

Determinação da cocaína e seus metabolitos usando águas residuais como matriz

Estefânia Raquel Silva Alves

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

Orientador: Professor Doutor André Ricardo Tomás dos Santos Araújo Pereira
Co-orientador: Professora Doutora Maria Eugenia Gallardo Alba
Co-orientador: Doutor Mário Jorge Dinis Barroso

março de 2023

Declaração de Integridade

Eu, Estefânia Raquel Silva Alves, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição m11123 de Biotecnologia da Faculdade de Ciências, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

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

Universidade da Beira Interior, Covilhã 15/03 /23

Estefânia Raquel Silva Alves

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação.”

-Simone de Beauvoir

Dedicatória

Finalizando esta etapa, não posso deixar de dedicar este trabalho a todos os que me apoiaram durante este percurso.

Primeiramente, dedico esta dissertação a mim própria, por nunca ter desistido deste sonho, apesar dos inúmeros desafios e incertezas.

À minha irmã Diana, por nunca ter desistido de mim e pela motivação dada ao longo deste percurso. Sempre me fizeste acreditar de que seria capaz, obrigada por seres tão especial.

Ao meu querido namorado e melhor amigo, por estar sempre a meu lado e por me tornar numa pessoa melhor a cada dia que passa. Sem ti, teria sido muito mais difícil, pois tornaste-te o meu porto seguro e a minha fonte de segurança.

À minha querida Professora Doutora Eugénia Gallardo, ou meu anjinho da guarda como gosto de lhe chamar, por me ter proporcionado esta oportunidade, e me fazer ingressar no que se tornou a minha profissão de sonho.

Ao Doutor Tiago Rosado, pela sua simpatia, disponibilidade e pelo bom ambiente que sempre proporcionou.

A todos os meus colegas de laboratório, por todo o conhecimento e tranquilidade que me transmitiram.

Por último, mas não menos importantes, agradeço ao Professor Doutor André Araújo e ao Professor Doutor Mário Barroso por toda a atenção dada durante esta jornada.

A todos, agradeço do fundo do meu coração pelo vosso apoio.

Resumo

O consumo de drogas de abuso, entre as quais cocaína, existe há muitos anos e permanece até aos dias de hoje, representando um problema para a saúde pública. A cocaína (COC) é a segunda droga mais consumida a nível europeu, e por se tratar de uma substância que estimula o sistema nervoso central (SNC), encontra-se associada a diversas doenças físicas e mentais. Outro fator preocupante é o impacto na saúde mental provocado pela pandemia causada pelo coronavírus (covid-19), levando a um aumento do consumo deste tipo de substâncias. Desta forma, torna-se importante o desenvolvimento de novas metodologias que permitam detetar e quantificar de forma fiável estas drogas, podendo utilizar vias indiretas de forma a obter dados credíveis que indiquem informação sobre o consumo destas substâncias através de amostras de recolha fácil. Assim sendo, o presente estudo teve como objetivo desenvolver um método analítico adequado à análise de águas residuais (AR's), utilizando extração em fase sólida (SPE) e identificação/quantificação, através da cromatografia gasosa (GC) e espectrometria de massas em tandem (GC-MS/MS). Os analitos alvo foram COC, ecgonina metilester (EME), benzoilecgonina (BEG), cocaetileno (COET) e norcocaína (NCO). O procedimento de extração previamente otimizado, resultou na aplicação de 50 mL de amostras de efluentes em cartuchos StrataTM-X-C. A extração foi iniciada com o acondicionamento dos cartuchos com 2 mL de metanol e 2 mL de água desmineralizada, adição de amostra, seguido de uma lavagem onde foram usados 2 mL de ácido clorídrico (HCl) (0,1M em água), eluição dos compostos com 2 mL de 5% hidróxido de amónia em metanol secagem, derivatização e posterior injeção no sistema GC-MS/MS. A metodologia foi validada seguindo as diretrizes de *Scientific Working group for Forensic Toxicology (SWGTOX)*. Foi obtida uma linearidade de 0,00625-5 ng/mL para todos os analitos em estudo, com coeficientes de superiores a 0,99 para todos os compostos. A precisão e exatidão intra- e interdia e intermedia revelaram coeficientes de variação e *BIAS* em conformidade com as diretrizes utilizadas. Este procedimento permitiu recuperações que variaram entre 72-115%. Todos os parâmetros estudados obedeceram aos critérios definidos. Um dos parâmetros avaliados durante o desenvolvimento do presente método foi a estabilidade, pois uma das maiores limitações dos laboratórios de toxicologia reside no armazenamento de amostras antes e depois do seu processamento, podendo resultar em perdas significativas dos compostos em estudo. Todos os analitos se mantiveram estáveis nos extratos à temperatura ambiente durante 24h e nas amostras sujeitas a ciclos de congelação/descongelação durante 24h.

Salienta-se que o método aqui descrito, é o primeiro que utiliza SPE através de cartuchos StrataTM-X-C, aliada à análise por GC-MS/MS.

Assim, este método constitui uma alternativa adequada para a monitorização da COC e dos seus metabolitos em amostras de águas residuais, com especial importância quer no ramo ambiental quer em termos de aplicação forense.

Palavras-chave

Cocaína; Metabolitos; Águas residuais; SPE; StrataTM-X-C GC-MS/MS.

Abstract

The consumption of drugs of abuse, for instance cocaine, dates many years back and remains until today; therefore, it is a danger to public health. Cocaine (COC) is the second most consumed drug in Europe, and because of the stimulation of the central nervous system (CNS), it has been associated with several physical and mental illnesses. Another concerning factor is the impact on mental health caused by the recent pandemic (covid-19), leading to an increase in the consumption of this type of substance. In this way, it is important to develop new methodologies to detect and quantify these drugs, using indirect ways to obtain credible data, providing information about the consumption of these substances through easy sampling. Therefore, this study aims to develop an analytical method suitable for the analysis of wastewaters (AR's), using solid phase extraction (SPE) and identification/quantification by gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). The target analytes were cocaine, ecgonine methylester (EME), benzoylecgonine (BEG), cocaethylene (COET) and norcocaine (NCOC). The previously optimized extraction procedure resulted in the application of 50 mL of effluent into Strata™-X-C cartridges. The extraction was initiated by conditioning the cartridges with 2 mL of methanol and 2 mL of demineralized water, sample addition, followed by a wash where 2 mL of hydrochloric acid (HCl) (0.1 M in water) was used, elution of the compounds with 2 mL of 5% ammonium hydroxide in methanol drying, derivatization and subsequent injection into the GC-MS/MS system.

The methodology was validated following the Scientific Working group for Forensic Toxicology (SWGTOX) guidelines. Linearity was obtained between 0.00625-5 ng/mL for all analytes under study, with coefficients of determination greater than 0.99 for all compounds. Intra- and interday, as well as intermediate, precision and accuracy showed coefficients of variation and *BIAS* in compliance with the guidelines used. This procedure allowed recoveries ranging from 72-115%. All of the studied parameters met the defined criteria.

One of the parameters evaluated during the development of this method was stability, since one of the biggest limitations of toxicology laboratories is storage of samples before and after their processing, which can result in significant losses of the compounds under study. The analytes were stable at room temperature for 24h and in samples subjected to freeze/thaw cycles for 24h. It is important to note that the method described is the first to use SPE using Strata™-X-C cartridges, combined with GC-MS/MS analysis.

Thus, this method constitutes a suitable alternative for monitoring COC and its metabolites in wastewater samples, with special importance both in the environmental field and in terms of forensic application.

Keywords

Cocaine; Metabolites; Wastewater; SPE; StrataTM-X-C; GC-MS/MS.

Índice

Capítulo 1 : Introdução	21
1. História da Cocaína	21
2. Isolamento.....	22
3. Mecanismo de Ação.....	23
4. Toxicocinética.....	24
5. Propriedades Químicas	26
5.1. Cocaína	26
5.2. Benzoilecgonina.....	27
5.3. Ecgonina metilester.....	28
5.4. Cocaetileno	28
5.5. Norcocaína.....	29
6. Efeitos e toxicidade.....	30
7. Tratamento em caso de intoxicação ou sobredosagem	30
8. Cocaína e o seu consumo.....	31
9. Métodos de análise para avaliação do consumo de drogas de abuso.....	33
10. Técnicas de preparação das amostras	34
10.1. Extração em Fase Sólida	35
10.2. Cromatografia	37
10.2.1. Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massa.....	37
10.2.2. Espectros de Massa da Cocaína e os seus Metabolitos.....	40
10.3. Validação de um método analítico	41
10.3.1. Seletividade	42
10.3.2. Linearidade e Curva de Calibração	43
10.3.3. Precisão e Exatidão	44
10.3.4. Limites analíticos	44
10.3.5. Estabilidade.....	46
10.3.6. Carryover.....	47
10.3.7. Recuperação.....	47
10.4. Detecção e quantificação de cocaína em águas residuais	47
Capítulo 2 : Justificação do tema e objetivos	54
Capítulo 3 :.....	55
Procedimento Experimental.....	55
3.1. Material e métodos.....	55
3.1.1. Material e Instrumentação	55

3.1.2. Reagentes e padrões	56
3.1.3. Preparação de soluções.....	56
3.1.3.1. Soluções Padrão	56
3.1.3.2. Reagente de derivatização	56
3.1.3.3. Solução de diclorometano:metanol (70:30, v/v).....	56
3.1.3.4. Solução de diclorometano:Isopropanol:Hidróxido de amónia (78:20:2, v/v/v)	57
3.1.3.5. Solução de HCl 0,1 M em água	57
3.1.3.6. Solução de HCl 0,1 M em metanol.....	57
3.1.3.7. Solução de amónia a 5 % em metanol.....	57
3.1.4. Amostras.....	57
3.2. Sistema e condições cromatográficas.....	58
3.3. Preparação de amostra.....	58
3.4. Procedimento de extração.....	58
Resultados e discussão	59
3.5. Identificação dos compostos em análise	59
3.6. Otimização do método extrativo	62
3.7. Validação do método	65
3.7.1. Seletividade.....	65
3.7.2. Linearidade e Curva de Calibração.....	68
3.7.3. Precisão e Exatidão.....	70
3.7.4. Estabilidade.....	73
3.7.5. Recuperação	75
3.7.6. Carryover	75
3.8. Aplicação do método a amostras reais.....	76
Capítulo 4:.....	78
Conclusão e Perspetivas Futuras.....	78
Referências Bibliográficas.....	80

Lista de Figuras

Figura 1 - <i>Erythroxylum</i> Coca. Adaptado de Biondich, <i>et al.</i> ⁴	22
Figura 2 - Estrutura da cocaína. Adaptado de DrugBrank Online ³⁸	26
Figura 3 - Estrutura da BEG. Adaptado de DrugBrank Online ³⁸	27
Figura 4 - Estrutura da ecgonina metilester. Adaptado de DrugBrank Online ³⁸	28
Figura 5 - Estrutura do cocaetileno. Adaptado de Pergolizzi <i>et al.</i> . ²²	28
Figura 6 - Estrutura da NCOC. Adaptado de Ambach <i>et al.</i> ⁴¹	29
Figura 7 - Distribuição geográfica europeia do consumo de cocaína. Adaptado de European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) ⁴⁷	32
Figura 8 - Taxa de consumo em Porto referente ao ano de 2021. Adaptado de EMCDDA ⁴⁷	32
Figura 9 - Taxa de consumo no Lisboa referente ao ano de 2021. Adaptado de EMCDDA ⁴⁷	32
Figura 10 - Tendências das quantidades médias diárias de BEG em miligramas por 1 000 habitantes em Antuérpia Zuid (Bélgica), Zagreb (Croácia), Paris Seine Centre (França), Milão (Itália), Eindhoven e Utrecht (Países Baixos), Castellón e Santiago (Espanha). Adaptado de EMCDDA ⁴⁶	33
Figura 11 - Representação esquemática das etapas de extração do método SPE. Adaptado de Humbert <i>et al.</i>	36
Figura 12 - Composição de um Sistema GC. Adaptado do site da corporação Shimadzu ⁶⁴	38
Figura 13 - Composição de um Cromatograma. Adaptado do site da corporação Shimadzu ⁶⁴	38
Figura 14 - Espetro de massa da COC. Adaptado de Castiglioni <i>et al.</i> ⁶⁷	40
Figura 15 - Espetro de massa da BEG. Adaptado de Castiglioni <i>et al.</i> ⁶⁷	40
Figura 16 - Espetro de massa do COET. Adaptado de Castiglioni <i>et al.</i> ⁶⁷	41
Figura 17 - Espetro de massa da EC (A) e EME (B). Adaptado de Castiglioni <i>et al.</i> ⁶⁷	41
Figura 18 - Espetro de massa da NCOC. Adaptado de Castiglioni <i>et al.</i> ⁶⁷	41
Figura 19 - Esquema da metodologia adotada no presente trabalho. Adaptado de.....	59
Figura 20 - Cromatograma em modo SCAN da solução padrão, contendo os compostos COC, BEG, EME, COET e NCOC à concentração de 10 µg/mL.....	60
Figura 21 - Espetro de massa em SCAN da solução padrão, contendo os compostos COC, BEG, EME, COET e NCOC à concentração de 10 µg/mL.....	60
Figura 22 - Cromatograma em modo MRM da solução padrão contendo todos os compostos em análise a 10 µg/mL.....	61

Figura 23 - Cromatograma de uma amostra branco vs o LOQ para a EME.	65
Figura 24 - Cromatograma de uma amostra branco vs o LOQ para a COC.	66
Figura 25 - Cromatograma de uma amostra branco vs o LOQ para o COET.	66
Figura 26 - Cromatograma de uma amostra branco vs o LOQ para a BEG.	67
Figura 27 - Cromatograma de uma amostra branco vs o LOQ para a NCOC.	67
Figura 28 - Cromatograma da amostra 1.	77

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Tempos de ação da COC. Adaptado de Pinheiro ⁶ , Zimmerman <i>et al.</i> ²⁰ , Goldstein <i>et al.</i> ² , Pergolizzi <i>et al.</i> ²² e Cunha <i>et al.</i> ²³	25
Tabela 2 - Propriedades químicas da COC ^{7, 33, 37, 38}	27
Tabela 3 - Propriedades químicas da BEG ^{37, 38}	27
Tabela 4 - Propriedades químicas da EME ³⁷	28
Tabela 5 - Propriedades químicas do COET Adaptado de Rosado <i>et al.</i> ²⁷	29
Tabela 6 – Propriedades químicas da NCOC ^{28, 38, 40, 41}	29
Tabela 7 - Intervalos máximos de tolerância permitidos para as abundâncias relativas dos iões, monitorizados em modo MRM e expressos em percentagem (%) ⁷⁶	42
Tabela 8 - Métodos cromatográficos para deteção e quantificação de COC e dos seus metabolitos em amostras de AR's	50
Tabela 9 - Transições monitorizadas em modo MRM para os diferentes analitos em estudo	62
Tabela 10 - Otimização do processo de extração SPE.	64
Tabela 11 - Otimização do processo de extração SPE para a técnica T3	64
Tabela 12 - Resultados do estudo de linearidade e curva de calibração	68
Tabela 13 - Precisão intradia e exatidão para a COC e os seus metabolitos	70
Tabela 14 - Precisão interdia e exatidão para a BEG.	71
Tabela 15 - Precisão intermedia e exatidão para a BEG.	71
Tabela 16 - Precisão interdia e exatidão para a COC.	71
Tabela 17 - Precisão intermédia e exatidão para a COC.	72
Tabela 18 - Precisão interdia e exatidão para o COET	72
Tabela 19 - Precisão intermédia e exatidão o COET	72
Tabela 20 - Precisão interdia e exatidão para a EME	72
Tabela 21 - Precisão intermédia e exatidão a EME	72
Tabela 22 - Precisão interdia e exatidão para a NCOC	73
Tabela 23 - Precisão intermédia e exatidão para a NCOC	73
Tabela 24 - Resultados referentes ao estudo da estabilidade de amostras processadas (n=3)	74
Tabela 25 - Resultados referentes ao estudo da estabilidade de ciclos de congelação e descongelação a (n=3)	74
Tabela 26 - Recuperação (%) para cada um dos compostos em estudo (n=3)	75
Tabela 27 - Resultados para as amostras 1, 2, 3 e 4, relativamente à quantificação de COC, EME, BEG, COET e NCOC.	76

Tabela 28 - Aplicação dos critérios de positividade em resultados positivos.....76

Lista de Acrónimos

AEME	Anidroecgonina metil éster
AR's	Águas Residuais
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BEG	Benzoilecgonina
COC	Cocaína
COET	Cocaetileno
COVID-19	<i>Coronavirus disease 2019</i>
d.C.	Depois de Cristo
DAT	Transportador Pré-sináptico de Dopamina
EC	Ecgonina
EMA	Agência Europeia de Medicamentos (do inglês <i>European Medicines Agency</i>)
EMCDDA	Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência (do inglês <i>European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction</i>)
EME	Ecgonina metilester
EU	União Europeia (do inglês <i>European Union</i>)
EUA	Estados Unidos
FDA	Food and Drug Administration
GC	Cromatografia Gasosa (do inglês <i>Gas chromatography</i>)
HBL	Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico (do inglês <i>Hydrophilic-Lipophilic-Balanced</i>)
hCE-1	Carboxilesterase 1
hCE-2	Carboxilesterase 2
HCL	Ácido Clorídrico
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês <i>Liquid Chromatography</i>)
IUPAC	União Internacional da Química Pura e Aplicada (do inglês <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
LC	Cromatografia Líquida (do inglês <i>Liquid chromatography</i>)
LD ₅₀	Dose letal 50
LLE	Extração Líquido-Líquido (do inglês <i>Liquid-liquid Extraction</i>)
LLOQ	Limite inferior de quantificação (do inglês <i>Lower Limit of Quantification</i>)
LOD	Limite de Detecção (do inglês <i>Limit of Detection</i>)

LOQ	Limite de Quantificação (do inglês <i>Limit of Quantification</i>)
RT	Tempo de retenção (do inglês <i>Retention Time</i>)
SCAN	Varrimento
SIM	Monitorização seletiva de iões (do inglês <i>Selected Ion Monitoring</i>)
MCX	Troca Catiónica (do inglês <i>Mixed-mode Cation-exchange</i>)
MHLW	Ministério da Saúde, Trabalho e Bem-Estar (do inglês <i>Ministry of Health, Labour and Welfare</i>)
NAT	Transportador de Norepinefrina
NCOC	Norcocaína
NMDA	N-metil-D-aspartato
N.R.	Não Referido
MS	Espetrometria de Massa (do inglês <i>Mass Spectrometry</i>)
MS/MS	Espetrometria de Massa em Tandem (do inglês <i>Tandem Mass Spectrometry</i>)
MSTFA	N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida
PChE	Acetilcolinesterase
QC's	Controlos de Qualidade (do inglês <i>Quality Controls</i>)
SNC	Sistema Nervoso Central
SPE	Extração em Fase Sólida
SWGTOX	Scientific Working group for Forensic Toxicology
TMCS	Trimetilclorosilano
UPLC	Cromatografia Líquida de ultra eficiência (do inglês <i>Ultra High</i>
UHPLC	<i>Performande Liquid Chromatography</i>)
MRM	Monitorização de reações múltiplas

Capítulo 1 : Introdução

1. História da Cocaína

A cocaína (COC) é uma substância natural proveniente das folhas da planta *Erythroxulum coca*, originária da América do Sul, México, Indonésia e Índias ocidentais. O seu consumo é um hábito muito antigo, com evidências de restos de folhas de COC nas bochechas de múmias encontradas em escavações arqueológicas no Peru e Bolívia. Da mesma forma, dois metabolitos de COC, benzoilecgonina (BEG) e ecognina (EC), foram encontrados nos cabelos de múmias de 1000 d.C., através da cromatografia gasosa (GC) acoplada à espectrometria de massa ^{1,2}.

Os povos indígenas da América do Sul também usavam folhas de COC para fins religiosos e cerimoniais, por intermédio de chás e o ato de mascar as folhas. Estes hábitos persistem até aos dias de hoje, devido aos seus efeitos estimulantes, alívio dos sintomas associados à altitude e alívio da fome e sede ^{1,3,4}.

Quando os espanhóis conquistaram a América do Sul, em 1492, o uso da folha de coca foi proibido. Essa proibição não durou muito tempo, porque depois de um tempo, perceberam que os índios não conseguiam realizar trabalhos duros sem o seu uso e era um negócio bastante lucrativo. Em 1569, foi anunciado que era permitida a mastigação de folhas de COC, por ser visto como um hábito essencial à saúde ^{1,2}.

O primeiro relato de COC na Europa foi em 1507, por Américo Vespúcio, onde descrevem o consumo de COC através da mastigação de folhas com cinzas ⁵. Anos depois, em 1855, o químico alemão Friedrich Gaedcke, isolou o alcalóide COC, dando-lhe o nome de eritroxilina, passando o estudo para o seu aluno Albert Niemann ¹. No ano de 1860, Albert Niemann desenvolveu um processo para isolar e purificar a COC a partir das folhas de coca, permitindo o estudo dos seus efeitos e posterior uso de COC para fins terapêuticos ^{2,4,6}.

O uso de COC como agente anestésico em cirurgias, surgiu pela primeira vez em 1880 e foram publicados um livro, assim como um artigo sobre os benefícios da COC em 1884. Consequentemente a COC e os seus derivados começaram a ser utilizados como remédio para diversas doenças, e embora a qualidade das folhas de coca pudesse estar comprometida, continuou a ser vulgarmente prescrita e usada.

A COC começou a ser incorporada em diversos produtos, e até a famosa bebida “Coca-Cola”, passou a usar esta substância. Devido ao excesso de aplicações da COC, surgiu a necessidade de serem formuladas regulamentações medidas pela “*Pure Food and Drug Act and the Harrison Anti-Narcotic Act*”. A legalização da COC terminou em 1914,

quando a substância passou a ser de uso médico controlado nos Estados Unidos da América (EUA), permanecendo assim até aos dias de hoje ^{1,3}.

Até à década de 1970, o consumo de COC nas ruas só era possível na forma de cloridrato de COC, mas a partir dos anos 80 houve uma alteração, quando surgiu como uma droga recreativa na forma de crack, levando a uma quebra nos custos de produção, resultando num aumento de oferta e aumento acentuado do seu consumo ⁷⁻⁹.

Apesar de proibida, esta droga continua a ser consumida por milhões de pessoas em todo o mundo, movimentando bilhões de dólares anualmente ⁶.

2. Isolamento

A COC pura tem dois nomes químicos, benzoilmetilecgonina e éster do ácido benzóico ⁶, sendo também conhecida como sopro, neve, charlie e C ³. Esta é uma substância alcalóide natural e extraída de um arbusto chamado *Erythroxylum* Spp. Esta planta é encontrada principalmente na América do Sul, e possui várias espécies ⁶. Duas espécies principais para a extração de COC são *Erythroxylum* Coca (Figura 1) e *Erythroxylum novogranatense*, apesar de terem sido identificadas cerca de 250 espécies, através das quais é possível produzir esta droga.



Figura 1 - *Erythroxylum* Coca. Adaptado de Biondich, *et al.* ⁴.

A COC pode ser encontrada na totalidade da planta mas para obtenção de maior rendimento, a sua extração é feita utilizando apenas as folhas, uma vez que a concentração desta substância é cerca de 20% a 90% do conteúdo total de alcalóides presentes neste órgão. Após colheita das folhas, existem vários fins de consumo, podendo ser mascaradas, transformadas em cigarros ou chá. Para além destas formas básicas de consumo, pode ocorrer um processo de extração de COC, dando origem a pasta de coca, cloridrato de COC ou crack ^{1,4,10}.

As duas formas principais são cloridrato de COC e crack, ambos provenientes de um sólido castanho-amarelado intitulado por “pasta de coca”. Esta pasta contém entre 40-80% de COC, e apenas pode ser fumado. O cloridrato de COC é solúvel em água, e

apresenta-se sob a forma de pó branco, inodoro e amargo. A sua pureza varia entre 20 a 95% e pode ser consumido por via intravenosa ou intranasal, apenas não pode ser fumado por apresentar um ponto de fusão elevado. O crack, por outro lado, pode ser fumado e apresenta um grau de pureza entre os 20 e 80% ^{3, 10-12}.

3. Mecanismo de Ação

A COC possui diferentes propriedades farmacodinâmicas que possibilitam seu uso como anestésico local e como estimulante simpatomimético do SNC. A ação anestésica da cocaína está relacionada à sua capacidade de bloquear os canais de sódio dependentes de voltagem, estabilizando esses canais em um estado inativo. A ligação da COC ao do canal impede que o sódio flua através dele para as células e, assim, bloqueia o processo de despolarização e a propagação de impulsos elétricos ¹³. O uso médico atual é muito limitado, pois a maioria dos países o considera obsoleto. Ainda pode ser usado como anestésico tópico, o que pode ser particularmente útil para a cirurgia endoscópica sinusal, devido aos seus efeitos vasoconstritores ². No entanto, existem controvérsias relacionadas ao desenvolvimento de morbidades leves, como hipertensão e taquicardia ¹³.

Os efeitos psicoativos e simpatomiméticos da COC derivam do bloqueio dos transportadores pré-sinápticos responsáveis pela recaptação de serotonina, norepinefrina e dopamina. Neste último caso, o bloqueio do transportador pré-sináptico de dopamina (DAT) na fenda sináptica causa um aumento extracelular de dopamina com superestimulação dos recetores dopaminérgicos pós-sinápticos, induzindo a euforia ¹⁴. Outros mecanismos de tolerância neste nível são responsáveis pela queda subsequente nos níveis de dopamina experimentada como um "crash" disfórico. Consumidores crônicos de COC exibem uma redução significativa nos recetores de dopamina D2 e D3 nas regiões do cérebro estriado, caudado e putamen, bem como uma disponibilidade significativamente aumentada de DAT em todo o corpo estriado ¹⁵.

Quando a COC é consumida, a atividade dopaminérgica exacerbada ocorre ao longo das vias mesocorticolímbicas. Os neurónios nessas vias estão localizados na área tegmental ventral e projetam-se para outros locais no cérebro, incluindo o *núcleo accumbens*. Isso poderia explicar o porquê da COC ter tanto potencial viciante, pois é reconhecido que o *núcleo accumbens* pode desempenhar um papel importante nas propriedades gratificantes e viciantes da cocaína e outras drogas ¹⁴. A capacidade da COC aumentar a atividade serotoninérgica (que pode induzir convulsões) também pode contribuir para o potencial viciante da COC ¹⁶.

As propriedades simpatomiméticas da COC estão relacionadas com a já mencionada inibição da recaptação da norepinefrina através do transportador de norepinefrina (NAT). Como a COC impede essa recaptação de norepinefrina e, assim, aumenta sua disponibilidade, haverá aumento da estimulação dos recetores α e β adrenérgicos e aumento da resposta adrenérgica, o que está relacionado às acentuadas propriedades vasoconstritoras da COC ^{17, 18}.

Além disso, a COC também tem a capacidade de atingir diretamente os opióides adrenérgicos, N-metil-D-aspartato (NMDA) e os recetores sigma e kappa. Recentemente, foi sugerido que a ação farmacológica da cocaína sobre o DAT pode não ser tão simples quanto a inibição da função de recaptação do transportador isoladamente, pois seu comportamento é diferente de outros inibidores do DAT de igual ou maior potencia (com igual capacidade de atravessar a BHE) e se assemelha ao metilfenidato (um inibidor da recaptação de norepinefrina-dopamina que também induz a liberação sináptica de dopamina). Como tal, foi levantada a hipótese de que, semelhante às anfetaminas, a COC funciona como um modulador alostérico negativo do DAT (ou seja, um "agonista inverso" do DAT), alterando a função do transportador e invertendo a direção do transporte do DAT ¹⁹.

4. Toxicocinética

Nas seguintes linhas apresenta-se de forma resumida a toxicocinética da COC.

A COC é administrada principalmente por 4 vias, sendo elas: oral, intranasal, intravenosa e inalatória (através do fumo). O seu consumo isolado, ou em conjunto com outras substâncias, como outras drogas ou álcool, influencia a intensidade e duração do seu efeito ^{6, 20}.

A administração desta substância por via intranasal, resulta num alastramento lento pela mucosa, e só depois é absorvido, exercendo um grande efeito vasoconstritor e conseqüentemente, fazendo com que o fluxo sanguíneo da região fique reduzido. Desta forma, a absorção da droga é mais lenta e duradoura. O consumo por via oral também resulta numa taxa de absorção lenta, devido ao tempo que leva a chegar ao estômago e posteriormente, ao intestino. O uso de crack por via pulmonar deriva numa penetração rápida, levando à absorção eficiente pelos alvéolos pulmonares até à corrente sanguínea. Relativamente à duração dos efeitos, a via pulmonar apresenta uma duração de 5 a 15 minutos, enquanto que a via intravenosa possui uma extensão de efeitos entre 20 a 60 minutos. As vias intranasal e oral apresentam concentrações menores, mas um efeito prolongado devido às baixas taxas de absorção. Na tabela 1, constam alguns parâmetros farmacocinéticos, tempos de ação e biodisponibilidade ^{6, 20, 21}

Tabela 1 - Tempos de ação da COC. Adaptado de Pinheiro ⁶, Zimmerman *et al.* ²⁰, Goldstein *et al.* ², Pergolizzi *et al.* ²² e Cunha *et al.* ²³

	Via intravenosa	Via pulmonar	Via intranasal	Via oral
Início da ação	10-60 sec	3-5 sec	1-5 min	30-60 min
Pico da ação	3-5 min	1-3 min	20-30 min	60-90 min
Duração da ação	30-60 min	5-15 min	1-2 horas	60-120 min
Biodisponibilidade	-	> 90%	≅ 80%	-

A metabolização da COC advém da ação de duas enzimas presentes em vários órgãos como o coração, estômago, rins e fígado. Essas enzimas são a carboxilesterase 1 (hCE-1) e a carboxilesterase 2 (hCE-2), resultando em metabolitos inativos ou menos ativos, quando comparado com a droga original. Existem também metabolitos que são ainda mais tóxicos que a droga mãe, como é o caso da NCOC.

A principal via de eliminação da COC é por hidrólise química, formando a BEG, e por esterases enzimáticas hepáticas e plasmáticas, formando EME, com tempos de semi-vida de aproximadamente 6 a 8 horas e 2 a 4 horas, respetivamente ^{20, 24, 25}. Estes compostos, os dois metabolitos principais da COC, são hidrossolúveis e podem ser detetados por 14 a 60 horas em amostras de urina. A EME apresenta duas formações, sendo a anidroecgonina metil éster (AEME), quando ocorre a inalação de crack, e EME, quando a COC é fumada ^{26, 27}. A COC apresenta um tempo de semi-vida mais curto, entre 45 a 90 minutos, por este motivo é eliminada através da urina 4 a 6 horas após o seu consumo, podendo ser detetada até 24-36 horas após a sua excreção. Existem ainda metabolitos minoritários como a norcocaína (NCOC), originária da desmetilação enzimática da COC mediada pelo citocromo P450 (CYP3A4), e o COET ^{22, 28}, sendo um metabolito de transesterificação quando etanol e COC são ingeridos juntos, apresentando um tempo de semi-vida de 2,5 horas ^{20, 25, 28}. A NCOC é um metabólito altamente hepatotóxico capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e representa aproximadamente 5% da COC absorvida ^{2, 29}. A BEG e a EME podem sofrer mais *N*-desmetilação por CYP, produzindo norbenzoilecgonina e noregonina metil éster, respetivamente ³⁰. Metabólitos secundários adicionais são a meta-hidroxibenzoilecgonina, a *para*-hidroxibenzoilecgonina, a *meta*-hidroxicocaína, a ecgonidina e o éster metílico de norecgonidina ^{26, 31}.

Relativamente à toxicidade, estudos mostraram que o COET apresenta uma dose letal 50 (LD₅₀) menor (62 mg/Kg) que o da COC (95,1 mg/Kg), sendo este facto, mais uma causa para o aumento de casos mortais quando se juntam estas duas substâncias ³. A COC não metabolizada, poderá ser detetada entre 3 a 6 horas após consumo ^{24, 27, 32-34}.

A COC, assim como os seus metabolitos, são eliminados principalmente por via urinária, sendo possível detetar entre 85 a 90% dos compostos numa amostra de urina. Geralmente sob a forma de BEG e EME (principais metabolitos excretados), mantendo-se estáveis nas amostras dependendo do pH e temperatura ^{35, 36}. A restante percentagem de 1 a 5%, corresponde à COC inalterada.

Assim sendo, os principais produtos da COC detetados em amostras biológicas são:

- ✓ COC;
- ✓ BEG;
- ✓ AEME;
- ✓ EME;
- ✓ COET;
- ✓ NCOC.

Neste trabalho apenas foram englobados cinco destes compostos, estando descrito posteriormente um breve resumo sobre cada um, relativamente às propriedades químicas.

5. Propriedades Químicas

5.1. Cocaína

A COC (figura 2) é utilizada como um anestésico local, durante procedimentos diagnósticos e cirurgias nas cavidades nasais.

Estruturalmente é um alcalóide tropanico composto por uma região hidrofóbica onde se encontra um anel benzeno, e por uma região hidrofílica que consiste numa amina ^{37, 38}.

As propriedades químicas da COC estão descritas na Tabela 2.

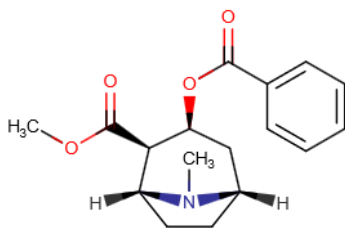


Figura 2 - Estrutura da cocaína. Adaptado de DrugBrank Online ³⁸.

Tabela 2 - Propriedades químicas da COC ^{7, 33, 37, 38}.

Propriedades	Cocaína
Nome IUPAC (União Internacional da Química Pura e Aplicada)	metil(1R,2R,3S,5S)-3-(benzoiloxi)-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octano-2-carboxilato
Fórmula molecular	C ₁₆ H ₁₉ NO ₄
Massa molecular	303,35 g/mol
Classe	Benzeno e substitutos derivados
Sub-classe	Ácidos benzóicos e derivados
Mecanismo de ação	Produz anestesia inibindo a excitação das terminações nervosas ou bloqueando a condução nos nervos periféricos
pKa	8,61 a 15 °C (composto básico)
Ponto de fusão	98 °C

5.2. Benzoilecgonina

A BEG (figura 3) é o principal ingrediente farmacêutico do medicamento Esterom[®]. Este medicamento é uma solução tópica para alívio de dores musculares, mas ainda se encontra em fase experimental por não ter sido aprovado pela FDA.

A BEG é um metabolito farmacologicamente inativo, considerado o composto principal para monitorização do consumo de COC, devido à sua alta afinidade com as proteínas plasmáticas, e conseqüentemente apresentar um tempo de semi-vida superior ao da COC ^{37, 38}.

As propriedades químicas da BEG estão descritas na Tabela 3.

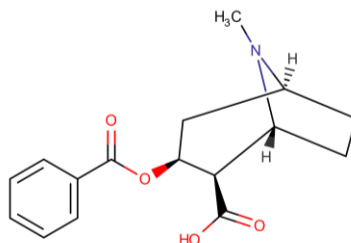


Figura 3 - Estrutura da BEG. Adaptado de DrugBrank Online ³⁸.

Tabela 3 - Propriedades químicas da BEG ^{37, 38}.

Propriedades	Benzoilecgonina
Nome IUPAC	(ácido 1R,2R,3S,5S)-3-(benzoiloxi)-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-2-carboxílico
Fórmula molecular	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄
Massa molecular	289,32 g/mol
Classe	Benzeno e substitutos derivados
Sub-classe	Ácidos benzóicos e derivados
pKa	9,54 (composto básico)
Ponto de fusão	195 °C

5.3. Ecgonina metilester

A EME (figura 4) é um metabolito farmacologicamente inativo, formado no plasma e fígado, por ação da acetilcolinesterase (PChE) e hCE-2, respetivamente. Encontra-se em menores concentrações que a BEG, apresentando um tempo de semi-vida inferior, devido a sofrer uma hidrólise espontânea dando origem à ecgonina (EC) ²⁸.

As propriedades químicas da EME estão descritas na Tabela 4.

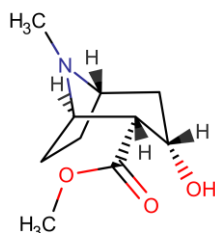


Figura 4 - Estrutura da ecgonina metilester. Adaptado de DrugBrank Online ³⁸.

Tabela 4 - Propriedades químicas da EME ³⁷.

Propriedades	Ecgonina metilester
Nome IUPAC	metil(1R,2R,3S,5S)-3-hidroxi-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octano-2-carboxilato
Fórmula molecular	C ₁₀ H ₁₇ NO ₃
Massa molecular	199,24 g/mol
Classe	Alcalóides de tropano
Mecanismo de ação	Produz anestesia inibindo a excitação das terminações nervosas ou bloqueando a condução nos nervos periféricos
pKa	9,04 (composto básico)

5.4. Cocaetilenol

A ingestão de álcool (etanol) combinado com COC, faz com que a via metabólica da COC seja diferente, dando origem a um metabolito psicoativo chamado COET. Até aos dias de hoje, é a única substância psicoativa formada inteiramente dentro do corpo.

O COET (figura 5) apresenta propriedades semelhantes à droga original, sendo por isso considerado o seu homólogo ativo, mas provoca efeitos mais duradouros. Possui também um maior poder cardiotoxíco ^{37, 39}.

As propriedades químicas do COET estão descritas na Tabela 5.

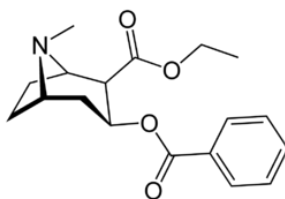


Figura 5 - Estrutura do cocaetilenol. Adaptado de Pergolizzi *et al.* . ²².

Tabela 5 - Propriedades químicas do COET Adaptado de Rosado *et al.* ²⁷.

Propriedades	Cocaetileno
Nome IUPAC	etil(1R,2R,3S,5S)-3-(benzoiloxi)-8-metil-8- azabiciclo[3.2.1]octano-2-carboxilato
Fórmula molecular	C ₁₈ H ₂₃ NO ₄
Massa molecular	317,38 g/mol
Classe	Benzeno e substitutos derivados
Sub-classe	Ácidos benzóicos e derivados
Mecanismo de ação	Bloqueia a recaptação de dopamina e aumenta a atividade neuronal pós-sináptica
pKa	8,77 (composto básico)

5.5. Norcocaína

A NCOC (figura 6) é um metabolito maioritário da COC, correspondendo a 5% da COC absorvida, mas apresenta um perfil altamente hepatotóxico e é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica.

O composto NCOC é descrito como um anestésico local mais potente que a droga original, sendo eficaz na inibição da captação de noradrenalina pelos sinaptossomas cerebrais ²⁸.

As propriedades químicas da NCOC estão descritas na Tabela 6.

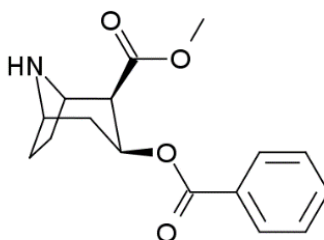


Figura 6 - Estrutura da NCOC. Adaptado de Ambach *et al.* ⁴¹.

Tabela 6 – Propriedades químicas da NCOC ^{28, 38, 40, 41}.

Propriedades	Norcocaína
Nome IUPAC	metil(1R,2R,3S,5S)-3-(benzoiloxi)-8-azabiciclo[3.2.1]octano-2-carboxilato
Fórmula molecular	C ₁₆ H ₁₉ NO ₄
Massa molecular	289,33 g/mol
Classe	Benzeno e substitutos derivados
Sub-classe	Ácidos benzóicos e derivados
Mecanismo de ação	Produz anestesia inibindo a captação de noradrenalina pelos sinaptossomas cerebrais.
pKa	9,56 (composto básico)
Ponto de fusão	82 °C

6. Efeitos e toxicidade

A toxicidade da COC já foi determinada em diversos estudos através da DL_{50} em diferentes modelos animais, como ratos e cães, com valores de 95,1 e 21 mg/Kg, respetivamente. A toxicidade em humanos, assim como os efeitos físicos, psicológicos e comportamentais, dependem do perfil do consumidor, via de administração, dose e combinação com outras substâncias.

Uma vez na corrente sanguínea, a COC espalha-se pelo organismo, exercendo efeitos em vários órgãos. Um deles é o cérebro, provocando efeitos como a euforia, e consequente aumento de sociabilidade, aumento do estado de alerta e consequente sensação de energia, diminuição de cansaço e apetite. Estes efeitos são a principal razão pelo consumo desta droga, existindo também efeitos negativos como efeitos psicogénicos, elevação da pressão arterial, aceleração dos batimentos cardíacos, pupilas dilatadas e aumento da temperatura corporal ⁶. Este aumento de temperatura pode causar coagulação intravascular disseminada, rabdomiólise e outros efeitos ²⁸. Após o término da euforia, vêm efeitos como a depressão e falta de ânimo, devido à ação inibitória da desativação de neurotransmissores relacionados com o prazer. À medida que o uso se torna repetitivo, as doses vão sendo maiores, assim como as suas consequências. Podem surgir sintomas incluindo agressividade, ataques de pânico, paranoia, cefaleias, alucinações, insónias e falta de apetite ⁶. Em casos mais graves, podem ocorrer complicações de saúde como acidente vascular cerebral (AVC) hemorrágico e isquémico, enfarte do miocárdio, dissecação de aorta, insuficiência cardíaca, crises convulsivas, síndromes neurológicas, rinite crónica, asma, hemorragia pulmonar, úlceras gástricas e perfurações, isquemia do pâncreas, botulismo, entre outros ^{6, 20, 28}.

7. Tratamento em caso de intoxicação ou sobredosagem

No caso de ser necessária ajuda hospitalar, não existe um tratamento específico, mas tipicamente é administrado lorazepam por via intravenosa ou intramuscular. Este ansiolítico age no sistema nervoso central e é administrada essencialmente para controlar a agitação do paciente. Desta forma ajuda a aliviar problemas cardíacos e reduz o risco de ataque cardíaco e AVC ^{20, 42}.

8. Cocaína e o seu consumo

A COC é uma das drogas ilícitas cuja produção, venda e uso são proibidos pelas leis nacionais e internacionais, pois existem estudos e casos clínicos que demonstram os elevados riscos para a nossa saúde ⁴³.

Infelizmente, a produção e consumo de drogas ilícitas tem vindo a aumentar significativamente ao longo dos anos. De acordo com o Relatório Europeu sobre drogas 2021 ⁴⁴, estima-se que cerca de 83 milhões de pessoas pertencentes à União Europeia (EU) tenham consumido drogas ilícitas pelo menos uma vez na vida.

Entre 2018 e 2019, houve um aumento acentuado no consumo de substâncias ilícitas a nível europeu, tendo liderança a canábis, COC e ecstasy. Em 2019, a COC continuou em segundo lugar no ranking das drogas mais consumidas, e a terceira droga mais apreendida a nível europeu. Estes dados revelam existir uma subida permanente da oferta deste estupefaciente, sendo um problema preocupante, uma vez que a sua pureza tem vindo a aumentar, levando ao incremento do número de internamentos, aparecimento de problemas de saúde, e morte por *overdose*. Analisando os dados fornecidos em 2019, foi possível verificar que a COC, principalmente na presença de opiáceos, esteve envolvida em mais de metade das mortes comunicadas em Espanha, e em mais de um quarto em França.

No ano de 2020 o cenário alterou-se, devido ao começo da pandemia de COVID-19. O consumo de canábis sofreu um aumento brusco, enquanto houve um decréscimo no consumo de ecstasy e COC. Este aumento surgiu devido às propriedades acalmantes da canábis, tendo ajudado na diminuição do *stress* causado pelo isolamento social e consequentemente auxiliou na diminuição de insónias. No caso da COC e ecstasy, a sua redução esteve relacionada com o fecho de bares, discotecas e espaços propícios à utilização destas drogas, devido aos seus efeitos de euforia, entre outros mencionados anteriormente. Atualmente, apesar de terem acontecido estas alterações durante o período de COVID-19, com o regresso à normalidade, veio também o regresso aos antigos padrões de consumo destas substâncias ^{44, 45}.

Uma forma de avaliar o consumo de uma população é através da identificação de compostos em águas residuais (AR's).

Na EU, as concentrações de BEG observadas em AR's, indicam que o consumo de COC continua a ser elevado na Europa Ocidental e Sul, particularmente em cidades como Bélgica, Países Baixos e Espanha. Relativamente à Europa Leste, os níveis de COC permanecem mais baixos, mas os dados mais recentes mostram sinais de aumento de consumo (Figura 7)⁴⁶.



Figura 7 - Distribuição geográfica europeia do consumo de cocaína. Adaptado de European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) 47.

Relativamente a Portugal, a taxa de consumo no Porto foi de 237,8 mg/1000p/dia, e em Lisboa foi de 404,51 mg/1000p/dia (Figuras 8 e 9), tendo tendência no aumento deste valor em Lisboa e em outros países (Figura 10) 47.

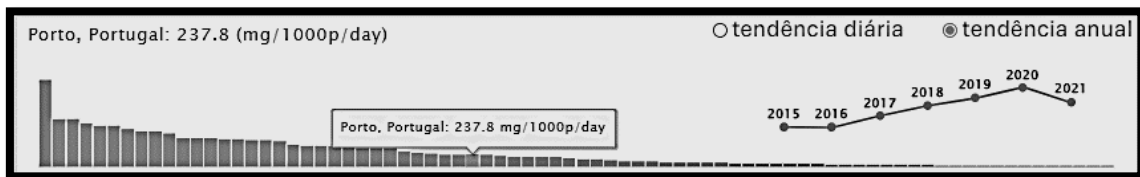


Figura 8 - Taxa de consumo em Porto referente ao ano de 2021. Adaptado de EMCDDA 47.

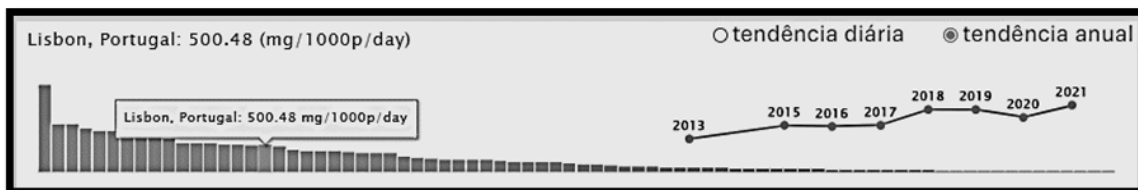


Figura 9 - Taxa de consumo no Lisboa referente ao ano de 2021. Adaptado de EMCDDA 47.

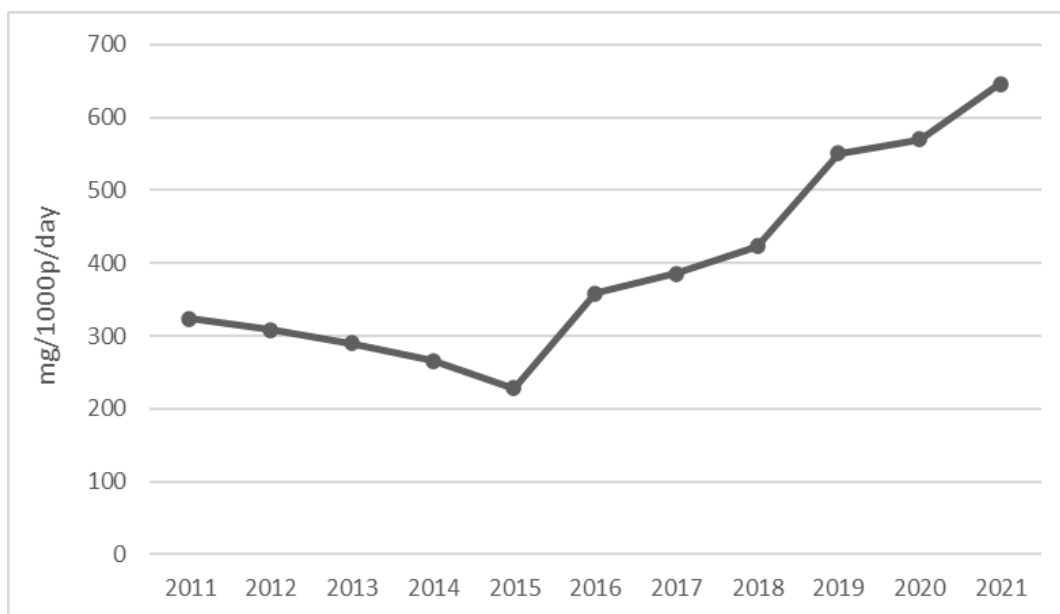


Figura 10 - Tendências das quantidades médias diárias de BEG em miligramas por 1 000 habitantes em Antuérpia Zuid (Bélgica), Zagreb (Croácia), Paris Seine Centre (França), Milão (Itália), Eindhoven e Utrecht (Países Baixos), Castellón e Santiago (Espanha). Adaptado de EMCDDA ⁴⁶.

Esta recuperação de mercado demonstrou a elevada capacidade de adaptação dos traficantes a novas circunstâncias, levando à diversificação do fornecimento de COC para a Europa e assim dificultar a apreensão desta droga, e aumentar a disponibilidade da mesma, levando a uma crescente preocupação perante um aumento significativo e constante no consumo de COC ⁴⁴.

Por este motivo, e respetivas consequências, é importante conhecer o padrão de consumo destas drogas, a fim de reduzir este problema.

9. Métodos de análise para avaliação do consumo de drogas de abuso

A análise do consumo de substâncias ilícitas permite conhecer quais as drogas mais utilizadas, os países e respetivas regiões onde o consumo aumenta, análise de preço, pureza, rotas, e outros aspetos que ajudam a caracterizar o tráfico existente.

A averiguação destes aspetos possibilita uma atuação no combate ao tráfico, consumo, e reger legislações que ajudem na diminuição desta problemática ⁴⁸.

A forma mais comum de realizar esta análise é através dos métodos tradicionais, baseando-se em dados médicos, inquéritos à população e estatísticas criminais. As limitações destes métodos incluem elevados custos, pouco objetividade, não refletem a realidade imediata, e existe a probabilidade de as repostas não serem confiáveis. Assim

sendo, é importante seguir outras abordagens mais económicas e precisas, como é o caso da análise de AR's ^{43, 48}.

O estudo epidemiológico baseado em AR's encontra-se em desenvolvimento em todo o mundo e é usado na pesquisa de biomarcadores de consumo, sendo um método mais económico, preciso e fiável. Este método foi proposto pela primeira vez por Daughton em 2001 ⁴⁹, tendo sido implementado pela primeira vez em 2005 por Zuccato *et al.* ⁵⁰, permitindo efetuar um estudo em tempo real sobre as substâncias psicoativas presentes e respetivos metabolitos, através de vários métodos de extração e deteção. Após análise e tratamento de resultados, é possível estimar os consumos de drogas ilegais, por meio de um cálculo retroativo conhecendo as populações servidas pelas respetivas estações de tratamento de AR's ^{43, 48}.

Apesar de haver muitos pontos favoráveis neste tipo de metodologia, existem também algumas limitações como a estabilidade dos metabolitos nas AR's, e o surgimento de novas drogas sem estudos suficientes que permitam a sua deteção ⁵¹.

Um aspeto importante na deteção de drogas utilizando as AR's está relacionado com a complexidade da matriz, requerendo um pré-tratamento das amostras antes de se efetuar a deteção ⁴⁸. Dentro do diverso leque de técnicas de pré-tratamento das amostras destaca-se a extração em fase sólida, que foi a técnica utilizada nesta dissertação e sobre a qual se segue uma breve introdução.

10. Técnicas de preparação das amostras

A preparação das amostras representa a maior fonte de imprecisões, inexatidões e é a etapa mais demorada de toda a análise. Por estes motivos, torna-se cada vez mais importante desenvolver processos mais rápidos, mais rentáveis e ecológicos ⁵².

Num processo de análise cromatográfica o objetivo da preparação da amostra é extrair os analitos de interesse presentes numa matriz para um solvente, e desta forma é possível melhorar a sensibilidade da metodologia ⁵³. A forma como se manipula a matriz determina a reprodutibilidade dos resultados, uma vez que pode influenciar negativamente o rendimento de extração e, conseqüentemente, todo o processo a seguir.

Existem diversas técnicas que podem ser aplicadas individualmente ou em conjunto, dependendo da complexidade da amostra, natureza da matriz e tipos de analitos. A escolha entre as diferentes técnicas vai depender da velocidade de extração, complexidade da instrumentação, flexibilidade e robustez da metodologia a ser desenvolvida ⁵⁴.

A extração seletiva atua com base nas diferenças de propriedades químicas e físicas: massa molecular, solubilidade, polaridade e volatilidade. A eficiência da técnica de extração está relacionada com a composição da amostra, tipos de solventes utilizados e respectivas concentrações, tempo de extração, temperaturas, entre outros fatores. De forma a representar um bom método extrativo, o mesmo deve ser reprodutível, prover elevadas recuperações, ser o mais automatizado possível e envolver o mínimo de passos necessários ⁵⁵.

Os procedimentos de extração mais comuns para AR's incluem técnicas como extração líquido-líquido (LLE) e SPE ⁵⁶. Esta última técnica foi a escolhida para a realização do presente trabalho, devido a ser menos demorada, requerer menor quantidade de solventes orgânicos e permitir uma maior seletividade.

10.1. Extração em Fase Sólida

A SPE foi proposta em 2001 pela primeira vez por Daughton ⁴⁹. Posteriormente, Zuccato *et al.* ⁵⁰, foram os pioneiros na determinação da COC e BEG em AR's, recorrendo à extração em fase sólida (SPE) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS). Esta determinação realizou-se em Itália e, desde então, vários outros países desenvolveram vários métodos analíticos baseados em SPE para a deteção de substâncias ilícitas em AR's ⁵⁷.

Esta técnica é vastamente utilizada, pela possibilidade de separar os analitos de interesse da matriz da amostra e eliminação de substâncias que podem interferir com a análise de forma automatizável, viabilizando a sensibilidade do método. Para além destas vantagens, permite ainda um elevado nível de recuperação em tempo reduzido, pode ser usada para métodos de concentração, torna-se um procedimento fácil de executar e adapta-se à análise cromatográfica ^{48, 58}.

A SPE consiste na retenção dos analitos presentes numa fase líquida, no material adsorvente mantido num cartucho, discos, pipetas ou seringas. Os cartuchos são o formato de SPE mais aplicados devido à sua ampla disponibilidade comercial. No entanto, algumas desvantagens são a perda de analito e entupimento. Em contrapartida, os discos têm uma vida útil mais longa, mas são mais caros e ainda apresentam limitações na sua aplicabilidade e limpeza ⁵⁹.

O protocolo de extração utilizando SPE consiste na aplicação de 5 etapas: acondicionamento, adição da amostra, lavagem, secagem e eluição (figura 11).

Primeiramente o cartucho deve ser acondicionado de forma a reter os compostos desejados, através de um solvente orgânico definido. Após a etapa de acondicionamento, a amostra (no estado líquido) é colocada no cartucho e posteriormente podem ser aplicadas uma ou mais etapas de lavagem, a fim de remover

interferentes indesejáveis. Depois, sucede-se a secagem do cartucho. Na última etapa, ocorre a eluição do analito, que acontece por meio do fornecimento de um ambiente mais propício para o mesmo, favorecendo a sua passagem do sistema SPE, para uma fase líquida ^{48, 58}.

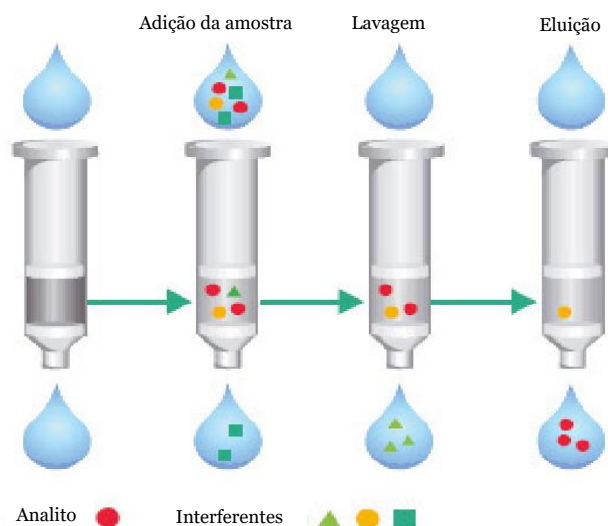


Figura 11 - Representação esquemática das etapas de extração do método SPE. Adaptado de Humbert *et al.* ⁶⁰

As colunas ou cartuchos, podem ser preenchidos pelos analistas, no entanto atualmente, de modo a agilizar esse trabalho e diminuir o tempo de execução, são comercializados já preparados com a fase sólida ⁴⁸. Estes preenchimentos sólidos desempenham um papel crucial no procedimento do SPE, pois a sua seletividade tem uma influência notável na precisão dos resultados e defluência na etapa de lavagem, uma vez que depende da afinidade entre a fase sólida e o analito alvo ⁵⁹.

As fases sólidas são classificadas em quatro grupos principais: fase normal, fase reversa, exclusão molecular ou troca iônica. Existem ainda métodos que combinam fase reversa e troca iônica, denominado por modo misto. A composição do suporte de extração varia dependendo do analito em estudo.

Existem diversas marcas que dispõem destes tipos de material, mas para as AR's, os mais utilizados são do tipo Oasis[®] e Strata[®] ⁴⁸.

Os cartuchos Oasis[®] HBL (Hydrophilic-Lipophilic-Balanced) da marca Waters contêm um adsorvente de fase reversa. Apresenta condições para um equilíbrio hidrofílico e lipofílico, sendo considerado um método amplo, que permite a sua aplicação numa vasta gama de objetivos ^{48, 59}. Os cartuchos Oasis[®] MCX (Mixed-mode cation-exchange) é bastante seletivo para bases, devido ao facto de apresentar um enchimento misto, com troca catiónica e fase reversa para bases ⁴⁸.

Os cartuchos Strata® da Phenomenex, apresenta dois produtos semelhantes aos da Oasis®, sendo eles o Strata™-X-C e o Strata™-X⁴⁸. Strata™-X é um polímero que possui propriedades hidrofílicas, e é praticamente universal, podendo ser empregue para analitos ácidos, básicos e neutros⁵⁹. Este é semelhante aos cartuchos HLB. Strata™-X-C funciona por troca catiónica (carga positiva), permitindo reter compostos básicos como bases fracas, como é o caso da COC e os seus metabolitos, isolando-os através de uma sílica com grupos de ácido sulfónico alifático. O principal mecanismo de retenção dos compostos é baseado na atração electrostática do grupo funcional do analito para o grupo que se encontra ligado à superfície da sílica⁶¹.

Neste trabalho foram testados dois tipos de cartuchos: Oasis® MCX e Strata™-X-C.

10.2. Cromatografia

A cromatografia é uma técnica que permite a separação, identificação e purificação de componentes alvos inseridos numa matriz, para análise qualitativa e quantitativa. Este método apresenta uma fase estacionária (fixa) e uma fase móvel (move-se). Os analitos de interesse encontram-se na fase estacionária e são separados através de um fluxo gerado pela fase móvel. Este processo de separação depende de fatores como as características moleculares de adsorção (líquido-sólido), partição (líquido-líquido) e afinidade ou diferença entre pesos moleculares. Um analito que tenha maior afinidade com a fase estacionária, move-se mais lentamente ao longo da coluna, resultando na separação deste composto de outros componentes que têm maior afinidade com a fase móvel. De forma a existir separação entre compostos, tem de existir diferenças na sua distribuição⁶².

Existem diversos tipos de cromatografia, que podem ser usados consoante o objetivo final. Neste trabalho apenas é abordada a técnica GC-MS/MS, uma vez que foi a técnica analítica utilizada nesta dissertação.

10.2.1. Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massa

A GC tem sido utilizada em diversos métodos analíticos devido à sua versatilidade, e por ser compatível com vários sistemas de deteção diferentes. Desta forma, permite não só uma análise qualitativa, como uma análise quantitativa, com alto desempenho e precisão.

Esta é uma técnica que permite a separação de compostos químicos inseridos numa matriz complexa, onde a fase móvel é um gás inerente (geralmente Hidrogénio, Hélio ou Azoto), que arrasta a amostra pela coluna cromatográfica, em sequência da unidade de injeção (injetor). Os analitos alvo são vaporizados na unidade de injeção e

transportados pela fase móvel até à coluna. Uma vez na coluna, a amostra é separada através da fase estacionária, sendo responsável pela separação dos diferentes compostos através dos tempos de retenção, ou seja, o tempo que o composto demora a chegar à saída da coluna ⁶²⁻⁶⁴. A composição de um sistema (figura 12) inclui ainda, um forno (onde se encontra a coluna), detetor e um *software* de tratamento de dados. O detetor é responsável pela identificação de sinais eletrónicos, enquanto o *software* transforma esses sinais em picos cromatográficos ^{62, 63}.

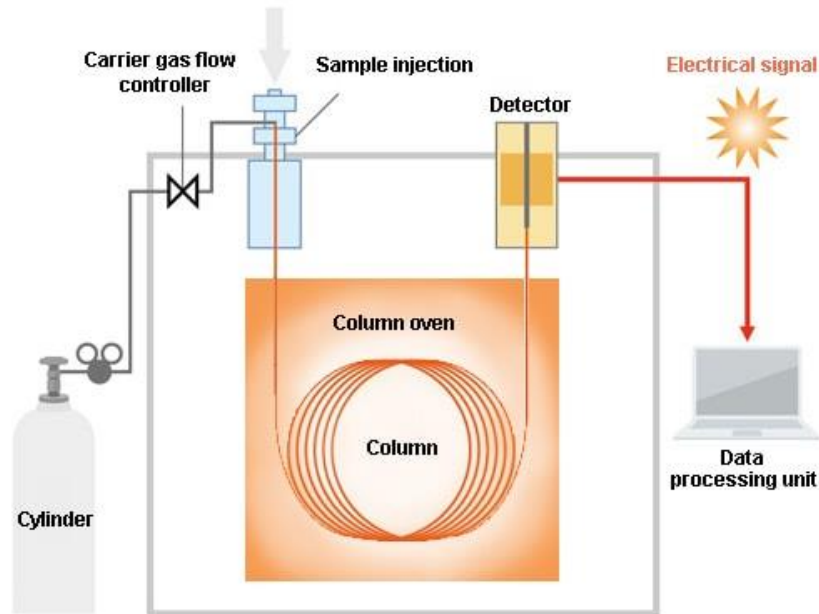


Figura 12 - Composição de um Sistema GC. Adaptado do site da corporação Shimadzu ⁶⁴.

Os picos cromatográficos compõem um cromatograma (figura 13). O eixo horizontal representa os tempos de retenção e o eixo vertical indica a intensidade do sinal. A linha de base é a parte em que nada é detetado ⁶⁴.

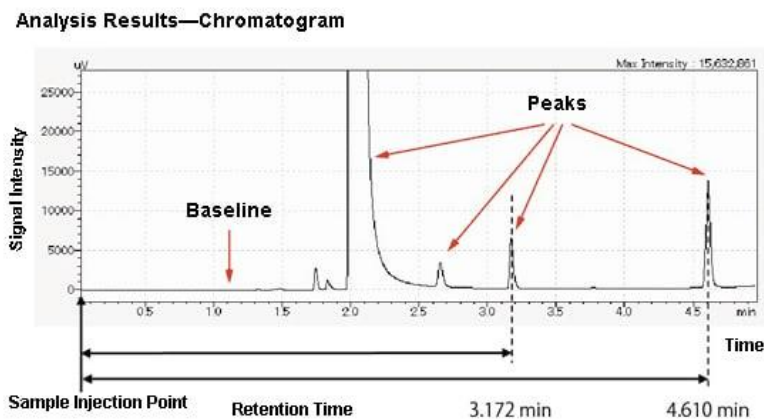


Figura 13 - Composição de um Cromatograma. Adaptado do site da corporação Shimadzu ⁶⁴.

Existem diversos tipos de detetor que podem ser conectados a um equipamento de GC, como o detetor de ionização de chama (FID), condutibilidade térmica (TCD), captura de elétrons (ECD), fotoionização (PID), espectrometria de massa (MS), entre outros. Neste trabalho irá ser abordado o detetor de espectrometria de massa em tandem (MS/MS) ⁶⁴.

A MS é o método de eleição para a detecção de substâncias ilícitas, podendo acoplar-se à cromatografia líquida e GC ⁴⁸.

A MS quando combinada com a GC é conhecida como GC-MS. Este tipo de detetor suporta uma vasta gama de aplicações, devendo-se ao facto de ter uma elevada sensibilidade, mesmo quando as concentrações do composto em estudo são baixas, permitindo uma distinção nítida, mesmo quando os tempos de retenção (RT's) são próximos. O detetor MS possui uma fonte de ionização, onde ocorre a ionização dos analitos, um analisador, responsável pela separação dos iões consoante a razão massa/carga (m/z) e detetor, que faz a geração de sinais elétricos, sendo posteriormente alterados pelo *software* de forma a obtermos um cromatograma.

Por sua vez, a espectrometria de massa sequencial, denominada igualmente por tandem, MS/MS ou MS², dispõe de três analisadores titulados de quadropolos (Q1, Q2 e Q3). O compartimento Q1 funciona como um filtro de massa, usado para isolar o ião precursor. O Q2 é onde ocorre a fragmentação do ião pai em iões filho, enquanto o Q3 é utilizado para estabelecer uma relação entre o ião precursor isolado e os iões gerados a partir da fragmentação induzida, com o auxílio do gás inerente (fase móvel).

Quando se combina espectrometria de massa em tandem à GC, o sistema é denominado por GC-MS/MS. A mais-valia de recorrer à técnica GC-MS/MS recai na possibilidade de monitorizar mais que um fragmento originado pelo ião precursor (dois fragmentos qualitativos e um fragmento quantitativo). Desta forma, quando existe uma matriz complexa, os iões produto oferecem informações fidedignas da presença de um determinado composto, tornando-se assim uma confirmação analítica. O detetor mede a quantidade de elétrons gerados pelos iões, dando origem a um registo de todas as cargas detetadas durante o varrimento, constituindo assim um espectro de massa, característico de cada composto. Este espectro pode ser programado para aquisição de dados, conforme 6 modos de operação: *full scan*, SIM, Iões produto, MRM, Iões precursores e perda neutra. Os principais são ^{65, 66}:

- ✓ SCAN (varrimento) - O espectro de massa é programado de modo a apresentar uma análise de todas as massas do seu espectro de operação ou dentro de uma determinada faixa;

- ✓ SIM (monitorização seletiva de iões) - Separação de somente um ião específico, aumentando a sensibilidade;
- ✓ MRM (monitorização de reações múltiplas) – Dois ou mais iões são separados e fragmentados, dando origem a outros analitos e aumenta a seletividade do método.

10.2.2. Espectros de Massa da Cocaína e os seus Metabolitos

Como descrito anteriormente, o detetor MS produz um espectro característico para cada composto, sendo operado em modo positivo ou negativo, consoante as características do analito alvo.

A COC e os seus metabolitos são analisados no modo positivo da MS ⁴⁸.

O espectro de massa da COC, figura 14, produz um fragmento m/z 182 devido à perda de ácido benzóico da sua estrutura original. Outro fragmento menor é produzido, correspondendo à perda de uma molécula de água ou metanol (m/z 150) ^{48, 67}.

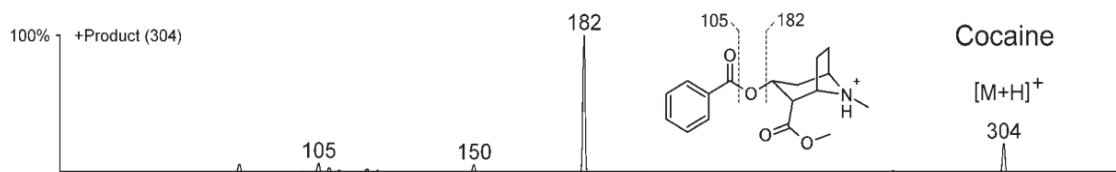


Figura 14 - Espectro de massa da COC. Adaptado de Castiglioni *et al.* ⁶⁷.

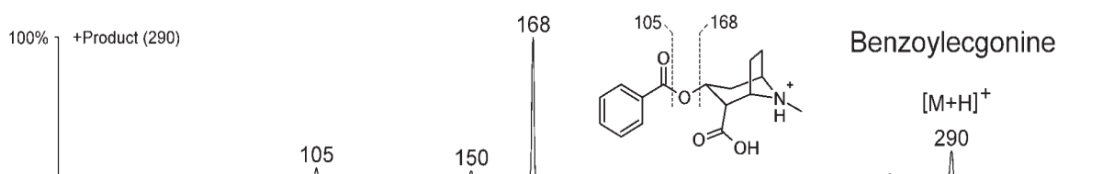


Figura 15 - Espectro de massa da BEG. Adaptado de Castiglioni *et al.* ⁶⁷.

No caso da BEG (figura 15), os seus fragmentos comportam-se da mesma forma, dando origem a um fragmento de m/z 168 e um de m/z 150 ^{48, 67}.

O COET (figura 16) apresenta um fragmento menor de 82 m/z , correspondendo a um fragmento de *N*-metilpirrolidina, e a um fragmento de m/z 196, tendo origem através da perda de ácido benzoico ^{48, 67}.

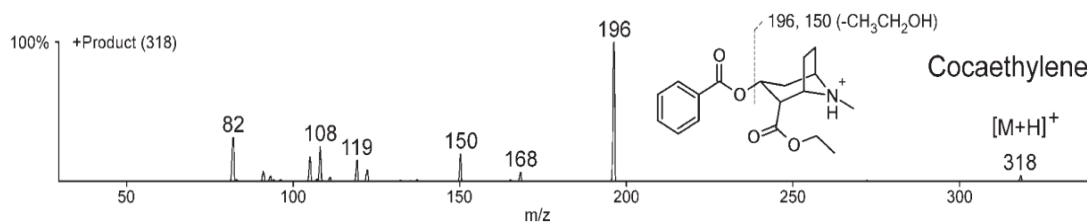


Figura 16 - Espectro de massa do COET. Adaptado de Castiglioni *et al.* ⁶⁷.

A EME tem um fragmento em comum com outro metabolito chamado de EC, de m/z 82 e que corresponde à *N*-metilpirrolidina. O que distingue estes dois metabolitos (EME e EC), são os fragmentos característicos de cada um, como pode ser observado na figura 17 ^{48, 67}.

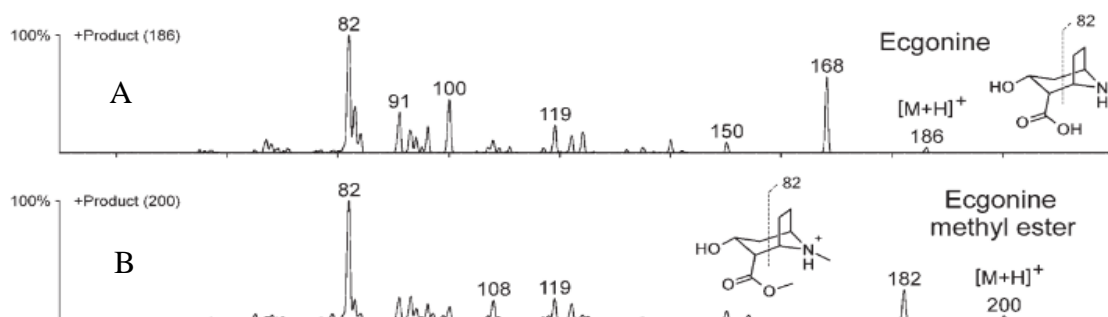


Figura 17 - Espectro de massa da EC (A) e EME (B). Adaptado de Castiglioni *et al.* ⁶⁷.

Por fim, o metabolito NCOC apresenta um fragmento com m/z 168 à conta da perda do ácido benzóico, e outro fragmento m/z 136 em virtude da perda de uma molécula de água (figura 18) ⁴⁸.

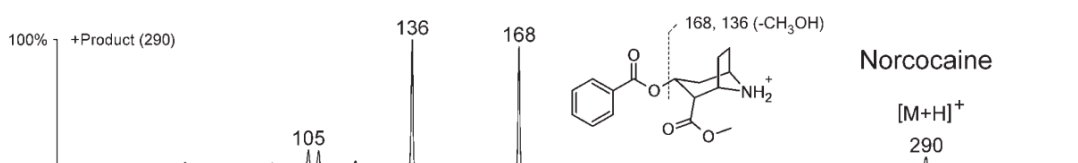


Figura 18 - Espectro de massa da NCOC. Adaptado de Castiglioni *et al.* ⁶⁷.

10.3. Validação de um método analítico

A validação visa demonstrar e garantir que um método analítico é adequado para o propósito a que se destina, tendo como objetivo a qualidade dos ensaios, de forma a obter um procedimento adequado, preciso e credível. Desta forma, a validação deve demonstrar seletividade para o analito em estudo, tendo em consideração os efeitos da matriz, fornecendo uma caracterização estatística dos resultados de vários critérios de desempenho do método ⁶⁸.

Podem ser aplicadas diferentes tipos de validações, consoante a situação. Os métodos não padronizados requerem uma validação completa, enquanto nos métodos padronizados é aplicada uma validação cruzada ou parcial. A validação cruzada aplica métodos utilizados num âmbito diferente, e a validação parcial é envidada no caso de extensão do método e quando ocorrem modificações ⁶⁹.

Todas as técnicas aplicadas aos métodos analíticos para a determinação e quantificação de drogas através da GC, estão sujeitos a parâmetros de validação. Para isso, existem diversas *guidelines* que podem ser seguidas (Agência Europeia de Medicamentos (EMA) ⁷⁰; *Ministry of Health, Labour and Welfare* (MHLW) ⁷¹; *Scientific Working group for Forensic Toxicology* (SWGTOX) ⁷²; *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) ⁷³, entre outras.

10.3.1. Seletividade

A seletividade de um método é demonstrada pela capacidade de identificar e/ou quantificar o composto de interesse inequivocamente, mesmo com todos os interferentes da matriz. Este parâmetro é de extrema importância, por garantir a ausência de interferentes que possam induzir a resultados falsos e não desejáveis.

A avaliação deste parâmetro pode ser efetivada por meio de uma matriz em branco, demonstrando a ausência de interferentes no mesmo tempo de retenção da substância a analisar, e possíveis iões de supressão ^{74, 75}. Para isso, além de analisar um branco, é importante monitorizar as intensidades relativas de cada composto, sendo necessário estabelecer critérios de aceitação.

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. A tabela 7 descreve os intervalos de aceitação utilizados para a identificação dos compostos em estudo.

Tabela 7 - Intervalos máximos de tolerância permitidos para as abundâncias relativas dos iões, monitorizados em modo MRM e expressos em percentagem (%) ⁷⁶.

Abundância relativa (%relativa ao pico base)	Intervalo máximo de tolerância permitido (%)
>50 - 100	±10 (intervalo absoluto)
>25 - 50	±20 (intervalo relativo)
1 - 25	±5 (intervalo absoluto)

Para além das abundâncias relativas, os critérios de confirmação qualitativa incluem a variação do tempo de retenção (RT) do composto, expresso pela razão entre o RT do composto e o RT do padrão interno. O tempo de retenção do composto em análise não deve diferir mais que 1% do RT do padrão interno. A razão entre o sinal do ião

diagnóstico menos intenso e o sinal correspondente ao ruído da linha base deve ser superior a 3:1 ⁷⁶.

10.3.2. Linearidade e Curva de Calibração

A linearidade de um método analítico é a sua capacidade de produzir resultados de teste proporcionais à concentração de analitos dentro de um intervalo especificado ou com a ajuda de ajustes matemáticos já descritos. Para estes testes, são injetadas diferentes concentrações dos analitos de estudo (calibradores), abrangendo a gama de concentração prevista em amostras reais, de forma uniforme e incluindo o limite inferior de quantificação (LOQ) definido para o método. Dependendo das *guidelines* de validação utilizadas, o número de calibradores pode ir até seis ou sete no mínimo. A sua preparação consiste na adição de uma concentração conhecida a amostras de branco ^{75, 77}. A solução utilizada como branco, varia conforme a matriz a ser estudada.

Para além dos calibradores, também se pode recorrer a *quality controls* (QC's) de forma a avaliar a precisão e exatidão do ensaio e a estabilidade. Os QC's podem ser preparados a partir da mesma solução de stock, mas em concentrações intermédias dos padrões de controlo ⁷⁵.

As curvas padrões resultantes, podem ser avaliadas por meios gráficos ou matemáticos. O modelo mais utilizado é a regressão linear simples, que assume a existência de linearidade entre duas variáveis. Esta é descrita pela seguinte expressão matemática ⁷⁵:

$$y = mx + b \tag{1}$$

Onde,

- **y** é a resposta medida;
- **x** é a concentração do analito;
- **m** é o declive da curva de calibração;
- **b** é a ordenada na origem (interseção da curva com o eixo das ordenadas).

Este modelo também permite calcular o coeficiente de determinação (r^2), sendo que o seu valor deve ser igual ou superior a 0,99, pois quanto mais próximo de 1,0, menor será a dispersão dos pontos experimentais e menor será a incerteza estimada ⁷⁵.

Outros modelos mais empregados são o de regressão linear e o quadrático, dependendo da precisão do método. Ocasionalmente, as curvas de calibração são ponderadas por $1/x$, $1/x^2$, $1/y^2$, entre outros fatores de ponderação, de forma a obter informações precisas através de recálculos ⁶⁹. Estas ponderações são utilizadas quando o desvio padrão do sinal aumenta com as concentrações, assim sendo, estas curvas de calibração

são melhores ajustadas com o uso de ponderações, permitindo uma melhor distribuição do peso atribuído a cada ponto ⁷⁸. O analista deve aplicar o modelo mais simples que descreva adequadamente a relação concentração-resposta e preparar os padrões de calibração, ou padrões de controlo, de acordo com a matriz das amostras ⁷⁵.

Os dados obtidos devem obter um coeficiente de correlação e um erro relativo médio ou *BIAS* de $\pm 15\%$, relativamente ao valor concentrações nominais (teóricas), exceto no limite de quantificação, onde o erro permitido é de $\pm 20\%$ das concentrações nominais ⁷⁵.

10.3.3. Precisão e Exatidão

A precisão expressa a proximidade entre os resultados de testes independentes obtidos em condições estipuladas. Este parâmetro divide-se em duas formas: Precisão intradia e precisão interdia. A precisão intradia é determinada através da análise de amostras adquiridas num curto espaço de tempo, de forma a não haver variação do resultado analítico devido a fatores como condições do laboratório, operador e equipamento. A precisão interdia consiste em analisar as mesmas medidas em dias diferentes ⁷⁵.

A exatidão é a concordância entre as médias dos resultados obtidos e o valor referência aceite como verdadeiro. Este parâmetro é determinado por réplicas de amostras fortificadas com quantidades conhecidas de analito. Este parâmetro pode ser avaliado de diversas formas, sendo a avaliação através do *BIAS* a mais utilizada.

A avaliação da exatidão através do *BIAS* utiliza uma fórmula (equação 2) onde são usadas as quantidades de analito calculadas por interpolação na curva de calibração e as que são adicionadas às amostras (considerado o valor aceite como verdadeiro) ⁷⁵.

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

10.3.4. Limites analíticos

É importante conhecer o valor de concentração mais baixa do analito que pode ser detetado e quantificado no decorrer do método em validação.

A atualização do limite de deteção (LOD) e do limite de quantificação (LOQ) deve ser realizada quando ocorrem alterações nos fatores de influência (analista, reagentes, equipamento, ambiente, etc) e sempre que uma nova curva de calibração é feita.

O LOD corresponde à quantidade mínima que pode ser detetado numa amostra, mas não necessariamente quantificável, e pode ser obtido de diversas formas ^{75, 79}. Geralmente a regressão linear é a abordagem mais adotada, tomando a designação de reta de calibração. O objetivo da regressão linear é encontrar um modelo capaz de estimar os valores assumidos pela variável dependente (y) quando as variáveis independentes (X_n) são conhecidas ou fixas. A metodologia mais utilizada para a sua determinação é o método dos quadrados mínimos, expresso pela seguinte fórmula:

$$SS = \sum (Y_{obs,i} - Y_{prev,i})^2 \quad (3)$$

No entanto, muitas vezes é necessário realizar um ajuste matemático, devido ao facto de existir intervalos de concentração amplos, resultando numa variância diferente para cada ponto da reta. Consequentemente as maiores concentrações tendem a influenciar bastante a reta de calibração, resultando na perda de exatidão, especialmente nos pontos mais baixos. Neste caso, é necessária a utilização do modelo de regressão linear ponderada, de forma a harmonizar as discrepâncias entre os diferentes pontos da reta. A expressão a ser minimizada toma a forma seguinte:

$$SS = \sum \frac{(Y_{obs,i} - Y_{prev,i})^2}{\sigma_l^2} \quad (4)$$

Onde,

- σ_l^2 representa a variância associada à resposta dos padrões de calibração.

O LOQ define-se pela menor concentração de um analito possível de medir e quantificar, com uma certa exatidão e precisão, com um coeficiente de variação inferior a 20% e *BIAS* num intervalo de $\pm 20\%$ da concentração calculada, e deve também ser pelo menos dez vezes superior à resposta da amostra branca ⁷⁵. Nestas situações o LOQ é designado como limite inferior de quantificação ou *lower limit of quantitation* (LLOQ).

Este parâmetro também pode ser obtido de diversas formas, mencionadas anteriormente.

10.3.5. Estabilidade

A estabilidade de um composto numa matriz depende de diversos fatores como as suas propriedades físico-químicas, propriedades da própria matriz e condições de armazenamento ⁷⁵. Existem diferentes formas de estudar a estabilidade dos compostos em estudo, pelo que se deverá optar por métodos que analisem a estabilidade de forma a abordar situações normalmente encontradas em contexto laboratorial, a menos que a estabilidade dos analitos já se encontre devidamente analisada, ou seja, através de referências publicadas ⁷².

A determinação da estabilidade deve efetuar-se a partir de materiais de referência, preparando amostras fortificadas com os analitos tanto em baixas como em altas concentrações. Estas amostras fortificadas devem ser preparadas na mesma matriz que a destinada às amostras reais e analisadas em triplicado. A metodologia a ser aplicada na análise da estabilidade das amostras deve ter em consideração as circunstâncias a que são sujeitas as amostras processadas/extratos até serem analisados ⁷².

Se fizer parte da prática padrão de um laboratório congelar as amostras antes da respetiva análise, a estabilidade dos analitos deve ser determinada após três ciclos de congelação/descongelação durante 24 horas. A descongelação não deve ser assistida, pelo que se deve realizar à temperatura ambiente. O analito será considerado estável até o sinal médio (área do pico ou razões entre a área do pico e a área do padrão interno, por exemplo) obter um *BIAS* aceitável. O *BIAS* admissível implica encontrar-se dentro dos 20% de tolerância, e caso seja necessário aplicar um critério mais limitado, essa tolerância deve ser de 10-15% ⁷².

Uma outra situação que pode surgir é não ser possível analisar de imediato a amostra preparada/extrato. Desta forma, poderá ser necessário executar a análise no dia seguinte, ou mais tarde. Nestes casos, torna-se importante determinar o período de tempo em que a amostra processada ou extratos se mantém sem sofrer alterações inaceitáveis, impedindo a deteção dos compostos, a sua identificação ou quantificação fiável. Neste estudo, deve-se fortificar amostras, realizar o seu processamento e analisar de forma a ter uma resposta comparativa. Seguidamente, são guardadas de forma igual ao que aconteceria durante o armazenamento durante a rotina laboratorial e novamente analisadas. Este ensaio deve ser realizado em triplicado e a sua avaliação é feita da mesma forma mencionada anteriormente ⁷².

10.3.6. Carryover

A transição do método para amostras reais pode conduzir a um resultado qualitativo ou quantitativo impreciso, devido ao transporte de concentrações dos compostos em estudo, para a próxima análise em sequência. O *carryover* do método de ser avaliado durante a validação do método a ser desenvolvido, com a exceção de o laboratório estar constantemente a adicionar este *carryover* à sua rotina laboratorial. A análise do *carryover* é feita em triplicado e através de brancos analisados imediatamente após uma amostra com concentração elevada ou matriz equivalente fortificada.

É aceitável limitar o estudo de transporte ao ponto mais alto da curva de calibração, mas preferencialmente devem ser testadas concentrações superiores ⁷².

10.3.7. Recuperação

As recuperações servem para assegurar que a extração é eficiente e reprodutível, sendo calculadas como recuperação média (%) dos analitos alvo.

O analista deve realizar experiências de recuperação comparando os resultados analíticos dos extratos obtidos (representando X% de recuperação), com os extratos brancos fortificados com os analitos após extração (representando 100% de recuperação) ⁷⁵.

A equação utilizada para o cálculo das recuperações encontra-se representada a seguir:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Área do pico sujeito a extração/PI}}{\text{Área do pico não sujeito a extração/PI}} \times 100 \quad (5)$$

10.4. Detecção e quantificação de cocaína em águas residuais

A literatura alusiva à deteção e quantificação de COC e dos seus metabolitos foi compilada na tabela 8.

A pesquisa bibliográfica foi baseada em dados provenientes da base de dados *PubMed* e *Google Scholar*, publicados desde 2015 até 2022, com a exceção da literatura utilizada para a introdução teórica e artigos sobre Strata[®]. As palavras-chave usadas foram “Cocaine”, “Benzoylcegonine”, “Ecgonine Methyl Ester”, “Cocaethylene”, “Norcocaine”, “GC-MS/MS and drug”, “Cocaine and its metabolites”, “SPE for Wasterwater”, “Wastewater Chromatography”, “StrataTM-X-C and Wastewater”, “StrataTM-X and Wastewater”, “Oasis[®] MCX and Wastewater”, “Oasis[®] HBL and Wastewater”, “Influent GC-MS/MS” e “Wastewater Extraction”. Os critérios tomados em conta para a seleção dos artigos foram baseados em datas de publicação, dando

preferência a estudos recentes, tipo de amostra utilizada para análise, tipo de extração usada e resultados obtidos, sendo que os dados descritos deveriam ser completos de forma a ser possível comparar com os dados obtidos neste trabalho prático. Desta forma, foram compilados 30 artigos, podendo ser consultados através da tabela 8.

A pesquisa efetuada, demonstra que a SPE é a técnica de extração mais empregue para a extração da COC e dos seus metabolitos em amostras de AR's. Os cartuchos preferencialmente utilizados são Oasis[®] MCX e Oasis[®] HLB, sendo interessante testar os cartuchos Strata[™]-X-C, pelo facto de apenas terem sido aplicados num artigo, no qual foram obtidos limites de quantificação e deteção inferiores aos reportados noutros trabalhos realizados com outros tipos de cartuchos e, apresentar taxas de recuperações acima das restantes. Apesar de não ser possível comparar um elevado número de artigos onde são implementados métodos com cartuchos Strata[™]-X-C, foi feita uma análise através do único estudo encontrado, realizou-se uma comparação entre Strata[™]-X-C com Strata[™]-X e Oasis[®] MCX com Oasis[®] HLB. A comparação entre diferentes colunas da Strata[™], engloba todos os artigos encontrados com os mesmos, enquanto a escolha de artigos para comparação entre Oasis[®] MCX com Oasis[®] HLB foi feita com base nos artigos com melhores resultados de LOD, LOQ e recuperações.

Bade *et al.*⁸⁰ realizaram a extração de BEG, através de cartuchos Strata[™]-X-C e respetiva análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS). O volume de amostra usado foi 50 mL, tendo sido filtradas e o pH ajustado para 4,5-5 utilizando para tal 28% amoníaco em água. As etapas incluídas no processo extrativo não foram mencionadas ao longo do artigo, pelo que não é possível analisar a escolha dos solventes. Contudo, são fornecidos dados referentes aos limites de deteção/quantificação e taxas de recuperação obtidas, embora sejam referentes a tipos de extração diferentes, fornecem um intervalo de possíveis resultados. Os LODs encontram-se num intervalo entre 0,01-0,5 ng/L e o LOQ entre 0,05-1 ng/L. As extrações obtiveram taxas de recuperação entre 82-119%. Apesar de não existirem outros trabalhos publicados onde tenham sido estudadas as mesmas condições de extração e análise, pode-se efetivar uma comparação com dois trabalhos onde foram utilizados cartuchos Strata[™]-X.

*Andrés-Costa et al.*⁸¹ e *Álvarez-Ruiz et al.*⁸² utilizaram volumes de 250 mL e colunas Strata[™]-X. Ambos os trabalhos condicionam os cartuchos com metanol e água, na etapa de lavagem apenas utilizam água Milli-Q e os analitos foram eluídos com metanol seguido de diclorometano. O que difere entre estes dois trabalhos são o tipo de amostra, o equipamento utilizado e os pré-tratamentos efetuados. *Andrés-Costa et al.* analisaram efluentes e efluentes tratados de AR's, obtendo LOD's de 50 ng/L para a

COC e 1 ng/L para a BEG, e LOQ's entre 1-100 ng/L. A quantificação dos compostos foi realizada por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massa em tandem com quadrupolo de tempo de voo (UHPLC-QqTOF-MS/MS), obtendo uma concentração de 15,3 ng/L e 125,1 ng/L respectivamente. Na avaliação das recuperações deste método, a maior percentagem obtida foi de 115%.

Álvarez-Ruiz *et al.* realizaram a análise de material particulado de efluentes por LC-MS/MS, alcançando um LOQ de 120-2310 ng/L para os diferentes compostos, enquanto o LOD para a COC foi de 50 ng/L e para a BEG foi de 40 ng/L. As percentagens de recuperações foram igualmente idênticas ao trabalho mencionado anteriormente. Entre estes dois últimos trabalhos, a publicação de Andrés-Costa *et al.* obteve melhores resultados, pois os autores atingiram limites mais baixos e taxas de recuperação idênticas às obtidas no artigo de Álvarez-Ruiz *et al.* Estas diferenças poderão estar relacionadas com o tipo de amostra e equipamento utilizado para respectiva análise.

Comparando os três trabalhos, os dados demonstram que o método onde se utilizam cartuchos Strata™-X-C, torna-se mais eficiente, podendo existir diferenças significativas entre os 3 artigos devido a tratar-se de amostras diferentes e métodos de análise igualmente dissemelhantes.

Liu *et al.* ⁸³ usaram uma coluna Oasis® MCX (60 mg, 3mL), enquanto que González-Mariño *et al.* ⁸⁴ fizeram uso de cartuchos Oasis® HLB com diferentes enchimentos (60 e 200 mg). Liu *et al.* ⁸³ utilizaram 50 mL de efluente como amostra e quantificaram através de GC-MS, tendo atingido um LOD de 0,0750 ng/L e LOQ de 0,250 ng/L para a BEG. Estes limites foram calculados pela razão sinal/ruído, por esse motivo são valores baixos. Relativamente às recuperações, estas foram de 98 %, comprovando que este método é bastante eficiente para além de demonstrar ser sensível para o metabolito BEG, através dos dados referidos anteriormente. González-Mariño *et al.* ⁸⁴ analisaram afluentes, efluentes e efluentes tratados, mas apenas se encontram mencionados os resultados obtidos para amostras de AR's efluentes de forma a facilitar comparações. Neste trabalho as amostras foram constituídas por 100 mL de efluente e a quantificação realizou-se através de GC-MS/MS, tendo sido obtido piores valores de LOD e LOQ, 8 ng/L e 26,4 ng/L respectivamente. A percentagem de recuperação de metabolitos em efluentes foi de 98,4%, mostrando que este método é semelhante ao anterior, em termos de eficiência.

Determinação da cocaína e seus metabolitos usando águas residuais como matriz

Tabela 8 - Métodos cromatográficos para detecção e quantificação de COC e dos seus metabolitos em amostras de AR's.

Tipo de amostra	Compostos	Volume (mL)	Método de extração	Método de detecção	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	Recuperação (%)	Referência
Efluente, Efluente tratada e Afluente	COC BEG COET EME	250	SPE (Strata™-X)	UHPLC-QqTOF-MS/MS	50 1 5 10	1-100	115 101 82 61	81
Sedimentos, Lamas e Partículas de Efluentes	COC BEG COET EME	250	SPE (Strata™-X)	LC-MS/MS	50 40	120-2310 76-102 81-106 0-75	92-114	82
Efluente	BEG	50	SPE (Oasis® MCX)	GC-MS	0,0750	0,250	98	83
Afluente, Efluente e Efluente tratada	COC BEG COET	100	SPE (Oasis® HLB)	GC-MS/MS	12 8 6	2-60	100,9 124,1 107,0	84
Efluente	BEG	50	SPE (Clean Screen® DAU, Oasis® MCX/HLB, Strata™-X-C) e fase C18)	LC-MS	0,01-0,5 85	0,05-1 85	82-119 85	80
Efluente	COC BEG COET NCOC	100	SPE (Oasis® HBL)	UPLC-MS/MS	3	10	121	86
Efluente e Efluente tratada	BEG	400	SPE (Oasis® HLB/MCX)	LC-MS/MS	7,9 5,9	23,7 17,7	111,6/87,4 107,6/n.r.	87
Efluente e Afluente	COC BEG COET NCOC	100	SPE (Oasis® HBL)	HPLC-MS/MS	130-200	500-16000	122	88
Efluente e Efluente tratada	COC BEG	240	SPE (Strata™ -Screen-C)	LC-MS/MS	625 625	625 625	n.r.	89

Determinação da cocaína e seus metabolitos usando águas residuais como matriz

Afluente e Sedimentos de Efluentes	COC BEG	1500	SPE (Bond Elut™ LRC)	GC-MS	n.r.	25 25	87-103 91-103	90
Efluente e Efluente tratada	COC BEG	500	SPE (Oasis® MCX)	GC-MS	n.r.	80	73-100 34-27	91
Efluente e Efluente tratada	COC BEG	500	SPE (Oasis® MCX)	HPLC-MS/MS	95 971	20	95 97	91
Efluente e Efluente tratada	COC BEG EME	10	SPE (Oasis® MCX)	LC-MS/MS	n.r.	5	n.r.	92
Efluente e Efluente tratada	BEG	200	SPE (UCT™ XRDAH)	LC-MS/MS	1	4	n.r.	93
Efluente	BEG	n.r.	SPE (Oasis® HBL)	LC-MS/MS	n.r.	n.r.	91-111	94
Efluente e Lama	BEG	50	Extração com Solvente Acelerado (ASE) e Extração assistida por ultrassom (USE)	UPLC-MS/MS	5	10	>75	95
Efluente	BEG	400	SPE (Oasis® MCX)	LC-MS/MS	0,08	0,250	89	96

Determinação da cocaína e seus metabolitos usando águas residuais como matriz

Efluente	BEG	250	SPE (Oasis® HBL)	LC-MS/MS	2,1-20,5	16,50	85-114	97
Efluente	COC BEG	1	SPE (Oasis® HBL)	UPLC-MS/MS	n.r.	5,00	n.r.	98
Efluente	COC BEG	5	SPE (Oasis® HBL)	UPLC-MS/MS	16,00	3,00	114-120	99
Efluente e Efluente tratada	COC BEG COET EME NCOE	50	SPE (Oasis® HLB/MCX, Supelclean™ ENVI-Carb™)	LC-MS/MS	3 30 3 30 30	10 100 10 100 100	80-100 100 100-90 90 90-50	100
Efluente e Efluente tratada	COC BEG	n.r.	SPE (Oasis® HBL)	UPLC-MS/MS	6 4	19,8 13,2	103 114	101
Efluente e Efluente tratada	COC BEG	20	Filtração	LC-MS/MS	10 20	30 n.d	n.r.	102
Efluente e Efluente tratada	COC BEG	n.r.	SPE On-Line	HPL-MS/MS	n.r.	6,1 4,6	n.r.	103
Efluente	COC BEG	50	SPE (Bond Elut™ PCX)	UHPLC-MS/MS	10 3	n.r.	n.r.	104
Efluente	COC BEG COET EME	50	SPE On-Line (PLRP-S)	LC-MS/MS	0,2 0,5 0,5 4	0,8 1,5 1,4 13	80-120	105

Determinação da cocaína e seus metabolitos usando águas residuais como matriz

Efluente	COC BEG	500 100	SPE (Oasis® MCX)	LC-MS/MS	n.r.	100	85,8-104,8	106
Efluente	COC BEG	240	SPE (Strata™-Screen-C)	LC-MS/MS	625	625	85-115	107
Efluente	COC BEG COET	10	SPE (Oasis® HBL)	UPLC-MS/MS	10 10 100	50 20 250	85-100 76-98 92-102	108
Efluente	BEG	150	SPE (Oasis® MCX)	LC-MS/MS	n.r.	10	n.r.	109

Nota¹: Os LOQ e LOD correspondem a dados provenientes da matriz e outros do equipamento utilizado para análise.

Nota²: Os dados fornecidos nesta tabela, apenas são referentes a efluentes.

Legenda: GC-MS: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa; GC-MS/MS: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa em tandem; LC-MS/MS: Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem; HPLC-MS/MS: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa em tandem; UHPLC-MS/MS: Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massa em tandem; UHPLC-MS/MS: Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massa em tandem; UHPLC-QqTOF-MS/MS: Cromatografia líquida de alta-ultra eficiência acoplada à espectrometria de massa em tandem com quadrupolo de tempo de voo; SPE: Extração em fase sólida; LOD: Limite de detecção; LOQ: Limite de quantificação.

Capítulo 2 : Justificação do tema e objetivos

Ao longo dos anos, o consumo de drogas ilícitas tem vindo a aumentar, levando a preocupações tanto a nível de saúde pública como a nível ambiental.

A COC continua a ser a segunda droga mais consumida a nível europeu e, portanto, continua a ser um grave problema provocando diversos problemas de saúde mencionados anteriormente e aumento da percentagem de *overdoses* fatais associadas ao seu consumo.

Apesar da taxa de consumo de COC apresentar valores inferiores quando comparada ao consumo de canábis, é a que provoca mais vício e apresenta efeitos adversos mais graves ¹¹⁰.

Com a pandemia e o fecho dos espaços noturnos, o consumo desta droga diminuiu, mas, atualmente, com o regresso à normalidade o consumo de ecstasy e COC tem vindo a aumentar novamente ⁴⁶. Contudo, é expectável que os consumos de drogas sofram um agravamento, devido à degradação da saúde mental da população graças ao longo período de confinamento e restrições.

O tipo de amostras preferencialmente usadas para a deteção e quantificação de drogas de abuso, com o intuito de combater tráfico de drogas, respetivo consumo e atualização de leis de forma a diminuir esta problemática, consiste em inquéritos, estatísticas criminais e dados médicos obtidos através de análises ao sangue e urina. Contudo, estas metodologias apresentam diversas limitações referidas anteriormente. Desta forma, tem vindo a aumentar o uso de AR's como matriz para a determinação indireta do consumo de drogas de abuso, por se tratar de um método mais económico, preciso, fiável, menos invasivo e com menor probabilidade de adulteração.

Por conseguinte, torna-se importante desenvolver métodos rápidos, precisos e eficazes que possam ser implementados em laboratórios de análises toxicológicas e forenses com vista à sua determinação neste tipo de matriz. Por este motivo, o presente estudo tem como principal objetivo desenvolver um método analítico adequando à análise de AR's, utilizando a SPE e a GC-MS/MS para a determinação de COC, EME, BEG, COET e NCOC.

Capítulo 3 :

Procedimento Experimental

3.1. Material e métodos

3.1.1. Material e Instrumentação

- Os cartuchos de SPE Oasis[®] MCX 30 mg da Waters (EUA), foram adquiridos à Waters Portugal, enquanto as colunas de SPE Strata[™]-X-C de 60mg/3mL, foram adquiridas à Phenomenex;
- Tubos falcon de 50 mL de polipropileno com tampa estanque da VWR (Portugal);
- Material comum de laboratório: Balões volumétricos de diferentes volumes, copos de precipitação, provetas, entre outros;
- Vortex mixer 230V, Labnet International (VWR International, Portugal);
- Câmara de refrigeração (a 4 °C), Dagard Ibérica (Portugal);
- Câmara de congelação da Electrolux – Modelo Inspire;
- Centrífuga Heraeus Multifuge IS-R, Thermo Scientific (Alemanha);
- Bloco de aquecimento “Tembloc” da J. P. Selecta (Reagente 5, Portugal);
- Micropipetas automáticas Gilson, volumes máximos 20, 200 e 1000 µL (VWR International, Portugal);
- Bomba de vácuo da GAST – modelo DOA-P505-BN (Waters, Portugal);
- Sistema de extração da Waters - WAT200683 (Waters, Portugal);
- Sistema de GC modelo HP 7890A, acoplado à espetrometria de massa triplo quadrupolo modelo 7000B, ambos da Agilent Technologies (Waldbronn, Alemanha). O sistema encontra-se também equipado com um injetor PTV da Gerstel (Mülheim na der Ruhr, Alemanha). A separação dos compostos foi realizada com recurso a uma coluna capilar (30m x 0,25mm de diâmetro interno, 0,25 µm de espessura de filme) com 5% fenilmetilsiloxano (HP-5 MS), fornecida por J&W Scientific (Folsom, CA, EUA).

3.1.2. Reagentes e padrões

- Os padrões analíticos de COC, BEG, EME, COET e NCOC procedem da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) a 1 mg/mL. Os padrões internos COC-d₃ e BEG-d₃ (1 mg/mL) e EME-d₃ (100 µg/mL) procedem da Sigma-Aldrich (Sintra, Portugal).
- Água ultra pura Milli-Q, obtida através do sistema Milli-Q RG Ultra-Pure Water System, Milipore Corporation (Milipore, Bedford, MA, EUA);
- *N*-metil-*N*-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA), Macherey-Nagel (Düren, Alemanha);
- Trimetilclorosilano (TMCS), Macherey-Nagel (Düren, Alemanha);
- Metanol 99,8% HPLC grade, Merck (Darmstadt, Alemanha);
- Ácido clorídrico (HCl) 37%, Carlo Erba (Milão, Itália);
- Diclorometano 99,5% pro analysis, Merck (Darmstadt, Alemanha);
- Isopropanol 99,8%, Panreac (Barcelona, Espanha);
- Hidróxido de amónia 24,5% (NH₄OH) (pro-analysis), J.T. Baker (Holanda);
- Hexano, Merck (Darmstadt, Alemanha).

3.1.3. Preparação de soluções

3.1.3.1. Soluções Padrão

A solução stock para a COC e dos seus metabolitos, foram preparadas através da diluição das respetivas soluções comerciais em metanol, para concentrações finais de 500 ng/mL, 100 ng/mL e 1000 ng/mL. Relativamente aos padrões internos, foi utilizada uma solução de trabalho com uma concentração de 1 µg/mL em metanol, contendo os análogos deuterados da COC, BEG, EME. Todos os padrões foram armazenados a 4°C, na ausência de luz.

3.1.3.2. Reagente de derivatização

O reagente de derivatização foi preparado de forma a obter uma concentração de 5% de TMCS em MSTFA. A solução foi armazenada protegida da luz e a 4°C.

3.1.3.3. Solução de diclorometano:metanol (70:30, v/v)

Para um balão de 50 mL, mediram-se 15 mL de metanol e perpez-se o volume final com diclorometano (35 mL).

3.1.3.4. Solução de diclorometano:Isopropanol:Hidróxido de amónia (78:20:2, v/v/v)

Para um balão de 100 mL foram medidos 78 mL de diclorometano, 20 mL de isopropanol e posteriormente, homogeneizou-se vigorosamente. A esta solução foram adicionados 2 mL de hidróxido de amónia, homogeneizando-se vigorosamente.

3.1.3.5. Solução de HCl 0,1 M em água

Para um volume de 50 mL foram medidos 0,414 mL de HCl a 37 % para um balão volumétrico de 50 mL, sendo o volume final aferido com água Milli-Q. A solução foi homogeneizada e armazenada a 4 °C.

3.1.3.6. Solução de HCl 0,1 M em metanol

Para um volume de 50 mL foram medidos 0,414 mL de HCl a 37 % para um balão volumétrico de 50 mL, sendo o volume final aferido com metanol. A solução foi homogeneizada e armazenada a 4 °C.

3.1.3.7. Solução de amónia a 5 % em metanol

Para um volume final de 50 mL foram medidos 2,5 mL de hidróxido de amónia para um balão volumétrico de 50 mL, sendo o volume aferido com metanol. A solução foi homogeneizada e armazenada a 4 °C.

3.1.4. Amostras

As amostras de AR's hospitalares foram fornecidas por um Hospital da cidade do Porto. A colheita das amostras foi feita em duplicado e em dois pontos de amostragem distintos: efluente dos serviços de internamento e efluente final da estação de tratamento de AR's do hospital. O transporte das amostras até ao laboratório foi realizado em recipientes contendo acumuladores de frio.

Todas as amostras encontravam-se armazenadas em garrafas de cor âmbar de 1000 mL, a uma temperatura de 4°C e ao abrigo da luz.

3.2. Sistema e condições cromatográficas

A análise cromatográfica foi realizada através de um sistema de GC modelo HP 7890A, acoplado à espectrometria de massa triplo quadrupolo modelo 7000B, ambos da Agilent Technologies (Waldbronn, Alemanha). O sistema encontra-se também equipado com um injetor PTV da Gerstel (Mülheim na der Ruhr, Alemanha). A separação dos compostos foi realizada com recurso a uma coluna capilar (30m x 0.25mm de diâmetro interno, 0,25 µm de espessura de filme) com 5% fenilmetilsiloxano (HP-5 MS), fornecida por J&W Scientific (Folsom, CA, EUA).

As condições cromatográficas foram baseadas no trabalho concretizado por Almeida *et al.* ¹¹¹. As amostras foram injetadas em modo *splitless* a 220°C (temperatura do injetor), e a linha de transferência foi aquecida a 280 °C (temperatura do detetor). O gás de arraste foi hélio 0,8 mL/min, e o gás de colisão foi nitrogénio a 2,5 mL/min. A temperatura inicial do forno foi mantida a 90 °C durante 2 minutos, sendo posteriormente elevada para 300 °C, a uma taxa de 20°C/min, mantendo-se neste regime por 3 minutos, resultando numa corrida com uma duração de 15,50 minutos no total. O detetor de massas operou em modo de ionização positivo, com corrente de 35 µA e energia eletrónica de -70 eV. O volume de injeção foi de 2 µL em modo *splitless*. Neste modo não existe divisão da amostra, sendo injetada na sua totalidade, permitindo uma melhor análise para concentrações vestigiais ¹¹².

Os resultados obtidos foram adquiridos no modo MRM, recorrendo ao *software* de aquisição MassHunter WorkStation Rev.B.02.01 (Agilent Technologies).

3.3. Preparação de amostra

O método de processamento das amostras teve início com a homogeneização das mesmas, de forma a ser retirado um volume representativo, de cada frasco, de 50 mL. Estas amostras foram centrifugadas a 4000 rpm, a 21 °C, durante 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e adicionaram-se 20 µL da solução de padrão interno antes do processo de extração.

3.4. Procedimento de extração

Neste estudo, a extração foi realizada através de SPE usando cartuchos Strata™-X-C 60 mg; 3 mL. As condições do procedimento foram previamente otimizadas, sendo as condições finais divididas em cinco etapas: acondicionamento, adição da amostra, lavagem, secagem e eluição. Foi utilizado um suporte para o uso de múltiplos cartuchos em simultâneo (*manifold*) (figura 19).

Na primeira etapa, os cartuchos foram acondicionados com 2 mL de metanol e 2 mL de água Milli-Q. Posteriormente ao acondicionamento, foi realizada a etapa de adição da amostra, sendo esta quando ocorre a passagem da amostra pelo cartucho. Depois da adição da amostra, foi realizada a etapa de lavagem com 2 mL de HCl (0,1M em água). De seguida, os cartuchos foram secos sob vácuo durante 15 minutos e, por fim, os analitos de interesse foram eluídos com 2 mL de 5% hidróxido de amónia em metanol.

Os extratos resultantes, foram evaporados até total secura sob um vapor de azoto e derivatizados com 40 μ L de MSTFA, e 5% TMCS durante 2 minutos com recurso a um microondas, na sua potência intermédia (400 w).

Uma alíquota de 2 μ L foi injetada no sistema cromatográfico.

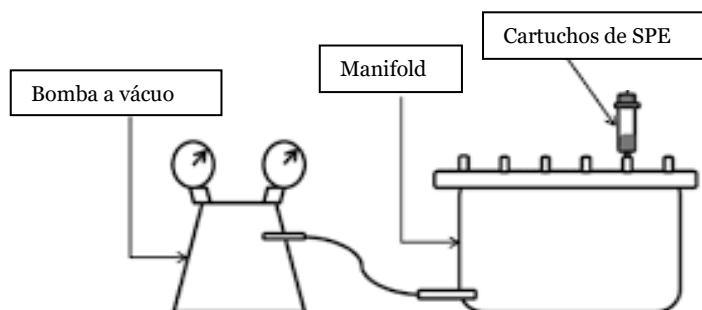


Figura 19 - Esquema da metodologia adotada no presente trabalho. Adaptado de ¹¹³.

Resultados e discussão

3.5. Identificação dos compostos em análise

Primeiramente foram definidas as condições cromatográficas a utilizar para a identificação da COC, BEG, COET, EME e NCOC. Os parâmetros de ajuste foram o fluxo do gás, o programa de temperaturas do forno, as energias de colisão e janelas de análise.

Numa primeira etapa é realizada uma análise qualitativa, utilizando o detetor de massa em modo de varrimento contínuo (modo SCAN), num intervalo entre 50 e 500 m/z , de forma a definir os iões mais característicos para cada composto (figuras 20 e 21, respetivamente), injetando 2 μ L de uma solução padrão (a 10 μ g/mL), contendo os compostos em estudo. A solução padrão foi evaporada até secura, derivatizada com 30 μ L de agente derivatizante (MSTFA + 5% TMCS) e posteriormente, aquecida no microondas durante 2 minutos em potência média. Após arrefecimento do tubo de ensaio contendo a solução padrão, foram injetados 2 μ L dessa solução. Com base nos

espectros e picos cromatográficos obtidos, foi feita uma comparação com os trabalhos de Rosado *et al.* ²⁷ e Almeida *et al.* ¹¹¹. Desta forma, procedeu-se à identificação dos iões precursores, tendo em conta a abundância relativa de cada ião, e respetivas transições possíveis, assim como os tempos de retenção para cada composto. Desta forma, não foi necessário realizar uma análise em modo *product ion* (PI).

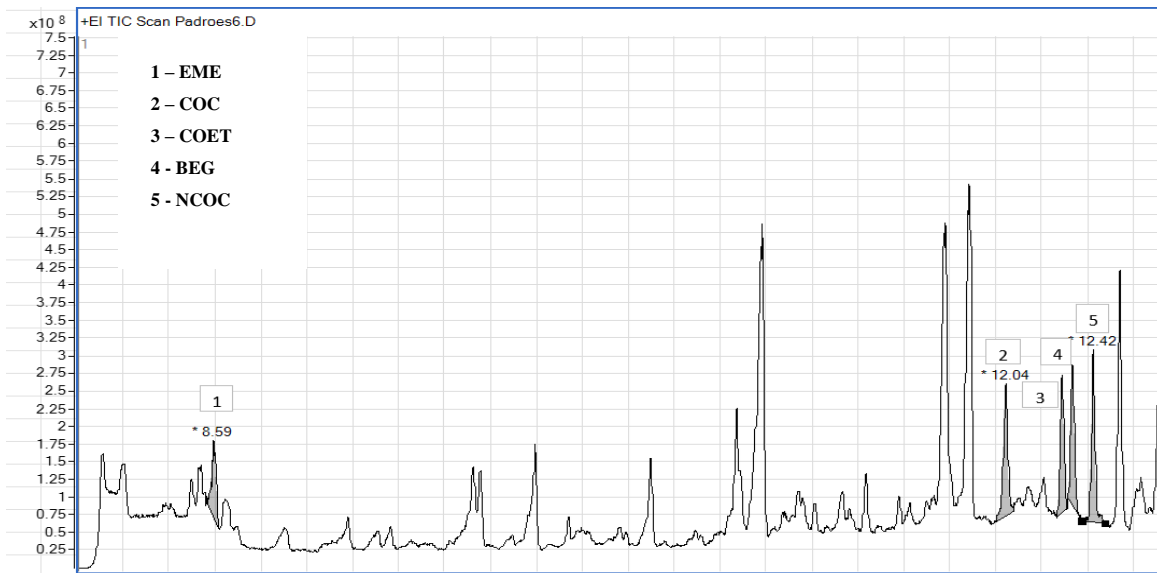


Figura 20 - Cromatograma em modo SCAN da solução padrão, contendo os compostos COC, BEG, EME, COET e NCOC à concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$.

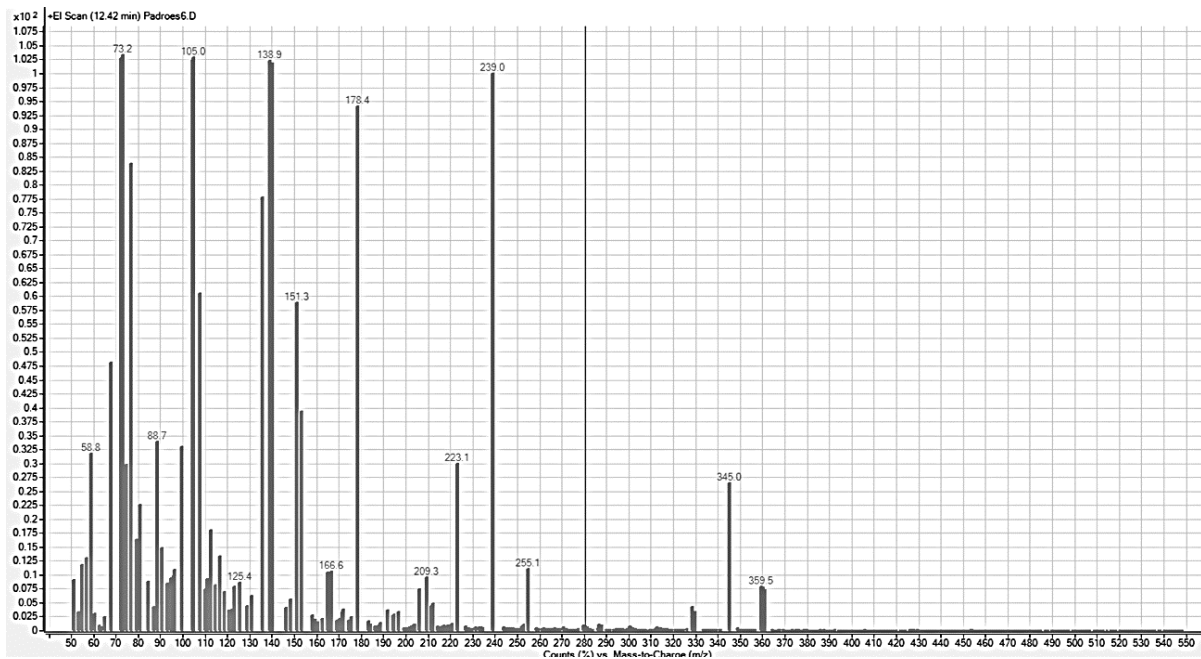


Figura 21 - Espectro de massa em SCAN da solução padrão, contendo os compostos COC, BEG, EME, COET e NCOC à concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$.

Depois de serem identificados os compostos, foi feita uma análise em modo de operação de MRM. Esta etapa resulta num aumento de seletividade e sensibilidade do método permitindo uma identificação inequívoca, uma vez que os íões precursoros são selecionados no primeiro analisador de massa para serem fragmentados no segundo quadrupolo, no momento posterior, cada um dos íões precursoros e íões produto são escolhidos e seguem para o terceiro quadrupolo onde é feita a sua deteção. Nas análises em modo MRM, é muito importante definir a janela de análise utilizada para cada composto, pois está associada à precisão do instrumento durante o isolamento do íão. O *dwell time* corresponde ao tempo de aquisição que o equipamento despense na procura de cada massa selecionada. Por ter sido utilizado um analisador de massa em série, foi possível selecionar dois fragmentos característicos de cada composto. O fragmento mais estável e intenso para a quantificação, sendo o segundo mais intenso utilizado para a qualificação (figura 22).

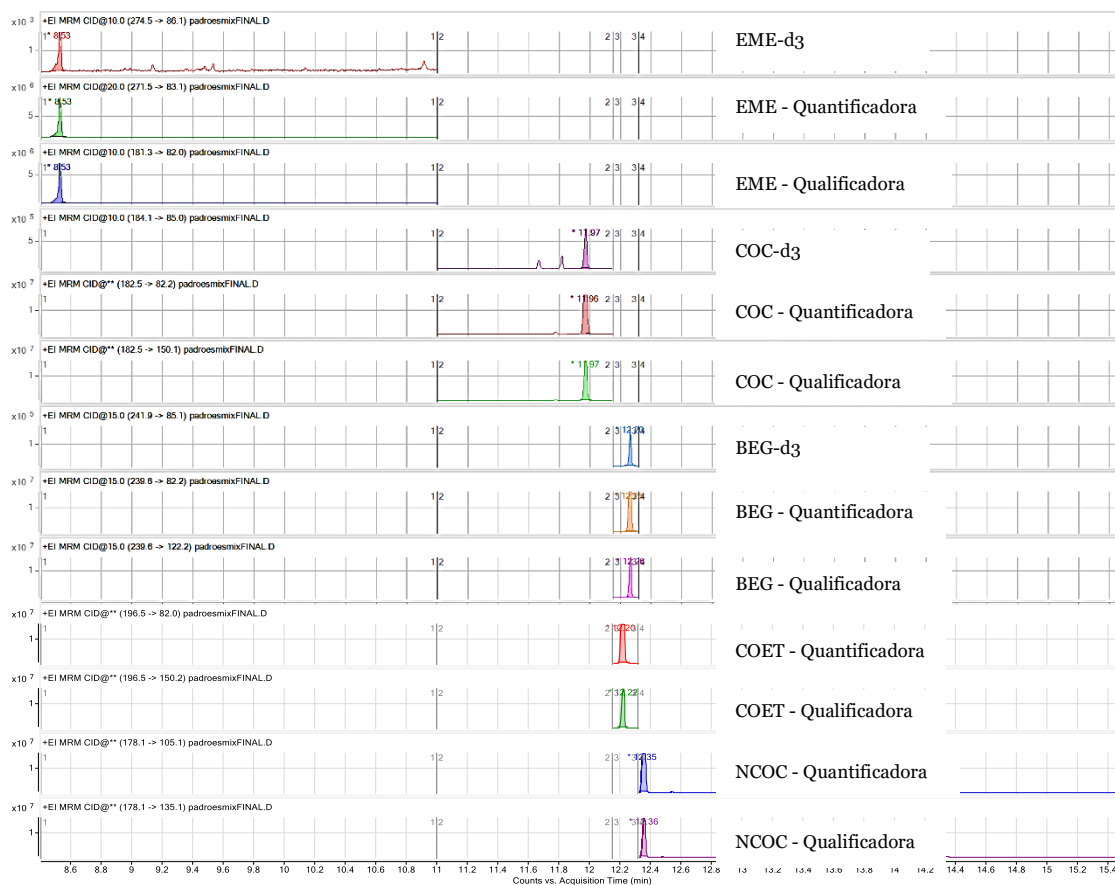


Figura 22 - Cromatograma em modo MRM da solução padrão contendo todos os compostos em análise a 10 µg/mL.

A tabela 9 mostra as condições utilizadas para a detecção dos compostos e padrões internos, incluindo transições quantificadoras e qualificadoras, energia de colisão, tempos de retenção e *dwell time*. Encontra-se sublinhada a transição correspondente à quantificação.

Tabela 9 - Transições monitorizadas em modo MRM para os diferentes analitos em estudo.

Analito	Tempo de retenção (min)	Transições (m/z)	Energia de colisão (eV)	<i>Dwell time</i> (ms)
EME	8,53	<u>271,5 – 83,1</u> 181,3 – 82,0	20 10	50
EME-d ₃	8,53	274,5 – 86,1	10	50
COC	11,96	<u>182,5 – 82,2</u> 182,5 – 150,1	10 5	50
COC-d ₃	11,97	184,1 – 85,0	10	50
COET	12,21	<u>196,5 – 82,0</u> 196,5 – 150,2	10 5	50
BEG	12,26	<u>239,6 – 82,2</u> 239,6 – 122,2	15 15	50
BEG-d ₃	12,27	241,9 – 85,1	15	50
NCOC	12,34	<u>178,1 – 105,1</u> 178,1 – 135,1	15 10	50

3.6. Otimização do método extrativo

O método extrativo utilizado, como referido, foi a SPE. Este procedimento permite tratar um grande volume de amostra, quando comparado com outras técnicas, mantendo a produtividade e minimizando os interferentes presentes na matriz da amostra.

O volume de amostra foi de 50 mL. Na literatura consultada (tabela 8) os volumes de amostra oscilam entre 50 e 1500 mL. Trata-se de volumes elevados, quando se esperam concentrações baixas dos analitos em estudo em amostras reais, e devido a tratar-se de matrizes aquosas.

Inicialmente, devido à presença de sedimentos sólidos nas amostras que iriam provocar a colmatagem dos cartuchos de extração e entupimento do equipamento, procedeu-se a uma etapa de centrifugação a 4000 rpm, durante 15 minutos. O sobrenadante foi utilizado para análise e o pelet foi descartado.

Tendo em conta as características dos analitos em estudo (bases fracas), foram testados dois tipos de cartuchos, Oasis[®]MCX e Strata[™]-X-C, cada um com dois métodos extrativos diferentes. De forma a obter extratos mais limpos e um método de extração mais eficiente, otimizaram-se as etapas de lavagem e eluição. Na etapa de lavagem, a

água possibilita a eliminação de interferentes da matriz, sem que os metabolitos sejam eluídos, devido à ação do HCl que desempenha um papel fundamental na retenção dos compostos, assegurando que os mesmos (compostos básicos) se encontram na forma ionizada, fazendo com que sejam retidos eficientemente pelo adsorvente, enquanto conjuntamente ajuda na eliminação dos interferentes como as proteínas. O metanol foi testado por remover grande parte dos interferentes polares, neutros ou ácidos, retidos por interações hidrofóbicas. Por estes motivos, foram comparados dois procedimentos de lavagem para cada tipo de cartucho: Oasis® MCX (T1) com 2 mL de HCl 0,1 M em água; Oasis® MCX (T2) com 2 mL de água desionizada, 2 mL de HCl 0,1 M em água, 2 mL de diclorometano em metanol (70:30 v:v) e 2 mL de hexano; Strata™-X-C (T3) com 2 mL de HCl 0,1M em água; Strata™-X-C (T4) com 2 mL de HCl 0,1 M em água e 2 mL de HCl 0,1M em metanol. Foram utilizados 2 mL de cada solução e não um volume superior, por aumentar o tempo de evaporação dos extratos.

Após a eluição dos compostos, é efetuada a evaporação da fase orgânica, devendo ser um processo realizado lentamente e com cuidado, evitando perdas de amostra devido a projeções ou acumulação na parte superior das paredes dos tubos de ensaio.

Na otimização desta etapa, foram testados dois métodos diferentes: Oasis® MCX com 2 mL de diclorometano : isopropanol : hidróxido de amónia (78:20:2, v:v:v) e Strata™-X-C com 2 mL de 5% de hidróxido de amónia em metanol. Foram utilizados 2 mL de cada solução e não um volume superior, uma vez que se verificou que os analitos são eluídos completamente e aumenta o tempo de evaporação dos extratos.

Posteriormente ao passo de evaporação, procede-se à derivatização dos analitos. No caso dos compostos da COC, a derivatização com um período de aquecimento da solução contendo os analitos e o reagente derivatizante (sililação), permite a substituição dos grupos -NH por um grupo trimetilsilil (TMS), tornando os compostos derivatizados mais voláteis, termicamente estáveis de forma a suportar temperaturas elevadas (250-350 °C) e permite passarem para o estado gasoso sem sofrerem degradações ou reações com outros compostos ¹¹⁴.

A técnica T1 corresponde ao método clássico utilizado com cartuchos Oasis® MCX, enquanto a técnica T2 corresponde a um método alterado. No que diz respeito aos cartuchos Strata-X-C, a técnica clássica corresponde ao T3 e o método modificado é representado por T4.

Na realização destes ensaios, primeiramente foi utilizada uma concentração de 0,025 ng/mL, em 50 mL de água. Todos os ensaios foram realizados em triplicado (tabela 10).

Tabela 10 - Otimização do processo de extração SPE.

Composto	T1		T2		T3		T4	
	Média AR ± DP	C.V. (%)	Média AR ± DP	C.V. (%)	Média AR ± DP	C.V. (%)	Média AR ± DP	C.V. (%)
EME	0,019 ± 0,00	10,30	0,113 ± 0,02	17,77	0,022 ± 0,00	4,66	0,017 ± 0,00	5,55
COC	0,370 ± 0,03	10,53	—	—	0,263 ± 0,03	13,82	0,241 ± 0,03	1,36
COET	0,304 ± 0,02	9,27	—	—	0,268 ± 0,04	15,27	0,331 ± 0,69	20,86
BEG	—	—	3,814 ± 0,50	13,32	—	—	—	—
NCOC	0,093 ± 0,04	5,02	—	—	—	—	0,094 ± 0,01	3,47

Legenda: Média AR ± DP. AR (área relativa), D.P. (desvio padrão), C.V. (coeficiente de variação)

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a técnica T3 é a que apresenta melhores extrações. A extração com colunas Strata™-X-C, aplicando o método clássico, apresenta menores desvio-padrão e menores coeficientes de variação, encontrando-se dentro dos limites estabelecidos ($\leq 20\%$). Outras vantagens de utilizar este método recaem no facto de ser um procedimento mais simples, requer menor quantidade de solventes comparando às técnicas T2 e T4, e por esse motivo, o tempo de evaporação é menor.

Após determinar a melhor técnica de extração, foi repetida a mesma em triplicado, com a adição de uma concentração de 0,05 ng/mL do mix de padrões, em 50 mL de água (tabela 11).

Tabela 11 - Otimização do processo de extração SPE para a técnica T3.

T3		
Composto	Média AR ± DP	C.V. (%)
EME	0,049 ± 0,00	5,98
COC	0,687 ± 0,00	0,04
COET	0,895 ± 0,19	21,36
BEG	0,728 ± 0,10	14,60
NCOC	0,633 ± 0,13	21,69

Legenda: Média AR ± DP. AR (área relativa), D.P. (desvio padrão), C.V. (coeficiente de variação)

Apesar do C.V. do COET e NCOC se encontrarem ligeiramente acima dos 20%, este é o único método extrativo que se encontra adequado para todos os analitos em estudo.

3.7. Validação do método

A validação deste estudo foi realizada seguindo a guideline Scientific Working group for Forensic Toxicology (SWGTOX) ⁷². Desta forma, pretende-se demonstrar que o presente método se encontra adequado ao objetivo a que se destina, sendo esse objetivo a pesquisa qualitativa e quantitativa da COC e dos seus metabolitos principais em amostras de AR's efluentes, por SPE-GC-MS/MS.

3.7.1. Seletividade

O método descrito foi considerado seletivo, tendo em conta os critérios mencionados anteriormente.

Na análise de brancos (n=5), não foram observados quaisquer interferentes que coeluissem com os analitos em estudo e respetivos padrões internos (figuras 23, 24 e 25).

Nas figuras 23 e 24, pode-se observar que não existem interferentes que coeluem com o composto EME e COC, respetivamente, nas suas transições quantificadoras, qualificadoras 1 e qualificadoras 2.

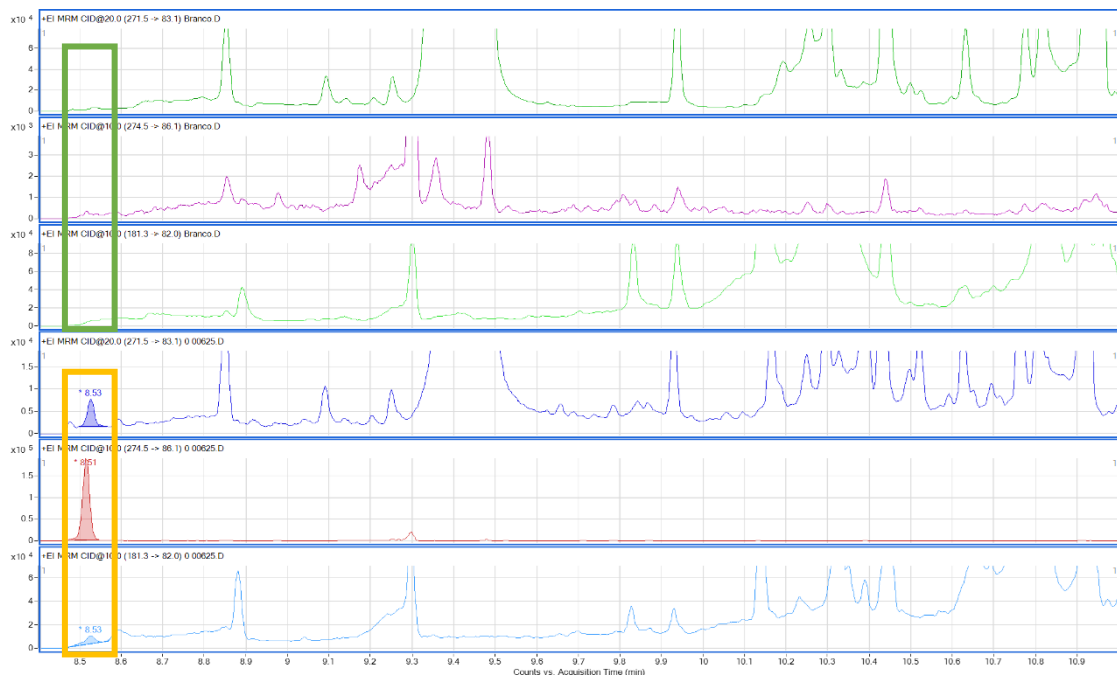


Figura 23 - Cromatograma de uma amostra branco vs o LOQ para a EME.

Determinação da cocaína e seus metabolitos usando águas residuais como matriz

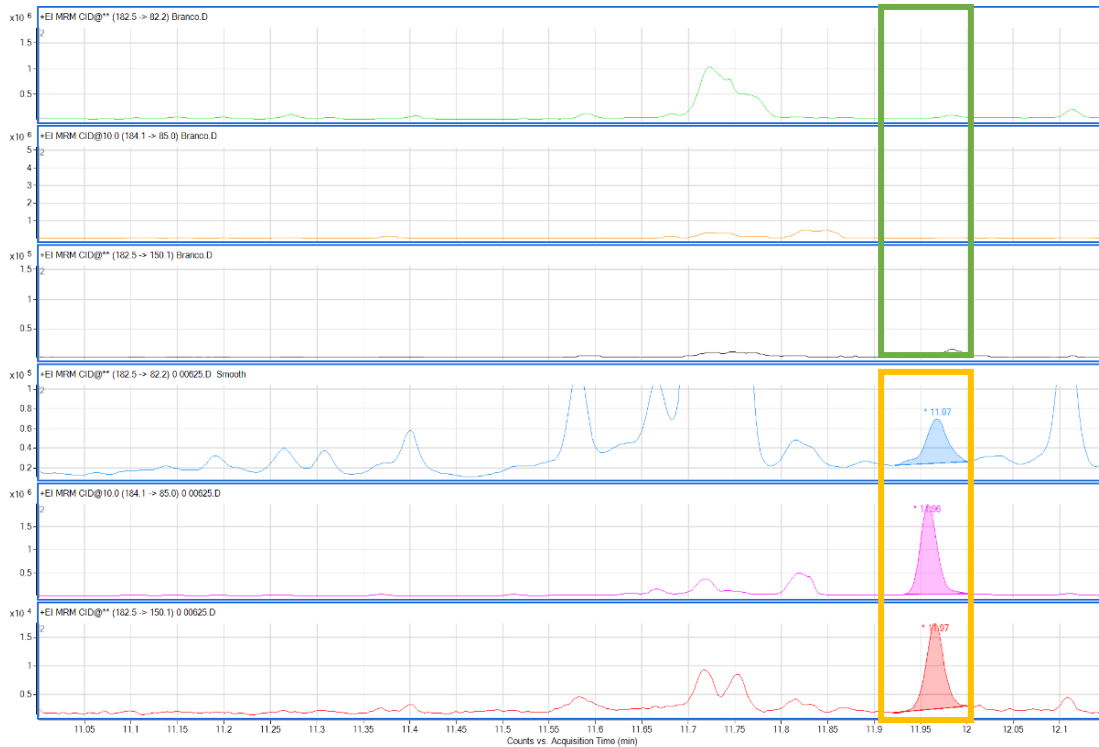


Figura 24 - Cromatograma de uma amostra branco vs o LOQ para a COC.

Na figura 25, pode-se observar que não existem interferentes que coeluem com o composto COET na sua transição quantificadora e qualificadora.



Figura 25 - Cromatograma de uma amostra branco vs o LOQ para o COET.

Relativamente aos compostos BEG e NCOC, pode-se visualizar através das figuras 26 e 27, que também não existem interferentes na mesma zona das transições quantificadoras e qualificadoras.

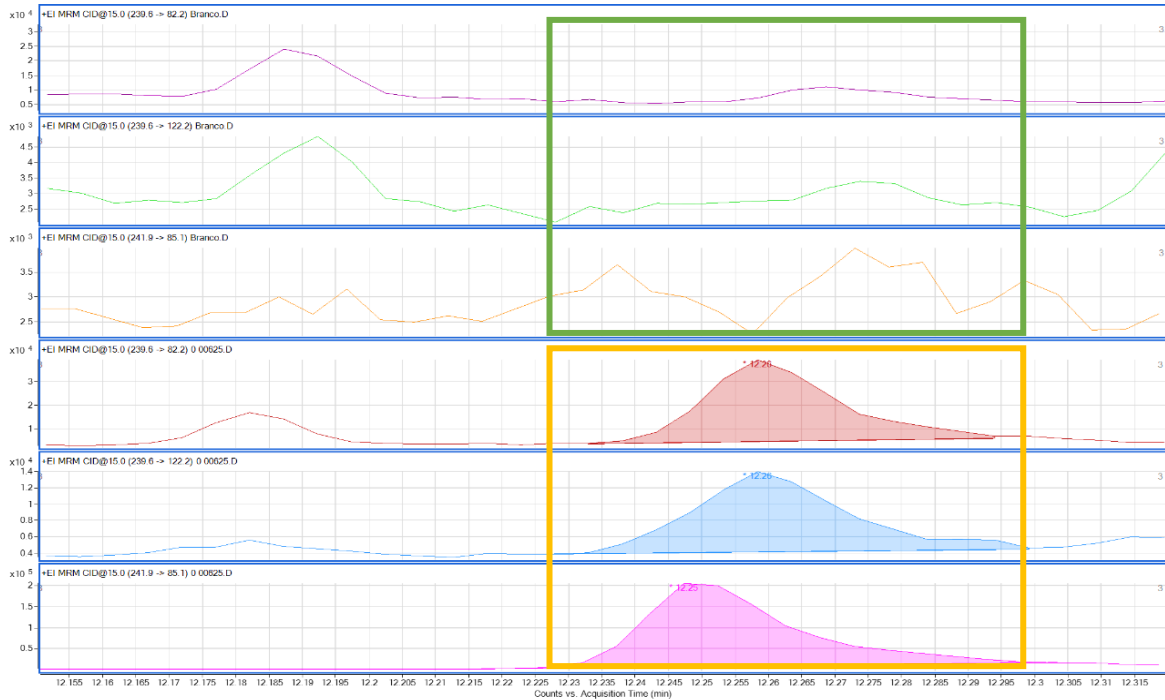


Figura 26 - Cromatograma de uma amostra branco vs o LOQ para a BEG.

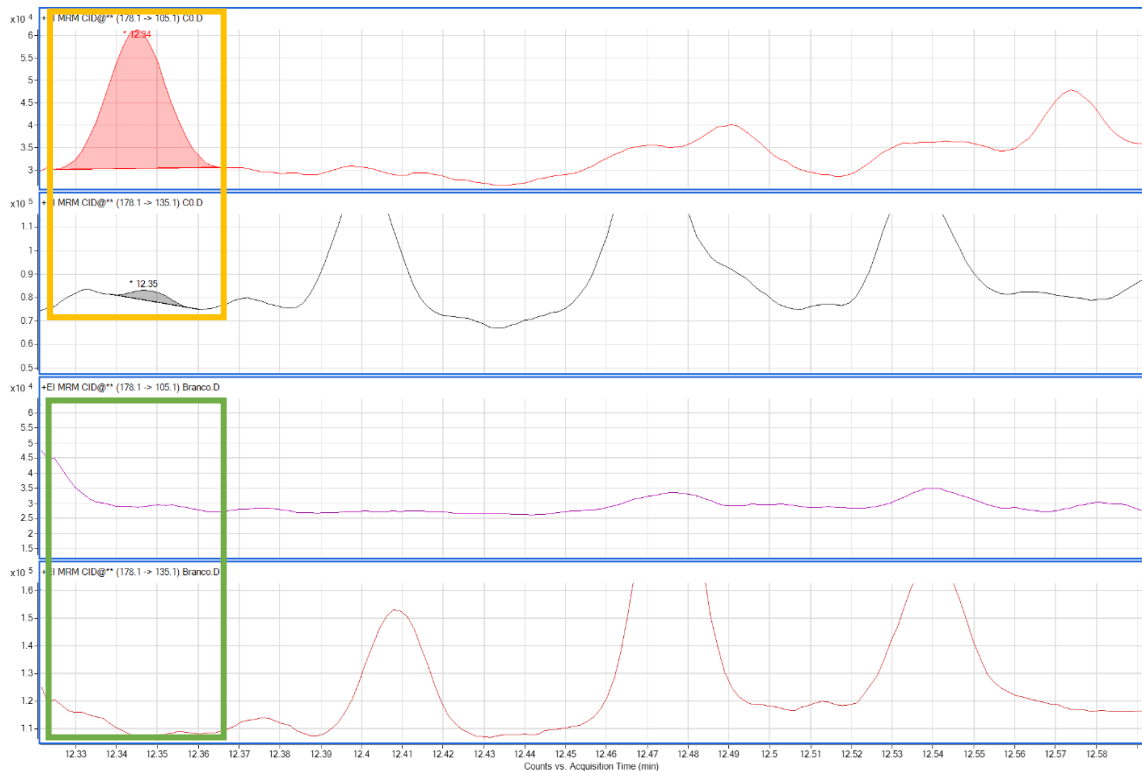


Figura 27 - Cromatograma de uma amostra branco vs o LOQ para a NCOC.

3.7.2. Linearidade e Curva de Calibração

Para a curva de calibração, foram utilizados 9 calibradores, distribuídos entre 0,00625 e 5 ng/mL. As áreas relativas de cada calibrador foram quantificadas na curva de calibração e determinou-se o *BIAS* de cada concentração, sendo que o mesmo se situou dentro dos limites estabelecidos para todas as concentrações. A curva de calibração foi avaliada ao longo de 5 dias.

Tabela 12 - Resultados do estudo de linearidade e curva de calibração.

Analito	Regressão	Linearidade (ng/mL)*	Declive (m)*	Ordenada na origem (b)*	R ² *
EME	1/x	0,00625-5	1,280±0,241	-0,002±0,013	0,998±0,002
COC	1/x	0,00625-5	13,537±0,467	0,165±0,066	0,994±0,007
COET	1/x	0,00625-5	11,568±1,641	0,089±0,135	0,998±0,002
BEG	1/x	0,00625-5	13,817±1,320	0,223±0,176	0,999±0,001
NCOC	1/x	0,00625-5	10,525±0,784	0,172±0,210	0,996±0,001

Legenda: * - valores expressos como média ± desvio padrão

Juntamente com os padrões de controlo, foram preparadas três concentrações de padrões de controlo de qualidade (QC's), gama baixa com uma concentração igual a 0,075 ng/mL, gama intermédia com uma concentração igual a 0,75 ng/mL e gama alta com uma concentração igual a 4 ng/mL. Todos os QC's obtiveram um *BIAS* dentro dos limites estabelecidos pela SWGTOX.

O LLOQ do presente trabalho foi de 6,25 ng/L para todos os compostos, correspondendo à quantidade mínima que o método consegue quantificar, cumprindo com os critérios referidos anteriormente. O LOD não foi avaliado de forma sistemática, pelo que o seu valor foi assumido com a mesma concentração obtida para o LLOQ.

Analisando a tabela 12, é possível verificar que o método descrito é linear dentro da gama de trabalho definida para todos os analitos em estudo, uma vez que a análise da regressão linear ponderada mostrou valores de R² superiores a 0,99 e valores de *BIAS* adequados.

Quando comparados os resultados apresentados neste trabalho com outros publicados na literatura verificamos que *Bade et al.*⁸⁰ utilizaram cartuchos Strata™-X-C para a quantificação de BEG em 50 mL de águas efluentes, obtendo um LOQ entre 0,05-1 ng/L e um LOD entre 0,01-5 ng/L, através de LC-MS/MS. Desta forma, verifica-se que o valor de LLOQ obtido através do método desenvolvido, encontra-se acima do referido no trabalho de *Bade et al.*, No entanto no presente estudo são determinados mais compostos. Não foram encontrados mais estudos publicados na literatura onde se analisam os restantes compostos em amostras de AR's através de cartuchos Strata™-X-

C. Por este motivo, foi feita uma comparação entre o método desenvolvido com outros trabalhos onde são utilizados outros tipos de cartucho e instrumentação analítica. Foram escolhidos trabalhos resumidos na tabela 8, com base no volume de amostra, tipo de amostra e instrumentação analítica utilizada.

Andrés-Costa *et al.*⁸¹ e Álvarez-Ruiz *et al.*⁸², analisaram 250 mL de efluentes e particulados de efluentes, respectivamente, por meio de cartuchos StrataTM-X.

Andrés-Costa *et al.*, efetuaram a análise por UHPLC-QqTOF-MS/MS, obtendo LOQ entre 1-100 ng/L e LOD de 50 ng/L para a COC, quanto que para a BEG obtiveram um LOD de 1 ng/L. A metodologia aplicada para análise das extrações realizadas no trabalho de Álvarez-Ruiz *et al.*, foi a LC-MS/MS, atingindo um LOQ entre 120-2310 ng/L, e um LOD de 50 ng/L e 40 ng/L, para os compostos COC e BEG respectivamente. Tendo em consideração estes valores, afere-se que o método descrito neste trabalho, apresenta valores de LLOQ (6,25 ng/L) bastante inferiores aos descritos, e apesar de o LOD ser considerado igual ao LLOQ, continua igualmente abaixo dos valores descritos mesmo utilizando um volume de amostra menor. Outra vantagem do método desenvolvido é continuar a abranger mais analitos.

Relativamente a trabalhos onde o volume de amostra utilizado foi o mesmo que no método desenvolvido, foi selecionado um artigo devido à metodologia analítica utilizada e quantidade de analitos estudados. Alexandros *et al.*¹⁰⁰ utilizaram 50 mL de amostra, analisadas por LC-MS/MS. Os compostos COC, BEG, COET, EME e NCOC foram analisados através de efluentes, por três tipos de cartuchos diferentes. Os valores de LOQ e LOD para a COC e COET, foram de 10 ng/L e 3 ng/L, respectivamente, enquanto para a BEG, EME e NCOC os valores foram de 100 ng/L e 30 ng/L, respectivamente. Comparado estes dados com os alcançados no método descrito ao longo deste trabalho, verifica-se que o mesmo é mais sensível que o método desenvolvido por Alexandros *et al.* De forma a comparar os resultados obtidos com os cartuchos Oasis[®] MCX, foi selecionado um artigo onde foi utilizado um equipamento semelhante ao usado no presente método. Mathieu *et al.*⁹¹ pesquisaram BEG e COC através de 500 mL de efluentes não tratados e tratados. A metodologia extrativa foi aplicada através de cartuchos Oasis[®] MCX e a análise dos resultantes extratos por feita por GC-MS, atingindo um LOQ de 80 ng/L, que contrapondo com o LOQ de 6,25 ng/L, demonstra que o método desenvolvido neste trabalho é mais sensível. González-Mariño *et al.*⁸⁴ utilizaram 100 mL de efluentes, cartuchos Oasis[®] HLB e análise por GC-MS/MS. Os valores de LLOQ foram entre 2-60 ng/L e o LOD obtido para COC foi de 12 ng/L, para o COET foi de 6 ng/L e para a BEG 8 ng/L. Comparando o trabalho de González-Mariño *et al.* com a metodologia desenvolvida, conclui-se que o método desenvolvido é mais sensível para os compostos alvo, por necessitar de um volume

menor de amostra e mesmo assim atingir valores de LLOQ e LOD inferiores. Por outro lado, demonstra-se que a GC-MS/MS é a metodologia ideal para este tipo de análise e torna-se possível realizar análises com um LLOQ baixo. Relativamente aos cartuchos Strata™-X-C, verificou-se serem eficientes na extração dos compostos propostos.

3.7.3. Precisão e Exatidão

A validação do parâmetro precisão foi efetuada a partir da precisão intradia e interdia. A precisão intradia foi estudada através de amostras fortificadas com concentrações baixas, por se tratar de concentrações onde existe maior possibilidade de surgirem erros (0,00625; 0,0125; 0,025; 0,1; 1; 2,5 ng/mL). As amostras foram preparadas e analisadas no mesmo dia (n= 5) (tabela 13).

Tabela 13 - Precisão intradia e exatidão para a COC e os seus metabolitos.

Analito	Concentração (ng/mL)	C.V. (%)	BIAS (%)
EME	0,00625	13,56	-10,15
	0,0125	12,88	7,32
	0,025	8,55	11,24
	0,1	10,34	8,32
	1	7,29	-3,45
	2,5	6,79	1,85
COC	0,00625	14,90	-18,09
	0,0125	14,65	11,34
	0,025	14,45	2,67
	0,1	10,85	9,81
	1	6,92	-2,78
	2,5	6,52	-4,81
COET	0,00625	13,80	13,76
	0,0125	10,77	8,25
	0,025	12,92	-4,23
	0,1	11,06	-6,26
	1	6,73	8,10
	2,5	6,88	0,75
BEG	0,00625	12,58	-15,13
	0,0125	11,06	10,29
	0,025	11,93	11,12
	0,1	10,92	9,41
	1	6,88	3,25
	2,5	5,75	-0,88
NCOC	0,00625	12,34	16,77
	0,0125	14,04	12,15
	0,025	11,46	-3,71
	0,1	13,16	-8,75
	1	6,97	2,35
	2,5	5,69	7,72

Legenda: C.V. (coeficiente de variação)

Analisando os resultados obtidos na precisão intradia, pode-se concluir que os resultados se encontram dentro dos limites, pois foram obtidos valores de C.V. e *BIAS* abaixo dos 20% para a menor concentração (LLOQ) e abaixo de 15% para as restantes concentrações.

Para a avaliação da precisão interdia e intermédia realizaram-se medições de amostras fortificadas com concentrações baixas e altas, em 5 diferentes dias. De forma a atingir estes objetivos, foram utilizadas 9 concentrações, abrangendo a curva de calibração, e as 3 concentrações correspondentes aos QC's: 0,00625; 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 2,5 e 5 ng/mL (tabelas 14, 16, 18, 20 e 22); 0,075; 0,75 e 4 ng/mL (tabelas 15, 17, 19, 21 e 23). Este estudo foi realizado ao longo de 3 dias consecutivos.

A exatidão foi estudada a partir do *BIAS*, permitindo obter uma comparação dos resultados obtidos com os dados teóricos.

Tabela 14 - Precisão interdia e exatidão para a BEG.

Analito	Concentração (ng/mL)	C.V. (%)	<i>BIAS</i> (%)
BEG	0,00625	0,17	14,26
	0,0125	1,67	-8,07
	0,025	4,66	-6,10
	0,05	5,34	-0,11
	0,1	9,10	-5,26
	0,5	3,68	8,76
	1	7,45	1,70
	2,5	3,70	-0,19
	5	1,25	-1,04

Legenda: C.V. (coeficiente de variação)

Tabela 15 - Precisão intermedia e exatidão para a BEG.

Analito	Concentração (ng/mL)	C.V. (%)	<i>BIAS</i> (%)
BEG	0,075	13,04	-3,59
	0,75	8,48	-1,97
	4	3,53	-8,05

Legenda: C.V. (coeficiente de variação)

Tabela 16 - Precisão interdia e exatidão para a COC.

Analito	Concentração (ng/mL)	C.V. (%)	<i>BIAS</i> (%)
COC	0,00625	0,40	13,55
	0,0125	2,95	10,12
	0,025	10,08	1,21
	0,05	6,03	7,88
	0,1	3,78	-8,12
	0,5	3,95	-9,86
	1	4,01	-6,01
	2,5	7,58	-5,48
	5	4,58	4,92

Legenda: C.V. (coeficiente de variação)

Tabela 17 - Precisão intermédia e exatidão para a COC.

Analito	Concentração (ng/mL)	C.V. (%)	BIAS (%)
COC	0,075	6,56	0,79
	0,75	8,46	-3,49
	4	2,26	2,49

Legenda: C.V. (coeficiente de variação)

Tabela 18 - Precisão interdia e exatidão para o COET.

Analito	Concentração (ng/mL)	C.V. (%)	BIAS (%)
COET	0,00625	1,12	4,84
	0,0125	1,34	5,42
	0,025	7,47	1,00
	0,05	8,92	0,33
	0,1	1,67	3,43
	0,5	0,63	-5,83
	1	6,48	-1,52
	2,5	3,11	0,46
5	1,30	0,68	

Legenda: C.V. (coeficiente de variação)

Tabela 19 - Precisão intermédia e exatidão o COET.

Analito	Concentração (ng/mL)	C.V. (%)	BIAS (%)
COET	0,075	10,28	0,63
	0,75	6,52	-2,54
	4	1,57	4,03

Legenda: C.V. (coeficiente de variação)

Tabela 20 - Precisão interdia e exatidão para a EME.

Analito	Concentração (ng/mL)	C.V. (%)	BIAS (%)
EME	0,00625	2,65	4,73
	0,0125	2,13	7,80
	0,025	8,82	-4,39
	0,05	2,62	-4,84
	0,1	9,82	-1,44
	0,5	4,55	-5,48
	1	5,40	4,72
	2,5	8,62	3,94
5	2,48	-0,71	

Legenda: C.V. (coeficiente de variação)

Tabela 21 - Precisão intermédia e exatidão a EME.

Analito	Concentração (ng/mL)	C.V. (%)	BIAS (%)
EME	0,075	0,84	1,18
	0,75	7,43	6,57
	4	5,62	4,34

Legenda: C.V. (coeficiente de variação)

Tabela 22 - Precisão interdia e exatidão para a NCOC.

Analito	Concentração (ng/mL)	C.V. (%)	BIAS (%)
NCOC	0,00625	3,17	6,93
	0,0125	11,78	2,18
	0,025	11,04	4,97
	0,05	12,51	1,49
	0,1	10,15	5,76
	0,5	3,20	-11,71
	1	3,97	-9,71
	2,5	2,99	1,49
5	0,10	3,25	

Legenda: C.V. (coeficiente de variação)

Tabela 23 - Precisão intermédia e exatidão para a NCOC.

Analito	Concentração (ng/mL)	C.V. (%)	BIAS (%)
NCOC	0,075	5,63	8,91
	0,75	10,32	-1,27
	4	2,68	4,79

Legenda: C.V. (coeficiente de variação)

Analisando os resultados obtidos na precisão interdia, precisão intermédia e exatidão, conclui-se que todos os dados se encontram dentro dos intervalos permitidos, encontrando-se o valor correspondente ao LOQ abaixo dos 20% e abaixo de 15% para as restantes concentrações, tanto a nível do C.V. como a nível do *BIAS*.

3.7.4. Estabilidade

A estabilidade dos compostos pode sofrer alterações devido a diversos fatores mencionados anteriormente. Por este motivo, torna-se importante testar condições que podem acontecer no dia-a-dia durante a preparação e análise de uma amostra. Este tipo de teste foi realizado através da estabilidade de amostras processadas e estabilidade a ciclos de congelação/descongelação.

A estabilidade de amostras processadas foi estudada a três níveis de concentração: 0,075; 0,75 e 4 ng/mL.

Após extração das amostras, os extratos foram analisados e posteriormente mantidos à temperatura ambiente durante 24 horas, sendo novamente reinjetados.

Através da tabela 24, pode-se verificar que os valores não se desviaram dos 15%, considerando que os analitos são estáveis em amostras processadas.

Tabela 24 - Resultados referentes ao estudo da estabilidade de amostras processadas (n=3).

Analito	Concentração teórica (ng/mL)	C.V. (%)	BIAS
EME	0,075	6,03	-8,57
	0,75	5,02	-0,01
	4	7,11	-0,01
COC	0,075	8,04	-3,68
	0,75	4,85	-0,02
	4	2,80	-0,07
COET	0,075	5,75	1,75
	0,75	13,66	0,11
	4	4,23	-0,02
BEG	0,075	2,52	-0,64
	0,75	2,91	-0,03
	4	12,66	-0,05
NCOC	0,075	5,32	13,50
	0,75	11,88	0,08
	4	6,31	-0,03

A estabilidade de amostras sujeitas a ciclos de congelação/descongelação foi estudada a três níveis de concentração: 0,075; 0,75 e 4 ng/mL.

As amostras foram fortificadas e submetidas a três ciclos de congelação e descongelação num período de 24 horas. No último ciclo de descongelação, as amostras permaneceram à temperatura ambiente durante 2 horas antes de proceder à respetiva extração. Após extração foram comparadas com amostras preparadas e analisadas no mesmo dia (tabela 25).

Tabela 25 - Resultados referentes ao estudo da estabilidade de ciclos de congelação e descongelação a (n=3).

Analito	Concentração teórica (ng/mL)	C.V. (%)	BIAS
EME	0,075	5,25	-5,22
	0,75	4,12	7,21
	4	4,09	-5,49
COC	0,075	7,65	5,13
	0,75	5,62	9,29
	4	14,05	-10,13
COET	0,075	6,83	-0,25
	0,75	9,80	3,00
	4	12,82	-6,46
BEG	0,075	157,83	2291,80
	0,75	8,67	8,50
	4	6,81	36,59
NCOC	0,075	59,05	-36,37
	0,75	8,67	8,50
	4	13,93	17,05

Os C.V. alusivos aos resultados do composto EME, COC e COET encontram-se abaixo dos 15% para todas as concentrações, demonstrando ser bastante estável durante pelo menos em três ciclos de congelação/descongelação.

Os compostos BEG e NCOC não demonstraram ser estáveis em concentrações baixas, pois tanto os valores de C.V. e *BIAS* excederam os limites (15% e $\pm 15\%$, respetivamente). Relativamente aos resultados referentes às concentrações intermédias, tanto os valores de C.V. como os valores de *BIAS*, encontram-se dentro dos limites estabelecidos, demonstrando serem estáveis durante três ciclos de congelação/descongelação. Nas concentrações mais altas, obtiveram-se valores de C.V. inferiores a 15%, mas o respetivo *BIAS* encontra-se acima, tratando-se assim de um possível erro experimental.

3.7.5. Recuperação

De forma a calcular as recuperações do método de extração, foram fortificadas amostras com 3 concentrações intermédias da curva de calibração, de forma a avaliar tanto para concentrações menores como concentrações superiores. Para cada concentração foram realizadas 3 réplicas (tabela 26).

Tabela 26 - Recuperação (%) para cada um dos compostos em estudo (n=3).

Concentração teórica (ng/mL)	Recuperação média EME (%) [*]	Recuperação média COC (%) [*]	Recuperação média COET (%) [*]	Recuperação média BEG (%) [*]	Recuperação média NCOC (%) [*]
0,075	93,0 \pm 14,6	106,4 \pm 9,6	89,9 \pm 8,0	114,6 \pm 6,0	109,5 \pm 8,4
0,75	72,4 \pm 1,8	102,9 \pm 1,8	99,2 \pm 4,3	101,4 \pm 3,0	110,7 \pm 18,0
4	98,6 \pm 1,8	106,7 \pm 10,5	107,0 \pm 10,5	110,0 \pm 5,6	86,4 \pm 9,7

Legenda: ^{*} - valores expressos como recuperação média \pm desvio padrão

Quando comparamos as recuperações obtidas com outros trabalho já publicados foi possível verificar que no trabalho de Bade *et al.* ⁸⁰ utilizaram cartuchos StrataTM-X-C e as recuperações para a BEG oscilaram entre 82-119%. No presente estudo foram obtidas recuperações similares, entre 101,4-114,6% para a composto BEG.

Os valores referentes à eficiência de extração dos restantes compostos oscilam entre 72,4 e 110,7%.

Apesar de não existirem dados de comparação com o mesmo tipo de cartuchos utilizados, foram obtidas recuperações superiores a outros métodos referidos na tabela 8, onde são usados outros tipos de colunas.

3.7.6. Carryover

Para avaliar o efeito *carryover*, após a extração e injeção no sistema cromatográfico do calibrador mais alto, injetou-se um derivatizante e verificou-se que não existiam restos de sinal dos compostos nos tempos de retenção e transições escolhidas neste estudo. O estudo foi realizado em triplicado.

3.8. Aplicação do método a amostras reais

Após a validação do método, a metodologia deve ser aplicada a amostras reais de forma a comprovar que continua a ser um método aplicável ao seu objetivo.

Assim sendo, o presente método foi aplicado a 4 amostras reais procedentes de uma unidade hospitalar do Porto. Para proceder à identificação dos compostos foram utilizados os critérios de positividade anteriormente descritos. Assim foi avaliado o ratio entre o ão qualificador e quantificador e ainda o tempo de retenção relativo ⁷⁶.

A tabela 27 mostra os resultados obtidos dos compostos presentes nas amostras analisadas nas amostras (amostra 1, 2, 3 e 4), enquanto a tabela 28 mostra se os resultados positivos cumprem com os critérios de positividade.

Tabela 27 - Resultados para as amostras 1, 2, 3 e 4, relativamente à quantificação de COC, EME, BEG, COET e NCOC.

Amostra	Concentração Calculada (ng/mL)				
	COC	EME	BEG	COET	NCOC
1	<LLOQ	<LLOQ	3,23	<LLOQ	<LLOQ
2	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
3	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
4	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ

Tabela 28 - Aplicação dos critérios de positividade em resultados positivos.

Analito	Amostra	QT/QL1	Critério
COC	4	220,290	> ±5
EME	1	6,364	> ±5
	2	6,161	> ±5
BEG	1	3,423	✓
	2	2,495	> ±5
	4	89,912	> ±5
NCOC	1	0,936	> ±5
	2	1,535	> ±5
	3	1,698	> ±5
	4	4,018	> ±5

Legenda: QT/QL1 - área obtida com a transição quantificadora / área obtida com a transição qualificadora principal; > ±5 superior ao critério estabelecido.

Destas quatro amostras, a amostra 1 é a única amostra positiva onde foi possível detetar a presença de BEG, já que foram cumpridos os critérios de positividade (relação entre o ão quantificador e qualificador para cada analito em estudo e tempo de retenção relativo) ⁷⁶.

A título de exemplo, a figura 28 representa o cromatograma relativo à amostra número

1.

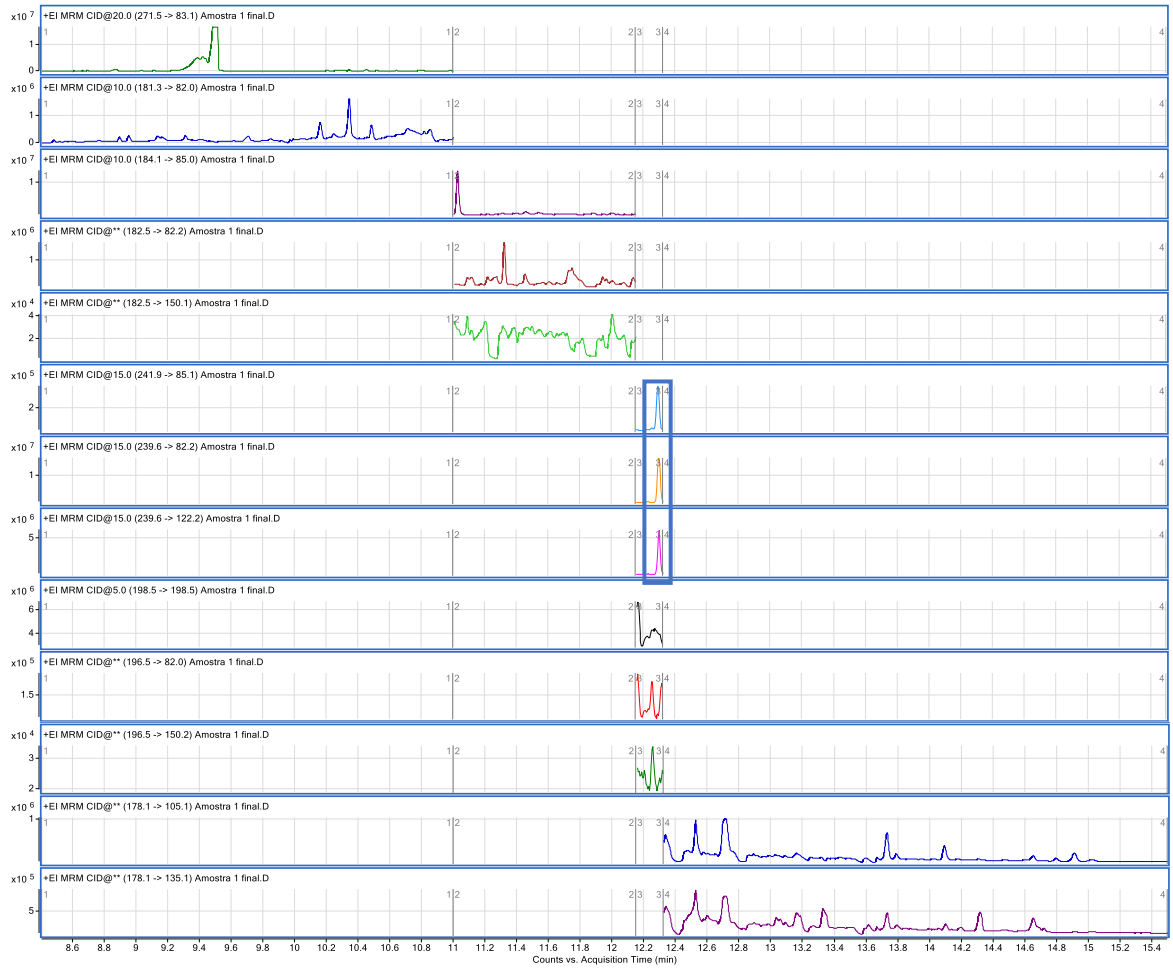


Figura 28 - Cromatograma da amostra 1.

Capítulo 4:

Conclusão e Perspetivas Futuras

Este estudo teve como base o desenvolvimento e otimização de um método analítico para a determinação de COC e dos seus metabolitos, nomeadamente EME, COC, COET, BEG e NCOC em AR's não tratadas, utilizando a SPE e posterior análise por GC-MS/MS.

O volume de amostra de 50 mL revelou ser satisfatório, possibilitando a realização da análise com sensibilidade adequada.

A metodologia desenvolvida revelou ser seletiva, linear, precisa e exata, encontrando-se validada segundo os critérios da SWGTOX. O método analítico mostrou ser linear entre 0,00625 - 5 ng/mL para todos os compostos estudados, com valores de R^2 superiores a 0,99, limites de deteção satisfatórios e abaixo dos descritos em outros trabalhos na sua maioria, e com taxas de recuperação superiores a outros trabalhos. Outro aspeto importante de referir, foi tratar-se de um primeiro estudo que permite detetar os compostos referidos anteriormente em conjunto, através de AR's, por meio de extração sólida com cartuchos StrataTM-X-C e análise conjunta por GC-MS/MS. Tendo todos estes fatores em consideração, a metodologia mostrou ser inovadora, apropriada e com a robustez necessária, resultando assim num método com aplicação no campo da toxicologia forense para monitorização do consumo de drogas de abuso de forma indireta, e na área ambiental para monitorização destes compostos no meio ambiente.

Futuramente, este método poderá ainda contribuir para a deteção destes compostos em diferentes tipos de águas em Portugal de forma a avaliar o consumo mas também realizar outro tipo estudos como a avaliação das possíveis consequências negativas nos ecossistemas aquáticos, por descarga de AR's contendo este tipo de compostos, e consequente impacto na saúde pública.

Referências Bibliográficas

1. Stolberg. *The Use of Coca: Prehistory, History, and Ethnography*. Journal of Ethnicity in Substance Abuse. 2011. p. 126-146.
2. Goldstein, *et al.* *Cocaine: History, Social Implications, and Toxicity—A Review*. Disease-a-Month. 2009. p. 6-38.
3. Drake, *et al.* *DARK Classics in Chemical Neuroscience: Cocaine*. ACS Chemical Neuroscience. 2018. p. 2358-2372.
4. Biondich, *et al.* *Coca: High Altitude Remedy of the Ancient Incas*. Wilderness & Environmental Medicine. 2015. p. 567-571.
5. Ferreira, *et al.* *Cocaína: lendas, história e abuso*. Revista Brasileira de Psiquiatria. 2001. p. 96-99.
6. Pinheiro. *Cocaína e crack: efeitos e complicações* 2022. Available from: <https://www.mdsau.de.com/dependencia/cocaina-crack/>. Accessed by: 09/11/22.
7. Kim, *et al.* *Acute and Chronic Effects of Cocaine on Cardiovascular Health*. International Journal of Molecular Sciences. 2019. p. 584.
8. Cornish, *et al.* *Crack cocaine abuse: an epidemic with many public health consequences*. Annu Rev Public Health. 1996. p. 259-273.
9. White, *et al.* *The pathophysiology of cocaine abuse*. J Clin Forensic Med. 2003. p. 27-39.
10. Dinis O. *Metabolomics of cocaine: implications in toxicity*. Toxicol Mech Methods. 2015. p. 494-500.
11. Karila, *et al.* *Addiction à la cocaïne : données actuelles pour le clinicien*. La Presse Médicale. 2014. p. 9-17.
12. Hatsukami, *et al.* *Crack cocaine and cocaine hydrochloride. Are the differences myth or reality?* Jama. 1996. p. 1580-1588.
13. O'Leary, *et al.* *Role of voltage-gated sodium, potassium and calcium channels in the development of cocaine-associated cardiac arrhythmias*. Br J Clin Pharmacol. 2010. p. 427-442.
14. Conner. *The Neuroscience of Cocaine*. 2017. Academic Press: San Diego, CA, USA.
15. Proebstl, *et al.* *Effects of stimulant drug use on the dopaminergic system: A systematic review and meta-analysis of in vivo neuroimaging studies*. Eur Psychiatry. 2019. p. 15-24.
16. Filip, *et al.* *The serotonergic system and its role in cocaine addiction*. Pharmacol Rep. 2005. p. 685-700.
17. Richards, *et al.* *β -Blockers, Cocaine, and the Unopposed α -Stimulation Phenomenon*. J Cardiovasc Pharmacol Ther. 2017. p. 239-249.
18. Riezzo, *et al.* *Side effects of cocaine abuse: multiorgan toxicity and pathological consequences*. Curr Med Chem. 2012. p. 5624-5646.
19. David J. Heal. *Dopamine reuptake transporter (DAT) "inverse agonism" - A novel hypothesis to explain the enigmatic pharmacology of cocaine*. 2014.
20. Zimmerman. *Cocaine intoxication*. Crit Care Clin. 2012. p. 517-526.
21. Cone. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cocaine*. Journal of Analytical Toxicology. 1995. p. 459-478.
22. Pergolizzi, *et al.* *Cocaethylene: When Cocaine and Alcohol Are Taken Together*. Cureus. 2022. p. e22498.
23. Cunha Oliveira. *Medical Toxicology of Drugs of Abuse*. 2013. Elsevier. p. 159-175.

24. McGrath, *et al.* *Systemic Pharmacokinetics of Topical Intranasal Cocaine in Healthy Subjects*. American Journal of Rhinology & Allergy. 2020. p. 336-341.
25. Pergolizzi, *et al.* *Cocaine and Cardiotoxicity: A Literature Review*. Cureus. 2021. p. e14594.
26. Cone, *et al.* *Cocaine metabolism and urinary excretion after different routes of administration*. Ther Drug Monit. 1998. p. 556-560.
27. Rosado, *et al.* *New miniaturized clean-up procedure for hair samples by means of microextraction by packed sorbent: determination of cocaine and metabolites*. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2020. p. 7963-7976.
28. Roque B, *et al.* *Cocaine: An Updated Overview on Chemistry, Detection, Biokinetics, and Pharmacotoxicological Aspects including Abuse Pattern*. Toxins. 2022. p. 278.
29. Wang, *et al.* *Contribution of the active metabolite, norcocaine, to cocaine's effects after intravenous and oral administration in rats: pharmacodynamics*. Psychopharmacology (Berl). 2001. p. 341-352.
30. Valente, *et al.* *Contribution of oxidative metabolism to cocaine-induced liver and kidney damage*. Curr Med Chem. 2012. p. 5601-5606.
31. Zhang, *et al.* *Cocaine metabolism in man: identification of four previously unreported cocaine metabolites in human urine*. J Anal Toxicol. 1990. p. 201-205.
32. Ruiz, *et al.* *Chronic and recreational use of cocaine is associated with a vulnerability to semantic interference*. Psychopharmacology (Berl). 2015. p. 1717-1726.
33. Dinis O. *Metabolomics of cocaine: implications in toxicity*. Toxicology Mechanisms and Methods. 2015. p. 494-500.
34. EMCDDA. *European Drug Report 2019: Trends and Developments*. 2019. Publications Office of the European Union, Luxembourg.
35. Barroso, *et al.* *Bioanalytical methods for the determination of cocaine and metabolites in human biological samples*. Bioanalysis. 2009. p. 977-1000.
36. Jatlow. *Cocaine: analysis, pharmacokinetics, and metabolic disposition*. Yale J Biol Med. 1988. p. 105-113.
37. Rodrigues. *Análise de Substâncias de Abuso Utilizando Novas Configurações de Microextração em Fase Sólida e Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa: Estudo de Prova de Conceito*, in *Forensic Sciences*. 2021. Egas Moniz University Institute.
38. Wishart, *et al.* *DrugBank 5.0*. 2018. Available from: www.drugbank.ca. Accessed by: 01/11/22.
39. Pomara, *et al.* *Data available on the extent of cocaine use and dependence: biochemistry, pharmacologic effects and global burden of disease of cocaine abusers*. Curr Med Chem. 2012. p. 5647-5657.
40. NCBI-PubChem Compound. *Norcocaine*. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Norcocaine>. Accessed by: 10/8/22.
41. Ambach, *et al.* *Determination of Cocaine and Metabolites in Dried Blood Spots by LC-MS/MS*. in *LC-MS in Drug Analysis: Methods and Protocols*. Langman, *et al.* Editors. 2019. Springer New York: New York, NY. p. 261-272.
42. Bachi, *et al.* *Vascular disease in cocaine addiction*. Atherosclerosis. 2017. p. 154-162.
43. Zarei, *et al.* *A global systematic review and meta-analysis on illicit drug consumption rate through wastewater-based epidemiology*. Environ Sci Pollut Res Int. 2020. p. 36037-36051.

44. EMCDDA. *European Drug Report 2021: Trends and Developments*. 2021. Publications Office of the European Union, Luxembourg.
45. United Nations Office on Drugs and Crime. *World Drug Report 2021*. 2021. Available from: <https://www.unodc.org/unodc/en/frontpage/2021/June/unodc-world-drug-report-2021--pandemic-effects-ramp-up-drug-risks--as-youth-underestimate-cannabis-dangers.html>. Accessed by: 20/08/22.
46. EMCDDA. *European Drug Report 2022: Trends and Developments*. 2022. Publications Office of the European Union, Luxembourg.
47. EMCDDA. *Wastewater analysis and drugs - a European multi-city study*. 2022. Available from: https://www.emcdda.europa.eu/publications/html/pods/wastewater-analysis_en#section0. Accessed by: 26/05/2022.
48. Figueiredo. *Análise de Águas Residuais na Monitorização de Biomarcadores de Consumo de Substâncias Psicoativas*, in *Pharmaceutical Sciences*. 2014. Egas Moniz University Institute.
49. Daughton. *Emerging pollutants, and communicating the science of environmental chemistry and mass spectrometry: pharmaceuticals in the environment*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry. 2001. p. 1067-1076.
50. Zuccato, *et al.* *Cocaine in surface waters: a new evidence-based tool to monitor community drug abuse*. Environmental Health. 2005. p. 14.
51. Reid, *et al.* *Using biomarkers in wastewater to monitor community drug use: A conceptual approach for dealing with new psychoactive substances*. Science of The Total Environment. 2014. p. 651-658.
52. Hyötyläinen, *et al.* *Sorbent- and liquid-phase microextraction techniques and membrane-assisted extraction in combination with gas chromatographic analysis: A review*. Anal Chim Acta. 2008. p. 27-37.
53. Abdel-Rehim. *New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications. I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies Biomedical Life Sciences. 2004. p. 317-321.
54. Berrueta, *et al.* *A review of solid phase extraction: Basic principles and new developments*. Chromatographia. 1995. p. 474-483.
55. Altun, *et al.* *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*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2004. p. 129-135.
56. Barroso, *et al.* *Role of microextraction sampling procedures in forensic toxicology*. Bioanalysis. 2012. p. 1805-1826.
57. Wang, *et al.* *Automatic analytical approach for the determination of 12 illicit drugs and nicotine metabolites in wastewater using on-line SPE-UHPLC-MS/MS*. Journal of Pharmaceutical Analysis. 2021. p. 739-745.
58. Ötles, *et al.* *Solid-Phase Extraction (SPE): Principles and Applications in Food Samples*. Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria. 2016. p. 5-15.
59. Moyo, *et al.* *Critical review of solid phase extraction for multiresidue clean-up and pre-concentration of antibiotics from livestock and poultry manure*. Food Additives & Contaminants: Part A. 2022. p. 229-241.
60. Humbert. *Extraction en phase solide (SPE) : théorie et applications*. Annales De Toxicologie Analytique. 2010. p. 61-68.

61. Telepchak, *et al.* *Introduction to Solid Phase Extraction*. in *Forensic and Clinical Applications of Solid Phase Extraction*. Telepchak, *et al.* Editors. 2004. Humana Press: Totowa, NJ. p. 1-39.
62. Coskun. *Separation techniques: Chromatography*. North Clin Istanb. 2016. p. 156-160.
63. Siqueira. *Princípios da Cromatografia a Gás (GC)*. 2019. Available from: <https://a3analitica.com.br/bloga3pharma/2019/01/08/principios-da-cromatografia-a-gas-gc/>. Accessed by: 10/10/22.
64. Shimadzu. *What is Gas Chromatography?* Available from: <https://www.ssi.shimadzu.com/service-support/faq/gas-chromatography/what-is-gas-chromatography/index.html>. Accessed by: 1/10/2022.
65. Demoliner. *Optimization and Validation of Analytical Methodology Using SPE and LC-ESI-MS/MS for the Determination of Pesticides and Metabolites in Surface Water and Public Supply Water* 2008. Federal University of Rio Grande.
66. Skoog, *et al.* *Fundamentals of analytical chemistry*. in *Analytical chemistry*. 2014. Brooks/Cole, Cengage Learning: Belmont, CA.
67. Castiglioni, *et al.* *Mass spectrometric analysis of illicit drugs in wastewater and surface water*. *Mass Spectrom Rev.* 2008. p. 378-394.
68. Maestroni, *et al.* *Validation of an Analytical Method for the Determination of Pesticide Residues in Vine Leaves by GC-MS/MS*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2018. p. 6421-6430.
69. Abrão, *et al.* *Toxicological analyses: analytical method validation for prevention or diagnosis*. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2021. p. 18-32.
70. Agency. *Guideline on Bioanalytical Method Validation*. . (CHMP). Editor. 2011.
71. Welfare. *Guideline on Bioanalytical Method Validation in Pharmaceutical Development*. 2013.
72. SWGTOX. *Scientific Working Group for Forensic Toxicology standard practices for method validation in forensic toxicology*. *J Anal Toxicol.* 2013. p. 452-474.
73. Thompson, *et al.* *Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report)*. 2002. p. 835-855.
74. Peters, *et al.* *Validation of new methods*. *Forensic Sci Int.* 2007. p. 216-224.
75. FDA. *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry*. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Editor. 2018.
76. Group. *Minimum Criteria for Chromatographic-Mass Spectrometric Confirmation of the Identity of the Analytes for Doping Control Purposes*. 2021.
77. Taylor. *Validation of Analytical Methods*. *Analytical Chemistry*. 1983. p. 600A-608A.
78. Shirley L. de Fariasa. *Avaliação Metrológica da Curva Analítica para Determinação do Teor de Enxofre em Baixíssimas Concentrações em Óleo Diesel s-10*. 2015.
79. Truta. *Development and Validation Procedures of a GC/MS-MS Analytical Methodology by GC/MS-MS for the Determination of Antidepressants in Whole Blood*. 2012. Polytechnic of porto.
80. Bade, *et al.* *How the recreational stimulant market has changed: Case study in Adelaide, Australia 2016–2019*. *Science of The Total Environment*. 2021. p. 143728.

81. Andrés-Costa, *et al.* *Analysis of psychoactive substances in water by information dependent acquisition on a hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometer.* Journal of Chromatography A. 2016. p. 98-106.
82. Álvarez-Ruiz, *et al.* *Simultaneous determination of traditional and emerging illicit drugs in sediments, sludges and particulate matter.* Journal of Chromatography A. 2015. p. 103-115.
83. Liu, *et al.* *Tracing consumption patterns of stimulants, opioids, and ketamine in China by wastewater-based epidemiology.* Environmental Science and Pollution Research. 2021. p. 16754-16766.
84. González-Mariño, *et al.* *Determination of drugs of abuse in water by solid-phase extraction, derivatisation and gas chromatography-ion trap-tandem mass spectrometry.* Journal of Chromatography A. 2010. p. 1748-1760.
85. Bade, *et al.* *Determination of 21 synthetic cathinones, phenethylamines, amphetamines and opioids in influent wastewater using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry.* Talanta. 2020. p. 120479.
86. Montgomery, *et al.* *Basketball and drugs: Wastewater-based epidemiological estimation of discharged drugs during basketball games in Kentucky.* Science of The Total Environment. 2021. p. 141712.
87. Christophoridis, *et al.* *Determination of illicit drugs and psychoactive pharmaceuticals in wastewater from the area of Thessaloniki (Greece) using LC-MS/MS: estimation of drug consumption.* Environmental Monitoring and Assessment. 2021. p. 249.
88. Skees, *et al.* *Contamination profiles, mass loadings, and sewage epidemiology of neuropsychiatric and illicit drugs in wastewater and river waters from a community in the Midwestern United States.* Science of The Total Environment. 2018. p. 1457-1464.
89. Gul, *et al.* *LC-MS-MS Method for Stimulants in Wastewater During Football Games.* Journal of Analytical Toxicology. 2016. p. 124-132.
90. Mari, *et al.* *Cocaine and heroin in waste water plants: A 1-year study in the city of Florence, Italy.* Forensic Science International. 2009. p. 88-92.
91. Mathieu, *et al.* *Assessment of total uncertainty in cocaine and benzoylecgonine wastewater load measurements.* Water Research. 2011. p. 6650-6660.
92. Plósz, *et al.* *Biotransformation kinetics and sorption of cocaine and its metabolites and the factors influencing their estimation in wastewater.* Water Research. 2013. p. 2129-2140.
93. Yadav, *et al.* *Occurrence, removal and environmental risk of markers of five drugs of abuse in urban wastewater systems in South Australia.* Environmental Science and Pollution Research. 2019. p. 33816-33826.
94. Thomas, *et al.* *Comparing illicit drug use in 19 European cities through sewage analysis.* Science of The Total Environment. 2012. p. 432-439.
95. Chiavola, *et al.* *A laboratory-study on the analytical determination and removal processes of THC-COOH and bezoylecgonine in the activated sludge reactor.* Chemosphere. 2019. p. 83-90.
96. Lai, *et al.* *Spatial variations in the consumption of illicit stimulant drugs across Australia: A nationwide application of wastewater-based epidemiology.* Science of The Total Environment. 2016. p. 810-818.
97. Daglioglu, *et al.* *Comparison of community illicit drug use in 11 cities of Turkey through wastewater-based epidemiology.* Environmental Science and Pollution Research. 2021. p. 15076-15089.

98. Löve, *et al.* *Analysis of stimulant drugs in the wastewater of five Nordic capitals.* Science of The Total Environment. 2018. p. 1039-1047.
99. Celma, *et al.* *Simultaneous determination of new psychoactive substances and illicit drugs in sewage: Potential of micro-liquid chromatography tandem mass spectrometry in wastewater-based epidemiology.* Journal of Chromatography A. 2019. p. 300-309.
100. Asimakopoulos, *et al.* *Determination of 89 drugs and other micropollutants in unfiltered wastewater and freshwater by LC-MS/MS: an alternative sample preparation approach.* Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2017. p. 6205-6225.
101. Moslah, *et al.* *Pharmaceuticals and illicit drugs in wastewater samples in north-eastern Tunisia.* Environmental Science and Pollution Research. 2018. p. 18226-18241.
102. Kumar, *et al.* *Assessment of drugs of abuse in a wastewater treatment plant with parallel secondary wastewater treatment train.* Science of The Total Environment. 2019. p. 947-957.
103. Mackuľak, *et al.* *Dominant psychoactive drugs in the Central European region: A wastewater study.* Forensic Science International. 2016. p. 42-51.
104. Maida, *et al.* *Illicit drugs consumption evaluation by wastewater-based epidemiology in the urban area of Palermo city (Italy).* Ann Ist Super Sanita. 2017. p. 192-198.
105. López-García, *et al.* *A fully automated approach for the analysis of 37 psychoactive substances in raw wastewater based on on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry.* Journal of Chromatography A. 2018. p. 80-89.
106. Klupczynska, *et al.* *Estimation of drug abuse in 9 Polish cities by wastewater analysis.* Forensic Science International. 2016. p. 14-21.
107. Gul, *et al.* *LC-MS-MS Method Development and Analysis of Stimulants, Opiates, Synthetic Opiates, PCP, and Benzodiazepines in Wastewater. Preponderance of these Drugs During Football Games.* in *Analysis of Drugs of Abuse.* Musah. Editor. 2018. Springer New York: New York, NY. p. 149-182.
108. Castrignanò, *et al.* *Enantiomeric profiling of chiral drug biomarkers in wastewater with the usage of chiral liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry.* Journal of Chromatography A. 2016. p. 84-99.
109. Bishop, *et al.* *Wastewater-based epidemiology pilot study to examine drug use in the Western United States.* Science of The Total Environment. 2020. p. 140697.
110. Ryan. *Cocaine Use in Adolescents and Young Adults.* Pediatr Clin North Am. 2019. p. 1135-1147.
111. Almeida. *Estudo da estabilidade de opiáceos e cocaína em Dried Saliva Spots.* 2020. Universidade da Beira Interior (UBI).
112. Fulton Kitson. *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A practical guide.* 1996.
113. Sanson, *et al.* *Equipamento de baixo custo para extração em fase sólida em amostras aquosas de grande volume utilizando pressão positiva de N.* Química Nova. 2014. p. 150-152.
114. Silva. *Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para Identificação e Quantificação de Alcaloides Minoritários em Amostras de Cocaína por Cromatografia Gasosa com Detetor de Ionização de Chama (CG-DIC).* 2016. Universidade de Brasília.