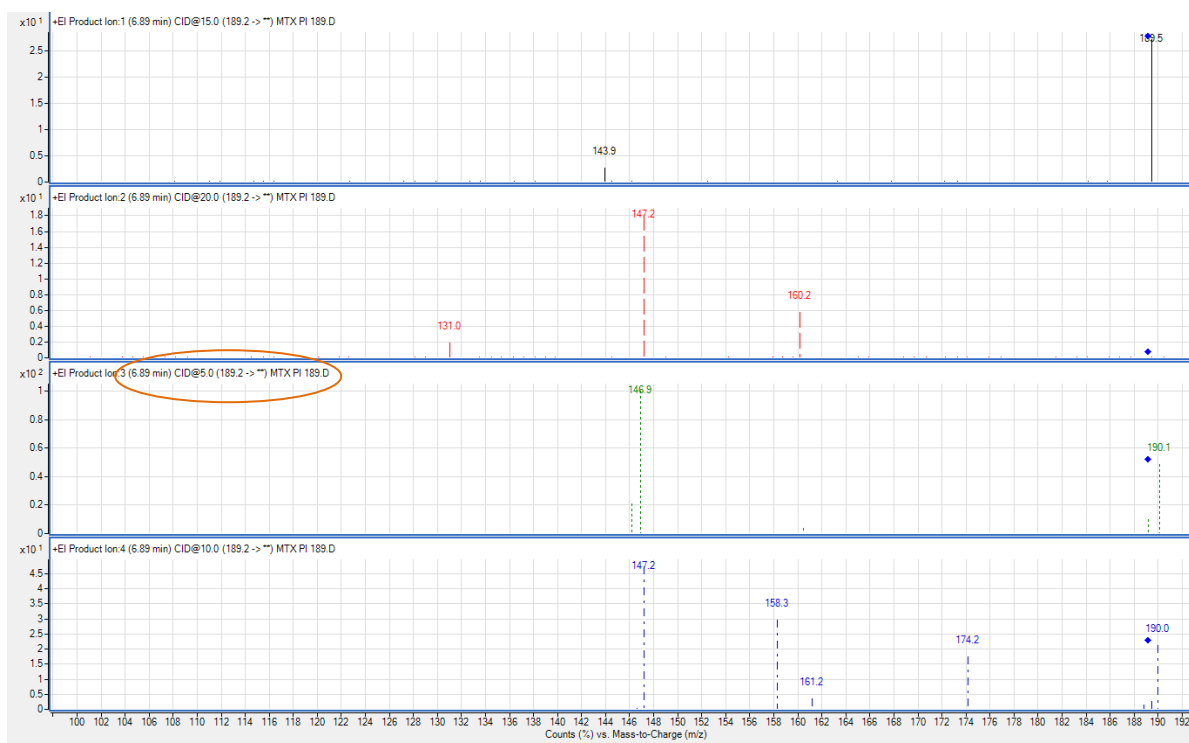
Anexo 1: SCAN da MXE a 50 µg/mL.



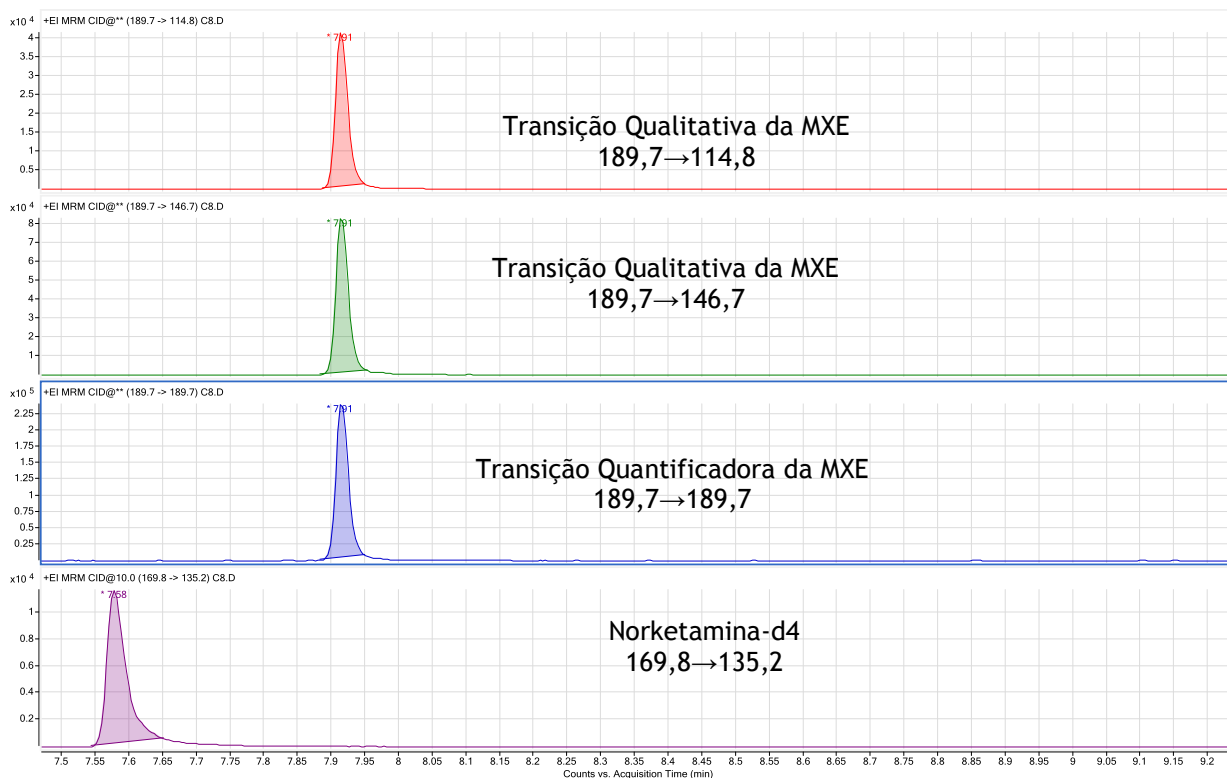
Anexo 2: SCAN da Norketamina-d4 a 100 µg/mL.



Anexo 3: Exemplo de um Product Ion realizado para o íão com m/z 189.7



Anexo 4: Exemplo de um Cromatograma em MRM a 600 ng/mL com as Transições quantificadora e qualitativas.



Anexo 5: Análise estatística para as técnicas de extração da MXE.

Anova: Fator único

SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
T1	3	15,10323	5,03441	0,611569
T2	3	0,927983	0,309328	0,002085
T3	3	1,208064	0,402688	0,008063
T4	3	3,53322	1,17774	0,011225
T5	3	14,04815	4,682716	0,01255
T6	3	19,0565	6,352168	0,347182
T7	3	23,68741	7,895803	8,227902
T8	3	25,01595	8,338649	11,99963
T9	3	18,81307	6,271024	0,350237

ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	235,6191134	8	29,45239	12,28865	7,15E-06	2,510158
Dentro de grupos	43,14087491	18	2,396715			
Total	278,7599883	26				

Testes T e F para as técnicas 1 e 5

Teste F: duas amostras para variâncias

Teste T: duas amostras com variâncias desiguais

	T1	T5		T1	T5
Média	5,034	4,6827	Média	5,03441	4,682716
Variância	0,6116	0,01255	Variância	0,611569	0,0125499
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Hipótese de diferença de média	0	
F	48,731		gl	2	
P(F<=f) uni-caudal	0,0201		Stat t	0,771065	
F crítico uni-caudal	19		P(T<=t) uni-caudal	0,260651	
			t crítico uni-caudal	2,919986	
			P(T<=t) bi-caudal	0,521303	
			t crítico bi-caudal	4,302653	

Testes T e F para as técnicas 1 e 6

Teste F: duas amostras para variâncias

Teste T: duas amostras com variâncias iguais

	T1	T6		T1	T6
Média	5,034	6,352	Média	5,0344	6,352
	0,611	0,34718		0,61156	0,3471
Variância	6	2	Variância	9	82
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2		0,47937	
F	1,761		Variância agrupada	5	
P(F<=f) uni-caudal	5		Hipótese de diferença de média	0	
F crítico uni-caudal	0,362		gl	4	
	1			-	
	19		Stat t	2,33101	
				0,04008	
			P(T<=t) uni-caudal	2	
				2,13184	
			t crítico uni-caudal	7	
				0,08016	
			P(T<=t) bi-caudal	4	
				2,77644	
			t crítico bi-caudal	5	

Testes T e F para as técnicas 1 e 9

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	T1	T9		T1	T9
Média	5,0344	6,27102 4	Média	5,03441	6,271024 1
Variância	0,6116	0,35023 7	Variância	0,611569	0,350237
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Variância agrupada	0,480903	
F	1,7462		Hipótese de diferença de média	0	
P(F<=f) uni-caudal	0,3641		gl	4	
F crítico uni-caudal	19		Stat t	-2,18399	
			P(T<=t) uni-caudal	0,047161	
			t crítico uni-caudal	2,131847	
			P(T<=t) bi-caudal	0,094323	
			t crítico bi-caudal	2,776445	

Testes T e F para as técnicas 5 e 6

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	T5	T6		T5	T6
Média	4,6827	6,35217 0,34718	Média	4,6827	6,3522
Variância	0,0125	2	Variância	0,0126	0,3471
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Variância agrupada	0,17986	
F	0,0361		Hipótese de diferença de média	6	
P(F<=f) uni-caudal	0,0349		gl	4	
F crítico uni-caudal	0,0526		Stat t	4,82109	
				0,00425	
			P(T<=t) uni-caudal	8	
			t crítico uni-caudal	2,13184	
				7	
			P(T<=t) bi-caudal	0,00851	
				6	
			t crítico bi-caudal	2,77644	
				5	

Testes T e F para as técnicas 5 e 9

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	T5	T9		T5	T9
Média	4,6827	6,271024	Média	4,682716	6,2710241
Variância	0,0125	0,350237	Variância	0,01255	0,350237
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Variância agrupada	0,181393	
F	0,0358		Hipótese de diferença de média	0	
P(F<=f) uni-caudal	0,0346		gl	4	
F crítico uni-caudal	0,0526		Stat t	-4,5674	
			P(T<=t) uni-caudal	0,00514	
			t crítico uni-caudal	2,131847	
			P(T<=t) bi-caudal	0,010281	
			t crítico bi-caudal	2,776445	

Testes T e F para as técnicas 6 e 9

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras com variâncias desiguais		
	T6	T9		T6	T9
Média	6,3522	6,271024	Média	6,352168	6,271024
Variância	0,3472	0,350237	Variância	0,347182	0,350237
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Hipótese de diferença de média	0	
F	0,9913		gl	4	
P(F<=f) uni-caudal	0,4978		Stat t	0,168295	
F crítico uni-caudal	0,0526		P(T<=t) uni-caudal	0,437259	
			t crítico uni-caudal	2,131847	
			P(T<=t) bi-caudal	0,874518	
			t crítico bi-caudal	2,776445	

Anexo 6 : Matriz do DOE da MXE.

RunOrder	Center Pt	Strokes	%Acido Fórmico	Volume Acido Fórmico	% Hidróxi do de Amónia	Volume eluição	Resposta
1	1	15	1	150	0,25	50	4,89
2	1	9	1	150	0,25	250	4,85
3	1	9	0,1	50	2,75	50	3,64
4	1	15	1	150	2,75	50	5,46
5	1	15	1	150	0,25	250	6,70
6	1	15	1	50	2,75	250	6,20
7	1	9	1	50	0,25	250	6,40
8	1	15	0,1	50	0,25	250	6,41
9	1	9	1	150	2,75	250	4,50
10	1	9	0,1	50	0,25	50	3,32
11	1	15	1	150	2,75	250	7,18
12	1	15	0,1	150	2,75	50	4,24
13	0	12	0,55	100	1,5	150	6,38
14	1	15	0,1	50	2,75	50	5,22
15	1	9	0,1	150	0,25	250	5,34
16	1	9	0,1	50	0,25	250	5,94
17	1	15	0,1	150	2,75	250	8,20
18	1	9	0,1	50	2,75	250	4,61
19	1	9	1	150	0,25	50	4,62
20	1	9	1	150	2,75	50	4,44
21	1	9	0,1	150	0,25	50	4,09
22	1	15	0,1	150	0,25	250	7,91
23	1	15	0,1	50	2,75	250	9,61
24	1	15	1	50	0,25	50	6,46
25	1	15	0,1	150	0,25	50	5,69
26	1	15	0,1	50	0,25	50	7,78
27	1	15	1	50	2,75	50	5,67
28	1	15	1	50	0,25	250	6,86
29	0	12	0,55	100	1,5	150	5,91
30	1	9	0,1	150	2,75	50	4,72
31	1	9	0,1	150	2,75	250	5,75
32	1	9	1	50	2,75	250	4,79
33	1	9	1	50	2,75	50	5,18
34	1	9	1	50	0,25	50	3,29
35	0	12	0,55	100	1,5	150	5,77

Anexo 7 : Análise da Análise Univariada em relação ao número de strokes.

Testes T e F para 15 e 20 strokes.

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	15	20		15	20
Média	206556	290664,6667	Média	206556	290664,6667
Variância	542522143	324057000,3	Variância	542522143	324057000,3
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Variância agrupada	433289571,7	
F	1,674156529		Hipótese de diferença de média	0	
P(F<=f) uni-caudal	0,373949688		gl	4	
F crítico uni-caudal	19		Stat t	-4,94876988	
			P(T<=t) uni-caudal	0,003884008	
			t crítico uni-caudal	2,131846786	
			P(T<=t) bi-caudal	0,007768016	
			t crítico bi-caudal	2,776445105	

Testes T e F para 15 e 25 strokes.

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	15	25		15	25
Média	206556	286222	Média	15,79544	22,90362
Variância	5,43E+08	1510112001	Variância	3,32863	1,844932973
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Variância agrupada	2,606782	
F	0,35926		Hipótese de diferença de média	0	
P(F<=f) uni-caudal	0,264305		gl	4	
F crítico uni-caudal	0,052632		Stat t	-5,39202	
			P(T<=t) uni-caudal	0,002861	
			t crítico uni-caudal	2,131847	
			P(T<=t) bi-caudal	0,005723	
			t crítico bi-caudal	2,776445	

Testes T e F para 20 e 25 strokes.

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	20	25		20	25
Média	290664,7	286222	Média	18,03206	22,90362
Variância	3,24E+08	1,51E+09	Variância	5,239703	1,884933
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Variância agrupada	3,562318	
F	0,214591		Hipótese de diferença de média	0	
P(F<=f) uni-caudal	0,176678		gl	4	
F crítico uni-caudal	0,052632		Stat t	-3,16116	
			P(T<=t) uni-caudal	0,017073	
			t crítico uni-caudal	2,131847	
			P(T<=t) bi-caudal	0,034146	
			t crítico bi-caudal	2,776445	

Anexo 8 : Análise da Avaliação Univariada em relação ao volume de eluição.

Testes T e F para 250 e 500 µL.

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	250	500		250	500
Média	22,1579303	14,83030455	Média	22,1579303	14,83030455
Variância	0,305950612	1,340135745	Variância	0,305950612	1,340135745
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Variância agrupada	0,823043178	
F			Hipótese de diferença de média	0	
P(F<=f) uni-caudal	0,228298225		gl	4	
F crítico uni-caudal	0,185865468		Stat t	9,892307321	
	0,052631579		P(T<=t) uni-caudal	0,000293028	
			t crítico uni-caudal	2,131846786	
			P(T<=t) bi-caudal	0,000586055	
			t crítico bi-caudal	2,776445105	

Testes T e F para 250 e 1000 µL.

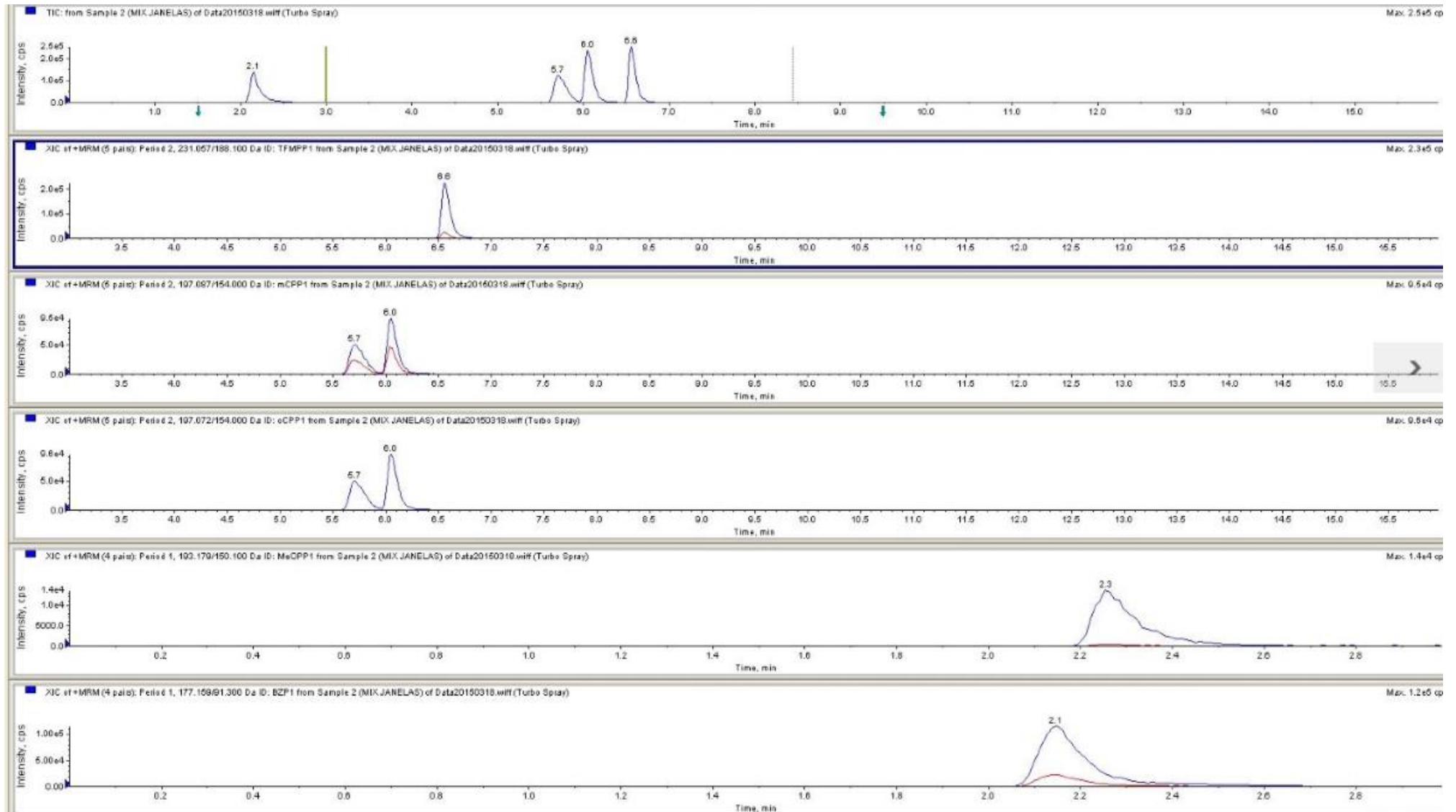
Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	250	1000		250	1000
Média	22,15793	20,10623486	Média	22,15793	20,10623486
Variância	0,305951	0,741037191	Variância	0,305951	0,741037191
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Variância agrupada	0,523494	
F			Hipótese de diferença de média	0	
P(F<=f) uni-caudal	0,412868		gl	4	
F crítico uni-caudal	0,29222		Stat t	3,472983	
	0,052632		P(T<=t) uni-caudal	0,012757	
			t crítico uni-caudal	2,131847	
			P(T<=t) bi-caudal	0,025514	
			t crítico bi-caudal	2,776445	

Testes T e F para 500 e 1000 µL.

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	500	1000		500	1000
Média	14,8303	20,10623	Média	14,8303	20,10623
Variância	1,340136	0,741037	Variância	1,340136	0,741037
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Variância agrupada	1,040586	
F	1,808459		Hipótese de diferença de média	0	
P(F<=f) uni-caudal	0,356067		gl	4	
F crítico uni-caudal	19		Stat t	-6,3344	
			P(T<=t) uni-caudal	0,00159	
			t crítico uni-caudal	2,131847	
			P(T<=t) bi-caudal	0,00318	
			t crítico bi-caudal	2,776445	

PIPERAZINAS

Anexo 9 : Sinal da BZP, MeOPP, mCPP, oCPP e TFMP a 100 ng/mL.



Anexo 10 : Análise estatística das técnicas das piperazinas.**a) BZP****Anova: fator único**

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
técnica 1	3	0,801462	0,267154	0,00992
técnica 2	3	0,073711	0,02457	8,04E-06
técnica 3	3	1,624053	0,541351	0,002324
técnica 4	3	0,834867	0,278289	0,002982
técnica 5	3	1,029023	0,343008	0,006659
técnica 6	3	0,003761	0,001254	6,18E-09
técnica 7	3	0,519873	0,173291	0,003848
técnica 8	3	1,231307	0,410436	0,007165

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,71626	7	0,102323	24,87596	1,84E-07	2,6571966
Dentro de grupos	0,06581	16	0,004113			
Total	0,78207	23				

Testes T e F para as técnicas 3 e 8

Teste F: duas amostras para variâncias

	T3	T8
Média	0,541351	0,410436
Variância	0,002324	0,007165
Observações	3	3
gl	2	2
F	0,324315	
P(F<=f) uni-caudal	0,244893	
F crítico uni-caudal	0,052632	

Teste T: duas amostras para variâncias desiguais

	T3	T8
Média	0,541351	0,410436
Variância	0,002324	0,007165
Observações	3	3
Hipótese de diferença de média	0	
gl	3	
Stat t	2,327754	
P(T<=t) uni-caudal	0,051179	
t crítico uni-caudal	2,353363	
P(T<=t) bi-caudal	0,102357	
t crítico bi-caudal	3,182446	

Testes T e F para as técnicas 3 e 5

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras para variâncias desiguais		
	T3	T5		T3	T5
Média	0,541351	0,343008	Média	0,541351	0,410436
Variância	0,002324	0,006659	Variância	0,002324	0,007165
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Hipótese de diferença de média	0	
F	0,348957		gl	3	
P(F<=f) uni-caudal	0,258686		Stat t	3,624626	
F crítico uni-caudal	0,052632		P(T<=t) uni-caudal	0,018065	
			t crítico uni-caudal	2,353363	
			P(T<=t) bi-caudal	0,03613	
			t crítico bi-caudal	3,182446	

Testes T e F para as técnicas 8 e 5

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras para variâncias iguais		
	T8	T5		T8	T5
Média	0,410436	0,343008	Média	0,410436	0,343008
Variância	0,007165	0,006659	Variância	0,007165	0,006659
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Hipótese de diferença de média	0,006912	
F	1,07598		gl	0	
P(F<=f) uni-caudal	0,4817		Stat t	4	
F crítico uni-caudal	19		P(T<=t) uni-caudal	0,993285	
			t crítico uni-caudal	0,188397	
			P(T<=t) bi-caudal	2,131847	
			t crítico bi-caudal	0,376794	

b) MeOPP

Anova: fator único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
técnica 1	3	0,024932	0,008311	7,73E-06
técnica 2	3	0,004123	0,001374	3,68E-08
técnica 3	3	0,035214	0,011738	4,69E-07
técnica 4	3	0,038153	0,012718	4,19E-06
técnica 5	3	0,030968	0,010323	1,61E-07
técnica 6	3	0,002683	0,000894	2,11E-08
técnica 7	3	0,017342	0,005781	7,05E-07
técnica 8	3	0,051324	0,017108	2,44E-05

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,000665	7	9,5E-05	20,18308	8,04E-07	2,657197
Dentro de grupos	7,53E-05	16	4,71E-06			
Total	0,000741	23				

Testes T e F para as técnicas 3 e 4

Teste F: duas amostras para variâncias

	T3	T4
Média	0,011738	0,012718
Variância	4,69E-07	4,19E-06
Observações	3	3
gl	2	2
F	0,111981	
P(F<=f) uni-caudal	0,100704	
F crítico uni-caudal	0,052632	

Teste T: duas amostras para variâncias desiguais

	T3	T4
Média	0,011738	0,012718
Variância	4,69E-07	4,19E-06
Observações	3	3
Hipótese de diferença de média	0	
gl	2	
Stat t	-0,78676	
P(T<=t) uni-caudal	0,256923	
t crítico uni-caudal	2,919986	
P(T<=t) bi-caudal	0,513847	
t crítico bi-caudal	4,302653	

Testes T e F para as técnicas 3 e 8

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras para variâncias iguais		
	T3	T8		T3	T8
Média	0,011738	0,017108	Média	0,011738	0,017108
Variância	4,69E-07	2,44E-05	Variância	4,69E-07	2,44E-05
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Hipótese de diferença de média	1,24E-05	
F	0,01924		gl	0	
P(F<=f) uni-caudal	0,018877		Stat t	4	
F crítico uni-caudal	0,052632		P(T<=t) uni-caudal	-1,86672	
			t crítico uni-caudal	0,067672	
			P(T<=t) bi-caudal	2,131847	
			t crítico bi-caudal	0,135343	

Testes T e F para as técnicas 4 e 8

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras para variâncias desiguais		
	T4	T8		T4	T8
Média	0,012718	0,017108	Média	0,012718	0,017108
Variância	4,19E-06	2,44E-05	Variância	4,19E-06	2,44E-05
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Hipótese de diferença de média	0	
F	0,171818		gl	3	
P(F<=f) uni-caudal	0,146625		Stat t	-1,42328	
F crítico uni-caudal	0,052632		P(T<=t) uni-caudal	0,124915	
			t crítico uni-caudal	2,353363	
			P(T<=t) bi-caudal	0,24983	
			t crítico bi-caudal	3,182446	

c) mCPP

Anova: fator único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
técnica 1	3	0,530743	0,176914	0,001945
técnica 2	3	0,083722	0,027907	2,31E-05
técnica 3	3	0,695277	0,231759	0,000188
técnica 4	3	0,791722	0,263907	0,000633
técnica 5	3	0,525213	0,175071	0,00067
técnica 6	3	0,072166	0,024055	3,33E-05
técnica 7	3	0,340962	0,113654	0,000627
técnica 8	3	0,781343	0,260448	0,000396

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,193865	7	0,027695	49,05729	1,24E-09	2,657197
Dentro de grupos	0,009033	16	0,000565			
Total	0,202897	23				

Testes T e F para as técnicas 3 e 4

Teste F: duas amostras para variâncias

	T3	T4
Média	0,231759	0,263907
Variância	0,000188	0,000633
Observações	3	3
gl	2	2
F	0,297544	
P(F<=f) uni-caudal	0,229313	
F crítico uni-caudal	0,052632	

Teste T: duas amostras para variâncias desiguais

	T3	T4
Média	0,231759	0,263907
Variância	0,000188	0,000633
Observações	3	3
Hipótese de diferença de média	0	
gl	3	
Stat t	-1,94257	
P(T<=t) uni-caudal	0,07367	
t crítico uni-caudal	2,353363	
P(T<=t) bi-caudal	0,147341	
t crítico bi-caudal	3,182446	

Testes T e F para as técnicas 3 e 8

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras para variâncias desiguais		
	T3	T8		T3	T8
Média	0,231759	0,260448	Média	0,231759	0,260448
Variância	0,000188	0,000396	Variância	0,000188	0,000396
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Hipótese de diferença de média	0	
F	0,47524		gl	4	
P(F<=f) uni-caudal	0,322144		Stat t	-2,05468	
F crítico uni-caudal	0,052632		P(T<=t) uni-caudal	0,054555	
			t crítico uni-caudal	2,131847	
			P(T<=t) bi-caudal	0,10911	
			t crítico bi-caudal	2,776445	

Testes T e F para as técnicas 4e 8

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras para variâncias iguais		
	T4	T8		T4	T8
Média	0,263907	0,260448	Média	0,263907	0,260448
Variância	0,000633	0,000396	Variância	0,000633	0,000396
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Hipótese de diferença de média	0,000515	
F	1,597211		gl	0	
P(F<=f) uni-caudal	0,385028		Stat t	4	
F crítico uni-caudal	19		P(T<=t) uni-caudal	0,186728	
			t crítico uni-caudal	0,430481	
			P(T<=t) bi-caudal	2,131847	
			t crítico bi-caudal	0,860962	

d) TFMPP

Anova: fator único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
técnica 1	3	1,400646	0,466882	0,019152
técnica 2	3	0,298179	0,099393	0,001153
técnica 3	3	1,973521	0,65784	0,005948
técnica 4	3	2,074331	0,691444	0,003935
técnica 5	3	1,507332	0,502444	0,007734
técnica 6	3	0,288141	0,096047	0,000217
técnica 7	3	1,009486	0,336495	0,001022
técnica 8	3	1,922822	0,640941	0,005994

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1,201818	7	0,171688	30,4172	4,31E-08	2,657197
Dentro de grupos	0,090311	16	0,005644			
Total	1,292129	23				

Testes T e F para as técnicas 3 e 4

Teste F: duas amostras para variâncias

	T3	T4
Média	0,6578	0,6914
Variância	0,005948	0,003935
Observações	3	3
gl	2	2
F	1,51149	
P(F<=f) uni-caudal	0,39817	
F crítico uni-caudal	19	

Teste T: duas amostras para variâncias iguais

	T3	T4
Média	0,6578	0,6914
Variância	0,005948	0,003935
Observações	3	3
Hipótese de diferença de média	0,004942	
gl	0	
Stat t	4	
P(T<=t) uni-caudal	-0,58544	
t crítico uni-caudal	0,294844	
P(T<=t) bi-caudal	2,131847	
t crítico bi-caudal	2,776445	

Testes T e F para as técnicas 4 e 8

Teste F: duas amostras para variâncias

	T4	T8
Média	0,263907	0,260448
Variância	0,000633	0,000396
Observações	3	3
gl	2	2
F	1,597211	
P(F<=f) uni-caudal	0,385028	
F crítico uni-caudal	19	

Teste T: duas amostras para variâncias desiguais

	T4	T8
Média	0,263907	0,260448
Variância	0,000633	0,000396
Observações	3	3
Hipótese de diferença de média	0,000515	
gl	0	
Stat t	4	
P(T<=t) uni-caudal	0,186728	
t crítico uni-caudal	0,430481	
P(T<=t) bi-caudal	2,131847	
t crítico bi-caudal	0,860962	

Testes T e F para as técnicas 3 e 8

Teste F: duas amostras para variâncias

	T3	T8
Média	0,6578	0,64094
Variância	0,00595	0,00599
Observações	3	3
gl	2	2
F	0,992305	
P(F<=f) uni-caudal	0,498069	
F crítico uni-caudal	0,052632	

Teste T: duas amostras para variâncias desiguais

	T3	T8
Média	0,65784	0,640941
Variância	0,00595	0,005994
Observações	3	3
Hipótese de diferença de média	0	
gl	4	
Stat t	0,267846	
P(T<=t) uni-caudal	0,401031	
t crítico uni-caudal	2,131847	
P(T<=t) bi-caudal	0,802063	
t crítico bi-caudal	2,776445	

Anexo 11: Análise estatística para a Avaliação Univariada em relação ao número de *strokes* (piperazinas)

a) BZP

Anova: fator único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
18	3	0,042611	0,014204	2,6E-06
24	3	0,054703	0,018234	4,65E-06
30	3	0,077817	0,025939	2,19E-05

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,000213	2	0,000107	10,97966	0,009883	5,143253
Dentro de grupos	5,83E-05	6	9,71E-06			
Total	0,000272	8				

Testes T e F para as 18 e 24 *strokes*

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras para variâncias iguais		
	18	24		18	24
Média	0,014	0,018	Média	0,014	0,018
Variância	2,6005E-06	4,68E-06	Variância	2,600E-06	4,651E-06
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Variância agrupada	3,62565E-06	
F	0,55915773		Hipótese de diferença de média	0	
P(F<=f) uni-caudal	5		gl	4	
F crítico uni-caudal	0,05263157		Stat t	2,592534003	
	9		P(T<=t) uni-caudal	0,030261039	
			t crítico uni-caudal	2,131846786	
			P(T<=t) bi-caudal	0,060522078	
			t crítico bi-caudal	2,776445105	

Testes T e F para as 18 e 30 strokes

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras para variâncias iguais		
	18	30		18	30
Média	0,014203	0,025939	Média	0,01420370	0,0259391
Variância	2,600E-06	2,189E-05	Variância	2,6005E-06	2,1893E05
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Variância agrupada	1,22E05	
F	0,118783		Hipótese de diferença de média	0	
P(F<=f) uni-caudal	0,106172		gl	4	
F crítico uni-caudal	0,0526315		Stat t	-4,10708	
	79		P(T<=t) uni-caudal	0,007384	
			t crítico uni-caudal	2,131847	
			P(T<=t) bi-caudal	0,014767	
			t crítico bi-caudal	2,776445	

Testes T e F para as 24 e 30 strokes

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras para variâncias iguais		
	24	30		24	30
Média	0,018234	0,02593912	Média	0,01823	0,0259391
Variância	4,65E06	2,1893E-05	Variância	4,65E06	2,1893E05
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Variância agrupada	1,33E-05	
F	0,212432		Hipótese de diferença de média	0	
P(F<=f) uni-caudal	0,175212		gl	4	
F crítico uni-caudal	0,052632		Stat t	-2,59024	
			P(T<=t) uni-caudal	0,030334	
			t crítico uni-caudal	2,13185	
			P(T<=t) bi-caudal	0,06067	
			t crítico bi-caudal	2,776445	

b) MeOPP

Anova: fator único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
18	3	0,018235	0,006078	3,71E-07
24	3	0,021047	0,007016	2,44E-06
30	3	0,035472	0,011824	4E-05

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	5,7E-05	2	2,85E-05	1,996507	0,216453	5,143253
Dentro de grupos	8,57E-05	6	1,43E-05			
Total	0,000143	8				

c) mCPP

Anova: fator único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
18	3	0,892144	0,297381	0,000827
24	3	1,0646	0,354867	0,000114
30	3	1,652254	0,550751	0,031049

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,105872	2	0,052936	4,964481	0,053443	5,143253
Dentro de grupos	0,063978	6	0,010663			
Total	0,169849	8				

d) TFMPP

Anova: fator único

SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
18	3	2,208588	0,736196	0,017638
24	3	2,569879	0,856626	0,018042
30	3	3,052752	1,017584	0,009878

ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	0,11959	2	0,059795	3,937528	0,080863	5,143253
Dentro de grupos	0,091116	6	0,015186			
Total	0,210705	8				

Anexo 12 : Matriz do desenho experimental das Piperazinas.

Tabela) Matriz do desenho experimental das Piperazinas.

	Solução de Lavagem				Solução de Eluição		Resposta $A_{relativa}$			
	Center Pt	Strokes	volume lavagem	% ácido fórmico	volume de eluição	% amônia	BZP	MeOPP	mCPP	TFMPP
1	1	8	1 x150 µL	1	1x150 µL	1	0,326	0,012	0,341	0,767
2	1	8	3 x150 µL	1	3 x150 µL	3	0,024	0,008	0,232	0,600
3	0	13	2 x150 µL	2	2 x150 µL	2	0,032	0,012	0,345	0,863
4	0	13	2 x150 µL	2	2 x150 µL	2	0,030	0,011	0,346	0,811
5	1	18	3 x150 µL	3	1 x150 µL	3	0,034	0,015	0,389	1,012
6	1	8	1 x150 µL	1	1 x150 µL	3	0,013	0,007	0,176	0,458
7	1	18	1 x150 µL	3	1 x150 µL	1	0,036	0,013	0,440	1,213
8	1	18	3 x150 µL	3	1 x150 µL	1	0,026	0,011	0,330	0,915
9	1	18	3 x150 µL	3	3 x150 µL	1	0,044	0,019	0,579	1,437
10	1	8	1 x150 µL	3	1 x150 µL	3	0,014	0,007	0,188	0,444
11	1	18	3 x150 µL	1	3 x150 µL	3	0,038	0,019	0,578	1,481
12	1	8	3 x150 µL	3	1 x150 µL	1	0,013	0,007	0,181	0,536

| Determinação de novas substâncias psicoativas em fluido oral

13	1	8	1 x150 µL	3	3 x150 µL	3	0,018	0,008	0,227	0,624
14	1	8	3 x150 µL	3	3 x150 µL	3	0,016	0,007	0,175	0,531
15	1	8	1 x150 µL	3	3 x150 µL	1	0,016	0,008	0,223	0,586
16	1	18	1 x150 µL	1	1 x150 µL	1	0,027	0,010	0,289	0,704
17	1	18	1 x150 µL	1	1 x150 µL	3	0,028	0,011	0,316	0,894
18	1	8	3 x150 µL	1	3 x150 µL	1	0,012	0,007	0,185	0,471
19	1	18	3 x150 µL	1	1 x150 µL	1	0,030	0,010	0,333	0,823
20	0	13	2 x150 µL	2	2 x150 µL	2	0,023	0,009	0,269	0,756
21	1	8	1 x150 µL	1	3 x150 µL	1	0,012	0,008	0,231	0,573
22	1	18	1 x150 µL	3	1 x150 µL	3	0,023	0,010	0,311	0,741
23	1	8	3 x150 µL	3	3 x150 µL	1	0,018	0,007	0,214	0,533
24	1	8	1 x150 µL	3	1 x150 µL	1	0,012	0,007	0,211	0,550
25	1	8	3 x150 µL	1	1 x150 µL	3	0,011	0,008	0,176	0,462
26	1	18	3 x150 µL	1	1 x150 µL	3	0,023	0,011	0,259	0,837
27	1	18	1 x150 µL	1	3 x150 µL	3	0,033	0,012	0,398	1,045
28	1	8	3 x150 µL	1	1 x150 µL	1	0,014	0,009	0,174	0,506
29	1	18	3 x150 µL	1	3 x150 µL	1	0,026	0,010	0,332	0,878
30	1	8	3 x150 µL	3	1 x150 µL	3	0,016	0,007	0,168	0,399
31	1	8	1 x150 µL	1	3 x150 µL	3	0,011	0,006	0,208	0,488
32	1	18	1 x150 µL	3	3 x150 µL	3	0,029	0,011	0,348	0,942
33	1	18	1 x150 µL	1	3 x150 µL	1	0,030	0,012	0,380	0,979
34	1	18	3 x150 µL	3	3 x150 µL	3	0,028	0,009	0,248	0,721
35	1	18	1 x150 µL	3	3 x150 µL	1	0,031	0,012	0,319	0,934

ANEXO 13: Cromatograma relativo à injeção de anfetaminas a 100ng/mL sem extração.

