

Estudo da estabilidade de opiáceos e cocaína em *Dried Saliva Spots*

Ema Cristina Roque de Almeida

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

Orientadora: Mestre Sofia Pires Seixo Soares
Co-orientadores: Mestre Tiago Alexandre Pires Rosado
Prof.^a Doutora Maria Eugenia Gallardo Alba

setembro de 2020

Folha em branco

Dedicatória

Esta dissertação é dedicada aos meus pais e avós por todo o apoio que me deram.

Folha em branco

Agradecimentos

A realização de uma dissertação exige muitas horas de estudo, pesquisa, reflexão e muito trabalho, mas não é um trabalho individual representa também uma etapa que não seria possível concluir sem o contributo de várias pessoas às quais eu gostaria de agradecer.

À Mestre Sofia Soares, pela orientação, conhecimento e compreensão que me transmitiu, por estar sempre disponível e por toda a ajuda que me deu na realização desta dissertação.

À Professora Doutora Eugenia Gallardo, por me ter despertado interesse na área da toxicologia e por toda a ajuda, motivação, incentivo e confiança que me deu. Obrigada por todos os conhecimentos que me transmitiu ao longo deste ano.

Ao Mestre Tiago Rosado, pela ajuda imprescindível e disponibilidade ao longo de todo o percurso.

Às minhas colegas de laboratório, Joana, Ana e Carina pelo companheirismo e pelo bom ambiente que me proporcionaram.

Aos meus pais, Tina e Paulo, por me darem a possibilidade de concluir mais esta etapa no meu percurso académico, pelo apoio incondicional e por acreditarem sempre em mim. Aos meus avós, tios e primos, por todo o carinho e apoio.

Às melhores amigas que fiz nesta etapa da minha vida que é a universidade e que me acompanham desde o início, Carolina, Catarina, Lara e Rafaela quero agradecer pela amizade, apoio e carinho e por nunca me abandonarem.

A todos, espero nunca vos desiludir. Muito obrigada!

Folha em branco

Resumo

O consumo de drogas remonta há inúmeros anos e continua, nos dias de hoje, a representar um problema a nível global. A cocaína (COC) é umas das drogas mais consumidas a nível mundial e atua como estimulante do sistema nervoso central (SNC), enquanto que os opiáceos, lícitos ou ilícitos, atuam como depressores do mesmo. De forma a detetar e quantificar estas drogas podem ser utilizadas várias amostras biológicas, destacando-se a utilização do fluido oral, que nos últimos anos tem vindo a aumentar por se tratar de uma amostra de recolha fácil e não invasiva. Uma das maiores limitações dos laboratórios de toxicologia reside na dificuldade de armazenar amostras antes e após análise até a sua destruição ou ordem devido aos sistemas clássicos de armazenamento. Além disso devido ao elevado volume de amostras que alguns laboratórios recebem, tal obriga a que muitas vezes estas amostras tenham de ser guardadas até à sua análise, podendo estar comprometida a estabilidade dos analitos nelas presentes. Por este motivo o parâmetro da estabilidade, é cada vez mais um parâmetro fundamental que deve ser estudado em qualquer desenvolvimento e validação de um método bioanalítico. Existem atualmente diferentes sistemas de tratamento de amostras, dentre eles os *dried saliva spots* (DSS). Os DSS, uma variação dos *dried blood spots* (DBS), consistem em dispositivos que permitem a recolha e o tratamento de amostras de fluido oral com a vantagem do rápido processamento laboratorial e baixo custo.

Assim sendo, o presente estudo tem como principal objetivo avaliar a influência de diferentes conservantes (ácido ascórbico, fluoreto de sódio e azida de sódio) na estabilidade da COC e opiáceos, bem como dos seus metabolitos, em amostras de fluido oral utilizando como técnica de extração os DSS e como técnica de identificação e quantificação a cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massa em tandem (GC-MS/MS). Os analitos englobados no estudo foram a COC, ecgonina metilester (EME), benzoilecgonina (BEG), cocaetileno (COET), norcocaína (NCOC), morfina (MOR), codeína (COD) e 6-monoacetilmorfina (6-MAM). O procedimento de extração previamente otimizado, resultou na aplicação de 50 µL de fluido oral, com conservante, nos *spots* que foram deixados a secar 12 horas. A extração foi realizada com a adição de 3 mL de metanol, seguido de agitação durante 5 minutos, centrifugação, evaporação à secura do sobrenadante, derivatização e posterior injeção no sistema de GC-MS/MS. Os parâmetros suscetíveis de influenciar a estabilidade como a temperatura, luz, concentração do conservante e tempo de armazenamento foram avaliados recorrendo a um desenho experimental (DOE, do inglês

design of experiments), uma ferramenta estatística que permite avaliar de forma multivariada estes parâmetros e o modo como interagem entre si.

No caso do ácido ascórbico, a BEG, a COD e a MOR apresentaram o fator tempo como aquele com maior influência na estabilidade. Relativamente ao fluoreto de sódio nenhum dos fatores teve influência estatisticamente significativa, e a azida de sódio foi descartada uma vez que apresentava piores resultados relativamente à resolução cromatográfica dos analitos em estudo. Assim, as melhores condições que permitem observar um aumento da estabilidade, e por isso as escolhidas para realizar o estudo de estabilidade a longo prazo, foram temperatura ambiente, presença de luz e 1% de fluoreto de sódio.

No que diz respeito à estabilidade a longo prazo os resultados revelaram que, nas condições referidas, a COD foi estável apenas 1 dia, a EME manteve-se estável durante 3 dias, a COC, o COET, a NCOC e a 6-MAM foram estáveis por 7 dias, a MOR apresentou estabilidade de 14 dias e a BEG manteve-se estável ao longo de todo o estudo (136 dias).

Este estudo permitiu avaliar quais as melhores condições para maximizar a estabilidade da COC, opiáceos e respetivos metabolitos em amostras de fluido oral, permitindo ainda avaliar a utilização dos DSS como dispositivos de recolha, armazenamento e tratamento das amostras. É ainda importante salientar que este é o primeiro estudo que deteta estas drogas de abuso em amostras de fluido oral com recurso à técnica de DSS e que avalia a sua estabilidade.

Palavras-chave

Cocaína;Opiáceos;*Dried saliva spots*;Fluido oral;Estabilidade

Abstract

Drug use dates back many years and continues to be a global problem. Cocaine (COC) is one of the most consumed drugs in the world and acts as a central nervous system (SNC) stimulant, while opioids, legal or illegal, act as depressants of the same. In order to detect and quantify these drugs, several biological samples can be used and in recent years, the use of oral fluid, has been increasing due to its easy and non-invasive collection. One of the biggest limitations of toxicology laboratories is the difficulty of storing samples before and after analysis, which is due to the classic storage systems. This is even more important for heavily busy laboratories, and may have consequences in the stability of the analytes. For this reason, the stability is increasingly an essential parameter that must be studied in any development and validation of a bioanalytical method. Different sample treatment systems exist, and dried saliva spots (DSS) is one of them. DSS, a variation of dried blood spots (DBS), consist of a device that allows the collection and treatment of oral fluid samples with the advantage of rapid sample processing with low cost associated.

Therefore, the present study aims to evaluate the influence of different preservatives (ascorbic acid, sodium fluoride and sodium azide) on the stability of COC and opiates, as well as their metabolites in oral fluid samples using DSS as extraction technique and gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) for identification and quantification of the selected analytes. The chosen substances were COC, ecgonine methylester (EME), benzoylecgonine (BEG), cocaethylene (COET), norcocaine (NCOC), morphine (MOR), codeine (COD) and 6-monoacetylmorphine (6-MAM). The previously optimized extraction procedure resulted in the application of 50 μ L of oral fluid with preservative to the spots after which were left to dry for 12 hours. The extraction was performed by adding 3 mL of methanol, followed by agitation for 5 minutes, centrifugation, evaporation of the supernatant to dryness, derivatization and subsequent injection into the GC-MS/MS system. The parameters likely to influence stability such as temperature, light, preservative concentration and time of storage were evaluated using the design of experiments (DOE), a statistical tool that allows multivariate evaluation of these parameters and the way they interact with each other.

For ascorbic acid, BEG, COD and MOR presented the time factor as the one with greatest influence on stability. Regarding sodium fluoride, none of the studied factors had a statistical influence, and sodium azide was rejected, as it presented the worst results regarding the chromatographic resolution of the analytes under study. This way, the best

conditions that increased stability, and therefore those chosen for the long-term stability study, were room temperature, presence of light and 1% sodium fluoride.

Regarding long-term stability, the results revealed that under the mentioned conditions, COD was only stable for 1 day, EME was stable for 3 days, COC, COET, NCOC and 6-MAM were stable for 7 days, MOR was stable for 14 days and BEG remained stable throughout the study period of time (136 days).

This study allowed us to assess which were the best conditions to maximize the stability of COC, opiates and their metabolites in oral fluid samples, allowing, also, the evaluation of DSS as devices for storage and sample treatment. It is also important to note that this is the first study that detects these drugs of abuse in oral fluid samples using DSS technique and evaluates their stability.

Keywords

Cocaine;Opiates;*Dried saliva spots*;Oral fluid;Stability

Índice

Dedicatória	iii
Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract.....	ix
Lista de Figuras	xiii
Lista de Tabelas	xv
Lista de Gráficos	xvii
Lista de Acrónimos	xix
Capítulo 1.....	1
Introdução	1
1. Consumo de cocaína.....	1
1.1. Evolução do consumo	1
1.2. Extração e Síntese	2
1.3. Farmacocinética.....	3
1.4. Mecanismo de ação.....	9
1.5. Efeitos adversos	10
1.6. Tratamento	11
2. Consumo de opiáceos.....	11
2.1. Evolução do consumo	11
2.2. Extração e Síntese	12
2.3. Farmacocinética.....	13
2.4. Mecanismo de Ação	18
2.5. Efeitos adversos	19
2.6. Tratamento	20
3. Investigação Toxicológica	21
4. Determinação de cocaína e opiáceos em amostras de fluido oral.....	23
4.1. Fluido oral como amostra de interesse em Toxicologia	23
4.1.1. Fisiologia e mecanismo de incorporação	24
4.1.2. Recolha da amostra	25
4.1.3. Armazenamento, preservantes e conservantes	26
4.2. Detecção e quantificação de cocaína, opiáceos e metabolitos em fluido oral	27
4.3. <i>Dried Matrix Spots</i>	41
Capítulo 2	45

Justificação do tema e objetivos.....	45
Capítulo 3	47
Procedimento experimental.....	47
1. Materiais e métodos.....	47
1.1. Reagentes e padrões	47
1.2. Amostras biológicas.....	47
1.3. Condições de GC-MS/MS.....	48
1.4. Preparação da amostra.....	48
2. Resultados e discussão.....	49
2.1. Identificação dos compostos em estudo.....	49
2.2. Desenho experimental.....	51
2.2.1. Ácido Ascórbico.....	53
2.2.2. Fluoreto de sódio.....	63
2.2.3. Azida de sódio	72
2.3. Condições ótimas.....	74
2.4. Ensaio sem conservante	76
2.5. Estabilidade a longo prazo	77
3. Conclusões e considerações finais	87
Referências.....	88

Lista de Figuras

Figura 1. Metabolismo da COC. Adaptado de Dinis-Oliveira [10]	6
Figura 2. Estrutura química da COC. Adaptado de Pomara et al. [22].....	8
Figura 3. Estrutura química da BEG. Adaptado de Ambach et al. [23]	8
Figura 4. Estrutura química da EME. Adaptado de Ambach et al. [23]	8
Figura 5. Estrutura química COET. Adaptado de Ambach et al. [23].....	9
Figura 6. Estrutura química NCOC. Adaptado de Ambach et al. [23]	9
Figura 7. Metabolismo da HER. Adaptado de Boerner et al. [58]	13
Figura 8. Metabolismo da MOR. Adaptado de Sverrisdóttir et al. [61]	15
Figura 9. Metabolismo da COD. Adaptado de Hull et al. e Crews et al. [63, 65]	15
Figura 10. Estrutura química da HER. Adaptado de Rook et al. [66].....	16
Figura 11. Estrutura química da 6-MAM. Adaptado de Bogen et al. [68].....	16
Figura 12. Estrutura química da MOR. Adaptado de Sverrisdóttir et al. [61].....	17
Figura 13. Estrutura química da COD. Adaptado de Hull et al. [63]	17
Figura 14. Espectro de massa da COD em modo <i>scan</i> (10 µg/mL)	49
Figura 15. <i>Product ion</i> do íon 369.8 para a COD.....	50
Figura 16. Cromatogramas obtidos para a EME, para a condição de temperatura ambiente, presença de luz e baixa concentração do conservante para o dia 1 (A) e para o dia 7 (B) ..	73
Figura 17. Cromatogramas obtidos para a EME e COET, para a condição de temperatura a 4°C, ausência de luz e alta concentração do conservante para o dia 1 (A) e para o dia 7 (B)	74

Folha em branco

Lista de Tabelas

Tabela 1. Início, pico e duração do efeito da COC em função da via de entrada. Adaptado de Goldstein et al., Coe et al. e Cunha-Oliveira et al. [2, 14, 17].....	4
Tabela 2. Vantagens e desvantagens do uso de fluido oral como amostra biológica em toxicologia. Adaptado de Gallardo et al. e Elmongy et al. [100, 103]	24
Tabela 3. Métodos cromatográficos para detecção e quantificação de COC, opiáceos e dos seus metabolitos em amostras de fluido oral.	32
Tabela 4. Vantagens da utilização de DMS. Adaptado de Jacques et al. [144]	41
Tabela 5. Tempos de retenção e transições para os diferentes analitos em estudo	50
Tabela 6. Matriz experimental	52
Tabela 7. Resultados das extrações do DOE para o AA.....	53
Tabela 8. Resultados das extrações do DOE para o NaF	63
Tabela 9. Resultados das extrações do DOE para a NaN_3	72
Tabela 10. Comparação do AA com o NaF	75
Tabela 11. Respostas obtidas para o ensaio sem conservante	76
Tabela 12. Média entre as respostas obtidas para ensaio sem conservante para o dia 1 e dia 7	76
Tabela 13. Resposta dos analitos com e sem conservante após 1 e 7 dias de armazenamento nas condições ideais	77
Tabela 14. Estudo da estabilidade a longo prazo (n=3)	78

Folha em branco

Lista de Gráficos

Gráfico 1. Diagrama de Pareto da EME - AA.....	54
Gráfico 2. Diagrama de Pareto da COC - AA.....	54
Gráfico 3. Diagrama de Pareto do COET - AA.....	55
Gráfico 4. Diagrama de Pareto da BEG - AA.....	55
Gráfico 5. Diagrama de Pareto da NCOC - AA.....	55
Gráfico 6. Diagrama de Pareto da COD - AA.....	56
Gráfico 7. Diagrama de Pareto da MOR - AA.....	56
Gráfico 8. Diagrama de Pareto da 6-MAM - AA.....	56
Gráfico 9. Efeitos principais para a EME - AA.....	57
Gráfico 10. Efeitos principais para a COC - AA.....	57
Gráfico 11. Efeitos principais para o COET - AA.....	57
Gráfico 12. Efeitos principais para a BEG - AA.....	58
Gráfico 13. Efeitos principais para a NCOC - AA.....	58
Gráfico 14. Efeitos principais para a COD - AA.....	58
Gráfico 15. Efeitos principais para a MOR - AA.....	58
Gráfico 16. Efeitos principais para a 6-MAM - AA.....	58
Gráfico 17. Interações entre os vários parâmetros para a EME - AA.....	59
Gráfico 18. Interações entre os vários parâmetros para a COC - AA.....	59
Gráfico 19. Interações entre os vários parâmetros para o COET - AA.....	60
Gráfico 20. Interações entre os vários parâmetros para a BEG - AA.....	60
Gráfico 21. Interações entre os vários parâmetros para a NCOC - AA.....	60
Gráfico 22. Interações entre os vários parâmetros para a COD - AA.....	61
Gráfico 23. Interações entre os vários parâmetros para a MOR - AA.....	61
Gráfico 24. Interações entre os vários parâmetros para a 6-MAM - AA.....	61
Gráfico 25. Diagrama de Pareto da EME - NaF.....	64
Gráfico 26. Diagrama de Pareto da COC - NaF.....	64
Gráfico 27. Diagrama de Pareto do COET - NaF.....	64
Gráfico 28. Diagrama de Pareto da BEG - NaF.....	65
Gráfico 29. Diagrama de Pareto da NCOC - NaF.....	65
Gráfico 30. Diagrama de Pareto da COD - NaF.....	65
Gráfico 31. Diagrama de Pareto da MOR - NaF.....	66
Gráfico 32. Diagrama de Pareto da 6-MAM - NaF.....	66
Gráfico 33. Efeitos principais para a EME - NaF.....	67
Gráfico 34. Efeitos principais para a COC - NaF.....	67

Gráfico 35. Efeitos principais para o COET - NaF	67
Gráfico 36. Efeitos principais para a BEG - NaF.....	67
Gráfico 37. Efeitos principais para a NCOC - NaF	67
Gráfico 38. Efeitos principais para a COD - NaF	68
Gráfico 39. Efeitos principais para a MOR - NaF	68
Gráfico 40. Efeitos principais para a 6-MAM	68
Gráfico 41. Interações entre os vários parâmetros para a EME - NaF.....	69
Gráfico 42. Interações entre os vários parâmetros para a COC - NaF.....	69
Gráfico 43. Interações entre os vários parâmetros para o COET - NaF	69
Gráfico 44. Interações entre os vários parâmetros para a BEG - NaF.....	70
Gráfico 45. Interações entre os vários parâmetros para a NCOC - NaF	70
Gráfico 46. Interações entre os vários parâmetros para a COD - NaF	70
Gráfico 47. Interações entre os vários parâmetros para a MOR - NaF.....	71
Gráfico 48. Interações entre os vários parâmetros para a 6-MAM - NaF	71
Gráfico 49. Estabilidade a longo prazo da EME	80
Gráfico 50. Estabilidade a longo prazo da COC	81
Gráfico 51. Estabilidade a longo prazo do COET	81
Gráfico 52. Estabilidade a longo prazo da BEG	81
Gráfico 53. Estabilidade a longo prazo da NCOC.....	82
Gráfico 54. Estabilidade a longo prazo da COD.....	82
Gráfico 55. Estabilidade a longo prazo da MOR	82
Gráfico 56. Estabilidade a longo prazo da 6-MAM	83

Lista de Acrónimos

6-MAM	6-Monoacetilmorfina
AA	Ácido ascórbico
AC	Adenilato ciclase
AEME	Anidroecgonina metil éster
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
APCI	Ionização química à pressão atmosférica (do inglês <i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>)
APPI	Fotoionização à pressão atmosférica (do inglês <i>Atmospheric pressure photo ionization</i>)
AVC	Acidente vascular cerebral
BEG	Benzoilecgonina
BuChE	Butirilcolinesterase
COC	Cocaína
COD	Codeína
COET	Cocaetileno
CYP	Citocromo P450
DBS	<i>Dried blood spots</i>
DMS	<i>Dried matrix spots</i>
DOE	Desenho experimental (do inglês <i>Design of experiments</i>)
DSS	<i>Dried saliva spots</i>
EI	Ionização de impacto eletrónico (do inglês <i>Electron ionization</i>)
EME	Ecgonina metilester
ESI	Ionização por electrospray (do inglês <i>Electrospray ionization</i>)
GC	Cromatografia gasosa (do inglês <i>Gas chromatography</i>)
hCE-1	Carboxilesterase 1
hCE-2	Carboxilesterase 2
HER	Heroína
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
LC	Cromatografia líquida (do inglês <i>Liquid Chromatography</i>)
LLE	Extração líquido-líquido (do inglês <i>Liquid-liquid extraction</i>)
LOD	Limite de deteção (do inglês <i>Limit of detection</i>)
LOQ	Limite de quantificação (do inglês <i>Limit of quantitation</i>)
M3G	Morfina-3-glucuronido
M6G	Morfina-6-glucuronido
MEPS	Microextração em seringa empacotada (do inglês <i>Microextraction by packed sorbent</i>)
MOR	Morfina
MS	Espectrometria de massa (do inglês <i>Mass spectrometry</i>)
MS/MS	Espectrometria de massa em tandem
MSTFA	N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida
NCOC	Norcocaína
PCI	Ionização química positiva (do inglês <i>Positive chemical ionization</i>)
PPT	Precipitação de proteínas
SNC	Sistema nervoso central

SPE	Extração em fase sólida (do inglês <i>Solid phase extraction</i>)
SPME	Microextração em fase sólida (do inglês <i>Solid phase microextraction</i>)
TMCS	Trimetilclorosilano
UGT1A3	Uridina difosfo-glucuronosiltransferase 1A3
UGT2B7	Uridina difosfo-glucuronosiltransferase 2B7
UHPLC ou UPLC	Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (do Inglês <i>Ultra high performance liquid chromatography</i>)

Capítulo 1

Introdução

1. Consumo de cocaína

1.1. Evolução do consumo

A cocaína (COC) é uma das drogas de abuso cujo consumo é mais antigo. Na sequência de escavações arqueológicas no Peru e na Bolívia, foram encontradas múmias que continham restos de folhas de coca na boca. Sabe-se, ainda, que o uso de COC teve origem nas grandes civilizações pré-colombianas dos Andes há mais de 4500 anos, onde as folhas de coca eram utilizadas em cerimónias religiosas e rituais. Em 1492, o uso das folhas de coca foi proibido quando os espanhóis conquistaram a América do Sul, mas esta proibição não durou muito tempo pois estes perceberam que os índios não conseguiam fazer os trabalhos mais duros sem o seu uso, tendo por isso, em 1569 sido declarado o ato de mascar folhas de coca como um hábito essencial à saúde. Na Europa, os primeiros relatos foram publicados em 1507 por Américo Vespúcio e descrevem o consumo de COC como folhas mastigadas com cinzas [1, 2].

Em 1859, o químico alemão Albert Niemann conseguiu isolar diferentes alcaloides a partir das folhas de coca, entre os quais se destaca a COC [1, 2]. Mais tarde, em 1880, surgiram os primeiros relatos do uso de COC para fins terapêuticos, onde era usada como agente anestésico em cirurgias. Em 1884, Sigmund Freud publicou um livro no qual defendia o uso de COC como afrodisíaco e como fármaco para tratamento de depressão e alcoolismo [3, 4]. Em 1890, a COC começou a ser usada como ingrediente da famosa bebida “Coca-Cola” mas os efeitos indesejados associados ao seu uso, como a violência, levaram a que fosse removida desta bebida passando a ser classificada como droga em 1914 [5].

Até aos anos 70, data em que a COC começou a ser usada como droga recreativa, a única forma de consumo disponível nas ruas era o cloridrato de COC. Mais tarde, nos anos 80, e com o surgimento nos Estados Unidos da América (EUA) de uma nova forma de COC, o “crack”, o consumo de COC sofreu um aumento brusco devido ao aumento da oferta e descida dos custos de produção, com o número de consumidores nos EUA estimado em 5,8 milhões em 1985. Em 2016 o número total de consumidores de COC foi estimado em 18,2 milhões em todo o mundo [3, 4, 6].

Atualmente, a COC é uma das drogas de abuso mais consumidas na Europa [7], tendo nos últimos anos ganho popularidade e perdido assim o estatuto de droga de elite, sendo o seu uso identificado como um problema de saúde pública tanto na Europa como nos EUA [8].

De acordo com o relatório anual de 2019 do Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência, cerca de 1,2% da população europeia com idade compreendida entre 15 e 64 anos, consumiu COC no último ano [9].

1.2. Extração e Síntese

A COC é extraída da planta *Erythroxylum coca* e representa 20 a 90% do conteúdo total de alcaloides presentes nas folhas desta planta. Apesar da COC ser encontrada na globalidade da planta, de modo a que a extração seja o mais rentável possível, são usadas as folhas uma vez que é nesta parte da planta que se encontra a maior concentração desta substância, cerca de 2% do peso seco. Após colheita, as folhas podem ser consumidas de diversas formas, por transformação em cigarros os quais são posteriormente fumados, utilizadas para chá ou mastigadas. Para além destas formas de consumo, as folhas podem ainda ser sujeitas a processos de extração da COC para consumo como pasta de coca, cloridrato de COC ou *crack* [10].

O primeiro passo para obtenção da “pasta de coca” consiste em macerar as folhas, adicionar uma base inorgânica, normalmente carbonato de sódio ou óxido de cálcio (cal), e humedecer com água. De seguida adiciona-se um solvente orgânico às folhas maceradas, sendo o mais comum o querosene seguido de gasóleo e gasolina. Esta mistura é agitada vigorosamente por várias horas ou deixada em repouso com agitação ocasional por 3 dias, de modo a que a COC seja extraída para o solvente. A eficiência da extração depende de vários fatores como o tempo de contacto com o solvente ou a maceração, sendo que quanto mais finas as folhas forem cortadas, maior a eficiência da transferência da COC para o solvente orgânico. Após extração, o solvente com a COC é retirado da mistura através de pressão, filtração ou drenagem. No caso de se observarem duas fases, a de baixo (aquosa) deve ser descartada. Posteriormente, é adicionado ácido sulfúrico e a mistura deve ser mexida vigorosamente por 2-10 minutos até que se obtenham novamente duas fases. O ácido converte a base de COC em sulfato de COC que se dissolve na fase aquosa (*agua rica*), à qual é lentamente adicionada uma base (carbonato de sódio, cal ou soda cáustica) com agitação constante. A base vai neutralizar o ácido sulfúrico e converter novamente o sulfato de COC em base de COC, que precipita sob a forma de um sólido castanho-amarelado denominado “pasta de coca”, que é depois filtrado e seco [11]. Esta pasta que contém 40-80% de COC, e que apenas pode ser fumada, é depois tratada e vendida sob duas formas diferentes, cloridrato de COC e em forma de base livre designando-se como “crack” [10].

A pasta de coca é em primeiro lugar redissolvida numa baixa quantidade de ácido sulfúrico de modo a reconstituir a *agua rica*. Posteriormente é adicionado permanganato de potássio que vai reagir com as impurezas presentes na pasta de coca e reduzir-se a dióxido de manganês, um sólido castanho insolúvel que precipita. Este reagente é adicionado até que todas as impurezas se encontrem no precipitado, ou seja, até que a solução seja incolor. A solução é filtrada e novamente tratada com uma base, normalmente amoníaco, sempre com agitação. O amoníaco neutraliza o sulfato de COC e algum ácido que ainda reste, levando à precipitação da base de COC purificada a qual é filtrada, seca e armazenada. Seguidamente, a base de COC é dissolvida em éter etílico, filtrada ou decantada de modo a eliminar impurezas insolúveis que ainda existam e é adicionada ao filtrado uma mistura de acetona e ácido clorídrico. O ácido atua imediatamente convertendo a base de COC em cloridrato de COC que precipita sob a forma de cristais brancos. O processo de cristalização dura cerca de 3 a 6 horas e quando termina o produto é filtrado, seco, pressionado, empacotado e distribuído [11]. O cloridrato de COC apresenta-se sob a forma de um pó branco, inodoro e amargo [12] e pode ser consumido por via intravenosa ou intranasal, mas nunca fumado, uma vez que tem um ponto de fusão elevado e se decompõe facilmente a temperaturas superiores a 198 °C [10].

Por outro lado, o crack é produzido pela mistura de cloridrato de COC com uma base (ex.: bicarbonato de sódio ou amoníaco) e posterior dissolução em éter. Por fim, esta mistura é aquecida de modo a evaporar o líquido dando origem a um cristal estável a temperaturas altas, que é fumado [10, 13]. No que diz respeito à pureza, a do cloridrato de COC varia entre 20 e 95% e pode ser influenciada por adulterantes como açúcares que são muitas vezes adicionados, enquanto que a pureza do crack ronda geralmente os 20 a 80% [14].

1.3. Farmacocinética

A via de entrada (pulmonar, intravenosa, intranasal ou oral), a forma em que se encontra a COC consumida (cloridrato de COC ou crack) e o seu consumo concomitante com outras drogas, nomeadamente álcool, influenciam a intensidade e a duração do seu efeito [15].

O uso de crack, com administração por via pulmonar, resulta numa penetração rápida e numa concentração plasmática máxima rapidamente obtida, como consequência da absorção eficiente nos alvéolos pulmonares para a corrente sanguínea. No caso da via intranasal, a COC difunde-se pela mucosa nasal e só depois é absorvida. Esta mucosa, combinada com a ação vasoconstritora da COC, resulta numa taxa de absorção mais lenta o que faz com os efeitos sejam retardados. Relativamente à via oral, a taxa de absorção é lenta devido ao tempo que a COC leva para chegar ao estômago e intestino. No que diz respeito à duração dos efeitos, contrariamente às vias pulmonar e intravenosa cuja duração dos efeitos

é de 5 a 15 minutos e de 20 a 60 minutos respetivamente, o consumo de COC pela via intranasal e via oral produz menores concentrações por um período de tempo mais prolongado devido às baixas taxas de absorção. A biodisponibilidade é também influenciada pela via de administração da COC, verificando-se para a via pulmonar biodisponibilidades superiores a 90% enquanto que para a via intranasal esta é de aproximadamente 80% [2, 16].

Na tabela 1 encontram-se descritos alguns parâmetros farmacocinéticos associados com a concentração plasmática máxima, a via de entrada e a duração dos efeitos.

Tabela 1. Início, pico e duração do efeito da COC em função da via de entrada. Adaptado de *Goldstein et al., Coe et al. e Cunha-Oliveira et al.* [2, 14, 17]

Via de entrada	Início do efeito	Concentração plasmática máxima	Duração do efeito
Pulmonar	3-5 segundos	1-3 minutos	5-15 minutos
Intravenosa	10-60 segundos	3-5 minutos	20-60 minutos
Intranasal	5 minutos	15-20 minutos	60-90 minutos
Oral	30 minutos	50-90 minutos	60-120 minutos

Após a absorção, a COC é rapidamente distribuída estando aproximadamente 90% ligada a proteínas plasmáticas. A COC consegue atravessar a placenta e pode ser encontrada no leite materno [18].

Em amostras *postmortem*, a COC é encontrada na urina, sangue e cabelo por ordem decrescente de concentração [19], podendo também ser encontrada em tecido cerebral [20].

No caso de se suspeitar de morte causada por abuso de COC, a causa pode ser confirmada através da análise da relação entre a distribuição e a concentração de COC/benzoilecgonina (BEG) no cérebro e no sangue, respetivamente. A BEG não atravessa a barreira hematoencefálica devido à sua elevada polaridade, no entanto a COC consegue atravessar esta mesma barreira [20].

Foram identificadas em humanos, duas enzimas que estão envolvidas no metabolismo da COC, a carboxilesterase 1 (hCE-1) e a carboxilesterase 2 (hCE-2). Estas enzimas estão presentes em vários órgãos como o coração, estômago e rins mas é no fígado que existem em maior quantidade sendo por isso, neste órgão, que ocorre maioritariamente o metabolismo da COC [10]. Deste modo, e devido à sua elevada capacidade metabólica, o fígado é um dos órgãos que mais sofre com lesões por compostos exógenos como é o caso das drogas, uma vez que do seu metabolismo pelo citocromo P450 resultam espécies reativas de oxigénio e/ou radicais livres [21].

O metabolismo pode dar origem a metabolitos inativos ou menos ativos comparativamente à droga original, mas existem algumas drogas que originam metabolitos ainda mais tóxicos do que a droga mãe, como é o caso da COC [21].

A COC é metabolizada em dois metabolitos principais, BEG e ecgonina metilester (EME) e em metabolitos minoritários como norcocaína (NCOC), p-hidroxicocaína, m-hidroxicocaína, p-hidroxibenzoilecgonina e m-hidroxibenzoilecgonina. A maior transformação da COC dá-se pela hidrólise dos seus grupos éster o que pode ser considerado um passo de destoxificação uma vez que a BEG e a EME são metabolitos inativos [10].

A BEG pode ser formada através da ação da hCE-1 ou através de hidrólise espontânea da COC [22, 23] e posteriormente metabolizada a norbenzoilecgonina por ação da hCE-2 e oxidada a p-hidroxibenzoilecgonina e m-hidroxibenzoilecgonina [10]. A hidrólise da COC pelas esterases hepática e plasmática, hCE-2 e butirilcolinesterase (BuChE), respetivamente, origina EME, um metabolito inativo da COC que resulta da quebra da ligação éster [10, 14, 24]. Tanto a BEG como a EME podem sofrer uma nova reação e ser convertidas em ecgonina, sendo que no caso da EME esta conversão ocorre por hidrólise espontânea [10, 14]. Para além da ecgonina, a EME pode também ser metabolizada a ecgonina etil éster por ação do etanol [10].

A NCOC pode ser formada através de duas reações que representam menos de 10% do metabolismo da COC: (1) *N*-desmetilação pelo citocromo P450 CYP3A4 e (2) formação de COC *N*-óxido pela FAD monooxigenase seguida da ação do citocromo P450 que medeia a conversão a NCOC e formaldeído. A NCOC pode ser seguidamente metabolizada a norbenzoilecgonina e a *N*-hidroxi norcocaína, que se converte no radical livre de nitróxido da NCOC e por último no ião hepatotóxico, NO⁺ da NCOC [10].

Outra via minoritária de metabolização da COC é a sua hidroxilação a p-hidroxicocaína e m-hidroxicocaína [10].

Na presença de etanol, a conversão de COC a BEG e EME é inibida, o que faz com que a concentração plasmática de COC se mantenha elevada. Além disso, uma vez que o metabolismo da COC passa a ser feito por vias oxidativas alternativas, a concentração plasmática de NCOC também aumenta [10]. De seguida, a hCE-1 catalisa a transesterificação da COC a cocaetilenol (COET), um metabolito tóxico que pode ser novamente hidrolisado pela hCE-1 a BEG ou sofrer hidrólise pela hCE-2 e pela BuChE originando ecgonina etil éster [10, 22].

O aquecimento da COC durante a inalação de crack, resulta na formação de um produto de pirólise, anidroecgonina metil éster (AEME), que é rapidamente absorvido pelos pulmões e que é posteriormente metabolizado pela BuChE em ecgonidina [10]. A presença da AEME permite determinar que a COC foi fumada sendo por isso usada como marcador do consumo de crack [10, 25]. A figura 1 mostra o processo de metabolização da COC.

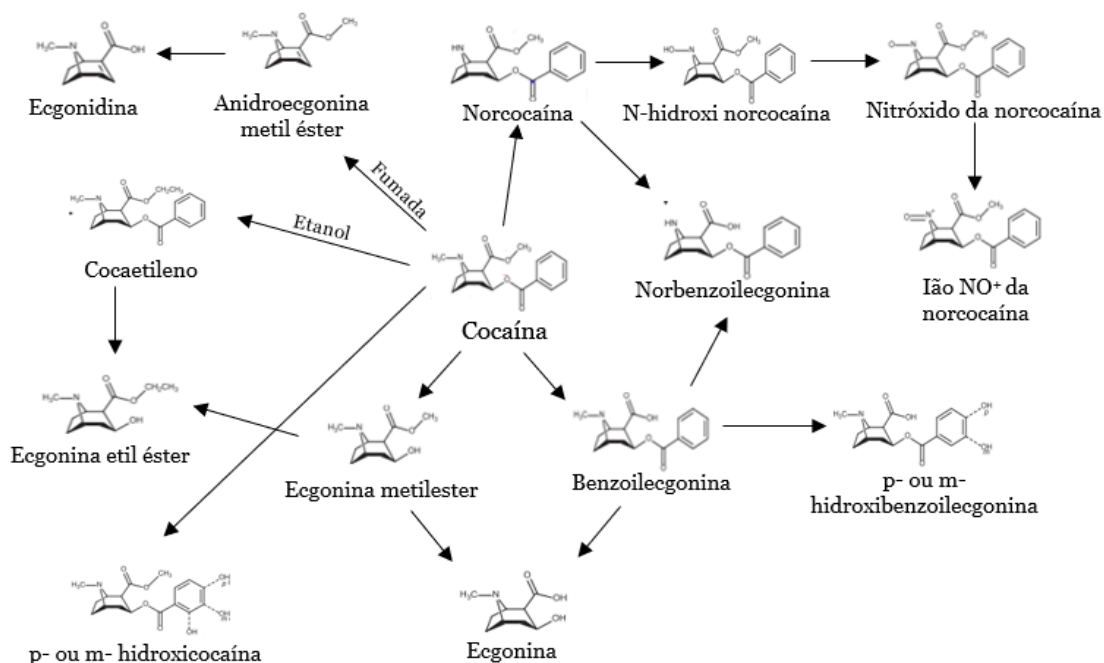


Figura 1. Metabolismo da COC. Adaptado de *Dinis-Oliveira* [10]

Dos metabolitos resultantes, a BEG e a EME são os produtos de excreção urinária maioritários, sendo na maioria dos casos a BEG o metabolito mais prevalente. Para alguns indivíduos, quando a COC é fumada, o metabolito mais prevalente passa a ser a EME [26].

A COC e os seus metabolitos são eliminados maioritariamente por via urinária, sendo possível recuperar 85 a 90% destes compostos numa amostra de urina. Cerca de 1 a 5% da droga é eliminada inalterada na urina de modo dependente do pH e 75 a 90% é eliminada na forma de BEG e EME [18, 27].

Cone et al. [26], determinaram que a percentagem de cada metabolito que é detetada na urina depende da via de administração da COC. Estes autores analisaram amostras de urina recolhidas três dias após o consumo de COC por diferentes vias e determinaram que quando a administração se deu por via intravenosa as percentagens excretadas na urina de cada composto foram 1%, 39%, 15% e 0.03% para COC, BEG, EME e NCOC, respetivamente. Quando a COC foi administrada por via intranasal obtiveram 0.5% de COC, 30% de BEG, 13% de EME e 0.02% de NCOC. Por último, para a administração pulmonar obtiveram as seguintes percentagens, 0.5% de COC, 16% de BEG, 7% de EME e quantidades vestigiais

(0.003%) de NCOC. Para além disto, concluíram ainda que a via de administração também influencia os tempos de eliminação da COC e dos seus metabolitos [26].

O tempo de meia vida da COC é relativamente curto, aproximadamente 45 a 90 minutos, o que faz com que seja eliminada na urina 4 a 6 horas após o seu consumo e possa ser detetada até 24-36 horas após o mesmo [2, 18, 27]. Por outro lado, os metabolitos BEG e EME têm um tempo de meia vida superior, 4 a 8 horas, e podem ser detetados até 48 horas após o seu consumo por via intravenosa e até 3 dias após consumo por via intranasal [10, 27]. Em caso de consumo crónico, os metabolitos da COC podem ser detetados até 6-14 dias após o seu consumo [18].

Para além da eliminação na urina, a COC e os seus metabolitos podem também ser eliminados através das fezes, mas em menor quantidade [10]. Enquanto que na urina, a percentagem de COC excretada na forma inalterada é de 0.9-5% e 2.2-3.3% para consumo agudo e crónico, respetivamente, nas fezes as percentagens de excreção são 1-1.6% para consumo agudo e 0.2-0.3% para consumo crónico [28].

Os principais produtos detetados em amostras biológicas de consumidores de COC são [25]:

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

De seguida e de forma resumida, apresentam-se os principais aspetos toxicológicos, características físico-químicas e respetivas estruturas químicas (figuras 2 a 6) dos compostos que foram abrangidos neste estudo.

Cocaína

A COC, cuja fórmula molecular é $C_{17}H_{21}NO_4$, apresenta uma massa molecular de 303,35 g/mol e é quimicamente conhecida como benzoilmetilecgonina. Esta é um composto básico uma vez que tem um pKa de 8.61, sendo estruturalmente um alcaloide tropanico composto por uma região hidrofóbica onde se encontra o anel benzeno e por uma região hidrofílica que consiste numa amina [3, 10, 29].

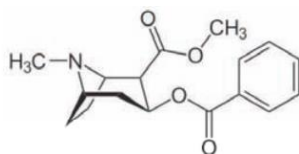


Figura 2. Estrutura química da COC. Adaptado de *Pomara et al.* [22]

Benzoilecgonina

A BEG pode ser detetada no plasma 15 a 30 minutos após ingestão de COC e atinge o seu pico em 1-4 horas. É considerada um metabolito farmacologicamente inativo e o seu tempo de eliminação (4 a 7 horas) é superior ao da COC, o que pode ser explicado pela elevada afinidade para as proteínas plasmáticas sendo por isso, usada na monitorização do seu consumo [10, 30].

Este metabolito tem como fórmula química C₁₆H₁₉NO₄, peso molecular de 289,33 g/mol e um valor de pKa de 9,54 [29, 31].

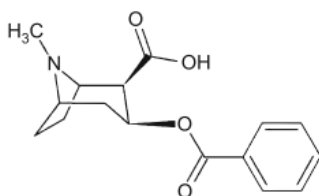


Figura 3. Estrutura química da BEG. Adaptado de *Ambach et al.* [23]

Ecgonina metilester

Quando sofre ação da hCE-2, a COC origina a EME [22], um metabolito inativo que apresenta tempo de meia vida superior ao da COC, e que é detetada em amostras biológicas após toda a COC ser eliminada [24].

A EME está presente em menores concentrações comparativamente à BEG e tem um tempo de meia vida inferior a este metabolito (3 a 4 horas) pois, sofre uma hidrólise espontânea que dá origem à ecgonina [10].

Em relação às propriedades físico-químicas, a EME, tem como fórmula molecular C₁₀H₁₇NO₃, apresenta um peso molecular de 199,25 g/mol e pKa de 9,04 [29, 31].

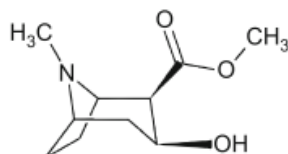


Figura 4. Estrutura química da EME. Adaptado de *Ambach et al.* [23]

Cocaetileno

Na presença de etanol, a hCE-1 catalisa a transesterificação da COC a COET, um metabolito tóxico [22]. Este metabolito representa 0.7% da COC extraída na urina 24 horas após consumo, e tem efeitos de euforia e estimulação do sistema nervoso semelhantes à COC, sendo por isso considerado o seu homólogo ativo. Para além disto, é também mais tóxico que a droga original uma vez que tem um tempo de meia vida superior (2.5-6 horas) [10, 15, 32].

O COET cuja fórmula molecular é $C_{18}H_{23}NO_4$, apresenta um peso molecular de 317,4 g/mol e um valor de pKa de 8,77 [29, 31].

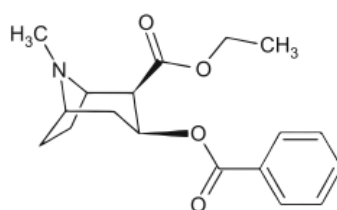


Figura 5. Estrutura química COET. Adaptado de *Ambach et al.* [23]

Norcocaína

A formação da NCOC envolve reações mediadas pelo citocromo P450 e pela FAD monooxigenase que levam também à produção de espécies reativas de oxigénio provocando stresse oxidativo e consequente apoptose celular, sendo por isso consideradas hepatotóxicas [21]. Deste modo, a NCOC tem um grande interesse clínico devido à sua hepatotoxicidade [30] e é um dos metabolitos mais tóxicos da COC [33]. Para além da sua hepatotoxicidade, sabe-se ainda que a NCOC consegue atravessar a barreira hematoencefálica [14].

Em relação às suas propriedades físico-químicas, a NCOC tem como fórmula molecular $C_{16}H_{19}NO_4$, apresenta um peso molecular de 289,33 g/mol e pKa de 9,56 [29, 31].

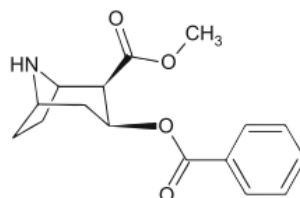


Figura 6. Estrutura química NCOC. Adaptado de *Ambach et al.* [23]

1.4. Mecanismo de ação

A COC estimula o sistema nervoso simpático através da inibição da recaptação de norepinefrina, dopamina e serotonina uma vez que interage com os transportadores destes neurotransmissores e inibe a ação da monoamina oxidase que os cataboliza, o que leva à

sua acumulação na fenda sináptica e à consequente atividade do sistema nervoso simpático exagerada e prolongada. Esta atividade aumentada é um estímulo para a liberação da norepinefrina, ou seja, para além de impedir a recaptção dos neurotransmissores, a COC, leva ainda a um aumento da concentração deste e de outros neurotransmissores excitatórios no cérebro, o que a curto prazo dá origem à sensação de euforia e a longo prazo produz tolerância aos efeitos eufóricos da COC assim como dependência física [6, 34, 35].

A estimulação das células dopaminérgicas aumenta a pressão sanguínea, efeito este que é antagonizado pelos bloqueadores dos recetores de dopamina D2 [36].

Além do anterior mecanismo de ação indicado, a COC bloqueia os canais de sódio e potássio induzindo depressão do sistema cardiovascular [37] e produzindo um aumento na atividade sináptica, quando administrada em baixas doses. Em doses elevadas, é muito mais perigosa do que qualquer outro estimulante do sistema nervoso central (SNC), podendo levar à morte súbita devido à ação que provoca nos canais de sódio e às suas propriedades anestésicas [36].

Para além disto, a COC estimula ainda a liberação de endotelina-1, um potente vasoconstritor das células endoteliais e inibe a produção de óxido nítrico, o principal vasodilatador destas células [37].

1.5. Efeitos adversos

O uso da COC está associado a uma série de problemas de saúde [7] tais como comprometimento neurológico [8], elevado risco de doença vascular, indução de danos nos sistemas cardiovascular, respiratório, nervoso, gastrointestinal e renal [6], e por vezes morte [7].

Estes efeitos dependem de vários fatores como a via de administração, a dose administrada e do próprio indivíduo [12].

A curto prazo, tem um efeito estimulante dando ao indivíduo uma sensação de bem-estar com aumento das sensações de euforia e desinibição, levando a taquipsiquismo, aumento de concentração, autoconfiança e hipervigilância [12, 24]. Ao nível do sistema cardiovascular, provoca taquicardia, arritmia [36], vasoconstrição [6], hipertensão, dissecação da aorta [38], enfarte do miocárdio [39] e acidente vascular cerebral (AVC) [40].

Para além destes efeitos, origina ainda hiperglicemia, hipertermia e midríase [6].

A longo prazo, o consumo de COC leva a deficiências ao nível da flexibilidade cognitiva [8, 41], memória [8, 42], toma de decisões [8, 43] e processamento de emoções [8, 44]. Em consumidores crónicos, a COC leva também a um estado de excitação, confusão, alucinações, autoconfiança, hipervigilância [10], comportamento violento, ansiedade, anorexia e perturbações de humor [24].

O uso repetido de COC induz alterações no organismo do consumidor que resultam em tolerância e dependência física. A tolerância é caracterizada pela diminuição progressiva do efeito gerado por uma determinada dose de droga com a sua utilização contínua, o que faz com que se tenha de aumentar a dose administrada para se conseguirem obter os efeitos desejados. A tolerância é muitas vezes acompanhada pelo desenvolvimento de dependência física. Esta é definida pela ocorrência de uma síndrome característica, síndrome de abstinência, quando a administração da droga é interrompida. Quanto mais depressa surgem os efeitos após a administração, maior é a probabilidade de o consumidor desenvolver dependência, ou seja, o uso de COC pelas vias intravenosa e pulmonar está associado à rápida progressão de uso para abuso e dependência [4, 45].

No que diz respeito à síndrome de abstinência de COC, as manifestações clínicas são opostas às verificadas aquando da intoxicação por esta droga, podem durar até alguns dias e quanto mais severas, pior será o prognóstico. Indivíduos nestas condições apresentam um quadro clínico depressivo com desconfiança, paranoia, hiperfagia, hipersónia e bradicardia. Em relação ao desejo de consumo, este pode persistir por várias semanas [12].

1.6. Tratamento

Não existe um tratamento antidótico em situações de *overdose*, mas a administração de benzodiazepinas pode ajudar a aliviar os problemas cardíacos e a reduzir o risco de ataque cardíaco e AVC [36]. Tipicamente, é administrado lorazepam por via intravenosa ou intramuscular de forma repetida até que os sintomas, essencialmente agitação do indivíduo, estejam totalmente controlados [15].

2. Consumo de opiáceos

2.1. Evolução do consumo

O termo opioide foi utilizado pela primeira vez por Acheson, para designar drogas com ação semelhante à morfina (MOR), mas que apresentam estrutura química diferente. Mais tarde, este conceito evoluiu e passou a englobar todas as substâncias naturais, semissintéticas ou sintéticas que reagem como agonistas ou antagonistas dos recetores opioides [46].

O consumo de ópio e a sua aplicação medicinal são práticas muito antigas que remontam à idade do bronze e idade neolítica. Em 1988, foi reconhecido o uso lícito de *Papaver somniferum* e desde o início do século 20 que o ópio e os seus derivados são sujeitos ao controlo internacional de droga [47]. Atualmente, este sistema de controlo tem por base três convenções das Nações Unidas, Convenção Única sobre Estupefacientes (1961), Convenção sobre Substâncias Psicotrópicas (1971) e Convenção sobre o Tráfico Ilícito de Estupefacientes e Substâncias Psicotrópicas (1988), tendo como principal objetivo limitar a produção, distribuição e uso de drogas para fins médicos e científicos [48, 49].

Nas últimas décadas, o uso de opiáceos lícitos tem vindo a aumentar especialmente para o tratamento da dor, essencialmente em pacientes com cancro, sendo que também é recomendado como tratamento alternativo após testes com antidepressivos e antiepiléticos [50].

Em relação aos opiáceos ilícitos, o Afeganistão é o seu maior produtor e o principal fornecedor para a Europa, onde o opiáceo mais consumido é a heroína (HER). Esta droga pode ser consumida por via oral, intravenosa ou intranasal e teve o seu primeiro pico de consumo nos anos 70 [9, 47].

De acordo com o relatório anual de 2019 do Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência [9], a prevalência do uso de opiáceos de alto risco em adultos com idades entre os 15 e os 64 anos é estimada em 0.4% da população da Europa, o que equivale a 1.3 milhões de utilizadores, e a percentagem de *overdoses* associadas a estas drogas é de 85%. Para além disto, em 2017, foi verificado que 35% dos pedidos de tratamento relacionados com drogas estavam associados ao consumo de opiáceos [9].

2.2. Extração e Síntese

O ópio é uma substância extraída a partir da papoila *Papaver somniferum* L. a qual é constituída aproximadamente por 25% de alcaloides. Estes estão divididos em 2 grupos distintos, fenantrénicos (MOR (4-21%), codeína (COD) (0.8-2.5%) e tebaína (0.5-2%)) e benzilisoquinolínicos (noscapina (4-8%) e papaverina (0.5-2.5%)) [47, 51]. A tebaína é um intermediário para a síntese da MOR e é usada pela indústria farmacêutica para a síntese de oxicodona, oximorfona, buprenorfina e naloxona. A noscapina, também denominada narcotina, é usada como antitússico, pensando-se que possa ter propriedades anticancerígenas, e a papaverina é usada como antiespasmódico [52].

Para além dos alcaloides já mencionados, na papoila do ópio podem ainda ser encontradas oripavina, boldina, reticulina, codamina, laudanina, laudanosina, norlaudanosina, narceína e criptopina em quantidades muito reduzidas [53].

As papoilas do ópio produzem alcaloides com grande importância farmacêutica como a MOR e a COD. O primeiro produto resultante da extração desta planta é a COD, que origina MOR através de uma reação irreversível. Estes compostos são metabolitos secundários, presentes essencialmente em cápsulas totalmente desenvolvidas ou em estádios tardios da planta [47].

Em alguns países, as sementes destas plantas são consumidas de forma comum em alimentos o que, uma vez que contêm MOR (0–450 µg/g de semente) e COD (0–57.1 µg/g de semente), pode interferir em resultados clínicos e forenses [54].

2.3. Farmacocinética

Heroína e 6-monoacetilmorfina

A HER é rapidamente absorvida seja qual for a via de administração. Quando esta é feita pela via intranasal e intramuscular, a concentração plasmática máxima é atingida em 3 a 5 minutos, e quando é administrada pela via subcutânea, demora 5 a 10 minutos a ser atingido o seu pico de concentração. Quando a via de entrada é a intravenosa, a concentração plasmática máxima é atingida em menos de 1 minuto [55]. Após ser absorvida, a HER é rapidamente hidrolisada pelas esterases do sangue e do fígado, sendo convertida em 6-monoacetilmorfina (6-MAM), que sofre nova hidrólise originando MOR (figura 7) [56, 57].

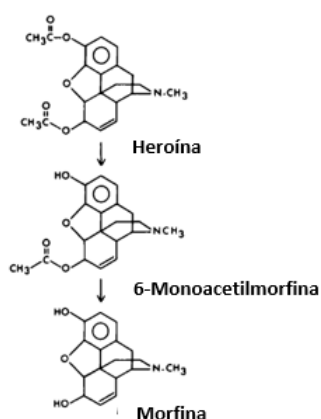


Figura 7. Metabolismo da HER. Adaptado de *Boerner et al.* [58]

Os níveis de HER no sangue diminuem muito rapidamente após administração intravenosa, tornando-se indetectáveis passado pouco tempo. Assim, esta droga não é encontrada na urina, o que implica que seja totalmente convertida antes da excreção renal [59].

Em contrapartida, a concentração máxima de 6-MAM é atingida aproximadamente entre 0.7 a 2.7 minutos após administração intravenosa da HER, e a sua detecção é possível até 1 a 3 horas no plasma e 1 a 4 horas na urina [59]. No que diz respeito à distribuição, devido à sua elevada lipofilicidade, a HER atinge rapidamente o cérebro sendo depois convertida em 6-MAM, que atinge o seu pico de concentração no cérebro passados 4.3 minutos da ingestão de HER, apresentando uma concentração muito superior à desta [60].

Uma vez que os metabolitos ativos da HER são tão importantes, a sua detecção é obrigatória para determinar se houve ou não consumo de HER, visto que o seu tempo de detecção é relativamente curto (5-10 minutos) [56].

O consumo de HER leva a efeitos ao nível do SNC muito graves que, sabe-se agora, são provocados pelo seu metabolito intermediário, a 6-MAM, por este apresentar uma elevada afinidade para os recetores μ [60].

Morfina

A MOR pode ser administrada por diferentes vias como a oral, intranasal, subcutânea ou intravenosa [58]. A absorção oral é lenta e ineficaz, resultado do metabolismo de primeira passagem pelo fígado, o que leva a que a sua biodisponibilidade após ingestão oral seja baixa (20 a 30 %) [61]. A distribuição mais rápida da MOR ocorre quando esta é administrada por via intravenosa, atingindo o seu pico de concentração na corrente sanguínea após 6 a 30 minutos do seu consumo, devido à solubilidade lipídica limitada [58, 62]. Esta substância é rapidamente distribuída por vários tecidos como pulmões, rins e fígado. Aproximadamente 15 a 35% da MOR liga-se a proteínas plasmáticas, predominantemente à albumina [61].

O metabolismo hepático representa aproximadamente 90% da eliminação da MOR, e tem como principal etapa metabólica a conjugação com ácido glucurónico, que por ação da uridina difosfo-glucuronosiltransferase 1A3 (UGT1A3) e da uridina difosfo-glucuronosiltransferase 2B7 (UGT2B7) origina morfina-3-glucuronido (M3G), e pela ação da UGT2B7 origina morfina-6-glucuronido (M6G), sendo o primeiro metabolito o principal (45-55%) (figura 8). Para além da conjugação com ácido glucurónico, a MOR pode ainda sofrer ação de enzimas da família do citocromo P450 (CYP3A4/CYP2C8) ocorrendo uma desmetilação que dá origem a normorfina [61].

Por fim, aproximadamente 10% da MOR é excretada na sua forma inalterada, enquanto que 45-55% é excretada sob a forma de M3G e 10-15% sob a forma de M6G. Estima-se ainda que uma pequena fração da MOR entre na circulação entero-hepática, sendo encontrada na forma inalterada ou sob forma de glucuronidos na biliar [61].

A eliminação a curto prazo da MOR livre que ocorre logo após o consumo, demora 3 a 4 horas em adultos, o que limita a duração do efeito analgésico [62].

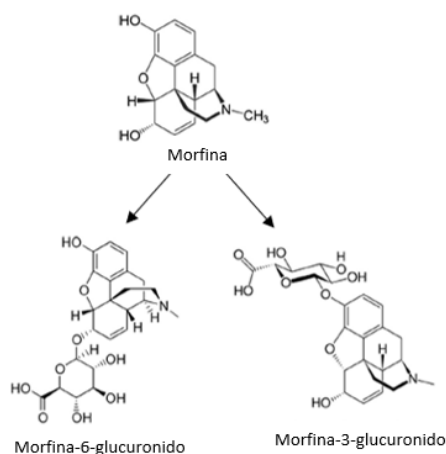


Figura 8. Metabolismo da MOR. Adaptado de *Sverrisdóttir et al.* [61]

Codeína

A COD é absorvida maioritariamente no trato gastrointestinal e o seu pico de concentração plasmática ocorre 1 hora após administração. No que diz respeito ao metabolismo da COD, este ocorre maioritariamente no fígado, dividindo-se em 3 reações: O-desmetilação pelo CYP2D6 que origina 5-15% de MOR, N-desmetilação via CYP3A4 dando origem a 10-15% de norcodeína e por fim, conjugação com ácido glucurónico por ação da UGT2B7 que dá origem a 50-70% de codeína-6-glucuronido (figura 9) [31, 63–65].

A COD é excretada na urina principalmente sob a forma conjugada e aproximadamente 10 a 15% na forma de MOR e norcodeína livres [63].

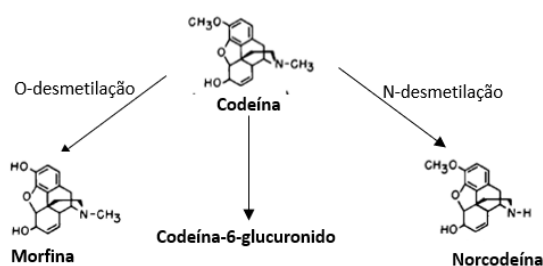


Figura 9. Metabolismo da COD. Adaptado de *Hull et al.* e *Crews et al.* [63, 65]

De seguida será realizado um breve resumo sobre cada um dos compostos em estudo na presente dissertação relativamente às características físico-químicas, estruturas químicas e aspetos toxicológicos.

Heroína e 6-monoacetilmorfina

A HER, também conhecida como diacetilmorfina, é um dos opiáceos ilícitos mais consumidos e pode levar à dependência, tolerância e adição [56, 57]. É um composto

semissintético derivado da MOR, obtido por acetilação de 2 grupos hidroxilo nas posições 3 e 6 (figura 10) [66, 67]. Devido a esta alteração conformacional, a lipofilicidade da HER é elevada, o que faz com que seja melhor absorvida através da barreira hematoencefálica do que a MOR, tornando-a numa droga muito perigosa [56, 60, 66].

Apresenta um pKa de 7.6 e a pH fisiológico, aproximadamente 40% desta, encontra-se na forma não ionizada, estando por isso acessível ao transporte através da membrana [59].

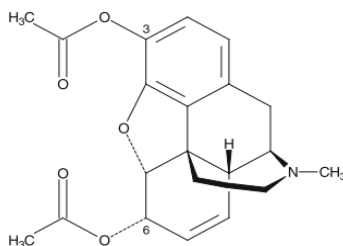


Figura 10. Estrutura química da HER. Adaptado de *Rook et al.* [66]

A 6-MAM, cuja fórmula molecular é C₁₉H₂₁NO₄ (figura 11), apresenta peso molecular de 327,27 g/mol e um valor de pKa de 9,08 [31]. Para além disto sabe-se que é muito lipofílica e apresenta afinidade para os recetores opioides μ muito superior à do seu precursor, a HER [59, 60].

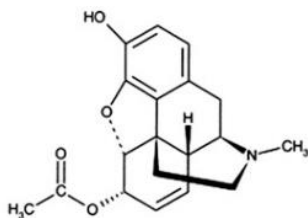


Figura 11. Estrutura química da 6-MAM. Adaptado de *Bogen et al.* [68]

Morfina

A MOR, cuja estrutura química está representada na figura 12, é o alcaloide natural maioritário do ópio e foi isolada pela primeira vez em 1805 [62]. É um derivado do fenantreno e uma base fraca com pKa de 7,9. Para além disto, é altamente hidrossolúvel sob condições ácidas e pouco solúvel em lípidos a pH fisiológico (7,4), sendo o opiáceo mais usado no tratamento da dor moderada a severa [61].

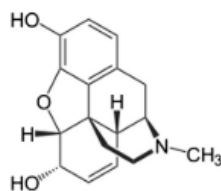


Figura 12. Estrutura química da MOR. Adaptado de *Sverrisdóttir et al.* [61]

A MOR liga-se aos recetores opioides, mas é um agonista total do recetor μ , sendo a sua ligação a este recetor 3.4 e 10 vezes mais forte do que aos recetores κ e δ , respetivamente. Para além disto, sabe-se ainda que a MOR apresenta maior afinidade para o subtipo μ_1 do recetor opioide μ do que para o subtipo μ_2 [61].

A MOR é um analgésico muito eficaz, que é atualmente usado na sedação pré-operatória como adjuvante da anestesia e no controlo e tratamento da dor severa associada a doenças neoplásicas, enfarte do miocárdio e cirurgia [69, 70]. Esta atua principalmente no cérebro, aumentando o limiar de dor, ou seja, diminuindo a consciência da mesma. Por outro lado, a MOR apresenta efeitos adversos que podem ser úteis como por exemplo a ocorrência de obstipação, sendo por isso também usada para tratamento de diarreia ou mesmo a euforia, útil no tratamento da dor em doentes terminais [70].

Os efeitos fisiológicos benéficos atribuídos à MOR incluem melhoria da dispneia, redução da atividade nervosa e efeito ansiolítico e vasodilatador [71].

Codeína

A COD, 3-metilmorfina, cuja estrutura química pode ser observada na figura 13, é obtida através da metilação natural da MOR e é usada como analgésico e agente antitússico há mais de 50 anos. A COD por si só não tem efeito analgésico, sendo uma pró-droga que necessita de ser metabolizada a MOR para ser eficaz [64].

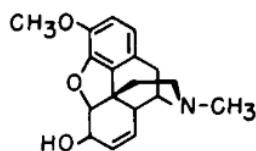


Figura 13. Estrutura química da COD. Adaptado de *Hull et al.* [63]

A COD é utilizada para o alívio da dor fraca a moderada e tem efeito supressor semelhante ao da MOR. Tal como esta, embora de forma menos potente, a COD liga-se a recetores opioides no cérebro, que estão associados à transmissão da sensação de dor. Para além de usada no alívio da dor, a COD é ainda usada como analgésico, antitússico, auxiliar no

tratamento de diarreia e é capaz de causar sedação, sonolência e diminuição da respiração [72, 73].

2.4. Mecanismo de Ação

Os opiáceos tanto naturais como sintéticos, têm uma grande capacidade anestésica sendo também muito aditivos. Estes compostos atuam nos receptores opioides, dos quais existem 3 tipos principais, μ , δ e κ , inibindo os neurotransmissores excitatórios no cérebro e a transmissão de sinais de dor para a medula espinhal [74].

Dos receptores opioides, sabe-se que os μ estão divididos em dois subtipos, μ_1 que medeiam a analgesia supra-espinhal e euforia e μ_2 o qual se pensa estar envolvido na analgesia espinhal, depressão respiratória, dependência física e em efeitos gastrointestinais como redução da mobilidade gastrointestinal e náusea [61, 75]. No que diz respeito aos outros receptores, para além de estarem envolvidos na analgesia, os δ estão também associados a propriedades ansiolíticas e antidepressivas, convulsões e obstipação, enquanto que os κ estão envolvidos no aumento da dor (alodinia), diurese, disforia e redução da inflamação [76, 77].

Os receptores opioides estão acoplados a proteínas G inibitórias (G_i/G_o). A ligação dos opiáceos aos seus receptores resulta em alterações conformacionais nestas proteínas, ocorrendo a dissociação nas subunidades G_α e $G_{\beta\gamma}$. A subunidade α vai inibir a enzima adenilato ciclase (AC) provocando uma diminuição na síntese de adenosina monofosfato cíclica (AMPC), enquanto que a subunidade $\beta\gamma$ interage diretamente com os canais de iões sensíveis à voltagem suprimindo o influxo de Ca^{2+} . Para além disto, a ativação do recetor opioide leva também à abertura de canais de potássio impedindo a propagação de potenciais de ação e levando à hiperpolarização da membrana. O efeito final é a diminuição da excitabilidade neuronal e redução da transmissão de impulsos nociceptivos bloqueando a perceção de dor [45, 77, 78].

Os opiáceos reduzem indiretamente a inibição dos neurónios dopaminérgicos uma vez que, inibem a libertação do ácido gama-aminobutírico (GABA) que se iria ligar a estes neurónios [79].

Para além de alívio da dor, o consumo de opiáceos está também associado a efeitos eufóricos, sendo esta uma das maiores razões para o abuso e uso indevido desta droga e que os tornam extremamente aditivos [74, 80].

2.5. Efeitos adversos

O consumo tanto agudo como crônico de opiáceos, pode dar origem a vários efeitos adversos que afetam o corpo humano, principalmente ao nível dos sistemas cardiovascular, nervoso central, respiratório, gastrointestinal e por vezes urinário [81].

No caso de ocorrer uma intoxicação aguda por opiáceos, os sintomas mais comuns são diminuição da respiração, estado mental anormal, miose [55], euforia, motivação elevada [82], arritmias, problemas ao nível do sistema respiratório como edema pulmonar e pneumonia e, por vezes morte [83].

Quando a intoxicação é considerada crónica, existem efeitos associados ao SNC tais como paranoia, depressão, ansiedade [82], sensação de sedação, náuseas e vômitos, mas também efeitos ao nível do sistema gastrointestinal como obstipação e ao nível do sistema respiratório como depressão do ciclo respiratório [84].

Para além destes efeitos, quando consumidos de forma crónica, os opiáceos levam ainda a irritabilidade, hostilidade, egocentrismo e isolamento [82].

No caso do uso de HER, tanto agudo como crónico, este pode estar associado ao desenvolvimento de doenças como sida, hepatite B e C, tétano, tuberculose, infeções na pele e ainda endocardite associadas ao compartilhamento de material, principalmente das agulhas [83, 85].

Tal como referido anteriormente, a administração de opiáceos causa diminuição na síntese de AMPc. Contudo, quando a administração é crónica, ocorre uma supra-regulação do fator de transcrição proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc (CREB), que estimula a transcrição da AC o que por sua vez restaura a produção de AMPc a níveis normais, neutralizando os efeitos agudos da droga resultando em tolerância. A tolerância é observada com o consumo crónico de opiáceos, e tal como verificado para a COC, está associada à dependência física caracterizada pela síndrome de abstinência quando a sua administração é interrompida [45]. Para além da dependência física, o consumo crónico de opiáceos está também associado a dependência psíquica [86].

A síndrome de abstinência de opiáceos é caracterizada por problemas a nível gastrointestinal, lacrimejo e transpiração excessivos, distúrbios no sono e na alimentação, aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial, aumento do tónus muscular, tremores, espirros e entupimento nasal excessivos [70, 87].

2.6. Tratamento

A naloxona e a naltrexona são antagonistas competitivos dos recetores opioides μ , κ e δ . Ambos atuam no SNC mas, uma vez que têm perfis farmacocinéticos diferentes, também os seus usos terapêuticos são diferentes [55, 78, 88].

Uma vez que tem elevada solubilidade lipídica, o que faz com que atinga rapidamente o SNC, quando administrada por via intravenosa, intramuscular ou por via de um tubo endotraqueal, a naloxona produz efeitos quase imediatos, revertendo em poucos minutos os efeitos adversos do consumo agudo de opiáceos, principalmente depressão respiratória, e reduzindo a sua mortalidade. Contudo, quando a administração é feita oralmente, a naloxona sofre um extenso metabolismo hepático dando origem a naloxona-3-glucuronido, um composto inativo que é excretado na urina [55, 88].

O tratamento de um paciente com uma overdose de opiáceos começa com a avaliação da ventilação do mesmo. Caso o paciente consiga respirar normalmente não se deve administrar naloxona, apenas esperar que recupere a consciência. Contudo, a maioria dos pacientes com overdoses desenvolvem depressão respiratória sendo, portanto, necessária a utilização de uma máscara de oxigénio seguida de terapia parenteral com naloxona. Inicialmente é recomendada uma dose de 0.4 mg de naloxona seguida de uma dose mais elevada (1 a 2 mg), caso não se verifiquem melhoras passados 3 a 5 minutos da primeira dose [55].

A distribuição de naloxona aos consumidores ou aos seus familiares, em associação com formação adequada dada por profissionais de saúde sobre o modo de reconhecer uma *overdose* e como administrar a naloxona, permite que possam ser prestados primeiros socorros reduzindo eficazmente o risco de *overdose* fatal [88, 89].

A naltrexona tem elevada afinidade para o recetor opioide μ , o que faz com que o consiga bloquear impedindo que os opiáceos se liguem a este recetor. Tendo em conta a sua elevada eficácia quando administrada por via oral e a longa duração de ação, a naltrexona é útil no tratamento de dissuasão, desintoxicação e manutenção do consumo de opiáceos [78, 90]. O tratamento com naltrexona apenas deve ser iniciado 10 a 15 dias após o último consumo e consiste na ingestão oral, três vezes por semana, de doses entre 50 a 100 mg [91].

Para além da naloxona e da naltrexona, existem mais 2 medicamentos que são usados para combater a dependência de opiáceos e que são aprovados pela *Food and Drug Administration*, a metadona e a buprenorfina. Estes medicamentos são considerados

agonistas de opioides uma vez que diminuem os desejos de procura da droga, diminuindo consequentemente o efeito de abstinência [90].

A metadona é um agonista sintético do recetor opioide μ . Esta substância é lipofílica, possui uma elevada biodisponibilidade oral (40 a 100%), um tempo de meia vida longo (>24 horas) que permite uma única administração diária e em quantidades suficientes induz a supressão dos sintomas de abstinência dos opiáceos. Para além disto, a metadona produz efeitos colaterais mínimos, sendo por isso um dos medicamentos mais usados na farmacoterapia da dependência de opiáceos e considerada como primeira opção no tratamento de abstinência dos mesmos [78, 91].

A primeira dose de metadona administrada, caso se verifiquem sintomas da síndrome de abstinência é de 10 mg. Depois desta dose, o paciente é avaliado a cada 4 horas durante o primeiro dia no hospital, sendo administrada uma dose de 10 mg de metadona sempre que se verifiquem os sintomas de abstinência. A dose total nas primeiras 24 horas não pode ultrapassar as 50 mg e é definida como dose de estabilização. A partir do segundo dia a dose de metadona é reduzida em 5 mg/dia, até que se verifique o desmame total da mesma [91].

A buprenorfina, tal como a metadona, é um agonista parcial do recetor opioide μ . Este medicamento que é eficaz no tratamento da síndrome de abstinência de opiáceos, pode ser administrado por via sublingual ou parenteral, possui um tempo de meia vida longo (~12 horas) e apresenta baixo risco de dependência física e abuso. No tratamento de manutenção de dependência de opiáceos, a dose recomendada de buprenorfina é de 8-16 mg/dia, 3 dias por semana [91].

3. Investigação Toxicológica

A deteção de COC, de opiáceos e dos seus metabolitos pode ser feita através do doseamento em diferentes amostras biológicas tais como sangue, urina, cabelo, suor, meconio, fluido oral, líquido amniótico [2] e tecido cerebral [20]. De todas estas amostras, as mais comumente usadas são a urina e o sangue [24].

A análise inicial para determinação de COC e opiáceos é geralmente realizada com recurso a amostras de urina [2, 92]. Esta amostra é usada de forma comum porque a sua recolha é fácil e não invasiva, apresenta concentrações de metabolitos superiores às concentrações encontradas no sangue e porque existem diversos imunoensaios que podem ser utilizados para a sua análise [2, 24]. Os imunoensaios são técnicas de *screening* com resposta rápida e custos reduzidos, que têm extrema utilidade na deteção do consumo de drogas por permitirem economizar tempo e dinheiro, que seriam usados em métodos confirmatórios

mais dispendiosos como as técnicas cromatográficas. Contudo, esta técnica é inespecífica e por isso, quando o seu resultado é positivo, as amostras devem ser analisadas por técnicas mais específicas de modo a confirmar os resultados e quantificar os analitos [18].

Apesar destas vantagens, o uso de urina apresenta também algumas desvantagens como a possibilidade de ocorrência de falsos positivos [2], facilidade de substituição e/ou adulteração [93] e o facto de apenas possibilitar a determinação da exposição à droga [24].

No que diz respeito ao uso de sangue para deteção de COC e opiáceos, este é indicativo de uma exposição mais recente e permite prever os efeitos biológicos, sendo portanto muito útil em toxicologia clínica [24]. O sangue apresenta como principais vantagens a possibilidade de correlação direta entre a concentração de droga e os efeitos verificados, fácil manuseamento, dificuldade de adulteração, obtenção de um volume de amostra considerável e a possibilidade de deteção de drogas poucos minutos após o seu consumo. Por outro lado, o sangue apresenta desvantagens relacionadas com o método de recolha visto ser invasivo, necessita de profissionais e equipamento especializados, tem uma janela de deteção pequena quando comparada com outras amostras biológicas e apresenta um grande conteúdo em proteína que dificulta o processo de extração [94, 95].

No caso particular da COC em estudos *postmortem*, o tecido cerebral é uma amostra potencialmente valiosa uma vez que a sua atividade metabólica é baixa, o que faz com que a degradação da COC seja mais lenta. Para além disto, uma vez que a droga fica num compartimento isolado e protegido, a sua concentração no tecido cerebral após a morte é muito semelhante ou mesmo igual à concentração existente antes da morte. [20].

A deteção de COC e opiáceos em amostras biológicas que envolvem técnicas cromatográficas necessita de ser acompanhada de técnicas de preparação da amostra. Assim, podem ser usados métodos como precipitação de proteínas (PPT), extração em fase sólida (SPE), extração líquido-líquido (LLE), microextração em fase sólida (SPME), microextração em seringa empacotada (MEPS) entre outras [18, 96]. A finalidade destas técnicas é remover o maior número possível de interferentes endógenos da amostra e isolar os analitos em estudo. De entre as várias técnicas de extração referidas, a SPE e a LLE são as mais utilizadas. Contudo, nos últimos anos têm-se vindo a desenvolver técnicas mais rápidas e simples como SPME e MEPS, que utilizam menores volumes de amostra e solventes, permitindo assim reduzir os custos e o tempo associados à extração [56]. Para esta dissertação optou-se pela utilização dos *dried matrix spots*. As características relativas a esta técnica de extração encontram-se descritas na seção 4.3.

Como referido anteriormente, após o isolamento dos analitos em estudo é possível proceder à deteção e quantificação por técnicas cromatográficas que incluem a cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida (LC) acopladas a diferentes detetores, normalmente de espectrometria de massa (MS) [97, 98]. O GC-MS está disponível em praticamente todos os laboratórios e é a técnica mais usada na deteção e quantificação de drogas e dos seus metabolitos em amostras biológicas. A sua vasta utilização deve-se ao facto de ser uma técnica com elevada reprodutibilidade, a partir da qual é possível obter espectros de massa semelhantes em diferentes laboratórios desde que as condições de ionização usadas sejam as mesmas, normalmente 70 eV. Uma outra vantagem é a disponibilidade de bibliotecas de espectros que por vezes ajudam na identificação das drogas e dos seus metabolitos [99, 100]. Por outro lado, quando a quantidade de amostra é limitada e os analitos estão presentes em baixas concentrações, a técnica pode perder sensibilidade, problema este que pode ser ultrapassado recorrendo ao uso de espectrometria de massa em tandem (MS/MS) [100]. A MS/MS é vantajosa na análise de amostras biológicas pois permite a fragmentação de iões específicos mais de uma vez, o que leva a um aumento da seletividade, da sensibilidade e ao aumento da capacidade de deteção [101]. É de salientar que em algumas situações é necessário um processo de derivatização de modo a aumentar a volatilidade, estabilidade, deteção e facilitar a separação cromatográfica. Este processo de derivatização pode ser acelerado com recurso a um micro-ondas [98, 102].

A técnica de LC-MS permite a análise de compostos não voláteis, lábeis e/ou de elevado peso molecular, mas em contrapartida tem como desvantagem o facto de ser afetada pelos constituintes da matriz biológica, devendo estes ser avaliados durante o desenvolvimento e validação do método. Tal como na cromatografia gasosa, os limites de deteção e quantificação deste método podem ser melhorados recorrendo à deteção por MS/MS [100]. Contrariamente ao verificado em GC-MS, em LC-MS a maioria dos analitos não necessitam de ser derivatizados, o que permite que se obtenham procedimentos mais simples e rápidos de preparação das amostras [18].

4. Determinação de cocaína e opiáceos em amostras de fluido oral

4.1. Fluido oral como amostra de interesse em Toxicologia

A deteção de drogas em amostras de fluido oral foi usada pela primeira vez no final da década de 1970, com a finalidade de monitorizar drogas terapêuticas [100].

Nos últimos anos, a análise de drogas em fluidos biológicos tem ganho cada vez mais interesse, bem como o uso de alternativas ao sangue e urina para avaliação da exposição a drogas, como é o caso do fluido oral [103].

O fluido oral apresenta várias vantagens em relação às amostras mais convencionais, como a colheita fácil e não invasiva e a dificuldade de adulteração. Apesar disto, o fluido oral tem também algumas desvantagens como a pequena janela de detecção e a obtenção de quantidades baixas e/ou insuficientes de amostra biológica (Tabela 2) [100].

Tabela 2. Vantagens e desvantagens do uso de fluido oral como amostra biológica em toxicologia. Adaptado de Gallardo *et al.* e Elmongy *et al.* [100, 103]

Vantagens	Desvantagens
Método não invasivo e rápido	Técnica não estéril, amostras sujeitas a degradação por bactérias
Baixo risco de adulteração	Quantidade de amostra insuficiente para análise
Não necessita de instalações específicas para recolha	Pequena janela de detecção
Representa a fração livre da droga	Ingestão recente leva a concentrações muito altas no fluido oral que não refletem a concentração no sangue
Reflete eficazmente a atividade da droga	
Estável à temperatura ambiente por longos períodos de tempo	

4.1.1. Fisiologia e mecanismo de incorporação

Os termos fluido oral e saliva são muitas vezes usados para designar a mesma amostra, contudo, o fluido oral é o líquido obtido da cavidade oral e é constituído por várias secreções, sendo por isso considerado uma mistura de fluidos [100]. Esta amostra contém as secreções das glândulas salivares maiores (submandibular, parótida e sublingual) e menores situadas na cavidade oral, as secreções nasofaríngeas e outros constituintes presentes na boca. Por outro lado, a saliva é o fluido recolhido diretamente de uma glândula específica [100, 104].

O fluido oral é constituído por aproximadamente 99% de água e sais minerais, estando também presentes várias proteínas e enzimas de digestão, mas em baixa percentagem. Este fluido tem um pH de aproximadamente 6,8 em condições fisiológicas, podendo este ser mais elevado quando existe um aumento no fluxo salivar [100, 103].

Um adulto saudável produz aproximadamente 0,5–1,5 L de fluido oral por dia [105], sendo a maior parte deste produzido pelas glândulas submandibulares (65%), seguidas das glândulas parótidas (20-50%) e sublinguais (5%) [106].

Pensa-se que existem diferentes mecanismos para a incorporação de drogas do sangue para o fluido oral, sendo o principal a difusão passiva através da membrana. Este processo depende das propriedades físico-químicas da droga, isto é, do pKa, peso molecular, constantes de dissociação, grau de ligação às proteínas e pH quer do sangue quer do fluido oral [100, 107]. A COC e os opiáceos são drogas básicas, o que faz com que a sua concentração seja superior no fluido oral quando comparado com o plasma. Esta diferença na concentração ocorre porque no fluido oral, onde o valor de pH é mais baixo, as drogas estão na sua forma ionizada, o que faz com que não sejam absorvidas e que por sua vez se acumulem neste fluido [100].

4.1.2. Recolha da amostra

As amostras de fluido oral devem ser recolhidas em jejum ou 2 a 3 horas após a ingestão de alimentos ou medicação [103].

Existe uma variedade de métodos disponíveis para a colheita do fluido oral, podendo esta ser feita com ou sem estimulação. Contudo, deve ter-se um especial cuidado nesta fase, visto que a maior parte dos problemas associados à análise de fluido oral estão relacionados com o modo de colheita, podendo a concentração das drogas ser afetada [100, 103].

O fluido oral não estimulado pode ser colhido pelo método de drenagem, que permite a queda gota a gota da boca para um recipiente de colheita, ou pode ser facilmente obtido cuspidando, fornecendo assim uma amostra pura [100]. Esta amostra tem elevada probabilidade de contaminação e a sua quantidade é normalmente insuficiente, o que pode pôr em causa a sensibilidade do método de deteção [103].

A estimulação pode ser feita mecanicamente, mastigando vários materiais como parafina, teflon, elásticos e pastilhas, e pode ser feita quimicamente, colocando sumo de limão ou ácido cítrico na boca. Esta estimulação apresenta alguns problemas que comprometem a precisão da análise como por exemplo, a parafina contém compostos que afetam a análise cromatográfica e o ácido cítrico afeta o pH do fluido oral, o que pode levar a alterações na concentração da droga em estudo [100]. Porém, tem também vantagens como uma maior quantidade de amostra obtida num curto espaço de tempo, um menor gradiente de pH entre o plasma e o fluido oral e o facto da variabilidade no ratio de concentração fluido oral/plasma para algumas drogas ser limitada [103].

Existe uma grande variedade de dispositivos de recolha de fluido oral disponíveis comercialmente como OmniSal[®], Salivette[®], Intercept[®] e Quantisal[™]. Estes dispositivos consistem normalmente num material absorvente, que fica saturado na boca do doador e de onde é, posteriormente, recolhido o fluido oral por centrifugação ou aplicando pressão. Após recolha, o dispositivo é colocado num recipiente que contém uma solução tampão estabilizante [100].

4.1.3. Armazenamento, preservantes e conservantes

As condições de armazenamento devem ser revistas para cada analito, mas, de uma forma geral, é recomendado congelar as amostras a -20 °C imediatamente após colheita até que sejam analisadas, visto que esta temperatura minimiza a degradação de analitos instáveis e previne o crescimento bacteriano. Quando não é possível congelar imediatamente as amostras, estas podem ser guardadas a 4 °C durante no máximo 2 horas e ser depois congeladas. No caso de amostras armazenadas durante um período superior a 4 meses, estes devem ser armazenadas a -80 °C [103].

De modo a estudar a estabilidade da COC e dos opiáceos em amostras de fluido oral, é preciso ter em conta vários fatores como a temperatura, o tempo de armazenamento e a adição de preservantes e estabilizadores. Na literatura científica disponível, o número de artigos que refiram a utilização de estabilizadores ou preservantes nas amostras de fluido oral é reduzido. De facto, o trabalho de *Ventura et al.* [108] é o único publicado onde se avalia a estabilidade da COC, BEG, MOR e 6-MAM. Estes autores demonstraram que a adição de uma mistura de tampão citrato (pH 4) e azida de sódio (NaN₃) (0,1%) ao fluido oral, aumenta a estabilidade quer da COC quer da 6-MAM, impedindo a sua degradação durante 7 dias quando conservadas a 25 e 37 °C e até 2 meses quando armazenadas a 4 e -20 °C [108].

Relativamente a outras substâncias, *Fisher et al.* [109] estudaram o efeito da adição de ácido ascórbico (AA) e tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) na estabilidade da olanzapina, um antipsicótico, em amostras de fluido oral, concluindo que estes aumentam a estabilidade do composto quando armazenado a -20 °C [109]. Por outro lado, *Stoykova et al.* [110] avaliaram a estabilidade do fluido oral usando fluoreto de sódio (NaF) (2% m/v), Na₂EDTA (1% m/v) e NaN₃ (0,2% m/v), concluindo que quando a temperatura de armazenamento é de -20 °C, se verifica um aumento da estabilidade para os componentes da saliva (creatinina e α-amilase) [110].

Com base nestes artigos, foram escolhidos o NaF, o AA e a NaN₃ como possíveis agentes preservantes ou estabilizadores a fim de avaliar a estabilidade dos compostos em estudo.

4.2. Detecção e quantificação de cocaína, opiáceos e metabolitos em fluido oral

A literatura existente para deteção e quantificação de COC, opiáceos e dos seus metabolitos foi compilada na seguinte tabela (Tabela 3). A pesquisa bibliográfica foi realizada usando a base de dados PubMed e as palavras chave utilizadas foram “*opiates; oral fluid*”, “*cocaine; oral fluid*” e “*cocaine; opiates; oral fluid*”. Dos resultados obtidos, foram selecionados para compilação, artigos desde 2005. Entre os artigos compilados, devem ser enfatizados aqueles em que se quantificam um maior número de compostos, tais como *Rubio et al.* [111], *Fiorentin et al.* [112], *Cognard et al.* [32], *Di Rago et al.* [113], *Montesano et al.* [114], *Wang et al.* [115], *Concheiro et al.* [116], *Pujadas et al.* [117] e *Wylie et al.* [118], no que diz respeito à COC e aos seus metabolitos. Relativamente aos opiáceos, devem ser destacados os trabalhos desenvolvidos por *Reisinger et al.* [119], *Grabenauro et al.* [120], *Shaparin et al.* [121], *Tuyay et al.* [122], *Zheng et al.* [123], *Fritch et al.* [124] e *Kala et al.* [125].

De acordo com a pesquisa efetuada, as técnicas mais utilizadas na preparação das amostras biológicas para a determinação destes compostos são a SPE, LLE e a PPT. No caso da técnica de SPE, as colunas mais usadas são C₈ e C₁₈ de fase reversa, com equilíbrio hidrofílico-lipofílico e troca catiónica, enquanto que para a técnica de LLE é comum o uso de misturas de solventes orgânicos como acetato de etilo e butilo, bem como hexano e heptano. No que diz respeito à PPT, o solvente mais utilizado é o acetonitrilo.

Usando como técnica de extração a SPE, existem alguns estudos em que são utilizadas colunas iguais, o que permite fazer uma comparação dos resultados obtidos entre eles.

Cognard et al. [32] e *Gunnar et al.* [126] usaram a coluna Isolute HXC (130 mg) para preparação das amostras, as quais foram posteriormente quantificadas por GC-MS/MS e GC-MS, respetivamente. Para a COC, o único composto quantificado nos dois estudos, os valores obtidos para o limite de quantificação (LOQ) foram de 2 ng/mL para *Cognard et al.* e 0,8 ng/mL para *Gunnar et al.*, o que permite concluir que usando a mesma coluna, os resultados obtidos no segundo estudo referido, mesmo com a utilização de um volume de fluido oral inferior (250 µL contra 500 µL), foram melhores.

Grabenauro et al. [120] e *Tuyay et al.* [122] usaram uma coluna Cerex Clin II (35 mg 3 mL) e quantificaram os compostos por LC-MS/MS. Os primeiros autores usaram 750 µL de fluido oral e obtiveram limite de deteção (LOD) de 0,01 ng/mL para a hidromorfona e a hidrocodona, 0,02 ng/mL para a MOR e oxicodona e 0,04 ng/mL para a COD, 6-MAM e oximorfona e valores de LOQ de 0,4 ng/mL para a 6-MAM e 1,5 ng/mL para os restantes compostos. Em relação às recuperações, os autores alcançaram valores entre os 71,7 e os 88,6%. *Tuyay et al.* [122], usando apenas 250 µL de amostra biológica conseguiram obter,

à exceção da 6-MAM, LOQs mais baixos (1 ng/mL) e melhores recuperações (94,2-103,0%) para todos os analitos. Para além disto, neste estudo foram quantificados mais compostos do que no anterior.

Pujadas et al. [117], *Wylie et al.* [118] e *Badawi et al.* [127] usaram uma coluna Bond Elut Certify® com diferentes enchimentos (300 mg 3 mL, 130 mg 10 mL e 130 mg 3 mL, respetivamente). *Pujadas et al.* [117], usaram 1 mL de fluido oral e quantificaram os analitos por GC-MS, obtendo os piores valores de LOD e LOQ (1,4 e 4,1 ng/mL (COC), 2,6 e 8 ng/mL (BEG), 2,4 e 7,2 ng/mL (COET), 4,2 e 12,7 ng/mL (EME), 2,2 e 6,5 ng/mL (MOR), 0,9 e 2,9 ng/mL (6-MAM) e 2,2 e 6,6 ng/mL (COD), respetivamente) e de forma geral as piores recuperações (58,3-89,1%). *Wylie et al.* [118], usaram o mesmo volume de amostra (1 mL) mas quantificaram os compostos por LC-MS/MS, tendo obtido valores mais baixos de LOD e LOQ (0,9 e 3,1 ng/mL (COC), 3,4 e 11,4 ng/mL (BEG), 1 e 3,4 ng/mL (COET), 0,3 e 0,9 ng/mL (EME), 0,5 e 1,8 ng/mL (COD), 0,5 e 1,7 ng/mL (MOR) e 0,3 e 1 ng/mL (6-MAM), respetivamente) e recuperações mais elevadas (52-98%). Por último, *Badawi et al.* [127], que quantificaram os analitos através de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espetrometria de massa em tandem (UPLC-MS/MS), foram os que obtiveram melhores resultados com o uso desta coluna, valores LOQ de 0,5 ng/mL para COC, BEG, COD, MOR e 6-MAM e recuperações entre 95,8 e 119%.

Concheiro et al. [128] usaram uma coluna Oasis® HLB (60 mg 3 cc) enquanto que *Wood et al.* [129] usaram uma coluna Oasis® MCX (30 mg 1 cm³) na extração dos analitos. No primeiro estudo foram usados 500 µL de fluido oral e obtiveram-se LOQs de 1 ng/mL para a 6-MAM e 5 ng/mL para COC, BEG, MOR e COD e recuperações entre 7,5 e 77,1%. No segundo estudo, o volume de fluido oral foi inferior (250 µL) mas foi atingido um valor de LOQ de 2 ng/mL para todos os compostos e recuperações mais elevadas (91,8-99%).

No que diz respeito à preparação das amostras com a técnica de PPT, tal como referido anteriormente, o solvente mais usado é o acetonitrilo [111, 116, 123]. *Rubio et al.* [111] utilizaram 200 µL de fluido oral e quantificaram os analitos por LC-MS/MS, obtendo LOQs de 5 ng/mL para a COC, BEG e COET e 10 ng/mL para a EME e AEME. *Zheng et al.* [123] quantificaram os analitos através de UPLC-MS/MS e para além de acetonitrilo usaram metanol, conseguindo, apenas com 150 µL de fluido oral, obter valores de LOQ mais baixos para COC e BEG (1,5 ng/mL).

Por último, para a técnica de LLE, é importante comparar os estudos de *Øiestad et al.* [130] e *Zancanaro et al.* [131], nos quais foi usado um volume de fluido oral de 500 µL e os analitos quantificados por LC-MS/MS. No primeiro estudo foi usado acetato de etilo e

heptano para a extração dos compostos, os valores de LOQ foram de 0,78 ng/mL para COC, 7,2 ng/mL para BEG, 6,5 ng/mL para COD, 7,1 ng/mL para a MOR e 0,82 ng/mL para a 6-MAM e o LOD foi de 0,5 ng/mL para todos os analitos. Em relação às percentagens de recuperação estas situam-se entre 0,2 e 80%. Por outro lado, *Zancanaro et al.* [131] usaram acetato de etilo e hexano como solventes de extração, conseguindo obter melhores resultados quer para o LOD (0,26 ng/mL para COC, BEG e COD e 0,65 ng/mL para EME e MOR), LOQ (0,65 ng/mL para COC, BEG e COD, 1,04 ng/mL para MOR e 1,3 ng/mL para EME) como para as recuperações (0,45-105%).

Para além destas técnicas de preparação de amostras, foi ainda implementado o uso de MEPS nos trabalhos publicados por *Ares et al.* [132] e *Montesano et al.* [114], técnica esta que por necessitar de um volume de amostra reduzido, apresenta grandes vantagens e por isso deve também ser realçada.

Ares et al. [132] usaram 300 µL de fluido oral os quais foram sujeitos a um processo de extração miniaturizado, MEPS, e posteriormente analisados recorrendo à UPLC-MS/MS. Neste estudo foram alcançados LODs de 0,25 ng/mL para a COC e COET, 0,5 ng/mL para a BEG, 2,5 ng/mL para a MOR e 1 ng/mL para a 6-MAM e LOQs de 0,5 ng/mL para a COC e COET, 1 ng/mL para a BEG, 10 ng/mL para a MOR e 2,5 ng/mL para a 6-MAM. No estudo realizado por *Montesano et al.* [114], o volume de fluido oral foi de 120 µL e o método de deteção foi LC-MS. Embora tenham obtido valores de LOD e LOQ mais elevados (0,3 e 1 ng/mL (COC), 0,8 e 2 ng/mL (BEG), 1 e 4 ng/mL (EME), 2 e 15 ng/mL (NCOC), 0,5 e 5 ng/mL (MOR), 2 e 5 ng/mL (COD) e 0,8 e 2 ng/mL (6-MAM), respetivamente), estes autores quantificaram mais compostos do que no estudo anterior. No que diz respeito à percentagem de recuperação, para a COC e os seus metabolitos foram obtidos valores entre 18 e 82% e para os opiáceos valores entre 70 a 102%.

Em relação às técnicas analíticas usadas na deteção dos compostos em análise em amostras de fluido oral, a cromatografia mais utilizada foi a LC-MS/MS. Aquando do uso desta técnica, o LOD e o LOQ mais baixos para a COC e para os seus metabolitos foram obtidos por *Concheiro et al.* [116] e *Zancanaro et al.* [131].

No estudo desenvolvido por *Concheiro et al.* [116] foram usados 250 µL de fluido oral, do qual foram extraídos os analitos com recurso à técnica de PPT com acetoneitrilo. Estes autores obtiveram como valor de LOD, 0,4 ng/mL para a COC e BEG e 0,8 ng/mL para a EME e a AEME e como valor de LOQ 0,5 ng/mL para a COC e BEG e 1 ng/mL para a EME e AEME. Para além destes valores, conseguiram ainda as melhores percentagens de recuperação para estes compostos usando LC-MS/MS (94,7-105,7%). *Zancanaro et al.*

[131], por sua vez, usaram 500 µL de fluido oral e a técnica de LLE com acetato de etilo e hexano (4:3) para a extração dos compostos, e conseguiram obter LODs mais reduzidos que o estudo anteriormente referido (0,26 ng/mL (COC e BEG) e 0,65 ng/mL (EME)) mas em contrapartida, os resultados obtidos tanto para o LOQ (0,65 ng/mL (COC e BEG) e 1,3 ng/mL (EME)) como para as percentagens de recuperação (0,45-95,1%), foram piores.

Para a classe dos opiáceos, os melhores resultados utilizando como método de detecção a LC-MS/MS foram obtidos por *Grabenauer et al.* [120], *Concheiro et al.* [116] e *Liu et al.* [133].

Grabenauer et al. [120] usaram 750 µL de fluido oral preparados com a técnica de SPE e conseguiram obter os valores mais baixos de LOD (0,01 ng/mL (hidromorfona e hidrocodona), 0,02 ng/mL (MOR e oxicodona) e 0,04 ng/mL (COD, 6-MAM e oximorfona)) e os seguintes valores de LOQ, 0,4 ng/mL para a 6-MAM e 1,5 ng/mL para os outros compostos. Em relação às recuperações, os valores encontram-se entre 71,7 e 88,6%. No estudo realizado por *Concheiro et al.* [116], os valores de LOD conseguidos foram mais elevados (0,5 ng/mL (MOR) e 0,4 ng/mL (COD, 6-MAM e 6-acetilcodeína)) mas em contrapartida foram conseguidos melhores valores de LOQ (1 ng/mL (MOR) e 0,5 ng/mL (COD, 6-MAM e 6-acetilcodeína)) e melhores recuperações (92,4-108,7%), usando apenas 250 µL de fluido oral e como técnica de extração a PPT. Por último *Liu et al.* [133] conseguiram valores de LOD e LOQ semelhantes ao estudo anterior (0,25 e 0,25 ng/mL (6-acetilcodeína), 0,5 e 0,5 ng/mL (MOR e 6-MAM) e 1 e 1 ng/mL (COD), respetivamente) usando um volume de amostra ainda mais pequeno de 40 µL de fluido oral centrifugados e injetados diretamente no sistema de LC-MS/MS.

Entre os estudos anteriormente referenciados, é também importante enfatizar o trabalho de *Wang et al.* [115], uma vez que estes autores foram os que conseguiram alcançar os melhores valores de LOD e LOQ tanto para a COC, como para os opiáceos e os seus metabolitos (0,18 e 0,48 ng/mL (COC), 0,15 e 0,20 ng/mL (NCOC), 0,04 e 0,11 ng/mL (BEG), 1,32 e 2,76 ng/mL (EME), 0,49 e 0,53 ng/mL (COET), 0,39 e 0,51 ng/mL (COD), 0,95 e 1,92 ng/mL (MOR) e 1,7 e 1,7 ng/mL (6-MAM), respetivamente). Neste estudo, foram usados 100 µL de fluido oral os quais foram filtrados e posteriormente analisados com recurso à cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada a espetrometria de massa em tandem (UHPLC-MS/MS), usando três fontes de ionização diferentes e sugerindo que a melhor seria a ionização por *electrospray* (ESI).

Usando a técnica de UHPLC-MS/MS, existem outros estudos que devem ser referidos como o desenvolvido por *Malaca et al.* [134] e o de *Valen et al.* [135]. No primeiro estudo foram usados 500 µL de fluido oral não sujeitos a qualquer processo de extração, sendo apenas

centrifugados e injetados no sistema de cromatografia, obtendo-se valores de LOD entre 1,4 e 1,5 ng/mL e valores de LOQ entre 4,5 e 4,9 ng/mL, para os opiáceos. Em relação à percentagem de recuperação este método permitiu obter valores entre 93,1 e 95,4%. No estudo desenvolvido por *Valen et al.* [135], foram usados apenas 200 µL de fluido oral, os quais foram sujeitos à extração líquida suportada e obtiveram-se melhores resultados tanto para o LOD como para o LOQ dos opiáceos (0,043-0,049 ng/mL; 0,087-0,099 ng/mL). Em contrapartida as percentagens de recuperação dos analitos foram menores (69,0-76,0%).

Tabela 3. Métodos cromatográficos para detecção e quantificação de COC, opiáceos e dos seus metabolitos em amostras de fluido oral.

Compostos	Volume (µL)	Método de extração	Método de detecção	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Recuperação (%)	Referência
Cocaína Benzoilecgonina Cocaetileno Ecgonina metilester Anidroecgonina metil éster	200	PPT (Acetonitrilo)	LC-MS/MS (ESI)	n.d. n.d. n.d. 5 5	5 5 5 10 10	n.d.	[111]
Cocaína Benzoilecgonina Cocaetileno Anidroecgonina metil éster	100	Injeção Direta	LC-MS (ESI)	1,7 1,7 1,7 3,4	4,25 para todos os compostos	72,2-108,6 65,1-79,1 74,4-103,5 80,4-88,03	[112]
Cocaína Benzoilecgonina	750	SPE (Clean Screen® DAU, 200 mg 10 mL)	2D-GC-MS (EI)	1 0,5	1 1	93,1-97,2 70,9-82,7	[136]
Cocaína Cocaetileno Ecgonina metilester Anidroecgonina metil éster	500	SPE (Isolute HCX 130 mg)	GC-MS/MS (PCI)	0,1 0,5 0,5 0,5	2 2 5 n.d.	n.d.	[32]
Codeína Morfina 6-Monoacetilmorfina Hidrocodona Hidromorfona Oxicodona Oximorfona	500	Injeção Direta	LC-MS/MS (ESI)	5 para todos os compostos	10 10 5 10 10 10 10	n.d.	[119]
Morfina 6-Monoacetilmorfina	250	SPE	LC-MS/MS (ESI)	5 5	10 10	91,3-95,1 87,5-87,6	[137]

Estudo da estabilidade de opiáceos e cocaína em *Dried Saliva Spots*

		(PolyChrom ClinII, 3 cc 35 mg)					
Codeína	750	SPE (Cerex ClinII, 35 mg 3 mL)	LC-MS/MS (ESI)	0,04	1,5	88,6	[120]
Morfina				0,02	1,5	71,7	
6-Monoacetilmorfina				0,04	0,4	82,6	
Hidrocodona				0,01	1,5	85,5	
Oxicodona				0,02	1,5	88,0	
Hidromorfona				0,01	1,5	83,5	
Oximorfona				0,04	1,5	84,7	
Morfina	500	SPE (SPEwar 3 cc)	LC-MS/MS (ESI)	n.d.	2,5	n.d.	[121]
Hidrocodona							
Hidromorfona							
Oxicodona							
Oximorfona							
Morfina	40	Injeção Direta	LC-MS/MS (ESI)	0,5	0,5	n.d.	[133]
Codeína				1	1		
6-Monoacetilmorfina				0,5	0,5		
6-Acetilcodeína				0,25	0,25		
Codeína	250	SPE (Cerex Clin II, 691-0353 T, 35 mg 3 mL)	LC-MS/MS (ESI)	n.d.	1 para todos os compostos	100	[122]
Morfina						94,2	
6-Monoacetilmorfina						102	
Oximorfona						102	
Hidromorfona						103	
Norcodeína						97,7	
Noroxicodona						98,3	
Norhidrocodona						101	
Dihidrocodeína						97,5	
Oxicodona	101						

Estudo da estabilidade de opiáceos e cocaína em *Dried Saliva Spots*

Hidrocodona						102	
6-Acetilcodeína						103	
Codeína	1000	LLE (Toxitubes A®)	GC-MS (PCI)	0,7	2,3	94,6	[138]
Morfina				2	6,7	93,3	
6-Monoacetilmorfina				0,6	2	111,3	
Cocaína	300	SPE (Strata-X-Drug-B® (n.d))	UHPLC-MS/MS (ESI)	10 para todos os compostos	n.d.	n.d.	[139]
Benzoilecgonina							
Morfina							
6-Monoacetilmorfina							
Codeína							
Cocaína	500	Injeção Direta	UHPLC-MS/MS (ESI)	0,4	1,3	101,3	[134]
Benzoilecgonina				0,1	0,5	98,8	
Morfina				1,4	4,7	93,1	
Codeína				1,5	4,9	90,6	
6-Monoacetilmorfina				1,4	4,5	95,4	
Cocaína	400	SLE (Isolute® SLE+400 µL)	LC-MS (ESI)	n.d.	1,2	>80%	[140]
Benzoilecgonina					1,4		
Codeína					5		
Morfina					5		
6-Monoacetilmorfina					1,1		
Cocaína	150	PPT (Acetonitrilo e metanol)	UPLC-MS/MS (ESI)	n.d.	1,5 para todos os compostos	87	[123]
Benzoilecgonina						88	
Codeína						75	
Etilmorfina						60	
Morfina						72	
6-Monoacetilmorfina						83	
Oxicodona						78	

Estudo da estabilidade de opiáceos e cocaína em *Dried Saliva Spots*

Cocaína Benzoilecgonina Cocaetileno Morfina 6-Monoacetilmorfina	300	MEPS (eVol®; M1-80% C8 (sílica) e 20% SCX)	UPLC-MS/MS (ESI)	0,25 0,5 0,25 2,5 1	0,5 1 0,5 10 2,5	n.d.	[132]
Cocaína Codeína Morfina 6-Monoacetilmorfina	200	SLE (Placa de 96 poços Isolute® SLE+)	UHPLC-MS/MS (ESI)	0,018 0,045 0,043 0,049	0,182 0,09 0,087 0,099	68-72 72-76 69.-72 73-76	[135]
Cocaína Benzoilecgonina Ecgonina metilester Cocaetileno Morfina Codeína 6-Monoacetilmorfina Hidromorfona	200	PPT (Clorofórmio:isopropanol (9:1))	LC-MS/MS (ESI)	n.d.	1 para todos os compostos	81-114 32-39 62-87 81-95 69-84 75-91 77-90 69-91	[113]
Cocaína Benzoilecgonina Ecgonina metilester Norcocaína Morfina Codeína 6-Monoacetilmorfina Heroína	120	MEPS (C18)	LC-MS (ESI)	0,3 0,8 1 2 0,5 2 0,8 10	1 2 4 1,5 5 5 2 30	82 25 18 88 70 100 102 101	[114]
Cocaína Benzoilecgonina Ecgonina metilester	500	LLE (Acetato de etilo:hexano (4:3))	LC-MS/MS (ESI)	0,26 0,26 0,65	0,65 0,65 1,3	81,6-95,1 0,45-1,6 14,2-52,7	[131]

Estudo da estabilidade de opiáceos e cocaína em *Dried Saliva Spots*

				5,31	14,4		
				0,69	0,69		
				0,13	0,43		
				0,49	0,69		
				0,29	0,29		
				0,67	0,67		
			UHPLC-MS/MS (APPI)	0,44	0,44		
				0,016	0,071		
				0,02	0,048		
				6,05	19,4		
				0,88	0,88		
				0,24	0,24		
				2,08	2,08		
				0,27	0,27		
				0,082	0,21		
Cocaína				0,4	0,5	96,5-104,4	
Benzoilecgonina				0,4	0,5	94,7-105,1	
Ecgonina metilester				0,8	1	101,7-104,1	
Anidroecgonina metil éster				0,8	1	99,6-105,7	
Morfina	250	PPT e SPE (Acetonitrilo em placa de 96 poços Isolute® PPT+)	LC-MS/MS (ESI)	0,5	1	99,3-105,4	[116]
Codeína				0,4	0,5	100-108,7	
6-Monoacetilmorfina				0,4	0,5	101,8-107,8	
6-Acetilcodeína				0,4	0,5	92,4-102,2	
Heroína				0,4	0,5	104,8-109	
Cocaína				0,4	0,8	87,7	
Benzoilecgonina				0,4	0,8	92,3	
Codeína	200	SPE (SPEC DAU 30 mg)	LC-MS/MS (ESI)	2	4	91,0	[124]
Morfina				2	4	91,2	

Estudo da estabilidade de opiáceos e cocaína em *Dried Saliva Spots*

6-Monoacetilmorfina				0,4	1	94,8	
Norcodeína				2	4	92,4	
6-Acetilcodeína				1	2	102,1	
Hidrocodona				2	4	91,9	
Norhidrocodona				2	4	84,0	
Dihidrocodeína				2	4	90,6	
Hidromorfona				2	4	90,7	
Oxicodona				2	4	91,5	
Noroxicodona				2	4	98,2	
Oximorfona				2	4	90,2	
Benzoilecgonina						96,3-103	
Cocaína						98,1-106	
Codeína	n.d.	SPE (Bond Elut Certify® 130 mg 3 mL)	UPLC-MS/MS (ESI)	n.d.	0,5 para todos os compostos	95,8-102	[127]
Morfina						103-119	
6-Monoacetilmorfina						101-108	
Cocaína				2	2		
Benzoilecgonina				2	2		
Codeína				10	10		
Morfina	500	SPE (UCT Zsdau005 50 mg 10 mL)	LC-MS/MS (ESI)	10	10	n.d.	[125]
Hidrocodona				10	10		
Hidromorfona				10	10		
Oxicodona				10	10		
Oximorfona				10	10		
Cocaína					5	76,0	
Benzoilecgonina				n.d.	5	7,5	
Morfina	500	SPE (Oasis® HLB 60 mg 3 cc)	LC-MS/MS (ESI)		5	24,6	[128]
Codeína					5	77,1	
6-Monoacetilmorfina					1	74,0	

Estudo da estabilidade de opiáceos e cocaína em *Dried Saliva Spots*

Cocaína	1000	SPE (Bond Elut Certify® 300 mg 3 mL)	GC-MS (EI)	1,4	4,1	73,6-84,3	[117]
Benzoilecgonina				2,6	8	63,9-83,2	
Cocaetileno				2,4	7,2	69,5-89,1	
Ecgonina metilester				4,2	12,7	58,3-79,3	
Morfina				2,2	6,5	71,9-72,9	
6-Monoacetilmorfina				0,9	2,9	67,2-82,8	
Codeína				2,2	6,6	70,3-77,7	
Cocaína	500	LLE ((Acetato de etilo:heptano (4:1))	LC-MS/MS (ESI)	0,5 para todos os compostos	<0,78	69-80	[130]
Benzoilecgonina					7,2	0,2	
Codeína					6,5	46-53	
Morfina					7,1	24-34	
6-Monoacetilmorfina					0,82	49-55	
Cocaína	250	SPE (Oasis® MCX 30 mg, 1 cm ³)	LC-MS/MS (ESI)	0,2-0,5 para todos os compostos	2 para todos os compostos	93,1	[129]
Benzoilecgonina						93,9	
Morfina						99	
6-Monoacetilmorfina						91,8	
Codeína						94,4	
Benzoilecgonina	250	SPE (Isolute HCX 130 mg 3 mL)	GC-MS (EI)	n.d.	8	58,4	[126]
Cocaína					8	83,9	
Morfina					20	62,5	
Codeína					20	84,0	
Etilmorfina					20	81,7	
Benzoilecgonina	1000	SPE (Bond Elut Certify® 130 mg 10 mL)	LC-MS/MS (ESI)	3,4	11,4	63	[118]
Cocaetileno				1	3,4	95	
Cocaína				0,9	3,1	89	
Ecgonina metilester				0,3	0,9	30	
Codeína				0,5	1,8	98	
Morfina				0,5	1,7	52	

Estudo da estabilidade de opiáceos e cocaína em *Dried Saliva Spots*

6-Monoacetilmorfina				0,3	1	93	
Dihidrocodeína				0,5	1,7	92	

Legenda: **2D-GC-MS:** Cromatografia gasosa bidimensional acoplada à espectrometria de massa; **APCI:** Ionização química à pressão atmosférica; **APPI:** Fotoionização à pressão atmosférica; **EI:** Ionização impacto eletrônico; **ESI:** Ionização positiva por *electrospray*; **GC-MS/MS:** Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa em tandem; **GC-MS:** Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa; **HPLC-MS/MS:** Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa em tandem; **LC-MS/MS:** Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem; **LC-MS:** Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa; **LLE:** Extração líquido-líquido; **LOD:** Limite de detecção; **LOQ:** Limite de quantificação; **MEPS:** Microextração em seringa empacotada; **n.d.:** não determinado; **PCI:** Ionização química positiva; **PPT:** Precipitação de proteínas; **SLE:** Extração líquida suportada; **SPE:** Extração em fase sólida; **UHPLC-MS/MS ou UPLC-MS/MS:** Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massa em tandem.

4.3. *Dried Matrix Spots*

O termo *dried matrix spots* (DMS) consiste numa técnica de colheita, transporte e armazenamento de uma matriz líquida como amostra seca num papel de filtro. Estes são usados para colheita de amostras para estudos de monitorização de drogas terapêuticas e apresentam várias vantagens (Tabela 4), mas também desvantagens especialmente no que diz respeito à extração, devido à baixa percentagem de recuperação dos compostos em estudo do papel de filtro. A técnica geral de extração estabelecida para os DMS consiste em cortar um disco do centro do papel de filtro, transferir este disco para um tubo e adicionar um solvente ou mistura de solventes de extração e um padrão interno, seguido de agitação e centrifugação do tubo, do qual se transfere o sobrenadante para um novo tubo. Finalmente, a amostra é evaporada até à *secura* e de seguida injetada e analisada [143].

Tabela 4. Vantagens da utilização de DMS. Adaptado de *Jacques et al.* [144]

Vantagens
Fácil transporte e armazenamento
Estabilidade do analito
Baixo risco de contaminação
Volume de amostra baixo
Baixo custo

Os DMS podem ter como matriz diversas amostras biológicas como sangue [145–147], urina [148–150], plasma [151], soro [152–154] e fluido oral [155–161].

Os *dried blood spots* (DBS), foram usados pela primeira vez há mais de um século por Ivar Bang para a determinação dos níveis de glucose no sangue [162, 163]. Em 1963, Robert Guthrie e Ada Susi, usaram esta técnica com o objetivo de desenvolver um método de rastreio neonatal da fenilcetonúria [164], e desde aí que o interesse nesta técnica tem vindo a aumentar.

Os DBS consistem numa técnica que envolve um baixo volume de sangue que é seco num papel, e posteriormente analisado em laboratório [147]. Este método pode ter várias aplicações como triagem e monitorização de HIV [145] e servir como alternativa ao uso de sangue venoso na monitorização de drogas terapêuticas [146], sendo por isso usada em várias áreas.

A técnica de DBS apresenta vantagens como o aumento da performance, redução dos custos e necessidade de volume de amostra reduzido, mas também desvantagens como a

imprecisão na medição do volume e problemas associados à heterogeneidade da amostra [147].

Um outro exemplo de DMS são os *dried urine spots*. Esta matriz foi já usada na deteção de benzodiazepinas e de MOR, tendo sido demonstrado que este é um método eficiente na determinação destes compostos [148, 150]. Os *dried saliva spots* (DSS), outro subtipo de DMS, têm ganho popularidade nos últimos anos uma vez que, o uso de fluido oral é mais vantajoso comparativamente a outras amostras biológicas. Este método é uma alternativa ao uso de fluido oral fresco para análise da farmacocinética e muito útil na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos e drogas [155], por se tratar de uma técnica simples e rápida na qual o volume de amostra necessário e o risco de contaminação são reduzidos [144].

Rehim et al. [156] foram os primeiros a usar o método de DSS como ferramenta de identificação e quantificação de lidocaína em amostras de fluido oral através de LC-MS/MS. Por análise dos resultados obtidos, os autores verificaram que a recuperação de lidocaína, quando aplicada a técnica de DSS, era próxima de 100% uma vez que as concentrações obtidas durante a extração, foram semelhantes às obtidas aquando da injeção direta do composto à mesma concentração, o que significa que a lidocaína é totalmente extraída do spot. Para além disto, verificaram que este composto é estável nos spots até 3 dias à temperatura ambiente. No que diz respeito ao método, os autores concluíram que este é fácil, com custos reduzidos, conveniente em termos de armazenamento e transporte e que fornece rapidez e simplicidade ao processo de preparação das amostras, sendo, portanto, uma boa alternativa de forma a contornar os problemas associados a amostras de plasma e sangue. Por último, concluíram ainda que os DSS, quando combinados com análise por MS, podem ser uma ferramenta muito útil na determinação de drogas de abuso e dos seus metabolitos, pois facilitam o processamento das amostras em termos de preparação, armazenamento e transporte [156].

Numako et al. [157] usaram os DSS para determinação de enantiómeros do ácido láctico (D-ácido láctico (D-AL) e L-ácido láctico (L-AL)), em indivíduos diabéticos e saudáveis com recurso à UPLC-MS/MS. Os autores analisaram o coeficiente de variação, a recuperação, estabilidade, exatidão e precisão da análise em DSS durante 14 dias, concluindo que à temperatura ambiente ambos os enantiómeros do ácido láctico são estáveis nos DSS durante pelo menos esse tempo. Seguidamente, testaram a percentagem de recuperação dos analitos, para os quais obtiveram valores entre 99.5 e 104.6% para as concentrações testadas (10-40 μM para D-AL e 100-400 μM para L-AL). Contudo, para concentrações inferiores, não conseguiram garantir uma boa recuperação a partir dos DSS. Por último, testaram o

efeito da matriz do fluido oral nos DSS concluindo que este é insignificante. Visto que a concentração absoluta de cada um dos enantiômeros não pode ser determinada pela análise de DSS, pois o volume de fluido oral recolhido é normalmente desconhecido, os autores recomendam que se determine a sua razão como descrito no artigo em que avaliam a razão D-AL/L-AL. Por análise de todos os resultados obtidos, e embora tenha sido observada uma grande variação na relação dos enantiômeros de pessoa para pessoa, a determinação pelo método de DSS foi realizada com sucesso. Os autores concluíram assim que a técnica de DSS pode ser aplicada no diagnóstico da diabetes e usada para determinação precoce de doenças pois é uma técnica simples, de baixo custo, que requer baixos volumes de amostra, o que torna a análise altamente sensível, e torna mais fácil o transporte, colheita, armazenamento e tratamento das amostras [157].

Neto et al. [158] testaram o uso de DSS como técnica de amostragem alternativa na determinação da atividade da enzima dihidropirimidina desidrogenase (DPD). Apesar da necessidade de confirmação com estudos que envolvam mais indivíduos, os resultados obtidos por estes autores apoiaram o uso de fluido oral como matriz alternativa para prever a deficiência de DPD, dado que esta amostra apresenta vantagens em relação à utilização de sangue, principalmente ao nível da colheita e transporte da amostra. Os resultados apoiam ainda a aplicabilidade de DSS na determinação do fenótipo e atividade da DPD, apresentando desempenho semelhante ao obtido com a amostra de fluido oral fresco [158].

Mais recentemente, o nosso grupo de investigação usou DSS na determinação e quantificação de fármacos e drogas como antiepiléticos [159], metadona e o seu metabolito EDDP [160] e antipsicóticos [161]. No estudo de antiepiléticos foram obtidas recuperações entre 41 e 61% e estabilidade de até 3 semanas à temperatura ambiente [159]. No caso da metadona foi possível observar que este composto é estável em DSS por apenas 2 semanas à temperatura ambiente, enquanto que o seu metabolito, EDDP, é estável por 2 meses nas mesmas condições. No que diz respeito à recuperação média obtida, esta foi de 67% para a metadona e 54% para o EDDP [160]. Por último, na determinação de antipsicóticos através do uso de DSS, obtiveram-se recuperações entre 63 e 97% e estabilidade nos DSS por 4 dias, sendo este período estendido a 8 dias para o haloperidol e a quetiapina [161].

Folha em branco

Capítulo 2

Justificação do tema e objetivos

A COC e os opiáceos são duas das drogas de abuso mais consumidas a nível mundial. O seu consumo tem vindo a aumentar nos últimos anos e está associado a inúmeros problemas sociais e de saúde pública. De acordo com o relatório anual de 2019 do Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência, a prevalência do consumo de COC e opiáceos na população europeia no ano anterior foi de 2.1 e 0.4%, respetivamente. Para além disso, neste relatório é possível ainda verificar que a percentagem de overdoses fatais associada ao consumo de opiáceos no mesmo período de tempo foi de 85%.

As amostras biológicas preferencialmente usadas para a deteção e quantificação destas drogas de abuso são o sangue e a urina. Contudo, nos últimos anos, o uso de fluido oral tem ganho cada vez mais interesse por se tratar de uma amostra que apresenta vantagens em relação às amostras mais convencionais, como a colheita não invasiva e dificuldade de adulteração.

Outro tópico a ter em conta é o tempo e custos dos métodos de preparação de amostras mais convencionais. Por se tratar de uma técnica simples, rápida e na qual o volume de amostra é bastante reduzido, o uso de DSS ganhou popularidade nos últimos anos.

Para além da importância de equipar os laboratórios de análises toxicológicas com métodos rápidos, precisos e eficazes para identificação e quantificação destas substâncias, a criação de métodos que permitam aumentar a sua estabilidade é também muito relevante.

Assim sendo, o presente estudo tem como principais objetivos avaliar a influência de diferentes conservantes na estabilidade da EME, COC, BEG, COET, NCOE, MOR, COD e 6-MAM em amostras de fluido oral, utilizando como técnica de extração os DSS e como técnica de análise e quantificação a GC-MS/MS e monitorizar a estabilidade a longo prazo destes mesmos compostos.

Folha em branco

Capítulo 3

Procedimento experimental

1. Materiais e métodos

1.1. Reagentes e padrões

Os padrões analíticos de COC, EME, BEG, NCOC e COET foram obtidos no Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) a 1 mg/mL. Os padrões internos COC-d₃ e BEG-d₃, os padrões analíticos de COD, MOR e 6-MAM, assim como os padrões internos COD-d₃, MOR-d₃ e 6-MAM-d₃, foram adquiridos no Sigma-Aldrich (Sintra, Portugal) todos a 1 mg/mL. O padrão interno EME-d₃ foi adquirido no Sigma-Aldrich (Sintra, Portugal) a 100 µg/mL.

O AA foi adquirido à Fisher Scientific (Loughborough, Reino Unido), o NaF no Sigma-Aldrich (Sintra, Portugal) e a NaN₃ foi adquirido à Panreac Química (Barcelona, Espanha).

A água desionizada foi obtida a partir de um sistema Mili-Q (Millipore, Billerica, MA, EUA). O N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA) e o trimetilclorosilano (TMCS) foram obtidos do Macherey-Nagel (Düren, Alemanha). Os cartões Whatman™ 903 foram adquiridos do Sigma-Aldrich (Sintra, Portugal).

As soluções de trabalho para a COC e os seus metabolitos, foram preparadas através da diluição das soluções comerciais e de *stock* com metanol (Merck Co., Darmstadt, Alemanha), para uma concentração final de 500 ng/mL para a COC, BEG, EME, COET e NCOC e uma concentração final de 1 µg/mL para os padrões internos. No que diz respeito às soluções de trabalho para os opiáceos, a diluição das soluções comerciais e de *stock* foi realizada com acetonitrilo (Carlo Erba Reagents, Val-de-Reuil, França) para uma concentração final de 2,5 µg/mL para a MOR, COD e 6-MAM e de 500 ng/mL para os respetivos padrões deuterados. Todas as soluções foram armazenadas em ausência de luz a 4 °C.

1.2. Amostras biológicas

As amostras brancas de fluido oral utilizadas ao longo deste trabalho, foram fornecidas pelo pessoal de laboratório. Todas as amostras de fluido oral foram obtidas por *spitting*, sem ser necessário o uso de dispositivos de colheita específicos. Foi realizada uma análise destas amostras em ausência de padrões internos (pelo procedimento que se descreve na seção 1.4)

a fim de garantir a ausência de interferentes nos iões e tempos de retenção dos analitos em estudo.

1.3. Condições de GC-MS/MS

A análise cromatográfica foi realizada através de um sistema de GC modelo HP 7890A, equipado com um espectrómetro de massa triplo quadrupolo (modelo 7000B), ambos da Agilent Technologies (Waldbronn, Alemanha), e um injetor PTV da Gerstel (Mülheim an der Ruhr, Alemanha). A separação dos compostos foi feita com recurso a uma coluna capilar (30m x 0.25mm I.D., espessura 0.25 µm) com 5% fenilmetilsiloxano (HP-5 MS), fornecida por J & W Scientific (Folsom, CA, EUA).

A temperatura inicial do forno foi mantida a 90 °C por 2 minutos, de seguida houve um aumento de 20 °C/minuto até se atingirem os 300 °C os quais foram mantidos por 3 minutos, resultando num tempo de corrida de 15,50 minutos. As temperaturas do injetor e do detetor usadas foram de 220 e 280 °C, respetivamente. A amostra foi injetada em modo splitless e o fluxo de hélio (gás de arraste) foi mantido constante a 0,8 mL/min.

O espectrómetro de massa operou com uma corrente de 35 µA, uma energia eletrónica de 70 eV no modo de ionização eletrónica positiva e a taxa de fluxo do gás de colisão (nitrogénio) foi mantida a 2,5 mL/min. Os resultados foram adquiridos no modo de monitorização de múltiplas reações (MRM) recorrendo ao *MassHunter WorkStation Acquisition Software* rev. B.02.01 (Agilent Technologies).

1.4. Preparação da amostra

O processo de extração da COC, opiáceos e metabolitos, foi previamente otimizado, sendo que o processo final foi: após homogeneização da amostra de fluido oral, foram aplicados 50 µL desta nos spots do cartão Whatman™903, os quais foram deixados a secar durante 12 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, os *spots* foram cortados e colocados num tubo ao qual se adicionaram 3 mL de metanol, 10 µL da solução de padrão interno (COC-d₃, EME-d₃, BEG-d₃ e COET-d₃ a 1 µg/mL) e 20 µL da solução de padrão interno (COD-d₃, MOR-d₃, 6-MAM-d₃ a 500 ng/mL). De seguida, os tubos foram colocados no agitador de rolos durante 5 minutos à temperatura ambiente e centrifugados durante 15 minutos a 3500 rpm. O extrato foi evaporado até à secura e posteriormente derivatizado com 50 µL de MSTFA + 5% TMCS por 2 minutos com recurso a um micro-ondas, na sua potencia máxima (700W). Uma alíquota de 3 µL foi injetada no sistema de GC-MS/MS.

2. Resultados e discussão

2.1. Identificação dos compostos em estudo

Após serem definidas as condições cromatográficas de GC-MS/MS, foi injetada em modo *scan* (entre m/z 50-550) uma solução padrão com todos os compostos a 10 $\mu\text{g/mL}$, de modo a identificar os íons que caracterizam a estrutura molecular de cada composto. A identificação da COC, dos opiáceos e dos seus metabolitos, foi feita através da comparação do espectro de massa obtido com espectros existentes na literatura. Após a escolha dos íons a partir do espectro de massa, estes foram fragmentados no modo *product ion* (PI) sob diferentes energias de colisão (5, 10, 15 e 20 eV). O resultado desta fragmentação permitiu obter as transições nas quais se obtém um melhor sinal cromatográfico, com a menor interferência possível e sem a contribuição dos outros analitos em estudo. A título de exemplo, as figuras 14 e 15 representam o espectro de massa da COD e o respetivo espectro após fragmentação, respetivamente.

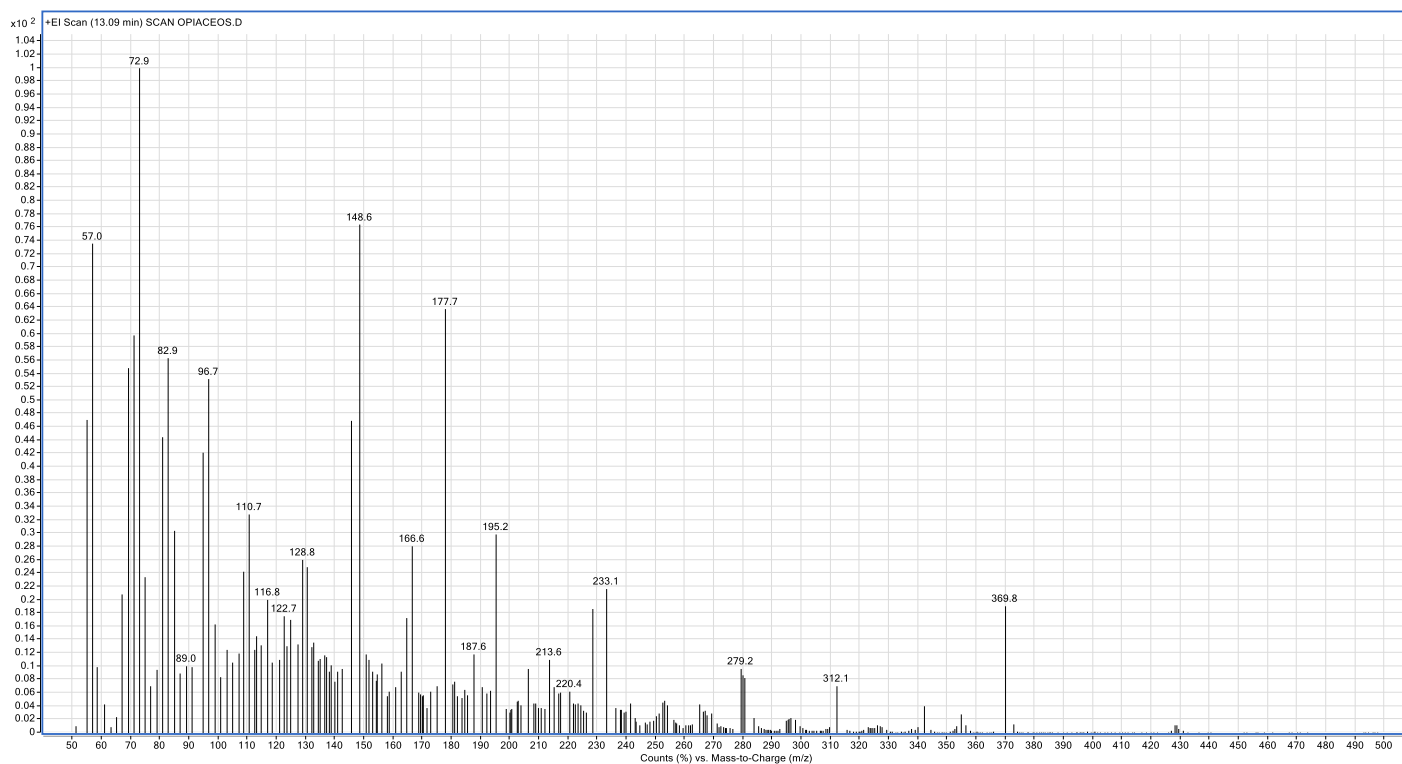


Figura 14. Espectro de massa da COD em modo *scan* (10 $\mu\text{g/mL}$)

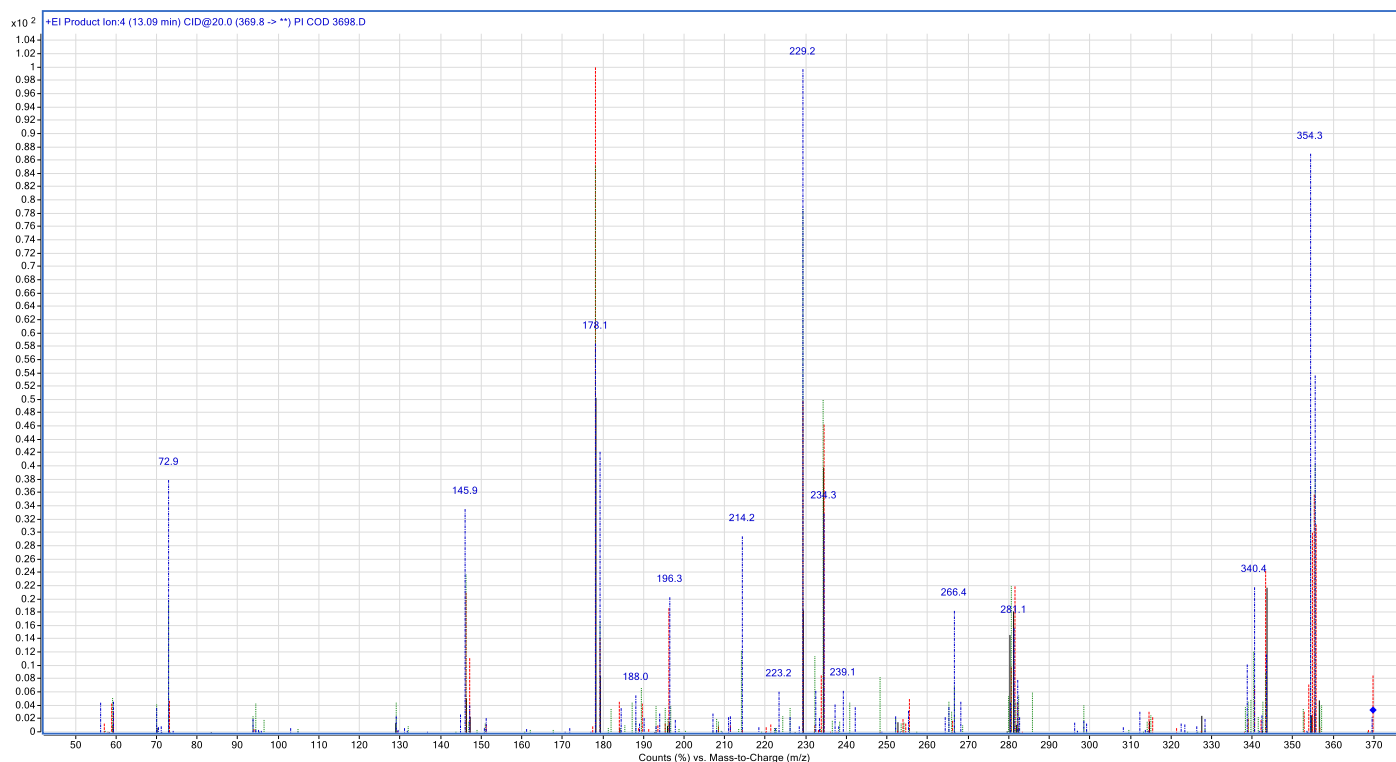


Figura 15. Product ion do ião 369.8 para a COD

As transições foram escolhidas com base nos iões mais intensos e na razão m/z mais elevada, obtendo-se assim duas transições: uma transição qualificadora e uma transição quantificadora. A Tabela 5 mostra as condições otimizadas para a detecção de cada composto e respectivos padrões internos, incluindo tempo de retenção, transições quantificadora e qualificadora, energia de colisão e *dwell time*.

Tabela 5. Tempos de retenção e transições para os diferentes analitos em estudo

Analito	Tempo de retenção (min)	Transições (m/z)	Energia de colisão (eV)	Dwell time (µs)
EME	8.51	271.5 - 83.1 *	5	50
		181.3 - 82.0	10	
EME-d ₃	8.50	274.5 - 86.1	10	50
COC	11.97	182.5 - 82.2 *	10	50
		182.5 - 150.1	5	
COC-d ₃	11.96	184.1 - 85.0	10	50
COET	12.22	196.5 - 82.0 *	10	50
		196.5 - 150.2	5	
BEG	12.25	239.6 - 82.2 *	15	50
		239.6 - 122.2	15	

BEG d3	12.21	241.9 – 85.1	15	50
NCO	12.35	178.1 - 105.1 *	15	50
		178.1 - 135.1	10	
COD	13.09	369.8 - 229.2	20	50
		369.8 - 354.3 *	20	
COD d3	13.08	374.0 – 374.0	5	50
MOR	13.32	235.4 - 146.1 *	10	50
		235.4 - 220.2	5	
6-MAM	13.67	397.9 - 287.4 *	20	50
		397.9 - 340.5	20	
6-MAM d3	13.65	402.4 – 402.4	5	50

* transição quantificadora

2.2. Desenho experimental

De modo a estudar a capacidade que diferentes conservantes, neste caso o AA, o NaF e a NaN_3 , têm para aumentar a estabilidade da COC, dos seus metabolitos e dos opiáceos, recorreu-se ao desenho experimental ou *Design of Experiments* (DOE). O DOE é uma ferramenta estatística, que permite identificar e quantificar as causas de um efeito dentro de um estudo experimental. O DOE manipula deliberadamente uma ou mais variáveis, normalmente parâmetros associados a esse estudo experimental, para medir o efeito que tem em outras variáveis de interesse. Permite ainda indicar qual o melhor procedimento, principais variáveis, a interação entre variáveis, quantas vezes é preciso repetir a experiência e a ordem para poder estabelecer com confiança a relação entre as variáveis e o efeito pretendido [165]. Visto que a avaliação dos parâmetros é feita de forma multivariada e que se recorre a um planeamento fatorial fracionado (2^4), esta abordagem permite-nos avaliar de forma simultânea o efeito de várias variáveis a partir de um reduzido número de ensaios, e assim diminuir o número total de experiências e obter bons resultados, poupando recursos e tempo [165, 166]. O tratamento de resultados foi posteriormente realizado no programa estatístico MINITAB®, versão 17.

Durante o estudo, os fatores analisados para cada um dos conservantes foram a temperatura (4 °C e temperatura ambiente), luz (presença e ausência), concentração do conservante (alta (600 ng/mL, 2% e 0,2% para AA, NaF e NaN_3 , respetivamente) e baixa (300 ng/mL, 1% e 0,1% para AA, NaF e NaN_3 , respetivamente)) e o tempo de armazenamento (1 e 7 dias) (Tabela 6). Na realização deste estudo foi usada uma concentração de 100 ng/mL. Esta concentração encontra-se dentro do intervalo de linearidade de todos os compostos em estudo [167].

Nas Tabelas 7-9 apresentam-se os resultados obtidos para cada um dos conservantes.

Tabela 6. Matriz experimental

Ordem	Temperatura	Luz	Conservante	Tempo
1	4 °C	Presença	Baixa	1 Dia
2	4 °C	Presença	Baixa	7 Dias
3	4 °C	Presença	Alta	7 Dias
4	4 °C	Ausência	Baixa	1 Dia
5	Ambiente	Presença	Alta	7 Dias
6	Ambiente	Ausência	Baixa	7 Dias
7	Ambiente	Ausência	Alta	7 Dias
8	Ambiente	Ausência	Baixa	1 Dia
9	4 °C	Ausência	Alta	7 Dias
10	Ambiente	Ausência	Alta	1 Dia
11	Ambiente	Presença	Baixa	7 Dias
12	4 °C	Ausência	Baixa	7 Dias
13	Ambiente	Presença	Alta	1 Dia
14	4 °C	Presença	Alta	1 Dia
15	Ambiente	Presença	Baixa	1 Dia
16	4 °C	Ausência	Alta	1 Dia

2.2.1. Ácido Ascórbico

Tabela 7. Resultados das extrações do DOE para o AA

Ordem	Temperatura	Luz	Conservante	Tempo	Resposta							
					EME	COC	COET	BEG	NCOC	COD	MOR	6-MAM
1	4 °C	Presença	Baixa	1 Dia	0,0943	0,1048	0,0912	0,2449	0,5907	0,0254	0,4177	0,0313
2	4 °C	Presença	Baixa	7 Dias	0,0848	0,1031	0,0895	0,2402	0,5669	0,0248	0,4111	0,0305
3	4 °C	Presença	Alta	7 Dias	0,1065	0,1423	0,0921	0,2663	2,4119	0,0313	0,5944	0,0535
4	4 °C	Ausência	Baixa	1 Dia	0,1585	0,1460	0,1505	0,4250	2,7973	0,0170	0,1035	0,0572
5	Ambiente	Presença	Alta	7 Dias	0,0940	0,1332	0,0846	0,2545	0,4274	0,0301	0,5018	0,0432
6	Ambiente	Ausência	Baixa	7 Dias	0,0924	0,0950	0,0705	0,2376	1,3968	0,0298	0,4168	0,0546
7	Ambiente	Ausência	Alta	7 Dias	0,0941	0,0931	0,0633	0,2030	0,7747	0,0304	0,5065	0,0419
8	Ambiente	Ausência	Baixa	1 Dia	0,1071	0,1483	0,1184	0,3454	1,4932	0,0219	0,1359	0,0383
9	4 °C	Ausência	Alta	7 Dias	0,1323	0,1386	0,1113	0,3105	1,5993	0,0242	0,4220	0,0588
10	Ambiente	Ausência	Alta	1 Dia	0,1286	0,2007	0,1415	0,3367	2,2346	0,0185	0,5732	0,0437
11	Ambiente	Presença	Baixa	7 Dias	0,0795	0,1106	0,0979	0,1940	0,5961	0,0204	0,3472	0,0364
12	4 °C	Ausência	Baixa	7 Dias	0,0912	0,1146	0,0805	0,1905	0,5804	0,0284	0,5120	0,0520
13	Ambiente	Presença	Alta	1 Dia	0,1141	0,1601	0,1728	0,4205	0,4625	0,0214	0,2824	0,0494
14	4 °C	Presença	Alta	1 Dia	0,0716	0,1186	0,0919	0,2697	1,8932	0,0238	0,2564	0,0433
15	Ambiente	Presença	Baixa	1 Dia	0,0900	0,1356	0,1046	0,3098	0,5765	0,0186	0,3064	0,0350
16	4 °C	Ausência	Alta	1 Dia	0,1388	0,1775	0,2348	0,4228	0,7875	0,0189	0,1718	0,0545

Legenda: **6-MAM:** 6-Monoacetilmorfina; **BEG:** Benzoilecgonina; **COC:** Cocaína; **COD:** Codeína; **COET:** Cocaetileno; **EME:** Ecgonina metilester; **MOR:** Morfina; **NCOC:** Norcocaína.

A resposta foi obtida através da razão entre a área do pico de cada composto (transição quantificadora) e a área do pico do padrão interno. Para o cálculo da resposta do COET, em ausência do respetivo análogo deuterado, foi utilizada a COC-d₃. O mesmo aconteceu para a NCOC onde se usou a EME-d₃ e para a MOR onde se usou o padrão de COD-d₃. Para os restantes compostos, foi usado o seu respetivo deuterado. Analisando os resultados do DOE e com base nas respostas obtidas, foi possível obter os Diagramas de Pareto para cada um dos compostos em estudo (Gráficos 1-8).

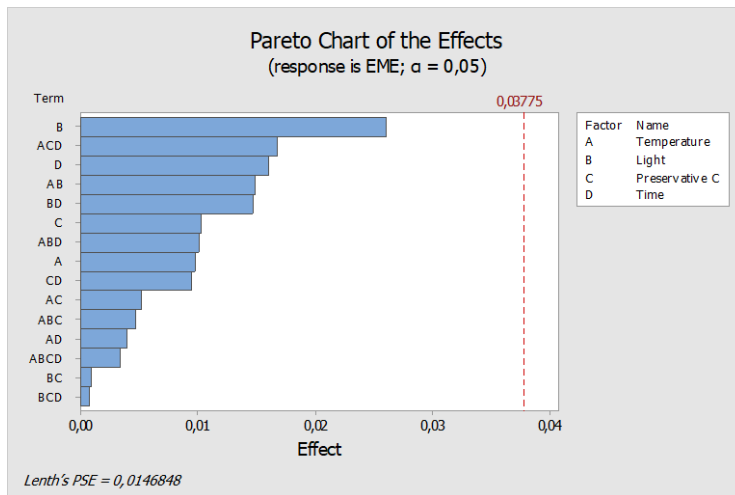


Gráfico 1. Diagrama de Pareto da EME - AA

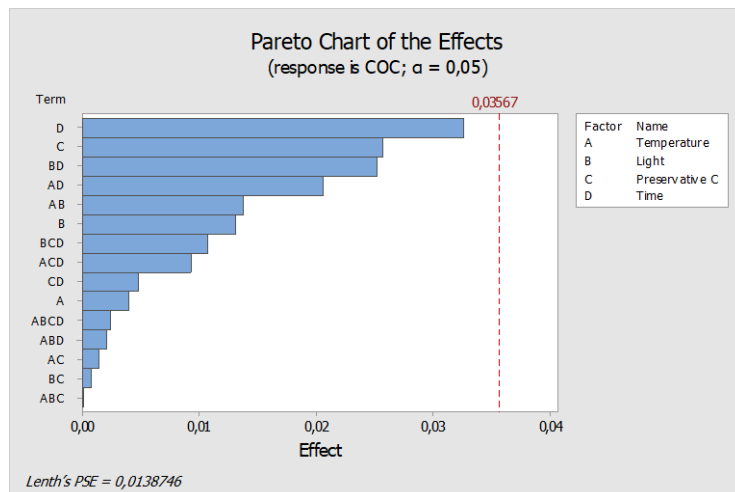


Gráfico 2. Diagrama de Pareto da COC - AA

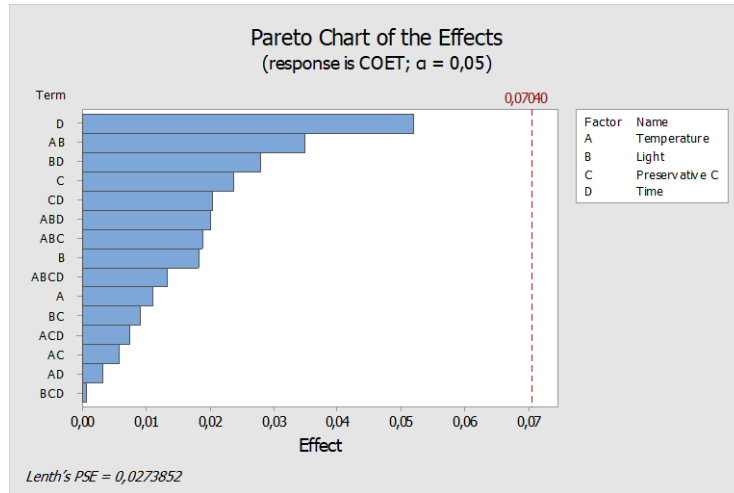


Gráfico 3. Diagrama de Pareto do COET - AA

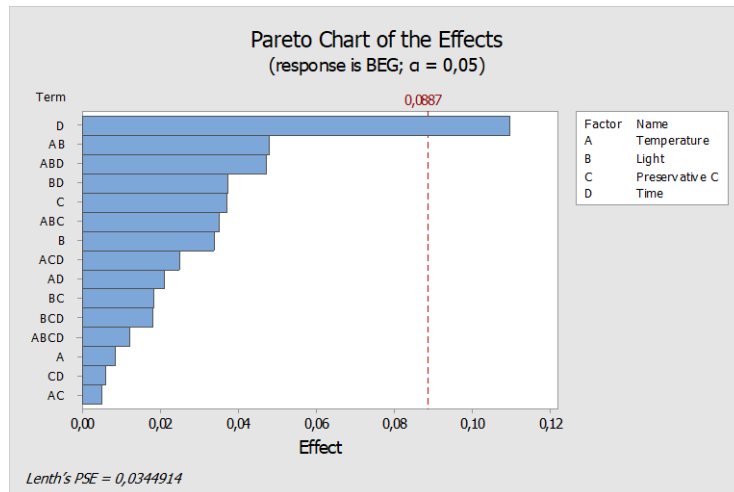


Gráfico 4. Diagrama de Pareto da BEG - AA

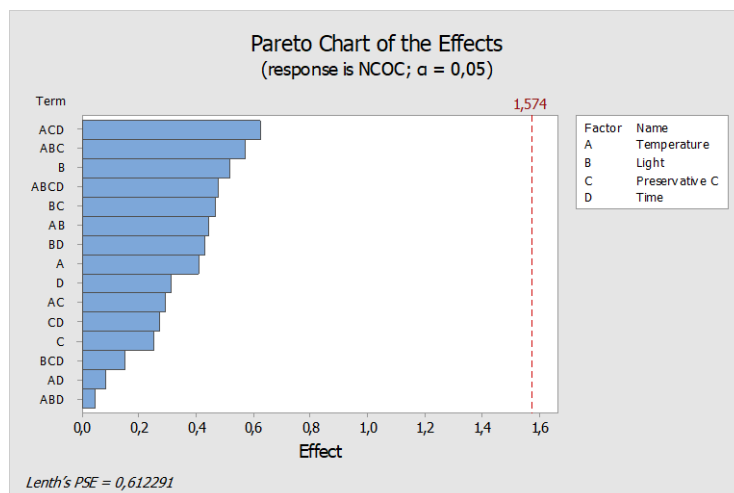


Gráfico 5. Diagrama de Pareto da NCOC - AA

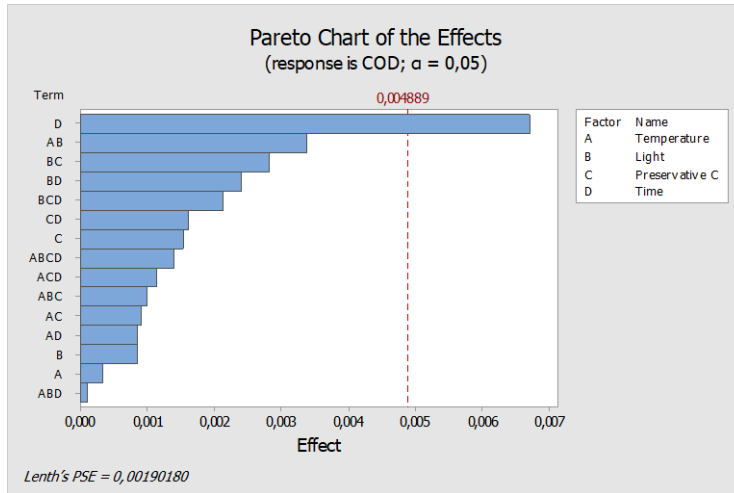


Gráfico 6. Diagrama de Pareto da COD - AA

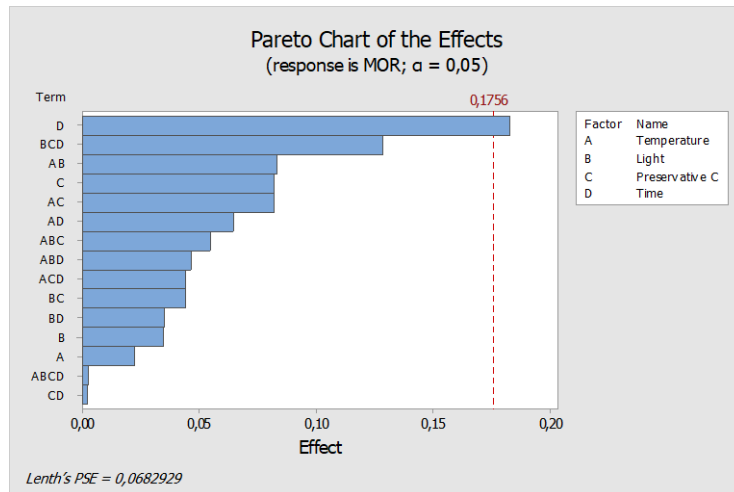


Gráfico 7. Diagrama de Pareto da MOR - AA

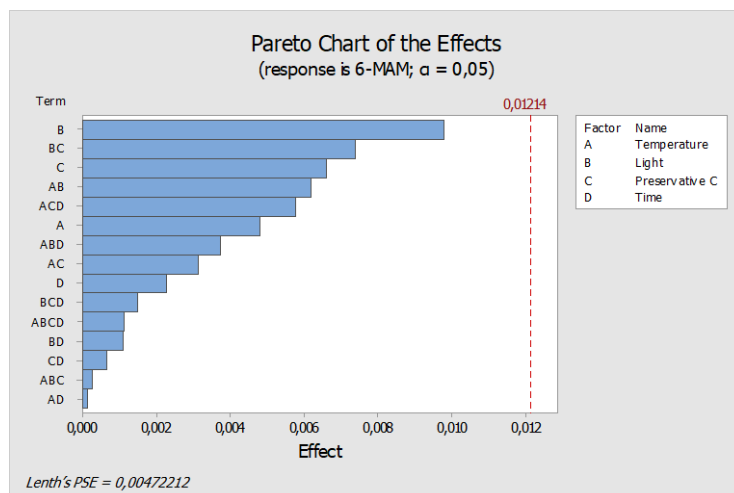


Gráfico 8. Diagrama de Pareto da 6-MAM - AA

Nos diagramas anteriores, o efeito de cada um dos fatores em estudo e as associações entre fatores, são apresentados por ordem decrescente de importância e só os fatores que ultrapassam a linha vermelha a tracejada, nível de significância de 5%, são considerados estatisticamente significativos, ou seja, apenas estes têm influência na resposta.

Analisando os diagramas, podemos afirmar que para a BEG, para a COD e para a MOR (gráficos 4, 6 e 7), o tempo é um parâmetro com influência estatística que irá, portanto, afetar a resposta para estes compostos. Para os restantes compostos, os parâmetros avaliados não apresentam diferenças estatísticas, uma vez que nenhum destes atravessa a linha de significância de 5%. Esta interpretação dos resultados pode ser reforçada pela análise dos gráficos de efeitos principais (Gráficos 9-16).

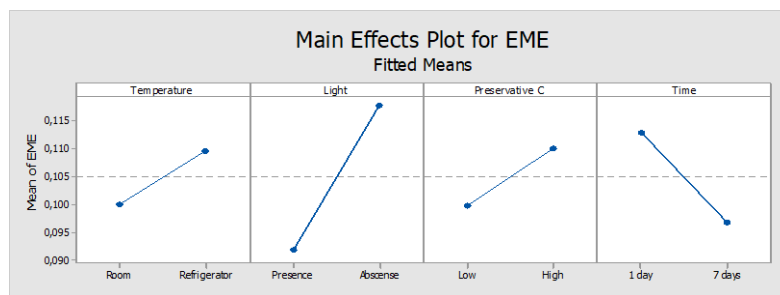


Gráfico 9. Efeitos principais para a EME - AA

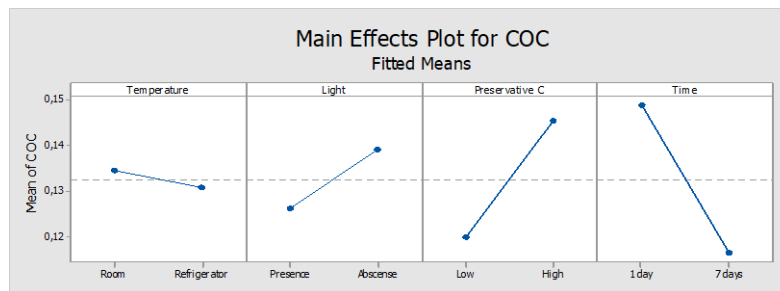


Gráfico 10. Efeitos principais para a COC - AA

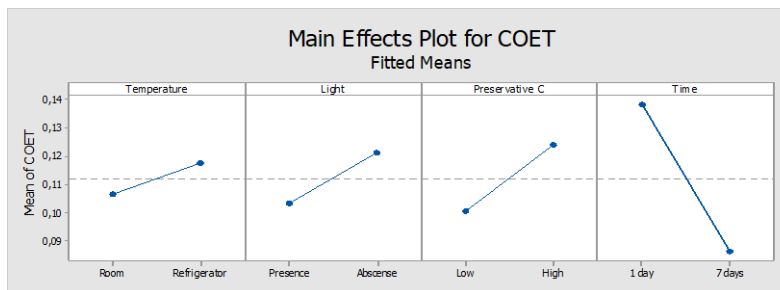


Gráfico 11. Efeitos principais para o COET - AA

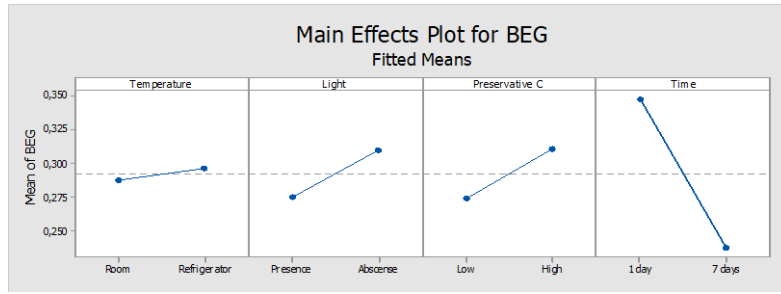


Gráfico 12. Efeitos principais para a BEG - AA

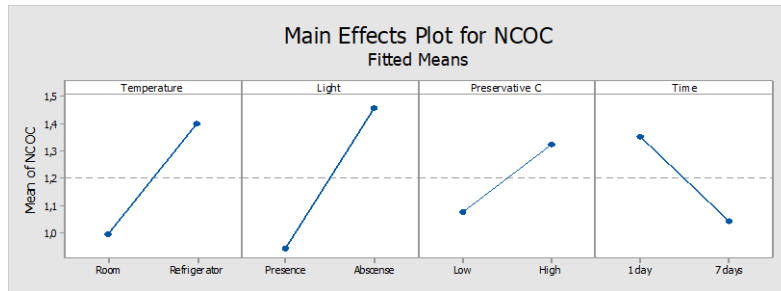


Gráfico 13. Efeitos principais para a NCOC - AA

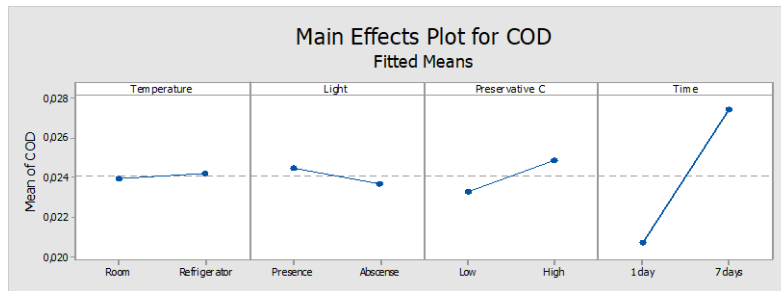


Gráfico 14. Efeitos principais para a COD - AA

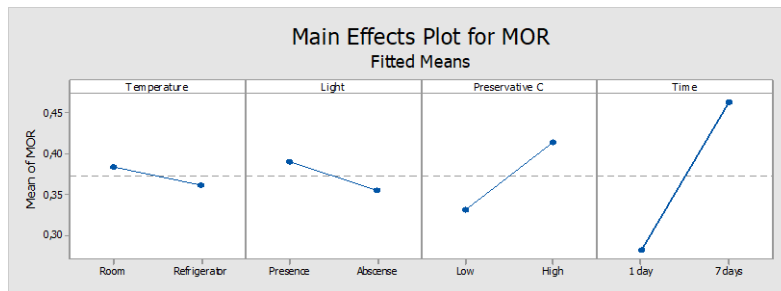


Gráfico 15. Efeitos principais para a MOR - AA

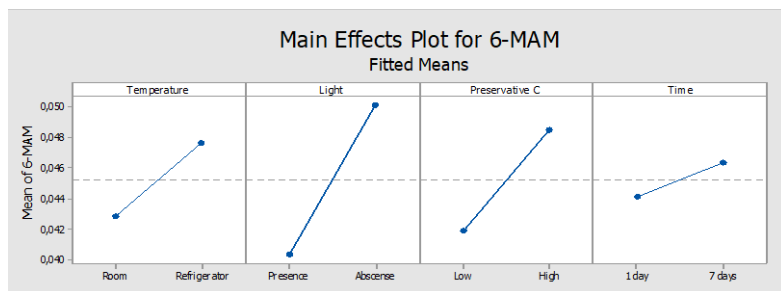


Gráfico 16. Efeitos principais para a 6-MAM - AA

Tendo em conta os gráficos anteriores, podemos observar que, existem variáveis onde é possível observar maior sinal, concretamente a 4 °C, ausência de luz e alta concentração do conservante (600 ng/mL). No entanto não têm significado estatístico.

Foi ainda estudada a influência de interações entre diferentes fatores na resposta obtida (Gráficos 17-24).

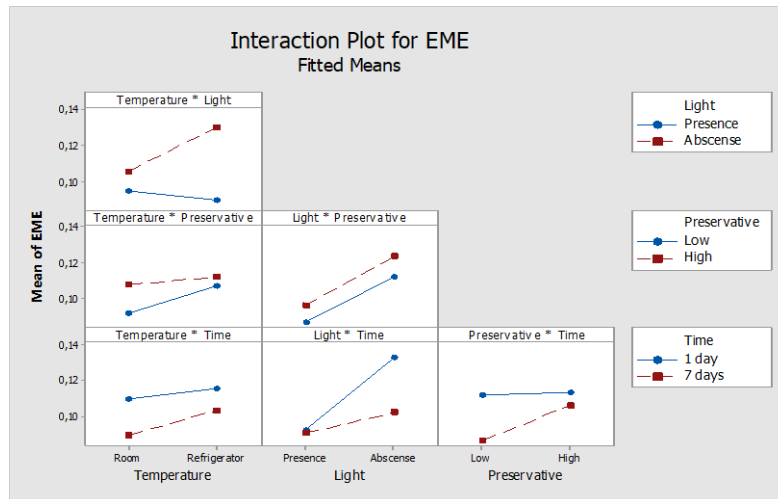


Gráfico 17. Interações entre os vários parâmetros para a EME - AA

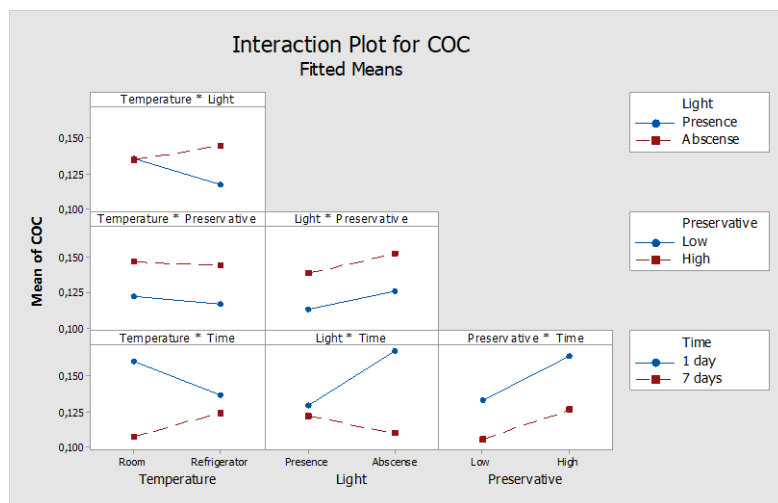


Gráfico 18. Interações entre os vários parâmetros para a COC - AA

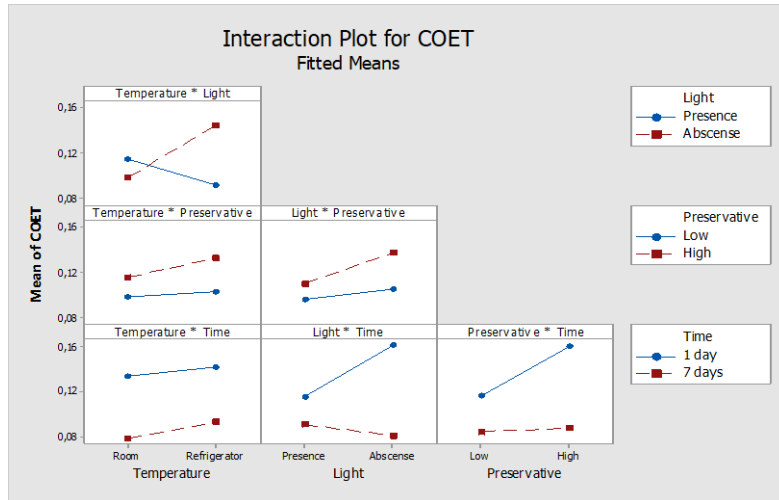


Gráfico 19. Interações entre os vários parâmetros para o COET - AA

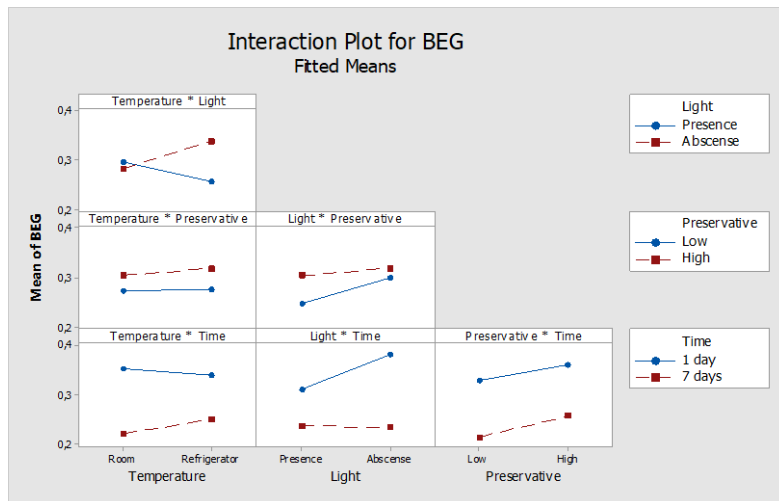


Gráfico 20. Interações entre os vários parâmetros para a BEG - AA

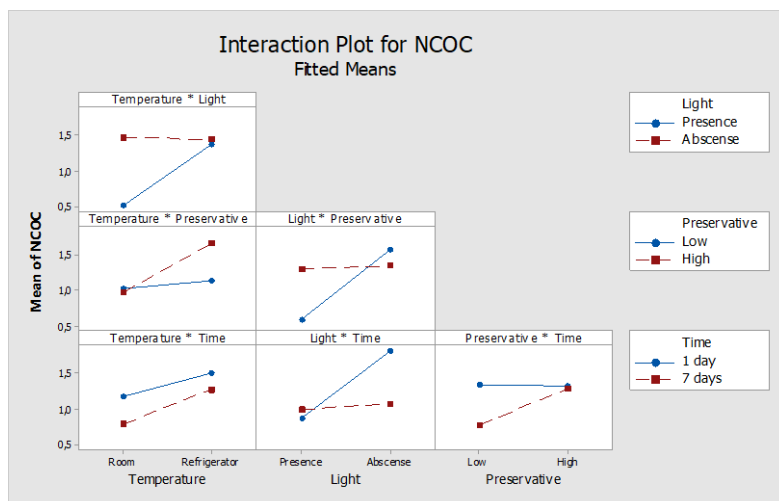


Gráfico 21. Interações entre os vários parâmetros para a NCOC - AA

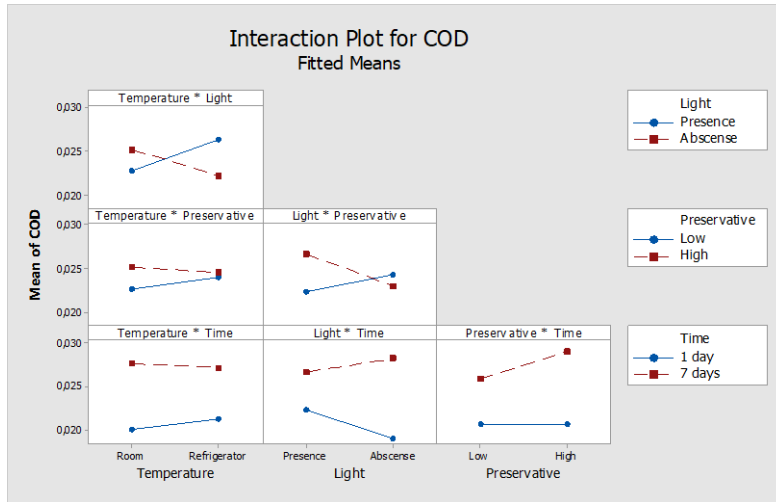


Gráfico 22. Interações entre os vários parâmetros para a COD - AA

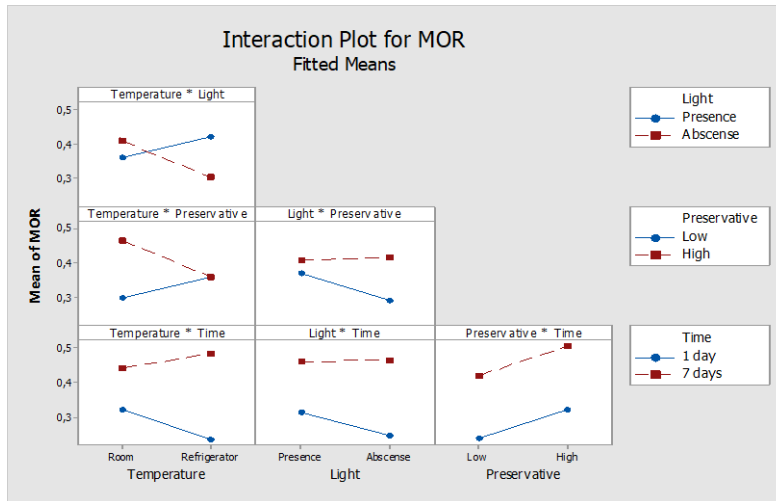


Gráfico 23. Interações entre os vários parâmetros para a MOR - AA

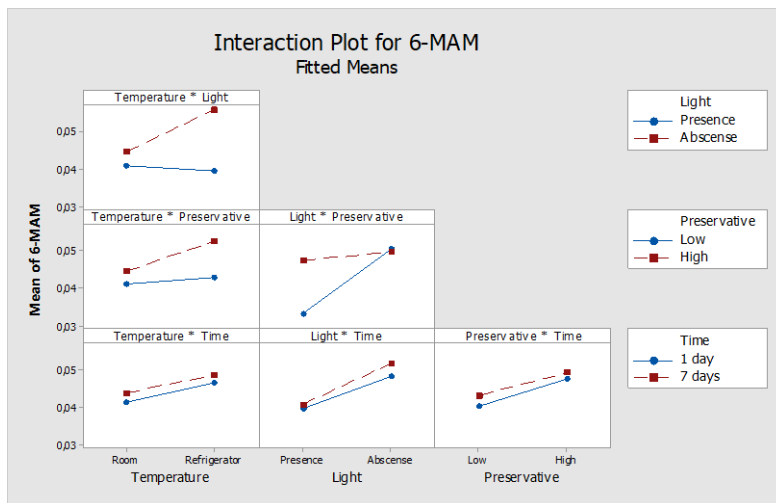


Gráfico 24. Interações entre os vários parâmetros para a 6-MAM - AA

Os gráficos de *Interaction Plot*, permitem-nos detetar quando duas variáveis independentes interagem entre si, sendo que esta interação é observada quando dois parâmetros se cruzam [166]. Analisando os gráficos, podemos observar que existem algumas situações em que dois fatores se cruzam mas, uma vez que esse cruzamento ocorre no ponto máximo, no ponto mínimo ou quando uma das variáveis se mantém constante ao longo do ensaio, não têm significado estatístico. Assim, e tal como verificado pela análise dos Diagramas de Pareto, podemos concluir que estas interações não afetam significativamente a resposta [168].

2.2.2. Fluoreto de sódio

Tabela 8. Resultados das extrações do DOE para o NaF

Ordem	Temperatura	Luz	Conservante	Tempo	Resposta							
					EME	COC	COET	BEG	NCOC	COD	MOR	6-MAM
1	4 °C	Presença	Baixa	1 Dia	0,2551	0,1549	0,1651	0,3796	14,6824	0,0287	0,2778	0,0482
2	4 °C	Presença	Baixa	7 Dias	0,1064	0,1354	0,1996	0,3460	1,6814	0,0356	0,1819	0,0443
3	4 °C	Presença	Alta	7 Dias	0,1704	0,1645	0,3164	0,3741	4,2389	0,0295	0,2323	0,0407
4	4 °C	Ausência	Baixa	1 Dia	0,1816	0,1809	0,1555	0,4130	5,7877	0,0377	0,6164	0,0859
5	Ambiente	Presença	Alta	7 Dias	0,0757	0,1258	0,2135	0,5703	2,2444	0,0690	0,8139	0,0599
6	Ambiente	Ausência	Baixa	7 Dias	0,0758	0,1284	0,1596	0,3788	2,5309	0,0303	0,4182	0,0507
7	Ambiente	Ausência	Alta	7 Dias	0,1253	0,1578	0,2036	0,3833	5,2839	0,0247	0,3527	0,0401
8	Ambiente	Ausência	Baixa	1 Dia	0,1821	0,1168	0,2510	0,2594	3,1446	0,0306	0,4380	0,0413
9	4 °C	Ausência	Alta	7 Dias	0,1167	0,1041	0,1283	0,2187	1,2128	0,0242	0,2327	0,0411
10	Ambiente	Ausência	Alta	1 Dia	0,0974	0,0848	0,1001	0,2215	6,2618	0,0302	0,5344	0,0528
11	Ambiente	Presença	Baixa	7 Dias	0,1347	0,1218	0,2757	0,9912	10,9822	0,0668	0,7716	0,0720
12	4 °C	Ausência	Baixa	7 Dias	0,1101	0,1485	0,1583	0,3176	7,1889	0,0314	0,3554	0,0452
13	Ambiente	Presença	Alta	1 Dia	0,1699	0,1094	0,1553	0,2971	7,0568	0,0291	0,2374	0,0458
14	4 °C	Presença	Alta	1 Dia	0,1607	0,1737	0,2054	0,4711	3,5242	0,0443	0,6660	0,0751
15	Ambiente	Presença	Baixa	1 Dia	0,4332	0,2290	0,4459	0,7389	17,2649	0,0921	1,2147	0,0969
16	4 °C	Ausência	Alta	1 Dia	0,1108	0,0883	0,1029	0,2217	7,2633	0,0305	0,2872	0,0500

Legenda: **6-MAM:** 6-Monoacetilmorfina; **BEG:** Benzoilecgonina; **COC:** Cocaína; **COD:** Codeína; **COET:** Cocaetileno; **EME:** Ecgonina metilester; **MOR:** Morfina; **NCOC:** Norcocaína.

Tal como para o AA, também para o conservante NaF se realizaram todas as extrações do DOE e se procedeu à análise dos resultados obtidos através dos Diagramas de Pareto (Gráficos 25-32).

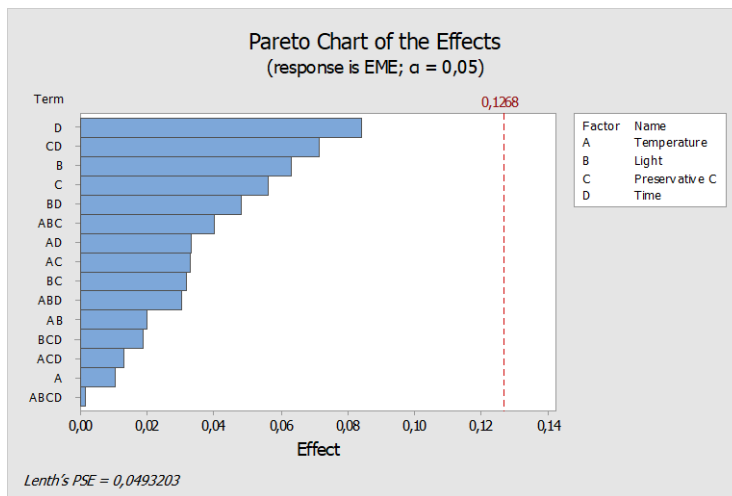


Gráfico 25. Diagrama de Pareto da EME - NaF

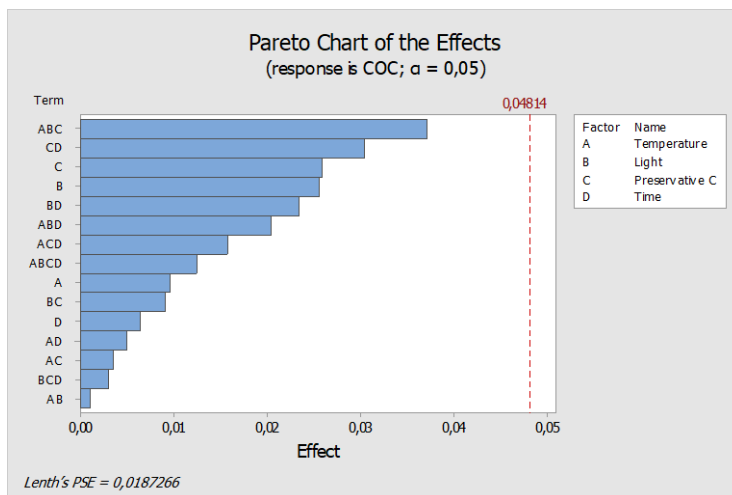


Gráfico 26. Diagrama de Pareto da COC - NaF

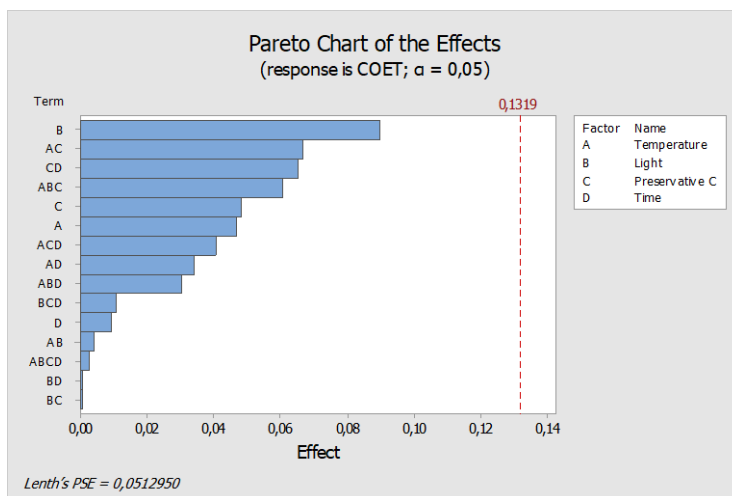


Gráfico 27. Diagrama de Pareto do COET - NaF

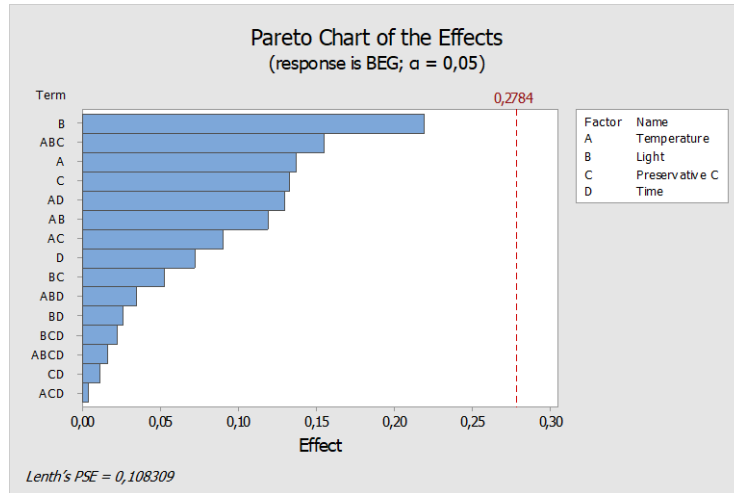


Gráfico 28. Diagrama de Pareto da BEG - NaF

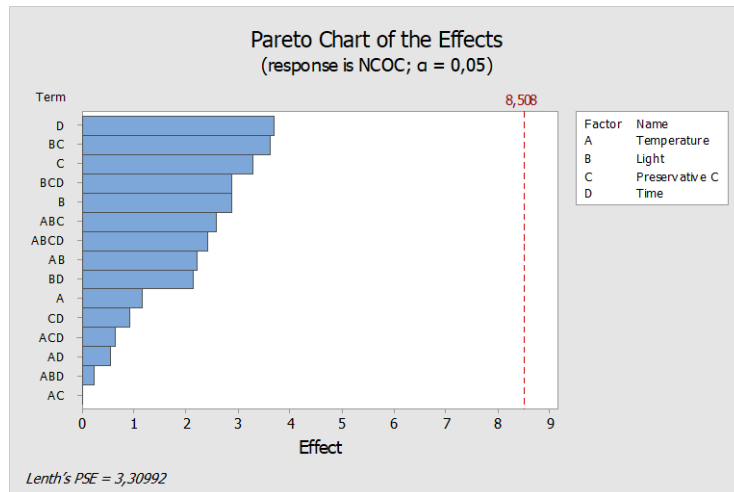


Gráfico 29. Diagrama de Pareto da NCOC - NaF

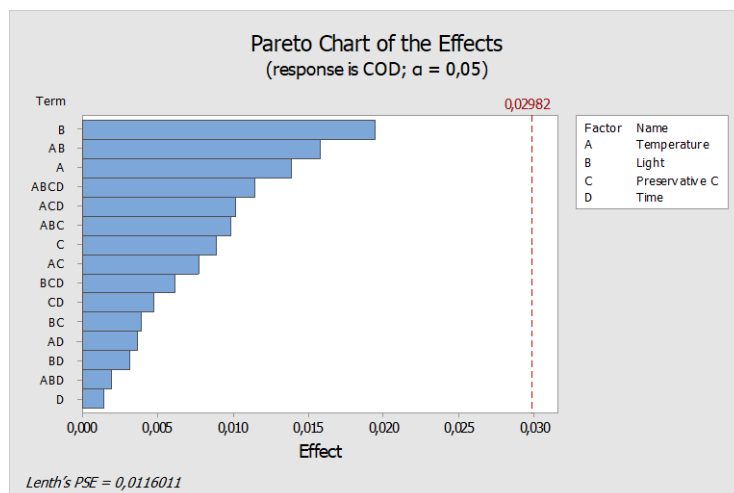


Gráfico 30. Diagrama de Pareto da COD - NaF

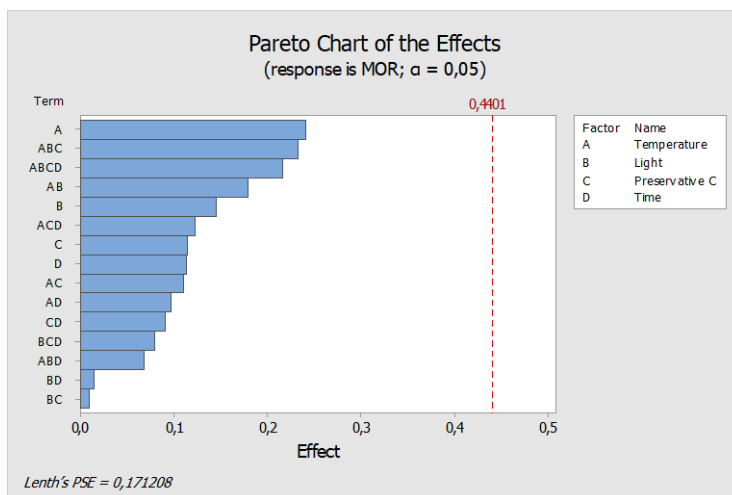


Gráfico 31. Diagrama de Pareto da MOR - NaF

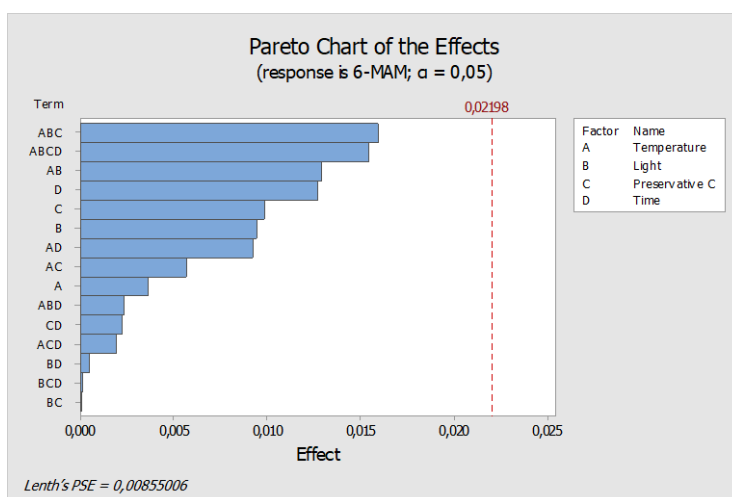


Gráfico 32. Diagrama de Pareto da 6-MAM - NaF

Através da análise dos diagramas anteriores, podemos afirmar que nenhum dos parâmetros em estudo apresenta significado estatístico, uma vez que não ultrapassam a linha de significância de 5%, ou seja, a resposta não é afetada por nenhum destes parâmetros. Embora não se verifique influência de nenhum parâmetro, é possível verificar que para a EME, o tempo foi o fator que se revelou ser mais importante, para o COET, BEG e COD o parâmetro com mais influência foi a luz, enquanto que para a COC, NCOC, MOR e 6-MAM não há um parâmetro que se destaque.

Tal como feito anteriormente, estes resultados podem ser reforçados pelos gráficos de efeitos principais (Gráficos 33-40).

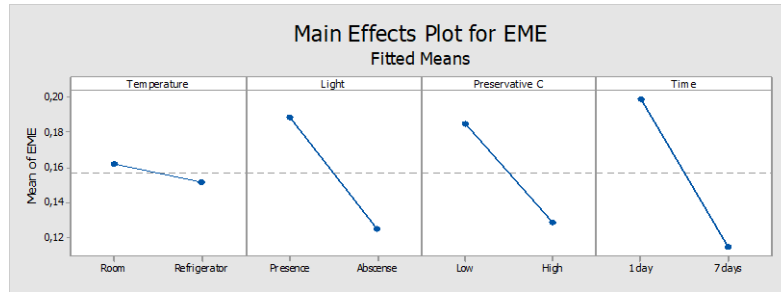


Gráfico 33. Efeitos principais para a EME - NaF

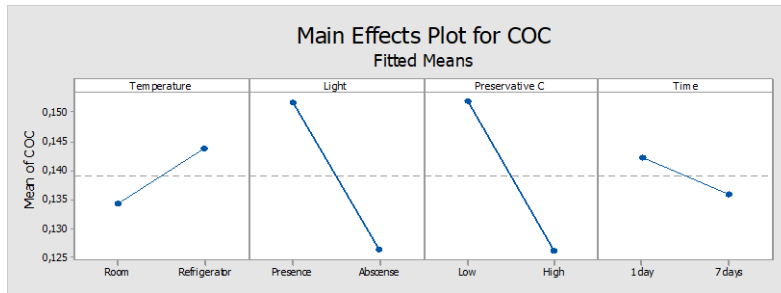


Gráfico 34. Efeitos principais para a COC - NaF

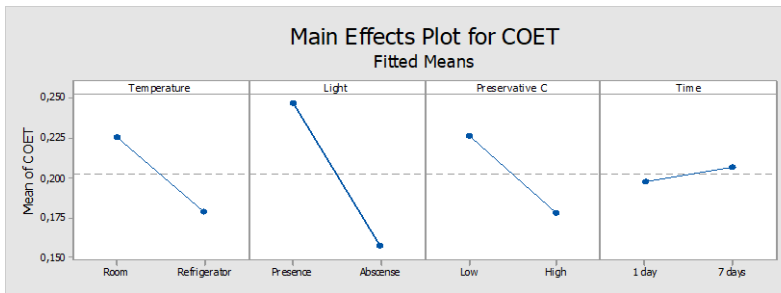


Gráfico 35. Efeitos principais para o COET - NaF

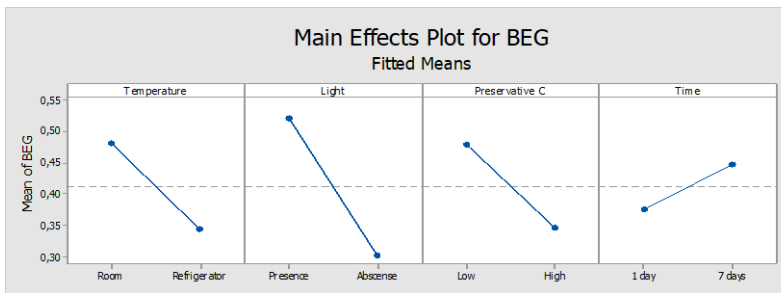


Gráfico 36. Efeitos principais para a BEG - NaF

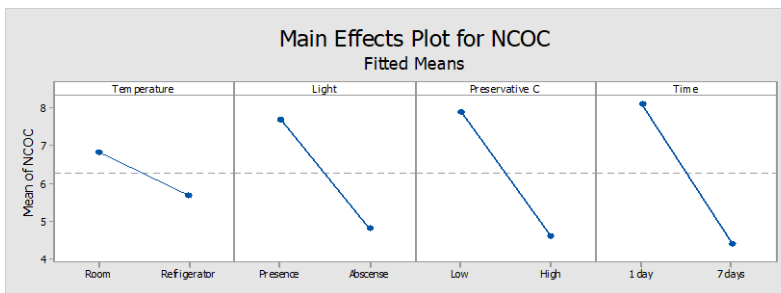


Gráfico 37. Efeitos principais para a NCOC - NaF

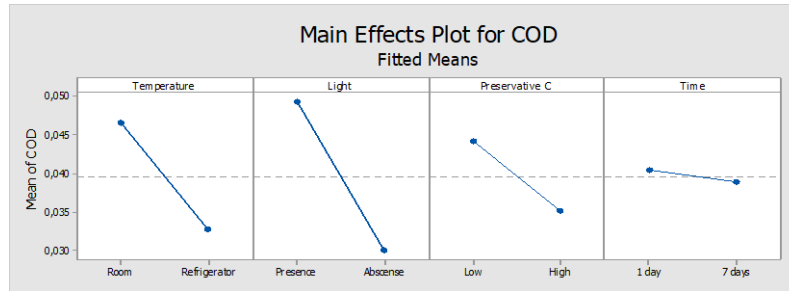


Gráfico 38. Efeitos principais para a COD - NaF

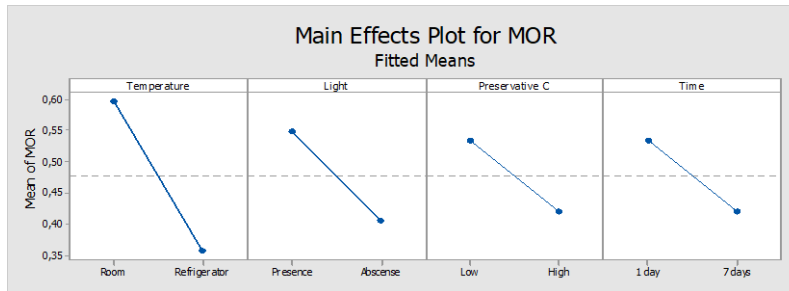


Gráfico 39. Efeitos principais para a MOR - NaF

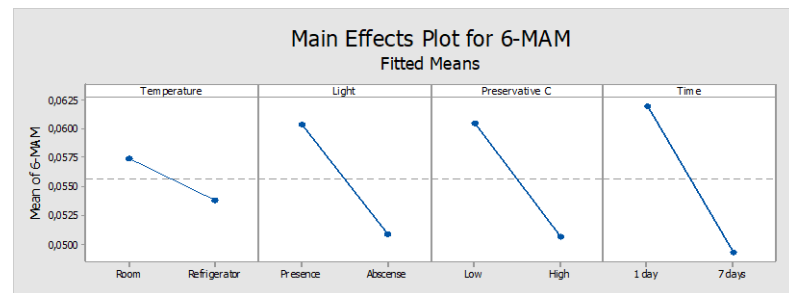


Gráfico 40. Efeitos principais para a 6-MAM

Tendo em conta os gráficos dos efeitos principais para cada um dos compostos, é possível afirmar que embora sem significado estatístico, de forma geral, a melhor condição, ou seja, a que tem melhores respostas, é a temperatura ambiente com presença de luz e baixa concentração do conservante (1%). Posteriormente, foram ainda analisados os gráficos de interação entre diferentes fatores (Gráficos 41-48), de modo a perceber se existiam interações que pudessem influenciar a resposta.

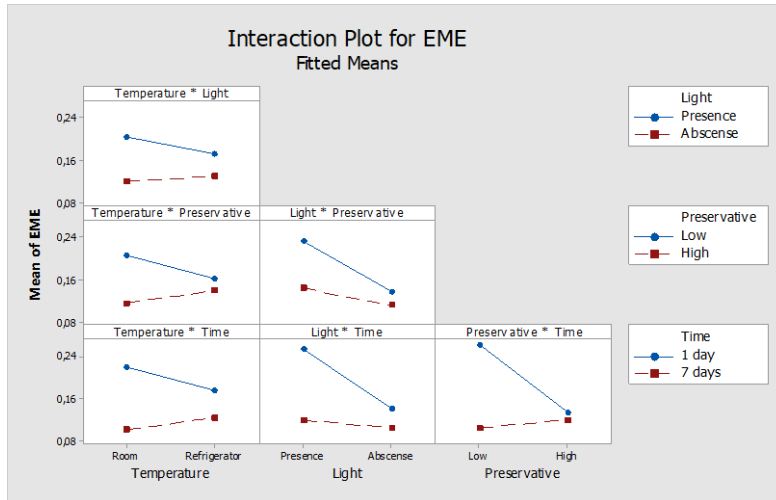


Gráfico 41. Interações entre os vários parâmetros para a EME - NaF

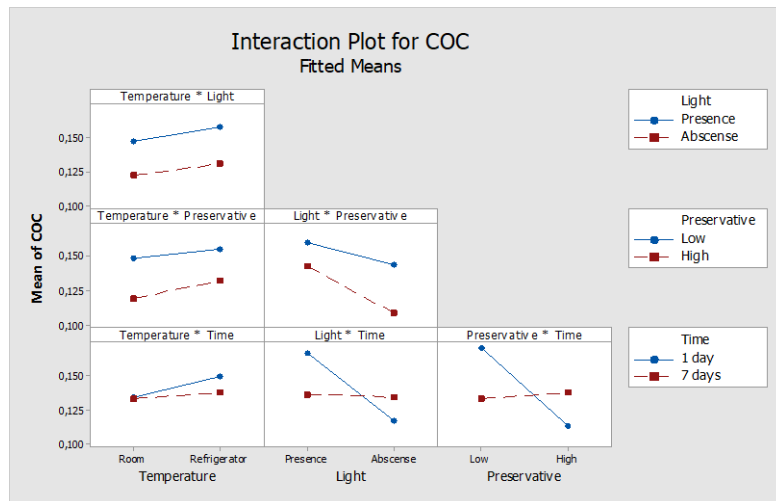


Gráfico 42. Interações entre os vários parâmetros para a COC - NaF

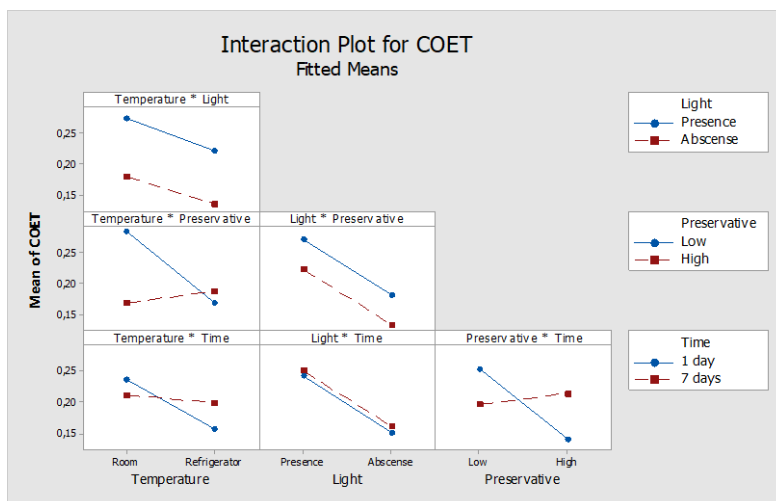


Gráfico 43. Interações entre os vários parâmetros para o COET - NaF

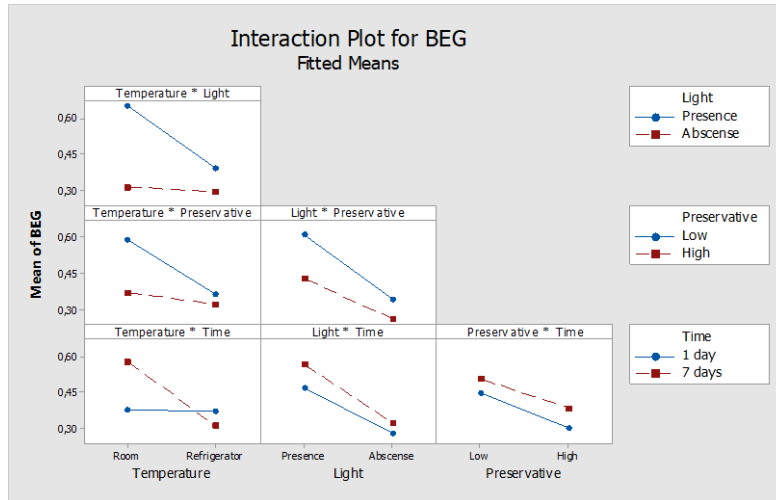


Gráfico 44. Interações entre os vários parâmetros para a BEG - NaF

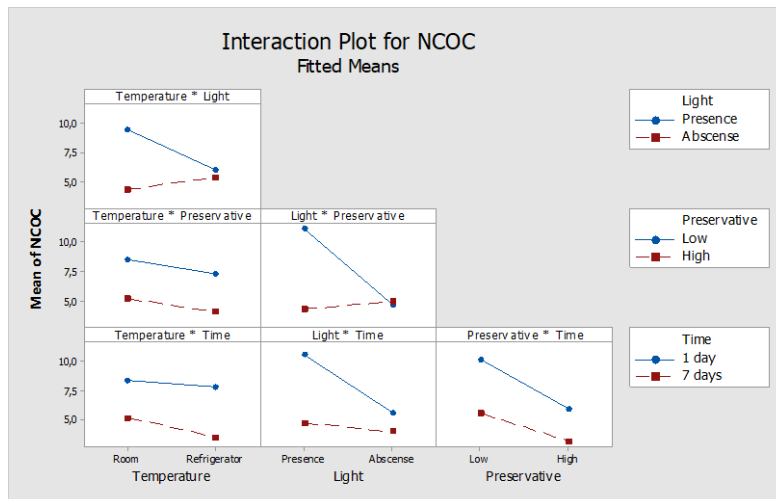


Gráfico 45. Interações entre os vários parâmetros para a NCOC - NaF

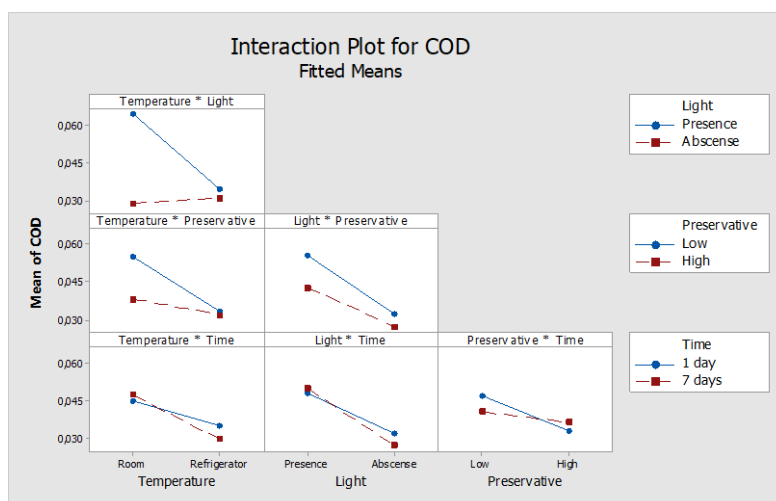


Gráfico 46. Interações entre os vários parâmetros para a COD - NaF

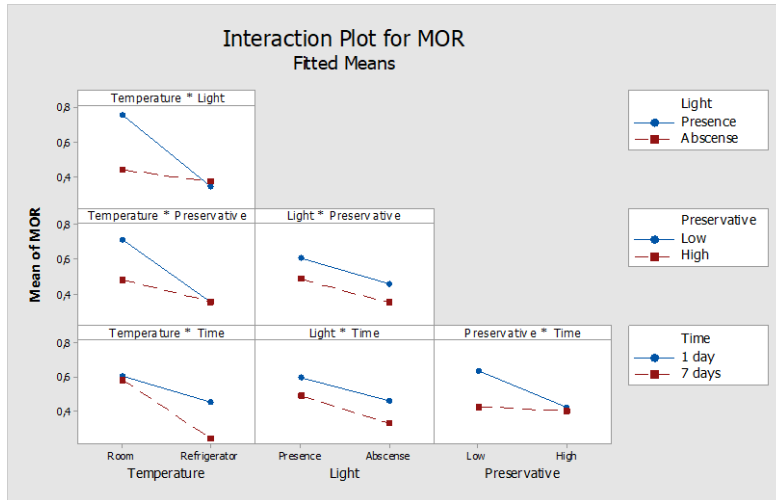


Gráfico 47. Interações entre os vários parâmetros para a MOR - NaF

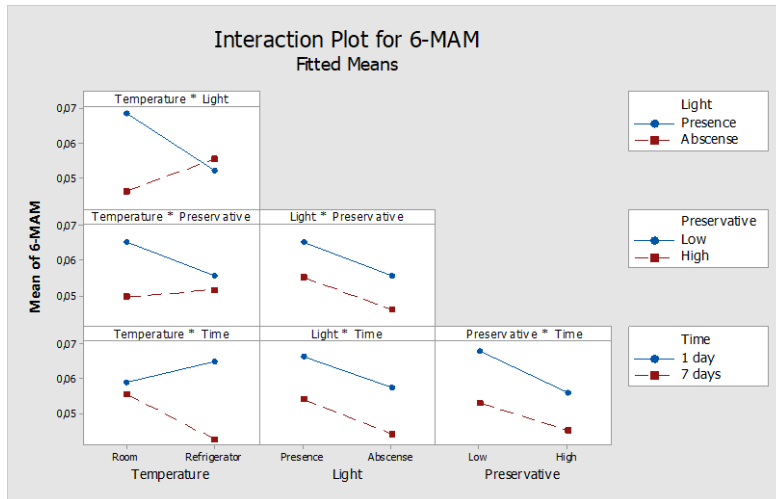


Gráfico 48. Interações entre os vários parâmetros para a 6-MAM - NaF

Tal como verificado para o AA, também para o caso do NaF não existem interações significativas visto que, através da análise dos gráficos anteriores, podemos verificar que dois parâmetros apenas se cruzam no ponto mínimo, no ponto máximo ou quando uma das variáveis se mantém constante ao longo do estudo.

2.2.3. Azida de sódio

Tabela 9. Resultados das extrações do DOE para a NaN₃

Ordem	Temperatura	Luz	Conservante	Tempo	Resposta							
					EME	COC	COET	BEG	NCOC	COD	MOR	6-MAM
1	4 °C	Presença	Baixa	1 Dia	0,1016	0,1170	0,1330	0,3249	0,1121	0,0371	0,6289	0,0554
2	4 °C	Presença	Baixa	7 Dias	0,1774	0,3053	0,3546	0,8135	0,1552	0,0433	0,9388	0,0560
3	4 °C	Presença	Alta	7 Dias	0,0932	0,1250	0,4034	0,8806	0,0803	0,0483	1,0197	0,0594
4	4 °C	Ausência	Baixa	1 Dia	0,2416	0,1789	0,1960	0,4553	0,0916	0,0608	0,9748	0,0780
5	Ambiente	Presença	Alta	7 Dias	0,2523	0,1138	0,2013	1,1649	0,0955	0,0617	1,2188	0,0254
6	Ambiente	Ausência	Baixa	7 Dias	0,0700	0,1475	0,3479	1,1768	0,1034	0,0561	0,8994	0,0656
7	Ambiente	Ausência	Alta	7 Dias	0,3021	0,1329	0,2780	1,8615	0,0761	0,0666	1,2045	0,0422
8	Ambiente	Ausência	Baixa	1 Dia	0,1003	0,1199	0,1433	0,4093	0,1207	0,0247	0,4779	0,0334
9	4 °C	Ausência	Alta	7 Dias	0,0398	0,1149	0,2807	0,4675	0,0697	0,0308	0,6189	0,0385
10	Ambiente	Ausência	Alta	1 Dia	0,1698	0,2381	0,3246	0,8416	0,1778	0,0557	0,7911	0,0636
11	Ambiente	Presença	Baixa	7 Dias	0,0000	0,1082	0,1513	0,9206	0,0644	0,0476	0,9308	0,0412
12	4 °C	Ausência	Baixa	7 Dias	0,2136	0,2619	0,3585	0,9572	0,1316	0,0546	1,2824	0,0615
13	Ambiente	Presença	Alta	1 Dia	0,1703	0,2824	0,4999	0,8661	0,0956	1,1457	1,5331	0,0597
14	4 °C	Presença	Alta	1 Dia	0,1084	0,1114	0,1319	0,3108	0,0679	0,0440	0,6612	0,0707
15	Ambiente	Presença	Baixa	1 Dia	0,2094	0,2941	0,3173	0,8830	0,1754	0,0275	0,4564	0,1217
16	4 °C	Ausência	Alta	1 Dia	0,2097	0,1222	0,1697	0,3423	0,0714	0,0579	1,0105	0,0804

Legenda: **6-MAM:** 6-Monoacetilmorfina; **BEG:** Benzoilegonina; **COC:** Cocaína; **COD:** Codeína; **COET:** Cocaetileno; **EME:** Egonina metilester; **MOR:** Morfina; **NCOC:** Norcocaína.

No caso da NaN_3 , uma vez que esta apresentou os piores resultados cromatográficos, sendo que numa das condições o metabolito EME não está presente (Figura 16), e que houve degradação de alguns compostos ao fim dos 7 dias (Figura 17), podemos concluir que não é um bom conservante para os analitos em estudo. Deste modo, não procedemos à avaliação dos resultados do DOE para a NaN_3 no MINITAB®.

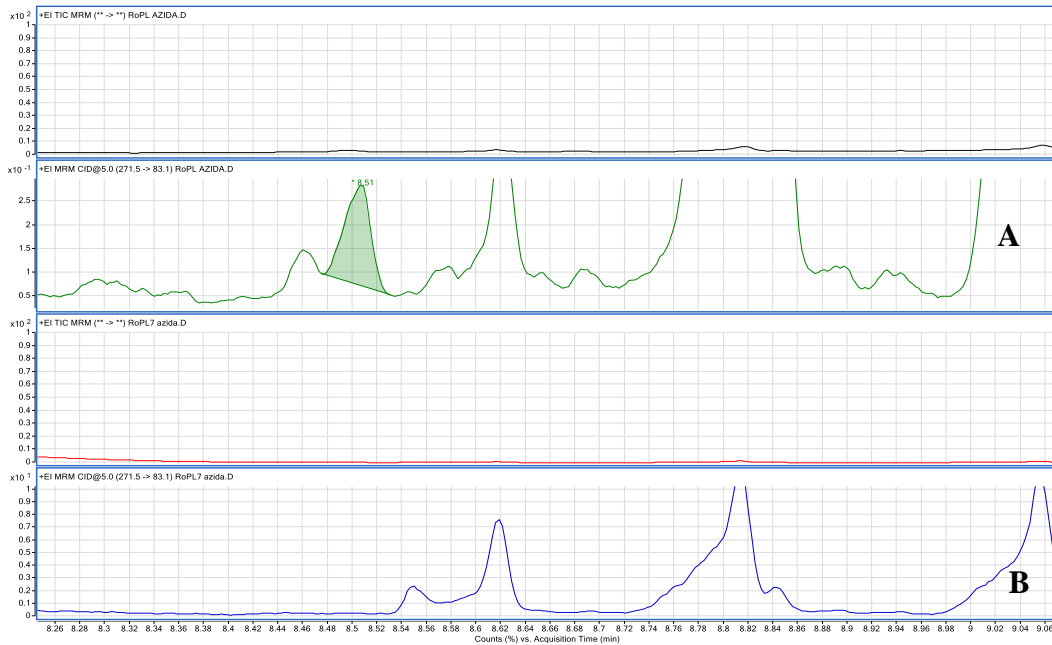
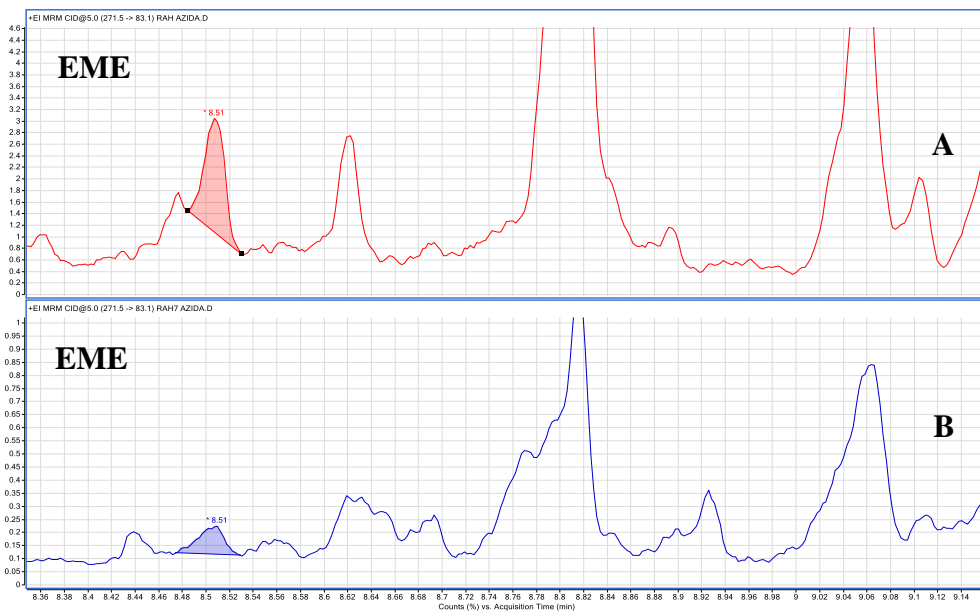


Figura 16. Cromatogramas obtidos para a EME, para a condição de temperatura ambiente, presença de luz e baixa concentração do conservante para o dia 1 (A) e para o dia 7 (B)



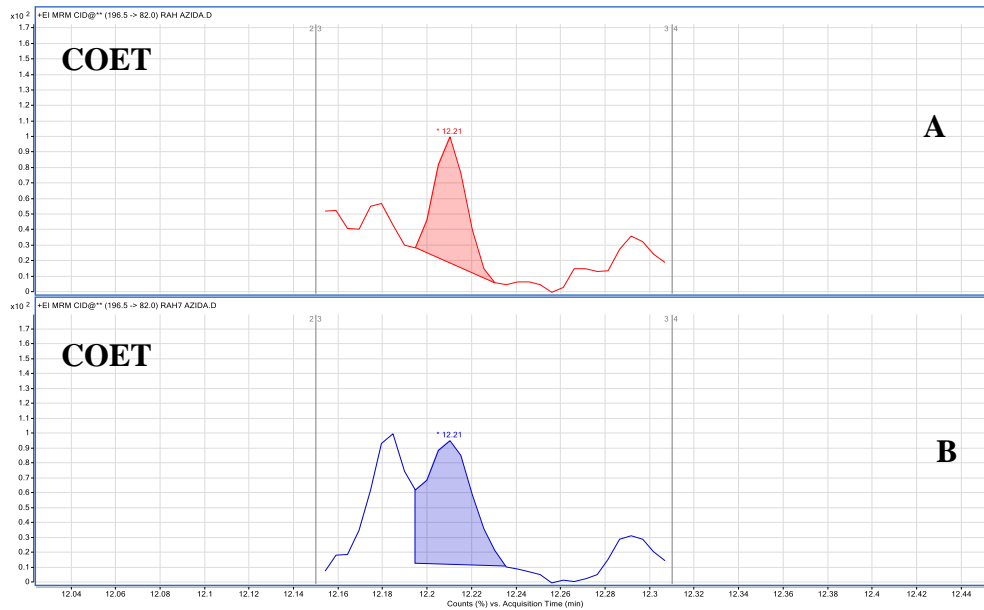


Figura 17. Cromatogramas obtidos para a EME e COET, para a condição de temperatura a 4^oC, ausência de luz e alta concentração do conservante para o dia 1 (A) e para o dia 7 (B)

2.3. Condições ótimas

De modo a determinar qual o melhor conservante, comparámos a resposta obtida para o AA e para o NaF, para todas as condições em estudo (Tabela 10).

De acordo com a Tabela 10, o NaF revelou ser o melhor conservante para os compostos analisados quando presentes em amostras de fluido oral, uma vez que para a maioria das condições e compostos, apresenta respostas mais elevadas comparativamente às do AA. Deste modo, foi este o conservante usado para testar a estabilidade da COC, dos opiáceos e dos seus metabolitos a longo prazo. No que diz respeito às condições ideais, de acordo com os gráficos de pareto e com os efeitos principais resultantes da análise do DOE neste conservante, não existem parâmetros com significância estatística. No entanto, a resposta obtida pela otimização resultou na implementação da temperatura ambiente, presença de luz e baixa concentração de NaF, sendo, portanto, estas as condições a adotar para o estudo da estabilidade a longo prazo.

Estudo da estabilidade de opiáceos e cocaína em *Dried Saliva Spots*

Tabela 10. Comparação do AA com o NaF

Condição	EME		COC		COET		BEG		NCOC		COD		MOR		6-MAM	
	AA	NaF	AA	NaF	AA	NaF	AA	NaF	AA	NaF	AA	NaF	AA	NaF	AA	NaF
RPL1	0,094	0,255	0,105	0,155	0,091	0,165	0,245	0,380	0,591	14,682	0,025	0,029	0,418	0,278	0,031	0,048
RPL7	0,085	0,106	0,103	0,135	0,090	0,200	0,240	0,346	0,567	1,681	0,025	0,036	0,411	0,182	0,031	0,044
RPH7	0,106	0,170	0,142	0,165	0,092	0,316	0,266	0,374	2,412	4,239	0,031	0,029	0,594	0,232	0,053	0,041
RAL1	0,159	0,182	0,146	0,181	0,151	0,155	0,425	0,413	2,797	5,788	0,017	0,038	0,104	0,616	0,057	0,086
RoPH7	0,094	0,076	0,133	0,126	0,085	0,213	0,255	0,570	0,427	2,244	0,030	0,069	0,502	0,814	0,043	0,060
RoAL7	0,092	0,076	0,095	0,128	0,070	0,160	0,238	0,379	1,397	2,531	0,030	0,030	0,417	0,418	0,055	0,051
RoAH7	0,094	0,125	0,093	0,158	0,063	0,204	0,203	0,383	0,775	5,284	0,030	0,025	0,507	0,353	0,042	0,040
RoAL1	0,107	0,182	0,148	0,117	0,118	0,251	0,345	0,259	1,493	3,145	0,022	0,031	0,136	0,438	0,038	0,041
RAH7	0,132	0,117	0,139	0,104	0,111	0,128	0,311	0,219	1,599	1,213	0,024	0,024	0,422	0,233	0,059	0,041
RoAH1	0,129	0,097	0,201	0,085	0,141	0,100	0,337	0,222	2,235	6,262	0,019	0,030	0,573	0,534	0,044	0,053
RoPL7	0,079	0,135	0,111	0,122	0,098	0,276	0,194	0,991	0,596	10,982	0,020	0,067	0,347	0,772	0,036	0,072
RAL7	0,091	0,110	0,115	0,149	0,080	0,158	0,191	0,318	0,580	7,189	0,028	0,031	0,512	0,355	0,052	0,045
RoPH1	0,114	0,170	0,160	0,109	0,173	0,155	0,421	0,297	0,463	7,057	0,021	0,029	0,282	0,237	0,049	0,046
RPH1	0,072	0,161	0,119	0,174	0,092	0,205	0,270	0,471	1,893	3,524	0,024	0,044	0,256	0,666	0,043	0,075
RoPL1	0,090	0,433	0,136	0,229	0,105	0,446	0,310	0,739	0,577	17,265	0,019	0,092	0,306	1,215	0,035	0,097
RAH1	0,139	0,111	0,177	0,088	0,235	0,103	0,423	0,222	0,788	7,263	0,019	0,031	0,172	0,287	0,055	0,050

Legenda: **1, 7:** Dia 1 e Dia 7; **6-MAM:** 6-Monoacetilmorfina; **A:** ausência de luz; **BEG:** Benzoilecgonina; **COC:** Cocaína; **COD:** Codeína; **COET:** Cocaetileno; **EME:** Ecgonina metilester; **H:** alta concentração; **L:** baixa concentração; **MOR:** Morfina; **NCOC:** Norcocaína; **P:** presença de luz; **R:** 4 °C; **Ro:** temperatura ambiente.

2.4. Ensaio sem conservante

De modo a estudar a estabilidade dos compostos para as mesmas condições que foram avaliadas no DOE, mas sem adição de qualquer conservante, foi realizado um ensaio no qual se aplicou nos *spots* o fluido oral fortificado com os analitos em estudo à mesma concentração, os quais foram armazenados nas condições em análise (temperatura ambiente e 4 °C, ausência e presença de luz e 1 e 7 dias). Ao fim de 1 e 7 dias, procedeu-se ao processo de extração tal como referido no tópico de preparação da amostra (1.4), e ao cálculo da resposta para cada um dos compostos a cada condição estudada (Tabela 11).

Tabela 11. Respostas obtidas para o ensaio sem conservante

Condições	Resposta								
	EME	COC	COET	BEG	NCOC	COD	MOR	6-MAM	
DIA 1	1	0,1499	0,1723	0,1395	0,4040	0,8395	0,0180	0,1756	0,0308
	2	0,1500	0,1888	0,1392	0,3080	0,9241	0,0171	0,2374	0,0359
	3	0,1254	0,1798	0,2595	0,3904	4,5708	0,0187	0,1923	0,0312
	4	0,1582	0,2172	0,2762	0,2962	4,3165	0,0194	0,3405	0,0287
DIA 7	1	0,1602	0,1584	0,1673	0,3069	1,2318	0,0221	0,2234	0,0271
	2	0,1761	0,1620	0,3905	0,3119	1,7817	0,0380	0,5227	0,0264
	3	0,1716	0,1773	0,3078	0,3150	1,3372	0,0189	0,2039	0,0249
	4	0,2049	0,1320	0,5994	0,2221	1,7851	0,0230	0,4797	0,0285

Legenda: **1:** 4 °C, presença de luz; **2:** 4 °C, ausência de luz; **3:** temperatura ambiente, presença de luz; **4:** temperatura ambiente, ausência de luz; **6-MAM:** 6-Monoacetilmorfina; **BEG:** Benzoilecgonina; **COC:** Cocaína; **COD:** Codeína; **COET:** Cocaetileno; **EME:** Ecgonina metilester; **MOR:** Morfina; **NCOC:** Norcocaína.

De modo a comparar os resultados obtidos para cada uma das condições, e tentar perceber se alguma apresenta melhores resultados comparativamente às outras, calculámos a média entre as respostas obtidas para o dia 1 e dia 7 para cada uma das condições, obtendo-se a seguinte tabela (Tabela 12).

Tabela 12. Média entre as respostas obtidas para ensaio sem conservante para o dia 1 e dia 7

Condição	Média							
	EME	COC	COET	BEG	NCOC	COD	MOR	6-MAM
1	0,1551	0,1654	0,1534	0,3554	1,0357	0,0201	0,1995	0,0289
2	0,1630	0,1754	0,2649	0,3100	1,3529	0,0276	0,3801	0,0312
3	0,1485	0,1785	0,2836	0,3527	2,9540	0,0188	0,1981	0,0281
4	0,1816	0,1746	0,4378	0,2592	3,0508	0,0212	0,4101	0,0286

Legenda: **1:** 4 °C, presença de luz; **2:** 4 °C, ausência de luz; **3:** temperatura ambiente, presença de luz; **4:** temperatura ambiente, ausência de luz; **6-MAM:** 6-Monoacetilmorfina; **BEG:** Benzoilecgonina; **COC:** Cocaína; **COD:** Codeína; **COET:** Cocaetileno; **EME:** Ecgonina metilester; **MOR:** Morfina; **NCOC:** Norcocaína.

Por análise da Tabela 12, verificámos que para a EME, COC, COD e 6-MAM não existem diferenças entre os valores médios obtidos para as diferentes condições, o que nos indica que para estes analitos a temperatura e luz não têm grande influência na sua estabilidade ao longo dos 7 dias de estudo. De forma pormenorizada e pela análise dos resultados, no caso do COET, foi verificado que a melhor condição para este analito é temperatura ambiente e ausência de luz. No entanto estas condições foram as piores para a BEG obtendo-se melhores respostas em presença de luz. Para a NCOC os melhores resultados foram obtidos à temperatura ambiente e a melhor resposta para a MOR ocorre quando o ensaio é feito na ausência de luz. Deste modo, para o ensaio sem conservante determinámos que as melhores condições são a temperatura ambiente e a ausência de luz.

Comparando as respostas obtidas para cada analito quando adicionado NaF 1% à temperatura ambiente na presença de luz (Tabela 8) e sem adição de conservante à temperatura ambiente na ausência de luz (Tabela 11), é possível observar que quando o conservante foi adicionado, as respostas foram maiores para a BEG, NCOC, COD, MOR e 6-MAM ao fim de 1 e 7 dias de armazenamento (Tabela 13). De acordo com a mesma tabela, podemos ainda verificar que para a EME e a COC, ao fim de 1 dia de armazenamento, se obtiveram melhores respostas sem conservante, mas que ao fim de 7 dias as respostas mais elevadas foram obtidas quando o conservante foi adicionado. Após 1 dia de armazenamento, a resposta do COET não é influenciada pela ausência ou presença de conservante enquanto que ao fim de 7 dias apresenta melhor resultado na ausência de conservante.

Tabela 13. Resposta dos analitos com e sem conservante após 1 e 7 dias de armazenamento nas condições ideais

	Dia	EME	COC	COET	BEG	NCOC	COD	MOR	6-MAM
Sem conservante	1	0,1582	0,2172	0,2762	0,2962	4,3165	0,0194	0,3405	0,0287
	7	0,2049	0,1320	0,5994	0,2221	1,7851	0,0230	0,4797	0,0285
Com conservante	1	0,1347	0,1218	0,2757	0,9912	10,9822	0,0668	0,7716	0,0720
	7	0,4332	0,2290	0,4459	0,7389	17,2649	0,0921	1,2147	0,0969

Legenda: **6-MAM:** 6-Monoacetilmorfina; **BEG:** Benzoilecgonina; **COC:** Cocaína; **COD:** Codeína; **COET:** Coaetilen; **EME:** Ecgonina metilester; **MOR:** Morfina; **NCOC:** Norcocaína.

2.5. Estabilidade a longo prazo

A estabilidade a longo prazo foi avaliada a fim de avaliar a estabilidade dos compostos em estudo num tempo superior a 7 dias, pelo que foi realizado um estudo ao longo de 136 dias. Para cada dia foi preparada uma mistura de fluido oral com os compostos em estudo a uma concentração de 100 ng/mL e NaF a 1%. Esta foi aplicada nos *spots* em triplicado (n=3) os quais foram deixados nas condições previamente definidas. Passados os 136 dias todos os *spots* foram sujeitos ao processo de extração, evaporação, derivatização e posterior injeção no sistema de GC-MS/MS.

Para cada *spot*, foram analisados os cromatogramas obtidos dos quais se retiraram as áreas de cada composto e dos respectivos padrões internos. Através do coeficiente entre estes valores foi calculada a resposta para cada um dos compostos. Uma vez que, para cada dia foram aplicados 3 *spots*, foi calculada a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV) que se encontra dentro dos valores aceitáveis (variabilidade até 20%), para cada dia e para cada composto. De modo a avaliar as perdas de cada analito ao longo do estudo, foi calculada em percentagem a variação em relação a uma amostra fresca (dia 1). Esta variação foi calculada com a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Média do dia } x - \text{Média do dia 1}}{\text{Média do dia 1}} * 100$$

onde x é o dia cuja variação estamos a calcular. Todos estes resultados são mostrados na tabela 14.

Tabela 14. Estudo da estabilidade a longo prazo (n=3)

Analito	Dia	Média	DP	CV (%)	Varição em relação ao dia 1 (%)	Analito presente (%)
EME	1	0,5487	0,0879	16,0		100
	3	0,4932	0,0841	17,0	-10	90
	7	0,3151	0,0134	4,0	-43	57
	14	0,0961	0,0091	10,0	-82	18
	21	0,0347	0,0080	20,0	-94	6
	28	0,0116	0,0012	11,0	-98	2
	44	0,0063	0,0007	11,0	-99	1
	112	0,0047	0,0006	12,0	-99	1
	121	0,0015	0,0001	10,0	-100	0
	136	0,0030	0,0002	8,0	-99	1
COC	1	0,3522	0,0555	16,0		100
	3	0,3603	0,0543	15,0	2	102
	7	0,2950	0,0351	12,0	-16	84
	14	0,1588	0,0325	20,0	-55	45
	21	0,1470	0,0244	17,0	-58	42
	28	0,1163	0,0134	12,0	-67	33
	44	0,0446	0,0046	10,0	-87	13
	112	0,0356	0,0017	5,0	-90	10
	121	0,0449	0,0068	15,0	-87	13
	136	0,0311	0,0043	14,0	-91	9
COET	1	0,3271	0,0533	16,0		100
	3	0,2868	0,0355	12,0	-12	88

Estudo da estabilidade de opiáceos e cocaína em *Dried Saliva Spots*

	7	0,2724	0,0416	15,0	-17	83
	14	0,1057	0,0216	20,0	-68	32
	21	0,1232	0,0221	18,0	-62	38
	28	0,1968	0,0326	17,0	-40	60
	44	0,0540	0,0096	18,0	-83	17
	112	0,0295	0,0040	14,0	-91	9
	121	0,0302	0,0057	19,0	-91	9
	136	0,0082	0,0008	10,0	-97	3
	1	1,2117	0,2296	19,0		100
	3	1,1712	0,0702	6,0	-4	96
	7	1,1243	0,1828	16,0	-8	92
	14	1,0315	0,1245	12,0	-15	85
BEG	21	1,1902	0,1798	15,0	-2	98
	28	1,2563	0,2034	16,0	3	103
	44	0,9815	0,0340	3,0	-19	81
	112	0,9955	0,0719	7,0	-18	82
	121	1,0039	0,0546	5,0	-17	83
	136	1,0520	0,1455	14,0	-14	86
	1	0,1236	0,0183	15,0		100
	3	0,1040	0,0188	18,0	-16	84
	7	0,1040	0,0129	12,0	-16	84
	14	0,0774	0,0144	19,0	-37	63
NCOG	21	0,0621	0,0105	17,0	-50	50
	28	0,0525	0,0042	8,0	-58	42
	44	0,0316	0,0028	9,0	-74	26
	112	0,0139	0,0022	16,0	-89	11
	121	0,0194	0,0030	15,0	-84	16
	136	0,0065	0,0005	8,0	-95	5
	1	0,0385	0,0061	16,0		100
	3	0,0100	0,0013	13,0	-74	26
	7	0,0137	0,0015	11,0	-64	36
	14	0,0118	0,0016	14,0	-69	31
COD	21	0,0043	0,0006	13,0	-89	11
	28	0,0176	0,0011	6,0	-54	46
	44	0,0129	0,0016	12,0	-66	34
	112	0,0108	0,0002	2,0	-72	28
	121	0,0097	0,0004	4,0	-75	25
	136	0,0084	0,0013	15,0	-78	22
	1	0,8677	0,1060	12,0		100
MOR	3	0,8045	0,0996	12,0	-7	93
	7	0,7638	0,0923	12,0	-12	88

	14	0,7135	0,0241	3,0	-18	82
	21	0,5825	0,0473	8,0	-33	67
	28	0,4795	0,0354	7,0	-45	55
	44	0,3870	0,0440	11,0	-55	45
	112	0,2107	0,0320	15,0	-76	24
	121	0,2745	0,0246	9,0	-68	32
	136	0,3051	0,0520	17,0	-65	35
6-MAM	1	0,0365	0,0029	8,0		100
	3	0,0318	0,0055	17,0	-13	87
	7	0,0304	0,0051	17,0	-17	83
	14	0,0210	0,0021	10,0	-42	58
	21	0,0177	0,0034	20,0	-52	48
	28	0,0119	0,0019	16,0	-67	33
	44	0,0080	0,0005	7,0	-78	22
	112	0,0036	0,0001	3,0	-90	10
	121	0,0045	0,0007	16,0	-88	12
	136	0,0044	0,0007	16,0	-88	12

Legenda: **6-MAM:** 6-Monoacetilmorfina; **BEG:** Benzoilecgonina; **COC:** Cocaína; **COD:** Codeína; **COET:** Cocaetileno; **CV:** Coeficiente de Variação; **DP:** Desvio Padrão; **EME:** Egonina metilester; **MOR:** Morfina; **NCOC:** Norcocaína.

Na tabela 14, é ainda possível verificar a quantidade (em percentagem) que estava presente nos extratos a cada dia do estudo para cada um dos analitos. Esta percentagem foi determinada de modo a avaliar a estabilidade a longo prazo e calculada com base nas variações verificadas, admitindo que no dia 1 o seu valor era de 100% para todos os analitos. A partir destes valores foram obtidos os gráficos 49-56, nos quais se pode ver a percentagem presente de cada analito em função do tempo.

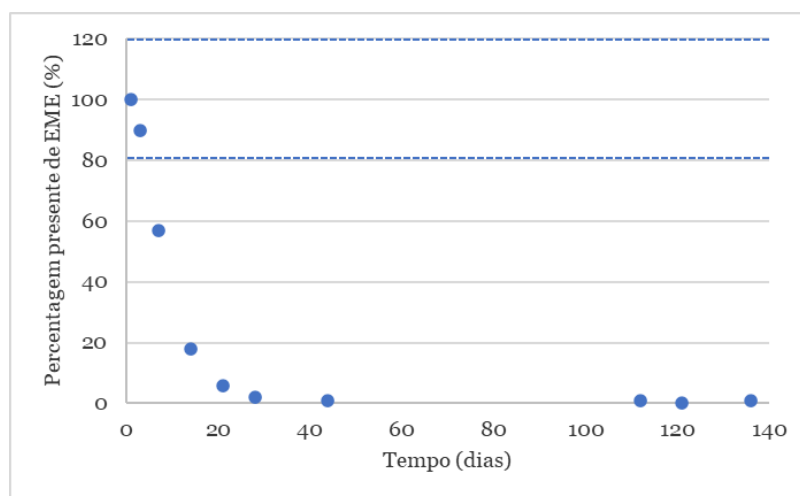


Gráfico 49. Estabilidade a longo prazo da EME

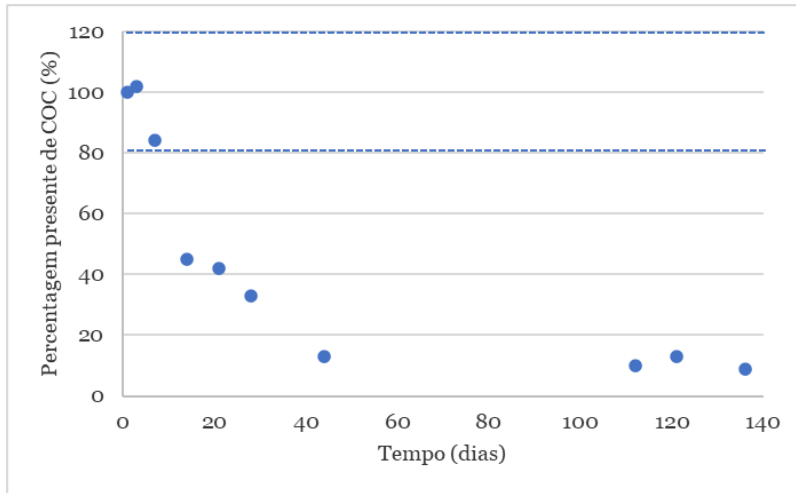


Gráfico 50. Estabilidade a longo prazo da COC

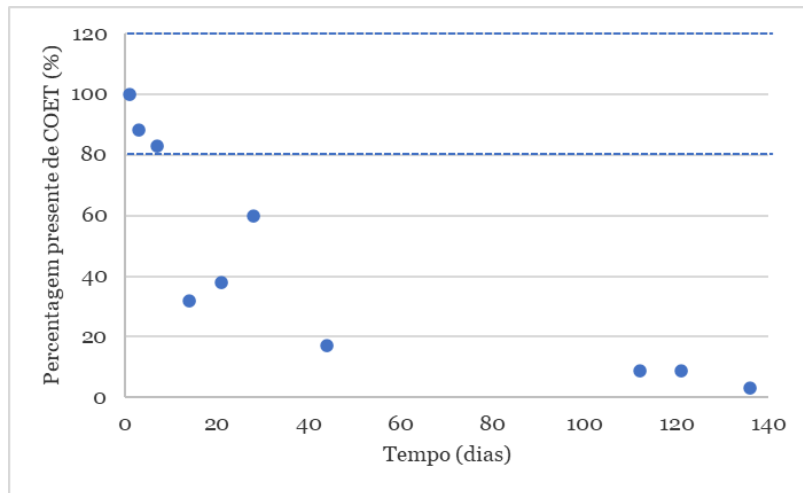


Gráfico 51. Estabilidade a longo prazo do COET

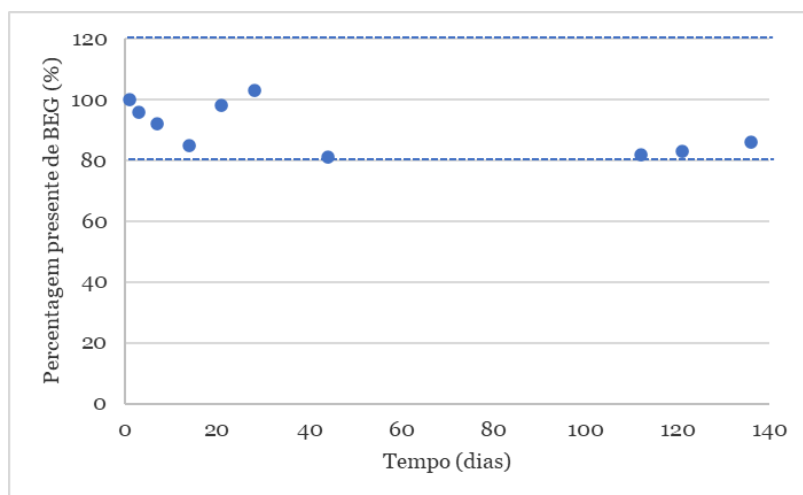


Gráfico 52. Estabilidade a longo prazo da BEG

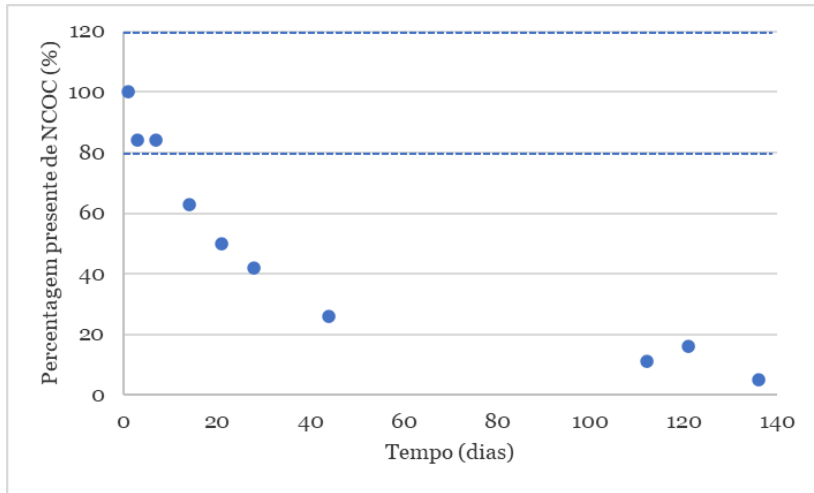


Gráfico 53. Estabilidade a longo prazo da NCOC

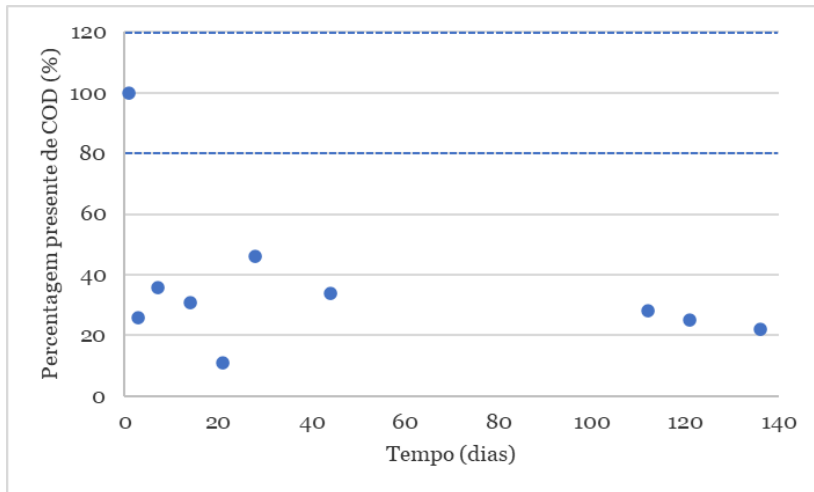


Gráfico 54. Estabilidade a longo prazo da COD

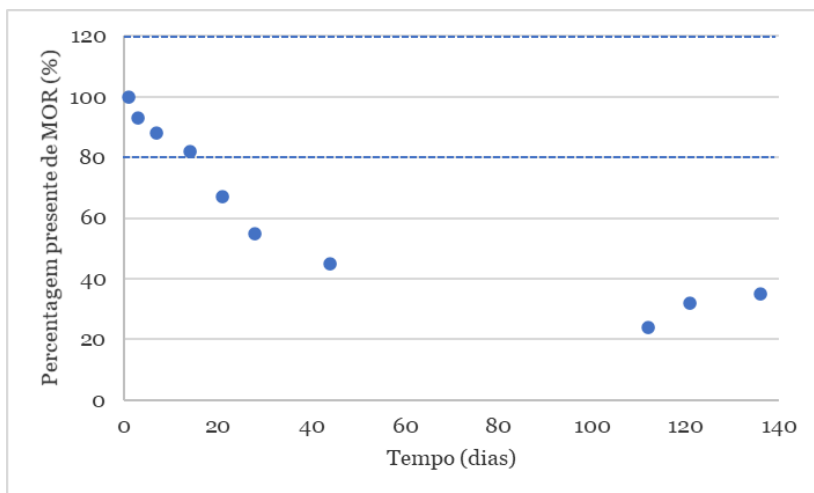


Gráfico 55. Estabilidade a longo prazo da MOR

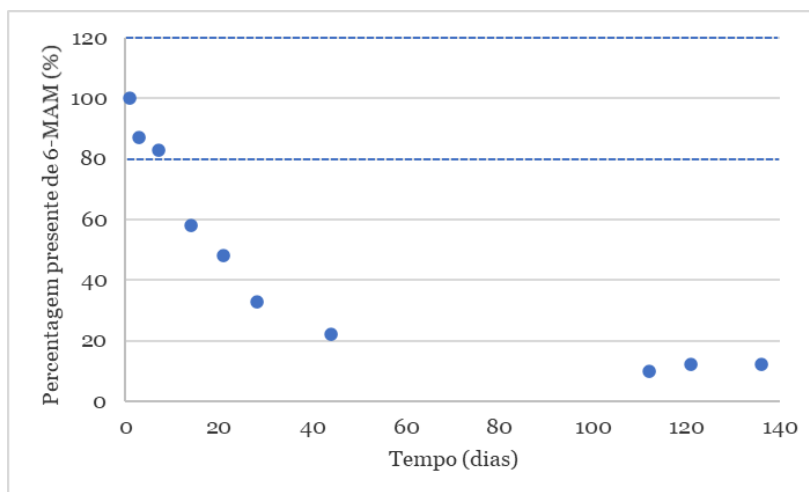


Gráfico 56. Estabilidade a longo prazo da 6-MAM

De modo a afirmar que um composto é estável, a percentagem de perda deste composto em relação a uma amostra fresca (dia 1), deve estar compreendida no intervalo de $\pm 20\%$ e, conseqüentemente, a percentagem do composto presente deve ser $100 \pm 20\%$.

Assim, analisando os gráficos anteriores podemos concluir qual a estabilidade de cada um dos analitos nas condições do estudo (temperatura ambiente, presença de luz e adição de 1% de NaF). Para a EME a estabilidade foi de 3 dias, a COC, o COET e a NCOC permaneceram estáveis por 7 dias e a BEG demonstrou ser estável ao longo de todo o estudo (136 dias). Apesar de apenas a BEG ter uma estabilidade superior a 1 semana, este método pode ser muito útil, uma vez que mesmo que a COC e os seus outros metabolitos desaparecem dos *spots*, a BEG permanece por pelo menos 136 dias, o que permite detetar o consumo de COC pois este metabolito apenas pode ser encontrado no fluido oral após consumo. No que diz respeito aos opiáceos, a COD foi o composto que apresentou menor estabilidade, apenas de 1 dia, seguida da 6-MAM que se manteve estável por 7 dias e da MOR cuja estabilidade foi de 14 dias.

Embora o presente trabalho seja o primeiro a determinar a estabilidade destes compostos em DSS, a estabilidade da COC, opiáceos e dos seus metabolitos em fluido oral, foi já previamente estudada sob diferentes condições de armazenamento usando diferentes dispositivos de colheita, conservantes e/ou estabilizantes e temperaturas [108, 135, 139, 142, 169–172].

Ventura et al. [108], avaliaram a estabilidade a curto e longo prazo de opiáceos e COC em fluido oral sob diferentes condições de armazenamento, com e sem adição de uma mistura de tampão citrato (pH 4) e NaN_3 (0,1%). A estabilidade a curto prazo foi avaliada a 25 e 37 °C por 7 dias e a estabilidade a longo prazo foi avaliada por 2 meses a 4 e -20 °C. Para o

ensaio sem tampão, os autores determinaram que a BEG, a COD e a MOR são estáveis por 7 dias a 25 e 37 °C e por pelo menos 2 meses a 4 e -20 °C. Contudo, a COC e a 6-MAM apresentam estabilidade de menos de 3 dias a 37 °C, menos de 7 dias a 25 °C e 2 meses a -20 °C. Em relação ao ensaio a 4 °C, a estabilidade foi de 1 mês para 6-MAM e menos de 1 semana para a COC. A adição do tampão ao fluido oral aumentou a estabilidade da COC e da 6-MAM, impedindo a sua degradação durante pelo menos 7 dias quando conservadas a 25 e 37 °C e até 2 meses quando armazenadas a 4 e -20 °C [108]. À exceção da COD, os resultados são concordantes com os obtidos na presente dissertação, demonstrando que a adição de um conservante previne a degradação de alguns compostos aumentando consequentemente a sua estabilidade.

Langel et al. [169], avaliaram a estabilidade de várias drogas de abuso incluindo COC, MOR e COD em amostras de fluido oral após 0, 14 e 28 dias de armazenamento a -18 °C, com recurso a diferentes dispositivos de recolha que contêm tampões (Quantisal™, Statsure Saliva Sampler™, Cozart®, Intercept®, Oracol, Varian Oratube™ e Salivette®), concluindo que o que apresentou maior estabilidade foi o Cozart®. Este estudo demonstrou que aquando do uso do dispositivo de colheita Quantisal™ a COC, COD e MOR não atingem a estabilidade de 28 dias. Quando a colheita é efetuada com o Intercept® a COC degrada-se em menos de 14 dias enquanto que nos restantes dispositivos de recolha, embora com algumas diferenças, os analitos permanecem estáveis durante os 28 dias do estudo [169]. Comparando este estudo com o da presente dissertação, é possível verificar que os autores obtiveram melhores resultados, sendo que esta diferença se pode dever à temperatura de armazenamento das amostras e aos tampões presentes nos dispositivos de recolha.

Alguns anos mais tarde, a mesma autora avaliou a estabilidade de 50 drogas de abuso após colheita de fluido oral com o dispositivo de recolha StatSure Saliva Sampler™, e armazenamento a -18 °C durante 378 dias, concluindo que mesmo depois de mais de um ano de armazenamento, todos os analitos estavam presentes em pelo menos 60% da concentração inicial [142].

Lund et al.[170], avaliaram a estabilidade de diferentes drogas de abuso em fluido oral em dois dispositivos de recolha (Intercept® e StatSure Saliva Sampler™). Com o dispositivo Intercept® avaliaram a estabilidade da 6-MAM, COD e MOR, enquanto que com o StatSure Saliva Sampler™ avaliaram a 6-MAM, BEG, COC, COD e MOR. A estabilidade a curto prazo foi testada após uma semana a 4 °C e à temperatura ambiente e a estabilidade a longo prazo foi avaliada após armazenamento a -20 °C por 3 e 11 meses [170].

Para o primeiro dispositivo de recolha, os autores concluíram que à exceção da 6-MAM os restantes compostos permaneceram estáveis durante o estudo a curto prazo, o que está de acordo com a presente dissertação no que diz respeito à MOR, mas ao contrário da mesma em relação à 6-MAM e à COD. Para além disto, verificaram que existiu um aumento na concentração de MOR quando armazenada à temperatura ambiente, que pode ser explicado pela degradação da 6-MAM e da COD. Em relação à estabilidade a longo prazo, a concentração de MOR aumenta ao longo do tempo pelos mesmos motivos anteriormente referidos e a 6-MAM diminui para cerca de 30% da concentração inicial após 11 meses de armazenamento. No estudo da estabilidade com o StatSure Saliva Sampler™, para ambas as condições de armazenamento de 1 semana, a concentração de MOR aumenta enquanto que as concentrações de COD e 6-MAM diminuem, mas embora se verifique uma diminuição na concentração de 6-MAM, a sua estabilidade é maior neste dispositivo. Os autores verificaram ainda que a concentração de COC diminui ao longo da primeira semana, sendo esta diminuição mais acentuada à temperatura ambiente, e que contrariamente, a concentração de BEG aumenta durante o mesmo período de tempo, provavelmente devido à degradação da COC. No que diz respeito à estabilidade a longo prazo, à exceção da 6-MAM e da COC, os autores concluíram que os restantes analitos são estáveis por pelo menos 11 meses a -20 °C [170].

Cohier et al. [171], estudaram a estabilidade de opiáceos, COC e dos seus metabolitos em amostras de fluido oral recolhidas com dois coletores (Quantisal® e Certus®) que contêm tampões conservantes e armazenadas sob diferentes temperaturas (4 °C, -20 °C e temperatura ambiente) durante 14 dias. Os autores consideraram estáveis os compostos cuja concentração passados 7 e 14 dias se encontra entre 90 a 110% da concentração inicial. Deste modo, a -20 °C, os resultados obtidos para a estabilidade foram de menos de 7 dias para a COD e 7 dias para a EME no Quantisal®, 14 dias para a BEG no Certus® e 14 dias para COC, MOR e 6-MAM em ambos os coletores. No que diz respeito ao ensaio a 4 °C, à exceção da COD, os compostos permaneceram estáveis por 14 dias em ambos os dispositivos de colheita, o que permitiu aos autores concluir que esta é a melhor temperatura para armazenamento até 14 dias e posterior deteção destas drogas de abuso em fluido oral. Por último, à temperatura ambiente a COC e a COD apresentaram estabilidade inferior a 7 dias e a 6-MAM estabilidade de 7 dias no Quantisal®, a MOR é estável por 7 dias no Quantisal® e 14 dias no Certus® e a EME e a BEG permanecem estáveis 7 dias em ambos os coletores [171]. Os resultados obtidos para os opiáceos estão em concordância com os obtidos no presente trabalho com a adição de NaF contudo, para a COC e para a BEG foi conseguida maior estabilidade.

Valen et al. [135], quantificaram 21 drogas em fluido oral entre as quais COC, COD, MOR e 6-MAM, e avaliaram a sua estabilidade durante 30 dias a -20, 4 e 18 °C, após colheita com os kits Intercept® e Quantisal®. Todos os analitos de interesse permaneceram estáveis após 30 dias de armazenamento a -20 °C para ambos os kits. A 4 °C, os opiáceos foram estáveis durante os 30 dias do estudo para os dois kits, enquanto que a COC apresentou estabilidade de 30 dias para o Quantisal® e 7 dias para o Intercept®. Em relação ao estudo da estabilidade à temperatura ambiente, os resultados obtidos para o Intercept® foram de 1, 7 e 30 dias para a 6-MAM, MOR e COD, respetivamente, e menos de 1 dia para a COC. Com o Quantisal® os autores obtiveram estabilidade de 30 dias para a 6-MAM e COD, 7 dias para a MOR e 1 dia para COC. Analisando todos os resultados, os autores deste estudo concluíram que a maioria das drogas são mais estáveis no Quantisal® [135]. Comparando os resultados obtidos à temperatura ambiente para o Quantisal® com os da presente dissertação, é possível verificar que o tampão presente neste dispositivo de colheita aumenta a estabilidade da COD e da 6-MAM, mas que para a COC e MOR a estabilidade é superior com o NaF.

Fabresse et al. [139], desenvolveram um método para a deteção de 10 drogas ilícitas em fluido oral colhido com o kit FLOQSwabs™, que contrariamente aos dispositivos de recolha anteriormente referidos, não contém qualquer tampão. A estabilidade dos compostos foi avaliada ao longo de 7 dias de armazenamento a 4 °C. A MOR e a COC foram estáveis por 3 dias e a BEG por 7 dias, enquanto que a COD e a 6-MAM se degradaram antes de atingir os 3 dias, demonstrando ser os compostos mais instáveis [139]. Analisando estes resultados é possível concluir que a estabilidade dos compostos, à exceção da COD, é mais elevada quando o fluido oral é armazenado sob a forma de DSS à temperatura ambiente e com adição de NaF, do que quando é colhido e armazenado no kit FLOQSwabs™ a 4 °C.

Marchei et al. [172], investigaram a estabilidade de drogas de abuso comuns e dos seus principais metabolitos em amostras de fluido oral, com e sem a presença de um tampão estabilizante alternativo (*M3 Reagent Buffer*®), por 1 ano de armazenamento a 3 temperaturas diferentes (temperatura ambiente, -20 e 4 °C). Com adição do tampão M3, os autores concluíram que todos os compostos permaneceram estáveis durante 1 ano a -20 °C. A 6-MAM foi estável no fluido oral sem tampão a -20 °C por 30 dias, a 4 °C por 14 dias, degradando-se em menos de 1 dia à temperatura ambiente, já com o tampão M3, a 6-MAM não sofreu degradação até aos 90 dias a 4 °C e foi estável por 7 dias à temperatura ambiente. A MOR apresenta estabilidade de 1 dia à temperatura ambiente, 14 dias a 4 °C e 30 dias quando armazenada a -20 °C sem adição de tampão e nas amostras com tampão a estabilidade da MOR aumenta para 14 e 90 dias à temperatura ambiente e a 4 °C, respetivamente. A COD é estável no fluido oral sem tampão por 30 dias à temperatura ambiente, 180 dias a 4 °C e 1 ano a -20 °C, enquanto que no ensaio com tampão a

estabilidade da COD foi de 1 ano para todas as temperaturas. A concentração de COC no fluido oral sem tampão diminui cerca de 26% após o primeiro dia à temperatura ambiente e começa a degradar-se após 7 dias a 4 °C e 90 dias a -20 °C. A estabilidade da BEG à temperatura ambiente, tal como verificado para a COC, é inferior a 1 dia. Quando armazenada a 4 °C a BEG permanece estável durante 14 dias e a -20 °C durante 1 ano. Tanto a COC como a BEG foram estáveis por 1 ano a todas as temperaturas quando adicionado tampão M3 às amostras de fluido oral [172]. Comparando a estabilidade à temperatura ambiente conseguida com o tampão M3, com a estabilidade alcançada com o NaF no presente estudo, para a MOR e a 6-MAM os resultados foram iguais (14 e 7 dias), contudo, para a COD, BEG e COC foram obtidos melhores resultados com o tampão.

3. Conclusões e considerações finais

Este estudo permitiu estabelecer quais as melhores condições para maximizar a estabilidade da EME, COC, COET, BEG, NCOC, COD, MOR e 6-MAM em amostras de fluido oral, avaliando a utilização dos DSS como dispositivos de recolha, armazenamento e tratamento das amostras e usando como técnica de análise a GC-MS/MS. Os fatores suscetíveis de influenciar a estabilidade dos compostos foram otimizados para diferentes conservantes, recorrendo ao DOE, de modo a maximizar as respostas obtidas. Este revelou ser uma ferramenta útil no processo de otimização das condições de armazenamento, permitindo diminuir o número de experiências a realizar.

Assim, através da análise dos resultados obtidos no DOE foi possível concluir que, dos conservantes em estudo, o NaF a 1% é o que apresenta maior estabilidade dos analitos em amostras de fluido oral armazenadas sob a forma de spots e que as melhores condições de armazenamento são a temperatura ambiente e a presença de luz.

Para além disto, através da comparação dos resultados obtidos com o NaF, com os do estudo sem conservante, foi possível verificar a importância da adição de um conservante uma vez que este aumenta as respostas dos analitos e por consequência a sua estabilidade após 7 dias de armazenamento.

Por último, os analitos demonstraram ser estáveis à temperatura ambiente e na presença de luz durante 7 dias, com exceção da EME, BEG, COD e MOR cuja estabilidade foi de 3, 136, 1 e 14 dias, respetivamente.

É importante salientar que este é o primeiro estudo que permite a deteção e quantificação destas drogas de abuso em amostras de fluido oral com recurso à técnica de DSS e avaliação da sua estabilidade.

Referências

1. Ferreira PEM, Martini RK (2001) Cocaine: myths, history and abuse. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 23:96–99 . doi: <https://doi.org/10.1590/S1516-44462001000200008>
2. Goldstein RA, DesLauriers C, Burda A, Johnson-Arbor K (2009) Cocaine: history, social implications, and toxicity: a review. *Seminars in Diagnostic Pathology* 26:10–17 . doi: [10.1053/j.semdp.2008.12.001](https://doi.org/10.1053/j.semdp.2008.12.001)
3. Kim ST, Park T (2019) Acute and chronic effects of cocaine on cardiovascular health. *International Journal of Molecular Sciences* 20:584 . doi: [10.3390/ijms20030584](https://doi.org/10.3390/ijms20030584)
4. Cornish JW, O'Brien CP (1996) Crack cocaine abuse: an epidemic with many public health consequences. *Annual Review of Public Health* 17:259–273 . doi: [10.1146/annurev.pu.17.050196.001355](https://doi.org/10.1146/annurev.pu.17.050196.001355)
5. Andrews P (1997) Cocaethylene toxicity. *Journal of Addictive Diseases* 16:75–84 . doi: [10.1300/J069v16n03_08](https://doi.org/10.1300/J069v16n03_08)
6. White SM, Lambe CJT (2003) The pathophysiology of cocaine abuse. *Journal of Clinical Forensic Medicine* 10:27–39 . doi: [10.1016/S1353-1131\(03\)00003-8](https://doi.org/10.1016/S1353-1131(03)00003-8)
7. Reid MJ, Langford KH, Grung M, Gjerde H, Amundsen EJ, Morland J, Thomas K V. (2012) Estimation of cocaine consumption in the community: a critical comparison of the results from three complimentary techniques. *BMJ Open* 2:e001637 . doi: [10.1136/bmjopen-2012-001637](https://doi.org/10.1136/bmjopen-2012-001637)
8. Ruiz MJ, Paolieri D, Colzato LS, Bajo MT (2015) Chronic and recreational use of cocaine is associated with a vulnerability to semantic interference. *Psychopharmacology* 232:1717–1726 . doi: [10.1007/s00213-014-3806-9](https://doi.org/10.1007/s00213-014-3806-9)
9. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) (2019) *European Drug Report 2019: Trends and Developments*. Publications Office of the European Union, Luxembourg
10. Dinis-Oliveira RJ (2015) Metabolomics of cocaine: implications in toxicity. *Toxicology Mechanisms and Methods* 25:494–500 . doi: [10.3109/15376516.2015.1072612](https://doi.org/10.3109/15376516.2015.1072612)
11. Casale JF, Klein RF (1993) Illicit production of cocaine. *Forensic Science Review* 5:95–107
12. Karila L, Zarmadini R, Petit A, Lafaye G, Lowenstein W, Reynaud M (2014) Addiction à la cocaïne: données actuelles pour le clinicien. *Presse Medicale* 43:9–17 . doi: [10.1016/j.lpm.2013.01.069](https://doi.org/10.1016/j.lpm.2013.01.069)
13. Afonso L, Mohammad T, Thatai D (2007) Crack whips the heart: a review of the cardiovascular toxicity of cocaine. *The American Journal of Cardiology* 100:1040–1043 . doi: [10.1016/j.amjcard.2007.04.049](https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2007.04.049)

14. Cunha-Oliveira T, Rego AC, Carvalho F, Oliveira CR (2013) Medical Toxicology of Drugs of Abuse. In: Principles of Addiction, 1st ed. Academic Press, pp 166–167
15. Zimmerman JL (2012) Cocaine Intoxication. *Critical Care Clinics* 28:517–526 . doi: 10.1016/j.ccc.2012.07.003
16. Cone EJ (1995) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cocaine. *Journal of Analytical Toxicology* 19:459–478 . doi: 10.1093/jat/19.6.459
17. Coe MA, Jufer Phipps RA, Cone EJ, Walsh SL (2018) Bioavailability and pharmacokinetics of oral cocaine in humans. *Journal of Analytical Toxicology* 42:285–292 . doi: 10.1093/jat/bky007
18. Barroso M, Gallardo E, Queiroz JA (2009) Bioanalytical methods for the determination of cocaine and metabolites in human biological samples. *Bioanalysis* 1:977–1000 . doi: 10.4155/bio.09.72
19. Gerace E, Petrarulo M, Bison F, Salomone A, Vincenti M (2014) Toxicological findings in a fatal multidrug intoxication involving mephedrone. *Forensic Science International* 243:68–73 . doi: 10.1016/j.forsciint.2014.04.038
20. Carvalho VM, Fukushima AR, Fontes LR, Fuzinato D V., Florio JC, Chasin AAM (2013) Cocaine postmortem distribution in three brain structures: A comparison with whole blood and vitreous humour. *Journal of Forensic and Legal Medicine* 20:143–145 . doi: 10.1016/j.jflm.2012.06.006
21. Vitcheva V (2012) Cocaine toxicity and hepatic oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry* 19:5677–5682 . doi: 10.2174/092986712803988929
22. Pomara C, Cassano T, D’Errico S, Bello S, Romano AD, Riezzo I, Serviddio G (2012) Data available on the extent of cocaine use and dependence: biochemistry, pharmacologic effects and global burden of disease of cocaine abusers. *Current Medicinal Chemistry* 19:5647–5657 . doi: 10.2174/092986712803988811
23. Ambach L, Stove C (2019) Determination of cocaine and metabolites in dried blood spots by LC-MS/MS. *Methods in Molecular Biology* 1872:261–272 . doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8823-5_23
24. de Lima Feltraco Lizot L, da Silva ACC, Bastiani MF, Hahn RZ, Bulcão R, Perassolo MS, Antunes MV, Linden R (2019) Simultaneous determination of cocaine, ecgonine methyl ester, benzoylecgonine, cocaethylene and norcocaine in dried blood spots by ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Forensic Science International* 298:408–416 . doi: 10.1016/j.forsciint.2019.03.026
25. Gambier N, Warling J, Van Elsue N, Yegles M (2019) AEME production in cocaine positive hair after thermal hair treatment. *Forensic Science International* 302:109894 . doi: 10.1016/j.forsciint.2019.109894
26. Cone EJ, Tsadik A, Oyler J, Darwin WD (1998) Cocaine metabolism and urinary

- excretion after different routes of administration. *Therapeutic Drug Monitoring* 20:556–560 . doi: 10.1097/00007691-199810000-00019
27. Jatlow P (1988) Cocaine: analysis, pharmacokinetics, and metabolic disposition. *Yale Journal of Biology and Medicine* 61:105–113
 28. Misra AL, Patel MN, Alluri VR, Mulé SJ, Nayak PK (1976) Disposition and metabolism of [3H] cocaine in acutely and chronically treated dogs. *Xenobiotica* 6:537–552 . doi: 10.3109/00498257609151666
 29. National Centre for Biotechnology Information (NCBI) PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Accessed 2 Jun 2020
 30. Langman LJ, Bjergum MW, Williamson CL, Crow FW (2009) Sensitive method for detection of cocaine and associated analytes by liquid chromatography – tandem mass spectrometry in urine. *Journal of Analytical Toxicology* 33:447–455 . doi: 10.1093/jat/33.8.447
 31. DrugBank database DrugBank. <https://www.drugbank.ca/>. Accessed 8 Oct 2020
 32. Cognard E, Bouchonnet S, Staub C (2006) Validation of a gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry for simultaneous analyse of cocaine and its metabolites in saliva. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41:925–934 . doi: 10.1016/j.jpba.2006.01.041
 33. Zheng X, Shang L, Zhan C-G, Zheng F (2019) In vivo characterization of toxicity of norcoethylen and norcocaine identified as the most toxic cocaine metabolites in male mice. *Drug and Alcohol Dependence* 204:107462 . doi: 10.1016/j.drugalcdep.2019.04.033
 34. Vongpatanasin W, Mansour Y, Chavoshan B, Arbique D, Victor RG (1999) Cocaine stimulates the human cardiovascular system via a central mechanism of action. *Circulation* 100:497–502 . doi: 10.1161/01.CIR.100.5.497
 35. Howell LL, Carroll FI, Votaw JR, Goodman MM, Kimmel HL (2007) Effects of combined dopamine and serotonin transporter inhibitors on cocaine self-administration in rhesus monkeys. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 320:757–765 . doi: 10.1124/jpet.106.108324
 36. Bachi K, Mani V, Jeyachandran D, Fayad ZA, Goldstein RZ, Alia-Klein N (2017) Vascular disease in cocaine addiction. *Atherosclerosis* 262:154–162 . doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.03.019
 37. Schwartz BG, Rezkalla S, Kloner RA (2010) Cardiovascular effects of cocaine. *Circulation* 122:2558–2569 . doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.940569
 38. Havakuk O, Rezkalla SH, Kloner RA (2017) The cardiovascular effects of cocaine. *Journal of the American College of Cardiology* 70:101–113 . doi: 10.1016/j.jacc.2017.05.014

39. Radunski UK, Fuger U, Reimer J, Lund G, Adam G, Blankenberg S, Muellerleile K (2013) Increased extracellular volume in asymptomatic cocaine abusers detected by cardiovascular magnetic resonance imaging. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance* 15:E101 . doi: 10.1186/1532-429x-15-s1-e101
40. Ren H, Du C, Yuan Z, Park K, Volkow ND, Pan Y (2012) Cocaine-induced cortical microischemia in the rodent brain: clinical implications. *Molecular Psychiatry* 17:1017–1025 . doi: 10.1038/mp.2011.160
41. Verdejo-Garcia A, Bechara A, C. Recknor E, Perez-Garcia M (2006) Executive dysfunction in substance dependent individuals during drug use and abstinence: An examination of the behavioral, cognitive and emotional correlates of addiction. *Journal of the International Neuropsychological Society* 12:405–415 . doi: 10.1017/S1355617706060486
42. Vonmoos M, Hulka LM, Preller KH, Jenni D, Baumgartner MR, Stohler R, Bolla KI, Quednow BB (2013) Cognitive dysfunctions in recreational and dependent cocaine users: role of attention-deficit hyperactivity disorder, craving and early age at onset. *British Journal of Psychiatry* 203:35–43 . doi: 10.1192/bjp.bp.112.118091
43. Hulka LM, Eisenegger C, Preller KH, Vonmoos M, Jenni D, Bendrick K, Baumgartner MR, Seifritz E, Quednow BB (2014) Altered social and non-social decision-making in recreational and dependent cocaine users. *Psychological Medicine* 44:1015–1028 . doi: 10.1017/S0033291713001839
44. Hulka LM, Preller KH, Vonmoos M, Broicher SD, Quednow BB (2013) Cocaine users manifest impaired prosodic and cross-modal emotion processing. *Frontiers in Psychiatry* 4:98 . doi: 10.3389/fpsy.2013.00098
45. Swift RM, Lewis DC (2009) Farmacologia da dependência e abuso de drogas. In: *Princípios de Farmacologia*, 2nd ed. pp 262–268
46. Duarte DF (2005) Opium and opioids: a brief history. *Revista Brasileira de Anestesiologia* 55:135–146 . doi: 10.1590/s0034-70942005000100015
47. Martínez MA, Ballesteros S (2019) Opium poisoning in modern times. An overview. *Forensic Science International* 302:109848 . doi: 10.1016/j.forsciint.2019.06.006
48. International Drug Policy Consortium (IDPC) Global Drug Control System. <https://idpc.net/pt/incidencia-politica-internacional/sistema-global-de-controle-de-drogas>. Accessed 18 Mar 2020
49. United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC) (2013) *The International Drug Control Conventions*. United Nations publication, Vienna
50. Heiskanen T, Langel K, Gunnar T, Lillsunde P, Kalso EA (2015) Opioid concentrations in oral fluid and plasma in cancer patients with pain. *Journal of Pain and Symptom Management* 50:524–532 . doi: 10.1016/j.jpainsymman.2014.09.004

51. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (2011) Scientific opinion on the risks for public health related to the presence of opium alkaloids in poppy seeds. *EFSA Journal* 9:1–150 . doi: 10.2903/j.efsa.2011.2405
52. Dasgupta A (2019) Analytical true positive: poppy seed products and opiate analysis. In: *Critical Issues in Alcohol and Drugs of Abuse Testing*, 2nd ed. Academic Press, pp 449–462
53. Liu C, Hua Z, Bai Y (2016) Classification of opium by UPLC-Q-TOF analysis of principal and minor alkaloids. *Journal of Forensic Sciences* 61:1615–1621 . doi: 10.1111/1556-4029.13190
54. Concheiro M, Newmeyer MN, da Costa JL, Flegel R, Gorelick DA, Huestis MA (2015) Morphine and codeine in oral fluid after controlled poppy seed administration. *Drug Testing and Analysis* 7:586–591 . doi: 10.1002/dta.1742
55. Sporer KA (1999) Acute heroin overdose. *Annals of Internal Medicine* 130:584–590 . doi: 10.7326/0003-4819-130-7-199904060-00019
56. Prata M, Ribeiro A, Figueirinha D, Rosado T, Oppolzer D, Restolho J, Araújo ARTS, Costa S, Barroso M, Gallardo E (2019) Determination of opiates in whole blood using microextraction by packed sorbent and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1602:1–10 . doi: 10.1016/j.chroma.2019.05.021
57. Teklezgi BG, Pamreddy A, Baijnath S, Gopal ND, Naicker T, Kruger HG, Govender T (2017) Post heroin dose tissue distribution of 6-monoacetylmorphine (6-MAM) with MALDI imaging. *Journal of Molecular Histology* 48:285–292 . doi: 10.1007/s10735-017-9726-3
58. Boerner U, Abbott S, Roe RL (1975) The metabolism of morphine and heroin in man. *Drug Metabolism Reviews* 4:39–73 . doi: 10.3109/03602537508993748
59. Rook EJ, Huitema ADR, van den Brink W, van Ree JM, Beijnen JH (2006) Pharmacokinetics and pharmacokinetic variability of heroin and its metabolites: review of the literature. *Current Clinical Pharmacology* 1:109–118 . doi: 10.2174/157488406775268219
60. Perekopskiy D, Kiyatkin EA (2019) 6-Monoacetylmorphine (6-MAM), not morphine, is responsible for the rapid neural effects induced by intravenous heroin. *ACS Chemical Neuroscience* 10:3409–3414 . doi: 10.1021/acscemneuro.9b00305
61. Sverrisdóttir E, Lund TM, Olesen AE, Drewes AM, Christrup LL, Kreilgaard M (2015) A review of morphine and morphine-6-glucuronide's pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships in experimental and clinical pain. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 74:45–62 . doi: 10.1016/j.ejps.2015.03.020
62. Pacifici GM (2016) Metabolism and pharmacokinetics of morphine in neonates: A

- review. *Clinics* 71:474–480 . doi: 10.6061/clinics/2016(08)11
63. Hull JH, Findlay JWA, Rogers JF, Welch RM, Butz RF, Bustrack JA (1982) An evaluation of the effects of smoking on codeine pharmacokinetics and bioavailability in normal human volunteers. *Drug Intelligence and Clinical Pharmacy* 16:849–854 . doi: 10.1177/106002808201601107
64. Tobias JD, Green TP, Coté CJ (2016) Codeine: time to say no. *Pediatrics* 138:e20162396 . doi: 10.1542/peds.2016-2396
65. Crews KR, Gaedigk A, Dunnenberger HM, Leeder JS, Klein TE, Caudle KE, Haidar CE, Shen DD, Callaghan JT, Sadhasivam S, Prows CA, Kharasch ED, Skaar TC (2014) Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for cytochrome P450 2D6 genotype and codeine therapy: 2014 Update. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 95:376–382 . doi: 10.1038/clpt.2013.254
66. Rook EJ, Huitema ADR, Van Den Brink W, Van Ree JM, Beijnen JH (2006) Population pharmacokinetics of heroin and its major metabolites. *Clinical Pharmacokinetics* 45:401–417 . doi: 10.2165/00003088-200645040-00005
67. Maas A, Madea B, Hess C (2018) Confirmation of recent heroin abuse: Accepting the challenge. *Drug Testing and Analysis* 10:54–71 . doi: 10.1002/dta.2244
68. Bogen IL, Boix F, Nerem E, Mørland J, Andersen JM (2014) A monoclonal antibody specific for 6-monoacetylmorphine reduces acute heroin effects in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 349:568–576 . doi: 10.1124/jpet.113.212035
69. INFARMED (2009) Folheto Informativo - Morfina. http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=16071&tipo_documento=rcm. Accessed 15 Jun 2020
70. Patrick GL (2013) The opioid analgesics. In: *An Introduction to Medicinal Chemistry*, 5th ed. Oxford University Press, pp 632–638
71. Caspi O, Naami R, Halfin E, Aronson D (2019) Adverse dose-dependent effects of morphine therapy in acute heart failure. *International Journal of Cardiology* 293:131–136 . doi: 10.1016/j.ijcard.2019.06.015
72. Bhandari M, Bhandari A, Bhandari A (2011) Recent updates on codeine. *Pharmaceutical Methods* 2:3–8 . doi: 10.4103/2229-4708.81082
73. Cooper JR, Bloom FE, Roth RH (2003) *The biochemical basis of neuropharmacology*, 8th ed. Oxford University Press
74. Kim J, Ji D, Kang S, Park M, Yang W, Kim E, Choi H, Lee S (2014) Simultaneous determination of 18 abused opioids and metabolites in human hair using LC-MS/MS and illegal opioids abuse proven by hair analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 89:99–105 . doi: 10.1016/j.jpba.2013.10.041

75. Kristensen K, Christensen CB, Christrup LL (1995) The mu₁, mu₂, delta, kappa opioid receptor binding profiles of methadone stereoisomers and morphine. *Life Sciences* 56:45–50 . doi: 10.1016/0024-3205(94)00937-6
76. Naser P V., Kuner R (2018) Peripheral Kappa Opioid Receptor Signaling Takes on a Central Role. *Neuron* 99:1102–1104 . doi: 10.1016/j.neuron.2018.09.006
77. Stein C (2016) Opioid Receptors. *Annual Review of Medicine* 67:433–451 . doi: 10.1146/annurev-med-062613-093100
78. Trescot AM, Datta S, Lee M, Hansen H (2008) Opioid pharmacology. *Pain Physician* 11:133–153
79. Levran O, Peles E, Randesi M, da Rosa JC, Ott J, Rotrosen J, Adelson M, Kreek MJ (2016) Glutamatergic and GABAergic susceptibility loci for heroin and cocaine addiction in subjects of African and European ancestry. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 64:118–123 . doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.08.003
80. Langlois LD, Nugent FS (2017) Opiates and plasticity in the ventral tegmental area. *ACS Chemical Neuroscience* 8:1830–1838 . doi: 10.1021/acchemneuro.7b00281
81. Chau DL, Walker V, Pai L, Cho LM (2008) Opiates and elderly: use and side effects. *Clinical Interventions in Aging* 3:273–278 . doi: 10.2147/cia.s1847
82. Mirin SM, Meyer RE, Mcnamee HB (1976) Psychopathology and mood during heroin use: acute vs chronic effects. *Archives of General Psychiatry* 33:1503–1508 . doi: 10.1001/archpsyc.1976.01770120107011
83. Duberstein JL, Kaufman DM (1971) A clinical study of an epidemic of heroin intoxication and heroin-induced pulmonary edema. *The American Journal of Medicine* 51:704–714 . doi: 10.1016/0002-9343(71)90298-1
84. Benyamin R, Trescot AM, Datta S, Buenaventura R, Adlaka R, Sehgal N, Glaser SE, Vallejo R (2008) Opioid complications and side effects. *Pain Physician* 11:105–120 . doi: 10.1007/978-3-540-35423-9_14
85. Demaret I, Lemaître A, Anseau M (2013) Heroin. *Revue Medicale de Liège* 68:293
86. Schlatter J, Sitbon N, Saulnier JL (2001) Médicaments et abus toxicomaniaques. *Presse Medicale* 30:282–287
87. Thajam D, Atkinson DE, Sibley CP, Lavender T (2010) Is neonatal abstinence syndrome related to the amount of opiate used? *Journal of Obstetric, Gynecologic and Neonatal Nursing* 39:503–509 . doi: 10.1111/j.1552-6909.2010.01174.x
88. Tobin H, Klimas J, Barry T, Egan M, Bury G (2018) Opiate use disorders and overdose: Medical students' experiences, satisfaction with learning, and attitudes toward community naloxone provision. *Addictive Behaviors* 86:61–65 . doi: 10.1016/j.addbeh.2017.11.028

89. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2015) Preventing fatal overdoses: a systematic review of the effectiveness of take-home naloxone. Publications Office of the European Union, Luxembourg
90. Harrison TK, Kornfeld H, Aggarwal AK, Lembke A (2018) Perioperative considerations for the patient with opioid use disorder on buprenorphine, methadone, or naltrexone maintenance therapy. *Anesthesiology Clinics* 36:345–359 . doi: 10.1016/j.anclin.2018.04.002
91. Baltieri DA, Strain EC, Dias JC, Scivoletto S, Malbergier A, Nicastrì S, Jerônimo C, De Andrade AG (2004) Brazilian guideline for the treatment of patients with opioids dependence syndrome. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 26:259–268 . doi: 10.1590/s1516-44462004000400011
92. Milone MC (2012) Laboratory Testing for Prescription Opioids. *Journal of Medical Toxicology* 8:408–416 . doi: 10.1007/s13181-012-0274-7
93. Schwartz RH (1988) Urine testing in the detection of drugs of abuse. *Archives of Internal Medicine* 148:2407–2412 . doi: 10.1001/archinte.1988.00380110059012
94. Moeller MR, Steinmeyer S, Kraemer T (1998) Determination of drugs of abuse in blood. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications* 713:91–109 . doi: 10.1016/S0378-4347(97)00573-2
95. Mali N, Karpe M, Kadam V (2011) A review on biological matrices and analytical methods used for determination of drug of abuse. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 1:58–65
96. Rosado T, Barroso M, Vieira DN, Gallardo E (2019) Determination of selected opiates in hair samples using microextraction by packed sorbent: A new approach for sample clean-up. *Journal of Analytical Toxicology* 43:465–476 . doi: 10.1093/jat/bkz029
97. Cone EJ, Hillsgrove M, Darwin WD (1994) Simultaneous measurement of cocaine, cocaethylene, their metabolites, and “crack” pyrolysis products by gas chromatography-mass spectrometry. *Clinical Chemistry* 40:1299–1305 . doi: 10.1093/clinchem/40.7.1299
98. Mortier KA, Maudens KE, Lambert WE, Clauwaert KM, Van Bocxlaer JF, Deforce DL, Van Peteghem CH, De Leenheer AP (2002) Simultaneous, quantitative determination of opiates, amphetamines, cocaine and benzoylecgonine in oral fluid by liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 779:321–330 . doi: 10.1016/S1570-0232(02)00400-2
99. Quintela O, Cruz A, Concheiro M, de Castro A, López-Rivadulla M (2005) Metodología LC–MS. Aspectos generales de la técnica y sus aplicaciones en el campo de la toxicología. *Revista de Toxicología* 22:7–14
100. Gallardo E, Barroso M, Queiroz JA (2009) Current technologies and considerations

- for drug bioanalysis in oral fluid. *Bioanalysis* 1:637–667 . doi: 10.4155/bio.09.23
101. da Fonseca BM, Moreno IED, Magalhães AR, Barroso M, Queiroz JA, Ravara S, Calheiros J, Gallardo E (2012) Determination of biomarkers of tobacco smoke exposure in oral fluid using solid-phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 889–890:116–122 . doi: 10.1016/j.jchromb.2012.02.006
 102. Rosado T, Gonçalves A, Margalho C, Barroso M, Gallardo E (2017) Rapid analysis of cocaine and metabolites in urine using microextraction in packed sorbent and GC/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 409:2051–2063 . doi: 10.1007/s00216-016-0152-2
 103. Elmongy H, Abdel-Rehim M (2016) Saliva as an alternative specimen to plasma for drug bioanalysis. A review. *Trends in Analytical Chemistry* 83:70–79 . doi: 10.1016/j.trac.2016.07.010
 104. Crouch DJ, Day J, Baudys J, Fatah AA (2004) Evaluation of saliva/oral fluid as an alternate drug testing specimen. <https://www.ncjrs.gov/pdffiles1/nij/grants/203569.pdf>. Accessed 10 Sep 2020
 105. Desrosiers NA, Huestis MA (2019) Oral fluid drug testing: analytical approaches, issues and interpretation of results. *Journal of Analytical Toxicology* 43:415–443 . doi: 10.1093/jat/bkz048
 106. Gröschl M (2017) Saliva: a reliable sample matrix in bioanalytics. *Bioanalysis* 9:655–668 . doi: 10.4155/bio-2017-0010
 107. Dams R, Choo RE, Lambert WE, Jones H, Huestis MA (2007) Oral fluid as an alternative matrix to monitor opiate and cocaine use in substance-abuse treatment patients. *Drug and Alcohol Dependence* 87:258–267 . doi: 10.1016/j.drugalcdep.2006.08.020
 108. Ventura M, Pichini S, Ventura R, Zuccaro P, Pacifici R, De La Torre R (2007) Stability studies of principal illicit drugs in oral fluid: preparation of reference materials for external quality assessment schemes. *Therapeutic Drug Monitoring* 29:662–665 . doi: 10.1097/FTD.obo13e318156e892
 109. Fisher DS, Partridge SJ, Handley SA, Flanagan RJ (2013) Stability of some atypical antipsychotics in human plasma, haemolysed whole blood, oral fluid, human serum and calf serum. *Forensic Science International* 229:151–156 . doi: 10.1016/j.forsciint.2013.03.021
 110. Stoykova S, Atanasov V, Pantcheva I (2015) Determination of some biochemical parameters in oral fluid and evaluation of their stability under different storage conditions. *Toxicologie Analytique et Clinique* 27:195–202 . doi: 10.1016/j.toxac.2015.03.111

111. Rubio NC, Bermejo-Barrera P, Bermejo AM, Moreda-Piñeiro A (2019) Development of a reliable method for assessing coca alkaloids in oral fluid by HPLC–MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology* 43:196–202 . doi: 10.1093/jat/bky076
112. Fiorentin TR, D'Avila FB, Comiran E, Zamboni A, Scherer JN, Pechansky F, Borges PEM, Fröhlich PE, Limberger RP (2017) Simultaneous determination of cocaine/crack and its metabolites in oral fluid, urine and plasma by liquid chromatography-mass spectrometry and its application in drug users. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 86:60–66 . doi: 10.1016/j.vascn.2017.04.003
113. Di Rago M, Chu M, Rodda LN, Jenkins E, Kotsos A, Gerostamoulos D (2016) Ultra-rapid targeted analysis of 40 drugs of abuse in oral fluid by LC-MS/MS using carbon-13 isotopes of methamphetamine and MDMA to reduce detector saturation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408:3737–3749 . doi: 10.1007/s00216-016-9458-3
114. Montesano C, Simeoni MC, Curini R, Sergi M, Lo Sterzo C, Compagnone D (2015) Determination of illicit drugs and metabolites in oral fluid by microextraction on packed sorbent coupled with LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407:3647–3658 . doi: 10.1007/s00216-015-8583-8
115. Wang IT, Feng YT, Chen CY (2010) Determination of 17 illicit drugs in oral fluid using isotope dilution ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry with three atmospheric pressure ionizations. *Journal of Chromatography B* 878:3095–3105 . doi: 10.1016/j.jchromb.2010.09.014
116. Concheiro M, Gray TR, Shakleya DM, Huestis MA (2010) High-throughput simultaneous analysis of buprenorphine, methadone, cocaine, opiates, nicotine, and metabolites in oral fluid by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398:915–924 . doi: 10.1007/s00216-010-3903-5
117. Pujadas M, Pichini S, Civit E, Santamariña E, Perez K, de la Torre R (2007) A simple and reliable procedure for the determination of psychoactive drugs in oral fluid by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 44:594–601 . doi: 10.1016/j.jpba.2007.02.022
118. Wylie FM, Torrance H, Anderson RA, Oliver JS (2005) Drugs in oral fluid: Part I. Validation of an analytical procedure for licit and illicit drugs in oral fluid. *Forensic Science International* 150:191–198 . doi: 10.1016/j.forsciint.2005.02.024
119. Reisinger AJ, Miller AC, Shaw LA, Champion JL, Neiswonger MA (2019) Oral cavity fluid as an investigative approach for qualitative and quantitative evaluations of drugs in postmortem subjects. *Journal of Analytical Toxicology* 43:444–451 . doi:

- 10.1093/jat/bkz032
120. Grabenauer M, Moore KN, Bynum ND, White RM, Mitchell JM, Hayes ED, Flegel R (2018) Development of a quantitative LC–MS-MS assay for codeine, morphine, 6-acetylmorphine, hydrocodone, hydromorphone, oxycodone and oxymorphone in neat oral fluid. *Journal of Analytical Toxicology* 42:392–399 . doi: 10.1093/jat/bky021
 121. Shaparin N, Mehta N, Kunkel F, Stripp R, Borg D, Kolb E (2017) A novel chronic opioid monitoring tool to assess prescription drug steady state levels in oral fluid. *Pain medicine* 18:2162–2169 . doi: 10.1093/pm/pnw335
 122. Tuyay J, Coulter C, Rodrigues W, Moore C (2012) Disposition of opioids in oral fluid: Importance of chromatography and mass spectral transitions in LC-MS/MS. *Drug Testing and Analysis* 4:395–401 . doi: 10.1002/dta.1324
 123. Zheng Y, Sparve E, Bergström M (2018) A simple validated multi-analyte method for detecting drugs in oral fluid by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). *Drug Testing and Analysis* 10:1001–1008 . doi: 10.1002/dta.2325
 124. Fritch D, Blum K, Nonnemacher S, Haggerty BJ, Sullivan MP, Cone EJ (2009) Identification and quantitation of amphetamines, cocaine, opiates, and phencyclidine in oral fluid by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology* 33:569–577 . doi: 10.1093/jat/33.9.569
 125. Kala S V., Harris SE, Freijo TD, Gerlich S (2008) Validation of analysis of amphetamines, opiates, phencyclidine, cocaine, and benzoylecgonine in oral fluids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology* 32:605–611 . doi: 10.1093/jat/32.8.605
 126. Gunnar T, Ariniemi K, Lillsunde P (2005) Validated toxicological determination of 30 drugs of abuse as optimized derivatives in oral fluid by long column fast gas chromatography/electron impact mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 40:739–753 . doi: 10.1002/jms.846
 127. Badawi N, Simonsen KW, Steentoft A, Bernhoft IM, Linnet K (2009) Simultaneous screening and quantification of 29 drugs of abuse in oral fluid by solid-phase extraction and ultraperformance LC-MS/MS. *Clinical Chemistry* 55:2004–2018 . doi: 10.1373/clinchem.2008.122341
 128. Concheiro M, De Castro A, Quintela Ó, Cruz A, López-Rivadulla M (2008) Determination of illicit and medicinal drugs and their metabolites in oral fluid and preserved oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391:2329–2338 . doi: 10.1007/s00216-008-2135-4

129. Wood M, Laloup M, Ramirez Fernandez MDM, Jenkins KM, Young MS, Ramaekers JG, De Boeck G, Samyn N (2005) Quantitative analysis of multiple illicit drugs in preserved oral fluid by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Science International* 150:227–238 . doi: 10.1016/j.forsciint.2004.11.027
130. Øiestad EL, Johansen U, Christophersen AS (2007) Drug screening of preserved oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry* 53:300–309 . doi: 10.1373/clinchem.2006.074237
131. Zancanaro I, Limberger RP, Bohel PO, dos Santos MK, De Boni RB, Pechansky F, Caldas ED (2012) Prescription and illicit psychoactive drugs in oral fluid-LC-MS/MS method development and analysis of samples from Brazilian drivers. *Forensic Science International* 223:208–216 . doi: 10.1016/j.forsciint.2012.08.048
132. Ares AM, Fernández P, Regenjo M, Fernández AM, Carro AM, Lorenzo RA (2017) A fast bioanalytical method based on microextraction by packed sorbent and UPLC–MS/MS for determining new psychoactive substances in oral fluid. *Talanta* 174:454–461 . doi: 10.1016/j.talanta.2017.06.022
133. Liu H-C, Lee H-T, Hsu Y-C, Huang M-H, Liu RH, Chen T-J, Lin D-L (2015) Direct injection LC–MS-MS analysis of opiates, methamphetamine, buprenorphine, methadone and their metabolites in oral fluid from substitution therapy patients. *Journal of Analytical Toxicology* 39:472–480 . doi: 10.1093/jat/bkv041
134. Malaca S, Busardò FP, Gottardi M, Pichini S, Marchei E (2019) Dilute and shoot ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS) analysis of psychoactive drugs in oral fluid. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 170:63–67 . doi: 10.1016/j.jpba.2019.02.039
135. Valen A, Leere ÅM, Strand DH, Skari R, Berg T (2017) Determination of 21 drugs in oral fluid using fully automated supported liquid extraction and UHPLC-MS/MS. *Drug Testing and Analysis* 9:808–823 . doi: 10.1002/dta.2045
136. Ellefsen KN, Concheiro M, Pirard S, Gorelick DA, Huestis MA (2016) Oral fluid cocaine and benzoylecgonine concentrations following controlled intravenous cocaine administration. *Forensic Science International* 260:95–101 . doi: 10.1016/j.forsciint.2016.01.013
137. Truver MT, Swortwood MJ (2018) Quantitative analysis of novel synthetic opioids, morphine and buprenorphine in oral fluid by LC–MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology* 42:554–561 . doi: 10.1093/jat/bky053
138. Cámpora P, Bermejo AM, Tabernero MJ, Fernández P (2006) Use of gas chromatography/mass spectrometry with positive chemical ionization for the

- determination of opiates in human oral fluid. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20:1288–1292 . doi: 10.1002/rcm.2449
139. Fabresse N, Aouad H, Knapp A, Mayer C, Etting I, Larabi IA, Alvarez J (2019) Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous detection of 10 illicit drugs in oral fluid collected with FLOQSwabs™ and application to real samples. *Drug Testing and Analysis* 11:824–832 . doi: 10.1002/dta.2563
 140. Tang MHY, Ching CK, Poon S, Chan SSS, Ng WY, Lam M, Wong CK, Pao R, Lau A, Mak TWL (2018) Evaluation of three rapid oral fluid test devices on the screening of multiple drugs of abuse including ketamine. *Forensic Science International* 286:113–120 . doi: 10.1016/j.forsciint.2018.03.004
 141. Strano-Rossi S, Anzillotti L, Castrignanò E, Felli M, Serpelloni G, Mollica R, Chiarotti M (2011) UHPLC-ESI-MS/MS method for direct analysis of drugs of abuse in oral fluid for DUID assessment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 401:609–624 . doi: 10.1007/s00216-011-5108-y
 142. Langel K, Gunnar T, Ariniemi K, Rajamäki O, Lillsunde P (2011) A validated method for the detection and quantitation of 50 drugs of abuse and medicinal drugs in oral fluid by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 879:859–870 . doi: 10.1016/j.jchromb.2011.02.027
 143. Abu-Rabie P, Spooner N (2011) Dried matrix spot direct analysis: evaluating the robustness of a direct elution technique for use in quantitative bioanalysis. *Bioanalysis* 3:2769–81 . doi: 10.4155/bio.11.270
 144. Jacques ALB, Santos MK dos, Limberger RP (2019) Development and validation of a method using dried oral fluid spot to determine drugs of abuse. *Journal of Forensic Sciences* 64:1906–1912 . doi: 10.1111/1556-4029.14112
 145. Lofgren SM, Morrissey AB, Chevallier CC, Malabeja AI, Edmonds S, Amos B, Sifuna DJ, Von Seidlein L, Schimana W, Stevens WS, Bartlett JA, Crump JA (2009) Evaluation of a dried blood spot HIV-1 RNA program for early infant diagnosis and viral load monitoring at rural and remote healthcare facilities. *AIDS* 23:2459–2466 . doi: 10.1097/QAD.obo13e328331f702
 146. Manicke NE, Abu-Rabie P, Spooner N, Ouyang Z, Cooks RG (2011) Quantitative analysis of therapeutic drugs in dried blood spot samples by paper spray mass spectrometry: An avenue to therapeutic drug monitoring. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 22:1501–1507 . doi: 10.1007/s13361-011-0177-x
 147. Soares S, Castro T, Rosado T, Fernández N, Barroso M, Gallardo E (2018) New analytical approach to determine organophosphorus insecticides in blood by dried matrix spots sampling and GC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*

- 410:7955–7964 . doi: 10.1007/s00216-018-1417-8
148. Jain R, Quraishi R, Ambekar A, Verma A, Gupta P (2017) Dried urine spots for detection of benzodiazepines. *Indian Journal of Pharmacology* 49:465–469 . doi: 10.4103/ijp.IJP_578_16
149. Michely JA, Meyer MR, Maurer HH (2017) Dried urine spots - A novel sampling technique for comprehensive LC-MSn drug screening. *Analytica Chimica Acta* 982:112–121 . doi: 10.1016/j.aca.2017.05.033
150. Jain R, Quraishi R, Verma A, Ambekar A (2019) Development and clinical evaluation of a dried urine spot method for detection of morphine among opioid users. *Indian Journal of Pharmacology* 51:40–44 . doi: 10.4103/ijp.IJP_305_18
151. Kostić N, Dotsikas Y, Jović N, Stevanović G, Malenović A, Medenica M (2015) Quantitation of pregabalin in dried blood spots and dried plasma spots by validated LC-MS/MS methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 109:79–84 . doi: 10.1016/j.jpba.2015.02.023
152. He J, Li A, Han H, Su S, Zhang P, Zhang E (2020) Direct analysis bromine and iodine of dried serum spots by laser ablation-Inductively coupled plasma mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 34:e8591 . doi: 10.1002/rcm.8591
153. Osteresch B, Viegas S, Cramer B, Humpf HU (2017) Multi-mycotoxin analysis using dried blood spots and dried serum spots. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 409:3369–3382 . doi: 10.1007/s00216-017-0279-9
154. Chantada-Vázquez MP, Moreda-Piñeiro J, Cantarero-Roldán A, Bermejo-Barrera P, Moreda-Piñeiro A (2018) Development of dried serum spot sampling techniques for the assessment of trace elements in serum samples by LA-ICP-MS. *Talanta* 186:169–175 . doi: 10.1016/j.talanta.2018.04.049
155. Zheng N, Zeng J, Ji QC, Angeles A, Aubry AF, Basdeo S, Buzescu A, Landry IS, Jariwala N, Turley W, Burrell R, Arnold ME (2016) Bioanalysis of dried saliva spot (DSS) samples using detergent-assisted sample extraction with UHPLC-MS/MS detection. *Analytica Chimica Acta* 934:170–179 . doi: 10.1016/j.aca.2016.05.057
156. Abdel-Rehim A, Abdel-Rehim M (2014) Dried saliva spot as a sampling technique for saliva samples. *Biomedical Chromatography* 28:875–877 . doi: 10.1002/bmc.3193
157. Numako M, Takayama T, Noge I, Kitagawa Y, Todoroki K, Mizuno H, Min JZ, Toyo’Oka T (2016) Dried saliva spot (DSS) as a convenient and reliable sampling for bioanalysis: an application for the diagnosis of diabetes mellitus. *Analytical Chemistry* 88:635–639 . doi: 10.1021/acs.analchem.5b04059
158. Neto OV, Raymundo S, Franzoi MA, do Carmo Artmann A, Tegner M, Müller VV, Hahn RZ, Alves GV, Schwartzmann G, Linden R, Antunes MV (2018) DPD functional

- tests in plasma, fresh saliva and dried saliva samples as predictors of 5-fluorouracil exposure and occurrence of drug-related severe toxicity. *Clinical Biochemistry* 56:18–25 . doi: 10.1016/j.clinbiochem.2018.04.001
159. Carvalho J, Rosado T, Barroso M, Gallardo E (2019) Determination of antiepileptic drugs using dried saliva spots. *Journal of Analytical Toxicology* 43:61–71 . doi: 10.1093/jat/bky064
160. Ribeiro A, Prata M, Vaz C, Rosado T, Restolho J, Barroso M, Araújo ARTS, Gallardo E (2019) Determination of methadone and EDDP in oral fluid using the dried saliva spots sampling approach and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 411:2177–2187 . doi: 10.1007/s00216-019-01654-z
161. Caramelo D, Rosado T, Oliveira V, Rodilla JM, Rocha PMM, Barroso M, Gallardo E (2019) Determination of antipsychotic drugs in oral fluid using dried saliva spots by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 411:6141–6153 . doi: 10.1007/s00216-019-02005-8
162. Schmidt V (1986) Ivar Christian Bang (1869-1918), founder of modern clinical microchemistry. *Clinical Chemistry* 32:213–215 . doi: 10.1093/clinchem/32.1.213
163. Fischer S, Obrist R, Ehlert U (2019) How and when to use dried blood spots in psychoneuroendocrinological research. *Psychoneuroendocrinology* 108:190–196 . doi: 10.1016/j.psyneuen.2019.06.011
164. Guthrie R, Susi A (1963) A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 32:338–343
165. Costa S, Barroso M, Castañera A, Dias M (2010) Design of experiments, a powerful tool for method development in forensic toxicology: application to the optimization of urinary morphine 3-glucuronide acid hydrolysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396:2533–2542 . doi: 10.1007/s00216-009-3447-8
166. Miller JN, Miller JC (2005) *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 5th ed. Pearson Education
167. Fernández N, Cabanillas LM, Rosado T, Barroso M, Gallardo E, Quiroga PN Dried saliva spots: development and validation of a new method for the quantification of drugs of abuse in oral fluid by GC-MS. XIV TIAFT Latin-American Regional Meeting I International meeting on NPS & Drug design, Buenos Aires 2018
168. Figueirinha DC (2014) Detecção de opiáceos em sangue post-mortem por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica usando microextração em seringa empacotada. Universidade da Beira Interior, Covilhã
169. Langel K, Engblom C, Pehrsson A, Gunnar T, Ariniemi K, Lillsunde P (2008) Drug testing in oral fluid - evaluation of sample collection devices. *Journal of Analytical*

- Toxicology 32:393–401 . doi: 10.1093/jat/32.6.393
170. Lund HME, Øiestad EL, Gjerde H, Christophersen AS (2011) Drugs of abuse in oral fluid collected by two different sample kits - Stability testing and validation using ultra performance tandem mass spectrometry analysis. *Journal of Chromatography B* 879:3367–3377 . doi: 10.1016/j.jchromb.2011.09.002
 171. Cohier C, Mégarbane B, Roussel O (2017) Illicit drugs in oral fluid: Evaluation of two collection devices. *Journal of Analytical Toxicology* 41:71–76 . doi: 10.1093/jat/bkw100
 172. Marchei E, Malaca S, Graziano S, Gottardi M, Pichini S, Busardò FP (2020) Stability and degradation pathways of different psychoactive drugs in neat and in buffered oral fluid. *Journal of Analytical Toxicology* 44:570–579 . doi: 10.1093/JAT/BKZ114