



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências

# Determinação de novas drogas de abuso com recurso à microextracção em seringa empacotada

Ivo Emanuel Dias Moreno

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

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Doutora Maria Eugenia Gallardo Alba  
Co-orientador: Doutor Mário Jorge Dinis Barroso  
Co-orientador: Mestre Maria Suzel Costa de Sousa e Escada

Covilhã, Junho de 2011



# Agradecimentos

A realização desta tese teve o envolvimento de várias partes.

Quero agradecer em primeiro lugar aos meus orientadores pelo apoio e orientação que me proporcionaram, Professora Doutora Eugénia Gallardo pelo encorajamento, ajuda para ultrapassar todas as dificuldades e pela amizade, Doutor Mário Barroso, que apesar da distância foi incansável e esteve sempre presente e à Mestre Suzel Costa por todos os conselhos para o bom desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço também à Rita e à Virgínia pelo tempo dispendido para me ajudarem na execução do trabalho.

Aos meus pais, irmão e família pela compreensão, ajuda e pelo apoio paciente através desta jornada.

Aos meus colegas que acompanharam este meu percurso académico, o meu muito obrigado pela companhia feita e pelos bons momentos de disposição.

Por último, mas de certa forma mais importante, quero agradecer especialmente à Beatriz por todo o apoio e ajuda que me deu, pela paciência que teve comigo em várias ocasiões, por todos os momentos em que esteve comigo, por vezes até altas horas da madrugada, por insistir sempre comigo no melhoramento de meu trabalho, por tudo.



# Resumo

As piperazinas são consideradas um novo grupo de drogas de abuso sintéticas que surgiram no mercado ilícito a partir da segunda metade dos anos 90. Os seus efeitos psicoactivos, como por exemplo estados de euforia, são comparáveis aos obtidos por consumo de anfetaminas e *ecstasy*, sendo por isso consideradas uma alternativa legal, barata e segura.

Deste modo torna-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos rápidos e sensíveis para a quantificação e determinação destas drogas em amostras biológicas.

O objectivo deste trabalho foi o desenvolvimento e validação de um método analítico usando microextracção em seringa empacotada (MEPS) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de fotodiodos (UPLC-DAD), para a determinação e quantificação de quatro derivados das piperazinas em amostras de urina. As piperazinas estudadas foram a 1-benzilpiperazina (BZP), 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina (TFMPP), 1-(3-clorofenil)piperazina (mCPP) e 1-(4-metoxifenil)piperazina (MeOPP), usando como padrão interno a 1-(2-clorofenil)piperazina (oCPP). É a primeira vez que este tipo de compostos é determinado em amostras de urina com recurso à MEPS.

O método foi totalmente otimizado usando o planeamento factorial, uma poderosa ferramenta estatística que permite avaliar de forma multivariada os diversos factores intervenientes no processo de extracção. As condições finais optimizadas foram: diluição da amostra (1:2), número de aspirações pelo dispositivo (8), activação do mecanismo de troca iónica (1% ácido acético), a quantidade de metanol no solvente de lavagem (10%) e a eluição dos analitos (5% de amoníaco em metanol).

O procedimento foi linear para o intervalo de concentrações de 0.1 (limite inferior de quantificação - LLOQ) até 5 µg/mL, com coeficientes de determinação ( $R^2$ ) superiores a 0.99 para todos os analitos. Os limites de detecção foram de 0.1 µg/mL para a BZP e TFMPP, enquanto para a MeOPP e mCPP foi obtido 0.05 µg/mL. Os valores da precisão intra-dia e intermédia variaram de 1 a 12% enquanto a exactidão está dentro de um intervalo de ±14% para todos os analitos, preenchendo os critérios normalmente aceites para a validação de métodos bioanalíticos. Nas condições optimizadas, obtiveram-se recuperações superiores a 80% para todos os analitos, excepto para a BZP (50%).

A MEPS mostrou ser uma técnica simples e rápida para a determinação de piperazinas em amostras de urina, permitindo poupar tempo e dinheiro. Além disso, o facto de que apenas 0.1 mL de amostra são necessários para efectuar a análise, torna o método uma ferramenta poderosa e valiosa para a monitorização destas drogas em urina, por exemplo em situações de âmbito forense.

## Palavras-chave

Piperazinas; Microextracção em seringa empacotada; Planeamento factorial; UPLC; Urina



# Abstract

Piperazines are considered a new group of synthetic drugs of abuse that emerged in the illicit market from the second half of 1990. Their psychoactive effects, such as states of euphoria, are comparable to those obtained by use of amphetamines and ecstasy, and is therefore considered a legal alternative, inexpensive and safe. Thus it becomes necessary to develop rapid and sensitive analytical methods for quantification and determination of these compounds in biological samples.

The goal of this work was to develop and validate an analytical method using microextraction syringe packed (MEPS) and high performance liquid chromatography coupled to detector efficiency photodiodes (UPLC-DAD) for the determination and quantification of four derivatives of piperazines in urine samples. The studied piperazines were: 1-benzylpiperazine (BZP), 1-(3-trifluoromethylphenyl)piperazine (TFMPP), 1-(3-chlorophenyl)piperazine (mCPP) and 1-(4-methoxyphenyl)piperazine (MeOPP), using as internal standard 1-(2-chlorophenyl)piperazine (oCPP). This is the first time that those compounds are determined in urine samples by means of MEPS. The method was comprehensively optimized using the factorial design approach, and the evaluated parameters were sample dilution (1:2), strokes (8), cation exchange mechanism enhancement (1% acetic acid), amount of methanol on the washing solvent (10%), and elution of the analytes (5% ammonia in methanol).

The procedure was linear at concentrations ranging from 0.1 (lower limit of quantitation - LLOQ) to 5 µg/mL, with correlation coefficients ( $R^2$ ) higher than 0.99 for all analytes in all runs. The limits of detection were 0.1 µg/mL for BZP and TFMPP, while for MeOPP and mCPP 0.05 µg/mL was obtained. Intra- and interday precision ranged from 1 to 12%, while accuracy was within a ±14% interval for all analytes, fulfilling the criteria normally accepted in bioanalytical method validation. Under the optimized conditions, extraction efficiency was higher than 80% for all analytes, except for BZP (50%).

MEPS has shown to be a rapid and robust procedure for the determination of piperazine-type stimulants in human urine, allowing reducing the handling time and costs usually associated to these analyses. Furthermore, the fact that only 0.1 mL of sample is required to accomplish the analysis make this method a valuable and powerful tool for drug monitoring in human urine.

## Keywords

Piperazines; Microextraction by packed sorbent; Factorial design; UPLC; Urine

Folha em branco

## Índice

<b>Resumo</b> .....	v
<b>Abstract</b> .....	vii
<b>Lista de figuras</b> .....	xi
<b>Lista de tabelas</b> .....	xiii
<b>Lista de acrónimos</b> .....	xv
<b>Justificação do tema e objectivos</b> .....	xix
<b>I. Revisão da literatura</b>	
<b>1. Drogas de abuso</b> .....	1
1.1 <i>Designer drugs</i> .....	2
1.2 Piperazinas.....	4
1.3 Legislação e piperazinas.....	5
1.4 Formas de apresentação das piperazinas.....	7
<b>2. Piperazinas: Características</b> .....	8
2.1 Estrutura química e classificação .....	8
2.2 Propriedades físico-químicas das piperazinas .....	10
2.3 Farmacocinética.....	11
2.3.1 Absorção .....	11
2.3.2 Distribuição .....	12
2.3.3 Biotransformação e Eliminação .....	12
2.4 Mecanismo de acção das piperazinas.....	16
2.5 Efeitos tóxicos .....	19
<b>3. Microextracção em seringa empacotada (MEPS)</b> .....	21
<b>4. Análise de piperazinas em amostras biológicas</b> .....	28
<b>II. Parte Experimental</b>	
<b>1. Material e Métodos</b> .....	33
1.1 Padrões e reagentes.....	33
1.2 Instrumentação .....	33
1.3 Materiais.....	34
1.4 Soluções.....	34
1.5 Sistema cromatográfico e de detecção .....	35
1.5.1 Condições cromatográficas .....	35
1.6 Amostras biológicas .....	35

1.7	Procedimento de extracção optimizado .....	36
<b>2.</b>	<b>Resultados e discussão .....</b>	<b>37</b>
2.1.	Optimização da fase móvel .....	37
2.2.	Identificação dos compostos .....	39
2.3.	Padrão interno .....	40
2.4.	Optimização do procedimento de extracção .....	41
2.5.	Desenho experimental - DOE .....	41
2.6.	Factores que influenciam a MEPS.....	42
2.6.1.	Colunas de fase reversa.....	43
2.6.2.	Colunas de modo misto .....	51
2.7.	Validação do método.....	53
2.7.1.	Selectividade .....	54
2.7.2.	Linearidade e modelo de calibração.....	55
2.7.3.	Limites de detecção e quantificação.....	56
2.7.4.	Precisão e exactidão.....	57
2.7.5.	Estabilidade .....	60
2.7.5.1.	Estabilidade a ciclos de congelação/descongelação.....	60
2.7.5.2.	Estabilidade em amostras processadas.....	61
2.7.5.3.	Estabilidade a curto prazo à temperatura do laboratório.....	62
2.7.6.	Recuperação.....	62
2.7.7.	<i>Arrastamento (carryover)</i> .....	62
2.7.8.	Aplicação do método a amostras reais.....	63
<b>III.</b>	<b>Conclusões .....</b>	<b>65</b>
<b>IV.</b>	<b>Bibliografia .....</b>	<b>67</b>
<b>V.</b>	<b>Anexos .....</b>	<b>73</b>

# Lista de Figuras

Figura 1. Classes e subclasses das novas drogas de abuso.	4
Figura 2. Estrutura química das piperazinas em estudo.	5
Figura 3. Comprimidos e cápsulas relacionadas com as piperazinas.	7
Figura 4. Estrutura química da piperazina.	9
Figura 5. Grupos de substituintes na estrutura química das drogas relacionadas com a piperazina.	9
Figura 6. Estrutura química da piperidina.	10
Figura 7. Representação esquemática do metabolismo da BZP: (1) BZP; (2) 4-OH-BZP; (3) 3-OH-BZP; (4) 1-(4-hidroxi-3-metoxi-benzil)piperazina; (5) piperazina; (6) benzilamina; (7) N-benziletilenodiamina.	14
Figura 8. Representação esquemática do metabolismo da TFMPP em ratos: (1) TFMPP; (2) hidroxí-trifluorometilfenilpiperazina (OH-TFMPP), 2 isómeros; (3) N-(3-trifluorometilfenil)etilenodiamina; (4) N-(hidroxí-3-trifluorometilfenil)etilenodiamina; (5) 3-trifluorometilanilina; (6) N-acetil-3-trifluorometilanilina; (7) hidroxí-3-trifluorometilfenilanilina; (8,9) N-acetil-hidroxí-3-trifluorometilanilina; (10,11) conjugação com o ácido glucurónico e com sulfatos (12).	14
Figura 9. Representação esquemática do metabolismo da mCPP nos ratos: (1) mCPP; (2,3) hidroxí-clorofenilpiperazina, 2 isómeros; (4) N-(3-clorofenil)etilenodiamina; (5) 3-cloroanilina; (6) N-acetil-3-cloroanilina; (7,8) hidroxí-3-cloroanilina; (9,10) N-acetil-hidroxí-3-cloroanilina.	16
Figura 10. Imagem ilustrativa do mecanismo de acção de drogas de abuso do tipo das piperazinas. (Adaptado de <a href="http://www.drugabuse.com">www.drugabuse.com</a> )	18
Figura 11. (A) Seringa de MEPS (250 µL) da SGE com coluna de extracção; (B) Representação esquemática da coluna de extracção.	23
Figura 12. Silanol	25
Figura 13. Três modelos de uma fase C18 ligada à sílica: (A) sem acondicionamento, (B) parcialmente acondicionada, (C) completamente acondicionada.	26
Figura 14. Etapas do processo de extracção na MEPS.	28
Figura 15. Cromatograma das piperazinas em estudo utilizando uma fase móvel de acetato de amónia 1mM, ácido fórmico e acetonitrilo (39:1:60, v/v): (1) MeOPP, (2) mCPP e TFMPP.	37
Figura 16. Cromatograma das piperazinas em estudo utilizando uma fase móvel de acetato de amónia 1mM e metanol (40:60, v/v): (1) MeOPP e BZP, (2) mCPP e (3) TFMPP.	38
Figura 17. Cromatograma das piperazinas (5 µg/mL) de estudo utilizando uma fase móvel formato de amónio 5 mM e metanol (55:45, v/v): (1) MeOPP, (2) BZP, (3) mCPP e (4) TFMPP.	38

Figura 18. Cromatograma dos compostos de estudo e padrão interno a 10 µg/mL.	40
Figura 19. Diagramas de Pareto ilustrando os factores que influenciam o processo de extracção para cada composto individualmente, usando as colunas C8 e C2. Encontram-se salientados com um círculo vermelho os parâmetros estatisticamente significativos.	44
Figura 20. Gráfico dos efeitos principais. Com um círculo vermelho encontra-se assinalado para o factor “coluna” o nível que origina a melhor resposta, neste caso a coluna C8.	45
Figura 21. Diagramas de Pareto ilustrando os factores que influenciam o processo de extracção para cada composto individualmente, usando as colunas C18 e SIL. Encontram-se salientados com um círculo vermelho os parâmetros estatisticamente significativos.	46
Figura 22. Gráficos representativos das interacções entre os vários parâmetros para cada composto. Com um círculo vermelho encontram-se assinaladas as interacções estatisticamente significativas.	47
Figura 23. Gráfico dos principais efeitos dos factores susceptíveis de influenciar o processo de extracção para cada composto. Os parâmetros que influenciam o processo de extracção para cada analito encontram-se assinalados.	49
Figura 24. Gráfico dos principais efeitos dos factores susceptíveis de influenciar o processo de extracção para cada composto. Os parâmetros que influenciam o processo de extracção para cada analito encontram-se assinalados.	49
Figura 25. Diagramas de Pareto ilustrando os factores que influenciam o processo de extracção para cada composto individualmente, usando as colunas M1.	51
Figura 26. Gráfico dos principais efeitos dos factores susceptíveis de influenciar o processo de extracção para cada composto.	52
Figura 27. Cromatograma de uma amostra branca.	54
Figura 28. Cromatograma de uma amostra fortificada com os analitos em estudo a 10 µg/mL. (1) MeOPP, (2) BZP, (3) mCPP e (4) TFMPP.	54
Figura 29. Cromatograma de uma amostra branca, que indica não existir carryover.	62
Figura 30. Cromatograma de amostra real (concentração de mCPP 0.22 µg/mL). (1) PI, (2) mCPP.	63

# Lista de Tabelas

Tabela 1. Dados físico-químicos das piperazinas estudadas .....	10
Tabela 2. Fases estacionárias usadas em MEPS .....	27
Tabela 3. Revisão das metodologias analíticas que visam a determinação de piperazinas em amostras biológicas.....	31
Tabela 4. Piperazinas em estudo e respectivos tempos de retenção e comprimento de onda máximo de absorção. ....	39
Tabela 5. Compostos testados como padrão interno e respectivos tempos de retenção. ....	40
Tabela 6. Matriz experimental e resultados das extracções com as colunas C <sub>2</sub> e C <sub>8</sub> . ....	43
Tabela 7. Matriz experimental e resultados das extracções com as colunas C <sub>18</sub> e SIL. ....	46
Tabela 8. Matriz experimental e resultados das extracções com as colunas C <sub>8</sub> e C <sub>18</sub> .....	48
Tabela 9. Optimização da percentagem de metanol na eluição. ....	50
Tabela 10. Matriz experimental e resultados das extracções com as colunas M <sub>1</sub> . ....	51
Tabela 11. Recuperações das piperazinas utilizando as colunas C <sub>18</sub> e M <sub>1</sub> (n=6). ....	53
Tabela 12. Condições finais de extracção (coluna M <sub>1</sub> ). ....	53
Tabela 13. Dados de linearidade para os compostos em estudo (n=5). ....	56
Tabela 14. Precisão intradia e exactidão (n=6). ....	58
Tabela 15. Precisão interdia e exactidão (n=5). ....	59
Tabela 16. Precisão intra e interdia combinada (n=15).....	60
Tabela 17. Estabilidade após ciclos de congelação/descongelação (n=3). ....	61
Tabela 18. Estabilidade em amostras processadas (n=3). ....	61
Tabela 19. Estabilidade a curto prazo à temperatura do laboratório. ....	62



# Lista de Acrónimos

3-OH BZP	3-hidróxido-piperazina
4-MTA	4-metiltioanfetamina
4-OH BZP	4-hidróxido-piperazina
5-HT	5-hidroxitriptamina (serotonina)
5-HT2A	Receptor 5-hidroxitriptamina 2A
5-HT2B	Receptor 5-hidroxitriptamina 2B
5-HT3	Receptor 5-hidroxitriptamina 3
5-MeO-DiPT	5-metoxi-di-isopropiltriptamina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BIN	Barrel Insert and Needle Assembly
BZP	1-benzilpiperazina
C <sub>18</sub>	Octadecilsilano
C <sub>2</sub>	Etilsilano
C <sub>8</sub>	Octilsilano
CAS	Chemical Abstracts Service
C <sub>max</sub>	Concentração máxima
COMT	Catecol-O-metil-transferase
CSA	<i>Controlled Substance Act</i>
CSAs	Controlo de Substâncias Análogas, (do inglês, <i>Controlled Substances Analogues</i> )
CV	Coeficiente de variação
DA	Dopamina
DEA	<i>U.S. Drug Enforcement Agency</i>
DOE	Desenho experimental, (do inglês, <i>Design of experiments</i> )
Europol	Serviço Europeu de Polícia, (do inglês, <i>European Police Office</i> )
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GC	Cromatografia gasosa (do inglês, <i>Gas Chromatography</i> )
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, <i>High-performance liquid chromatography</i> )
<i>i.v</i>	Intravenosa
LC	Cromatografia líquida (do inglês, <i>Liquid Chromatography</i> )
LLE	Extracção líquido-líquido (do inglês, <i>Liquid-liquid extraction</i> )
LOD	Limite de detecção (do inglês, <i>Limit of detection</i> )
LLOQ	Limite inferior de quantificação (do inglês, <i>Lower limit of quantification</i> )

LSD	<i>Lysergic acid diethylamine</i>
M <sub>1</sub>	Coluna de extracção modo misto
MAO	Monoamina oxidase
mCPP	1-(3-clorofenil)piperazina
MDBP	1-(3,4-metilenodioxibenzil)piperazina
MDMA	3,4-metilenodioxi- <i>N</i> -metilanfetamina
MeOPP	1-(4-metoxifenil)piperazina
MEPS	Microextracção em seringa empacotada (do inglês, <i>Microextraction by packed sorbent</i> )
NA	Noradrenalina
oCPP	1-(2-clorofenil)piperazina
OEDT	Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
PCP	Fencilclidina
PTFE	Politetrafluoroetileno
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação
SCX	Troca catiónica forte (do inglês, <i>Strong cationic exchange</i> )
SERT	Transportador pré-sináptico da serotonina
SNC	Sistema Nervoso Central
SPE	Extracção em fase sólida (do inglês, <i>Solid-phase extraction</i> )
SPME	Microextracção em fase sólida (do inglês, <i>Solid-phase microextraction</i> )
t <sub>½</sub>	Tempo de semi-vida
TFMPP	1-(3-trifluorometilfenil) piperazina
T <sub>máx</sub>	Tempo máximo
UDP	Uridina difosfato
UGT	Glucuronosiltransferases
UPLC-DAD	Ultra High-Performance Liquid Chromatography
UV	Ultra-Violeta
VD	Volume de distribuição





# Justificação do tema e objectivos

Segundo o Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência (OEDT), as novas substâncias psicoactivas e os novos padrões de consumo de droga, apesar de surgirem inicialmente em grupos sociais restritos e áreas geográficas circunscritas, podem ter importantes implicações em termos de política de saúde pública. O fornecimento de informações adequadas e objectivas aos responsáveis profissionais e ao público em geral sobre as novas ameaças de drogas de abuso constitui um desafio em termos de metodologia e prática; no entanto, é de grande importância dada a natureza cada vez mais dinâmica e célere do fenómeno da droga a nível europeu. Assim, o mecanismo de alerta rápido da União Europeia tem sido desenvolvido como meio de resposta ao aparecimento de novas substâncias psicoactivas no mercado [1].

Desde a sua criação em 1997 já foram notificadas ao OEDT e ao Serviço Europeu de Polícia (Europol) mais de 110 substâncias através do mecanismo de alerta rápido. Nos últimos anos, surgiram novos grupos de substâncias sintéticas não regulamentadas, sendo estas comercializadas através da Internet como «drogas lícitas». De facto, são normalmente sintetizadas de modo a serem diferentes das substâncias proibidas, criando deste modo um vazio legal que permite a sua comercialização. Assim sendo, a pesquisa sistemática destas novas substâncias psicoactivas fica dificultada [1].

Este é o caso das piperazinas, um novo grupo de drogas de abuso sintéticas, que começaram a surgir no mercado ilícito. Sendo estas substâncias não controladas em alguns dos Estados-Membros da União Europeia, são de aquisição relativamente fácil, nomeadamente através da Internet. Por outro lado, os efeitos psicoactivos, como por exemplo euforia, são comparáveis aos obtidos por consumo de anfetaminas e *ecstasy*, sendo consideradas uma alternativa legal, barata e segura a estas [2]. Não obstante, a sua reputação como drogas seguras tem sido posta em causa por alguns casos de intoxicação, nomeadamente com 1-benzilpiperazina (BZP) no Reino Unido [3].

Visto serem de fácil aquisição e apresentarem um elevado potencial de uso e abuso, a identificação e quantificação das piperazinas em amostras biológicas assume particular importância em Toxicologia Forense, permitindo de igual modo fornecer informação relevante no que respeita ao consumo destas drogas.

Foram seleccionadas para este estudo as piperazinas com maior relevância em termos de consumo: BZP, 1-(4-metoxifenil)piperazina (MeOPP), 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina (TFMPP) e 1-(3-clorofenil)piperazina (mCPP).

O objectivo deste trabalho consistiu então no desenvolvimento de um método analítico para a identificação e quantificação de piperazinas em urina por microextracção em seringa empacotada (MEPS) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de fotodiodos (UPLC-DAD). O processo extractivo foi previamente optimizado recorrendo ao planeamento factorial, após o que se procedeu à sua adequada validação. Por último, tentou-se aplicar o método desenvolvido e validado à determinação destes compostos em amostras provenientes de indivíduos consumidores.





# I. Revisão da literatura

## 1. Drogas de abuso

O uso de substâncias químicas com acção sobre o sistema nervoso central (SNC) é tão antigo como a Humanidade; de facto, o consumo de substâncias químicas quer para uso ritual, religioso, como medicamento, ou simplesmente pelo prazer que podiam proporcionar ao consumidor, esteve e está presente em várias sociedades e culturas. Durante a história, esse consumo passou quer por períodos de aceitação e de proibição total, sendo por isso algumas drogas aceites em determinadas culturas, ao passo que em outras o seu uso se restringe à clandestinidade [4]. As espécies alucinogénicas da planta de *Lotus* (usadas em rituais mágicos e religiosos) pelos antigos Egípcios e o uso da folha de coca pelos Incas são bons exemplos destas substâncias psicoactivas [5]. No entanto, e apesar de ao longo dos tempos a utilização de substâncias com o poder de modificar o humor ter sido comum, o seu uso tem vindo a generalizar-se, sendo na era da globalização que o consumo excessivo de drogas se intensifica e diversifica [6].

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), droga é toda a substância que introduzida no organismo vivo, seja qual for a via de administração, produz alterações no SNC, modificando uma ou mais das suas funções, criando dependência psicológica, física ou ambas. Por outro lado, o termo droga ilícita pode ser definido como uma substância que é proibida ou não é autorizada pela lei e pelas regras da sociedade. O termo **droga de abuso** refere-se ao consumo excessivo, persistente ou esporádico, inconsciente ou não de substâncias psicoactivas ou psicotrópicas sem qualquer utilização na prática terapêutica [7] usadas principalmente pelos seus efeitos de prazer, exóticos ou estimulantes, capazes de alterar o estado de consciência, o humor, o comportamento, as motivações e os processos do pensamento do indivíduo que as consome [2]. Assim, uma substância é considerada uma droga de abuso quando é usada para propósitos não terapêuticos, levando à dependência [8, 9]. Esta definição engloba substâncias ditas lícitas (bebidas alcoólicas, tabaco e certos medicamentos) e igualmente substâncias ilícitas, como a cocaína, LSD (dietilamina do ácido lisérgico), *ecstasy*, e opiáceos, entre outras [9]. Por outro lado, aplica-se também ao doping dos atletas de alta competição, por exemplo o uso de anabolizantes para aumentar o rendimento desportivo [8].

O consumo de drogas tem alcançado consideráveis proporções nos últimos anos, e actualmente considera-se um dos principais problemas de saúde pública. O uso de drogas ilícitas tem-se alastrado potencialmente a vários grupos da população em geral, predominantemente aos adolescentes [8].

No entanto, existe um conjunto de substâncias ilícitas inicialmente direccionadas para uso terapêutico, mas que devido aos seus efeitos estimulantes e alucinogénicos passaram a ser consumidas de forma recreativa (e.g. ketamina). Este fenómeno tem sido mais visível e crescente nos últimos anos, com o aparecimento das chamadas drogas sintéticas, cuja composição resulta da investigação laboratorial [6].

### 1.1 *Designer drugs*

O consumo mundial de drogas sintéticas de abuso, por vezes referidas como *designer drugs*, vem aumentando ano após ano. Estas drogas são vulgarmente produzidas em laboratórios clandestinos, muitas vezes sintetizadas a partir de outras substâncias químicas que já possuam actividade biológica conhecida [10]. Devido à legislação existente em muitos países, que tenta banir as drogas ou regulamentar o seu uso, os produtores procuram diferentes alternativas de as fazer circular legalmente. Uma vez que para uma substância ser catalogada é preciso que a sua estrutura química seja bem conhecida, os traficantes efectuam constantemente modificações nas estruturas de drogas ilícitas já existentes [11], com o objectivo de obter efeitos psicoactivos semelhantes ou ainda mais potentes [12]. Assim, a estrutura molecular da substância cujo consumo é ilegal é alterada, contornando desta forma a legislação e consequentes sanções penais [12, 13]. De facto, surgem novas substâncias em resposta à acção legislativa para repor rapidamente uma droga semelhante à recentemente proibida [14].

Quer a modificação quer a síntese de novas substâncias são motivadas pela procura do conhecimento acerca da relação estrutura-actividade, mas também pelos possíveis efeitos destes compostos a nível neurocomportamental [14].

No contexto do termo, **novo** significa que estas drogas têm aparecido ultimamente no mercado de drogas ilícitas e das quais se faz um uso abusivo. Não significa necessariamente que foram descobertas ou sintetizadas recentemente. Por vezes estas drogas podem ser consideradas como “agentes farmacêuticos fracos”, que já foram descritos na literatura científica mas não têm uma utilidade terapêutica comprovada. Em geral, estas substâncias permanecem num grupo restrito de utilizadores e não subsistem durante muito tempo [14]. Este é o caso específico das piperazinas, compostos estudados ao longo deste trabalho.

As substâncias que pertencem às **novas drogas de desenho** podem ser divididas principalmente em seis subgrupos estruturais: fenilalquilaminas, triptaminas, piperazinas, pirrolidinofenonas, derivados fenilciclohexil, e canabinóides sintéticos [14]. A inclusão das piperazinas neste grupo é controversa, à semelhança da 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), havendo alguns autores com alguma relutância em considerá-las como pertencentes às *designer drugs* [2].

### Fenilalquilaminas

As estruturas básicas da anfetamina e da MDMA têm sido o ponto de partida para muitas das modificações que foram realizadas, principalmente no anel aromático e com menos frequência na função amina e cadeia carbonada; foram assim obtidos diferentes derivados com base nos seus substituintes: derivados monometoxi-, dimetoxi- e trimetoxi-, compostos  $\beta$ -keto, anfetaminas ligadas a átomos de flúor, 4-MTA e homólogos, e difuranilfenalquilaminas [14].

### Triptaminas

Triptamina é a estrutura básica da psilocibina e psilocina, drogas alucinogénicas e principais constituintes dos “cogumelos mágicos” e da bufotenina, um alcalóide psicoactivo encontrado na pele de algumas espécies de batráquios (*Bufo alvarius* e *Bufo marinus*). O efeito das drogas estruturalmente análogas à triptamina deve-se à sua similaridade com a serotonina, provocando em geral alucinações e euforia moderada. A 5-metoxi-di-isopropiltriptamina (5-MeO-DiPT), também conhecida como *Foxy* ou *FoxyMetoxi*, é a triptamina sintética mais utilizada, tendo sido associada alguns casos de intoxicação [14].

### Pirrolidinofenonas

Estão estruturalmente relacionadas com as catinonas e os compostos  $\beta$ -keto, mas diferem destes no anel heterocíclico que contém um átomo de azoto. Os seus efeitos estimulantes são previsíveis mas não existem publicações acerca das suas propriedades farmacológicas ou casos de intoxicação [14].

### Derivados fenilciclohexil

Estes compostos são estruturalmente derivados da fenciclidina (PCP), mas em contraste com esta, nestes derivados a piperidina heterocíclica é substituída por uma amina secundária. O seu mecanismo de acção é desconhecido [14].

### Canabinóides sintéticos

Foram utilizados pelos farmacologistas como substâncias modelo na investigação do sistema complexo endocanabinóide, mas o facto de terem sido detectados em misturas de ervas comercializadas como alternativa legal à cannabis fez com que adquirissem maior notoriedade, levando a um aumento exponencial do seu consumo [14].

### Piperazinas

A popularidade dos compostos pertencentes a este grupo tem aumentado, circulando estas substâncias estimulantes entre os consumidores de drogas desde o início do século XXI [14].

Dividem-se em dois grupos: benzilpiperazinas e fenilpiperazinas.

A figura 1 resume de forma geral todas as classes e subclasses das denominadas *designer drugs*, mostrando claramente que estas novas drogas têm uma grande variedade de estruturas.

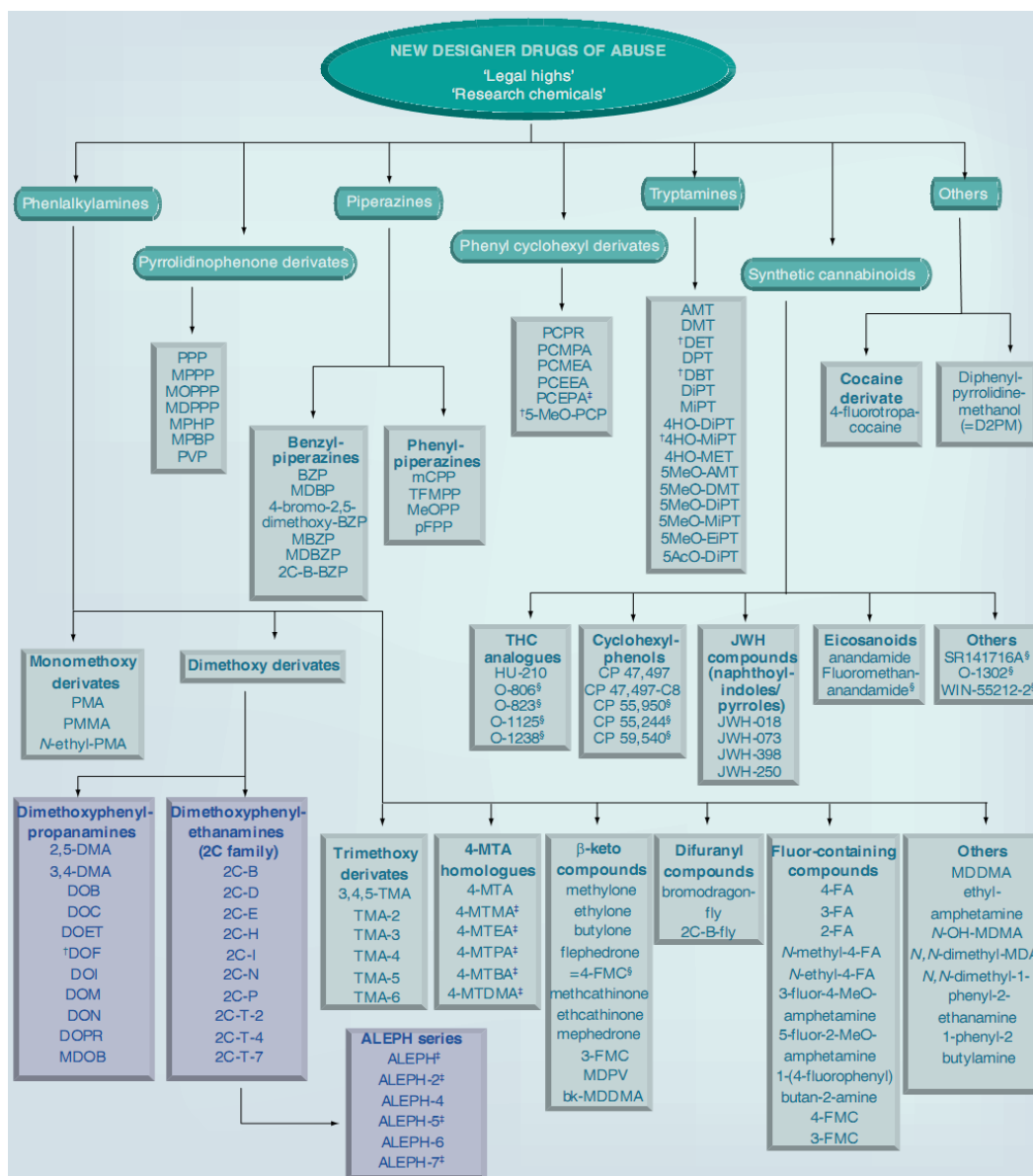


Figura 1. Classes e subclasses das novas drogas de abuso [14].

## 1.2 Piperazinas

Desde os finais da década de 90 e no início de 2000 tem havido uma expansão na produção clandestina das drogas de abuso sintéticas que alterou sem dúvida o mercado de drogas ilícitas [14]. Enquanto nas décadas anteriores as drogas de abuso estavam restritas a um número limitado de substâncias, nos últimos anos foram introduzidas mais de 100 novos compostos sintéticos no mundo das drogas [14].

Estas têm sido utilizadas como drogas recreativas sobre vários nomes como *Party Pills* ou *Herbal Highs* [15]. No entanto, a *US Drug Enforcement Agency* (DEA) aplica um nome menos deslumbrante para este grupo de drogas, denominando-as de *Controlled Substances Analogues* (CSAs), ou substâncias análogas controladas [15]. No entanto, este não é o caso das drogas seleccionadas para a realização deste trabalho, os análogos da piperazina (figura 2), que são geralmente substâncias não controladas em alguns países da União Europeia [15].

Entre as drogas sintéticas derivadas das piperazinas destacamos as benzilpiperazinas como a 1-benzilpiperazina (BZP) e as fenilpiperazinas como a 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina (TFMPP), a 1-(3-clorofenil)piperazina (mCPP) e a 1-(4-metoxifenil)piperazina (MeOPP) (figura 2) [15, 16].

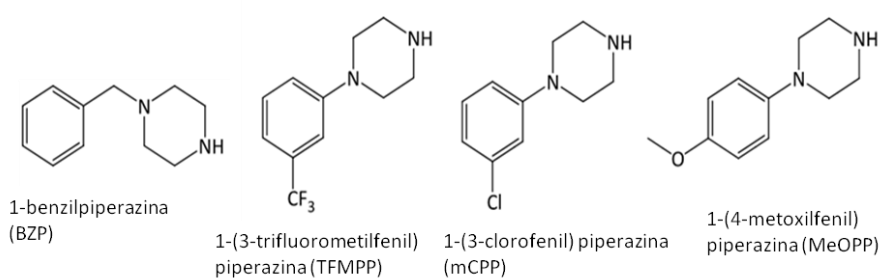


Figura 2. Estrutura química das piperazinas em estudo.

Estes derivados piperazínicos como a BZP, MeOPP, mCPP e TFMPP entraram no mercado das drogas como um novo grupo de *designer drugs* [17]. De facto, a primeira apreensão de BZP na Europa ocorreu em 1999 na Suécia [18]. A piperazina foi inicialmente usada terapêuticamente como agente anti-helmintico, sendo ainda utilizada em alguns países, incluindo Portugal. No entanto, o potencial das piperazinas como drogas recreativas destaca-se pelas suas propriedades psicoactivas e pelo seu modo de acção idêntico ao de outros estimulantes como a anfetamina e *ecstasy*, sendo por isso uma alternativa legal, barata e segura a estas drogas [15, 19]. Em algumas ocasiões são misturadas com outras drogas de abuso para potenciar os seus efeitos estimulantes e euforizantes, como é o caso de cocaína, *ecstasy*, anfetaminas e ketamina [3, 15].

### 1.3 Legislação e piperazinas

Segundo a Organização das Nações Unidas (ONU), os estimulantes do grupo anfetamínico estão em segundo lugar na lista de drogas de abuso mais consumidas a nível mundial, sendo superados apenas pelo uso de cannabis.

No entanto, outras substâncias têm sido igualmente alvo de apreensão por serem susceptíveis de utilização recreativa, como é o caso dos derivados piperazínicos [10]; porém, a sua situação jurídica ainda é muito inconsistente [20].

A BZP foi usada pela primeira vez na Europa como droga recreativa em 1999, e desde então o mercado expandiu-se a vários países incluindo Bulgária, Estados Unidos da América, Austrália, Suécia, Japão e África do Sul [21].

Entre 2000 e 2008, a Nova Zelândia era o único país a desenvolver um mercado lícito significativo conhecido como *BZP-party pills*. A partir de Março de 2006 foi aplicada à BZP uma restrição *R18*, o que significa que a venda só é legal para maiores de 18 anos. Todavia, a partir de Abril de 2008, este mercado das *BZP-party pills* foi banido, tendo sido este grupo de drogas reclassificado como de Classe I, e conseqüentemente tornando ilegal a sua posse, uso, venda, importação, exportação e fabrico destas e dos seus análogos, de qualquer isómero, sais ou misturas contendo qualquer um dos compostos [22, 23].

Nos Estados Unidos da América, o aumento do abuso de BZP e TFMPP levou a que, a 20 de Setembro de 2002, estes dois compostos tenham sido colocados temporariamente na *Schedule I* da *Controlled Substance Act* (CSA) [17, 21], a que se seguiu a decisão de colocar definitivamente a BZP nesta lista, a 18 de Março 2004. A partir desta data passou a ser ilegal fabricar, adquirir, deter, ou distribuir (vender, trocar ou dar) esta substância sem uma licença específica da DEA. Apesar disso, existem evidências que o uso destas drogas tem aumentado naquele país, uma vez que em 2004 só foram efectuadas 48 apreensões de BZP, enquanto em 2009 o número aumentou para 13 822. Em 2003 as autoridades Japonesas começaram também a controlar estas substâncias ao abrigo da *Narcotics and Psychotropics Control Law* [24].

A BZP é uma substância controlada na Austrália desde Fevereiro de 2003, e na Grécia e na Itália desde 26 de Junho de 2007. Na Alemanha não há restrições directas sobre as piperazinas, mas as substâncias apresentadas como pó branco que são psicoactivas são consideradas ilícitas [25].

Têm sido descritas apreensões de BZP, com maior relevância desde Maio de 2007, em vários países da Europa, como Alemanha, Bélgica, Dinamarca, Espanha, Finlândia, Grécia, Holanda, Irlanda, Malta, Noruega, Portugal, Reino Unido e Suécia [25].

A mCPP é uma nova droga sintética cada vez mais comum em países da Europa. Esta droga foi identificada pela primeira vez na Suécia, em 2004, e desde então já foi apreendida por forças policiais de 26 países europeus. Com efeito, durante o ano de 2006, foram apreendidos aproximadamente 823 000 comprimidos, variando a quantidade de substância activa em cada comprimido entre 22 e 80 mg.

Inclusivamente, esta droga já foi detectada em comprimidos associada a outras drogas estimulantes, ou até substituindo a MDMA. Porém, contrariamente a esta última, a mCPP não possui restrições ao seu uso na maioria dos países [10].

Segundo o documento do OEDT, desde Dezembro de 2005 foram confiscadas na Dinamarca as substâncias mCPP, BZP, TFMPP e MeOPP, estando incluídas na Tabela B da *Executive Order 698/1993 on Euphoric Substances* [10], onde se encontram também compostos utilizados para fins médicos e científicos controlados, como por exemplo a cocaína, MDMA, anfetaminas e metadona [25].

Em Portugal, a BZP encontra-se sob a regulamentação da Lei n.º 18/2009 de 11 de Maio, que procede à alteração do Decreto-Lei n.º 15/93, de 22 de Janeiro, sendo portanto sujeita às mesmas medidas de controlo aplicadas aos estupefacientes e substâncias psicotrópicas [26].

#### 1.4 Formas de apresentação das piperazinas

Estas drogas são geralmente vendidas através da internet, em discotecas, festas particulares, eventos musicais ou até mesmo nas ruas através do mercado negro, principalmente na forma de comprimidos, mas também sob a forma de cápsulas. Os comprimidos possuem variadas formas, cores e tamanhos, sendo por vezes impressos com logótipos atractivos, como por exemplo “Mitsubishi” ou “Smiley” como podemos ver na figura 3 [17, 18, 24].



Figura 3. Comprimidos e cápsulas relacionadas com as piperazinas [2].

Podem ainda ser comercializados na forma de pó, líquido ou solução mas no entanto menos frequentemente [15].

Acredita-se que muitos dos produtos contendo BZP são originários da Nova Zelândia, onde se desenvolveu um amplo mercado para esta substância. A dose média era inicialmente de cerca de 50 mg, mas actualmente é de 70 a 250 mg [23]. Quanto à pureza, consegue adquirir-se na Internet BZP com um grau de pureza superior a 99% [27].

Comummente às outras drogas, estes derivados têm também nomes bastante apelativos, como *party pills*, *herbal highs* ou ainda *legal highs*. Mais especificamente a BZP, que está disponível em sites Europeus, desde Janeiro de 2000, sendo designada por *A2*, *Legal E*, *Legal X*, *Frenzy* e *Nemesis* [15, 19, 28]. A TFMPP é conhecida como *Molly* [28], enquanto a mCPP é popularmente denominada *X4*, *rainbow*, *regenboogies* e *arc-en-ciel* [10].

A BZP e a TFMPP são frequentemente consumidas concomitantemente [23]. Algumas vezes são também utilizadas outras misturas de piperazinas, ou então associadas a outras drogas como MDMA, cocaína, anfetaminas e ketamina [15]. Alguns autores indicam que os comprimidos de mCPP podem conter diversos diluentes e adulterantes, como MDMA ou cocaína [10].

Hoje em dia, o baixo custo, a facilidade de transporte, o facto de ainda não serem substâncias regulamentadas na maioria dos países e a comodidade com que são adquiridas, devido à existência de variadíssimos sites na Internet, fazem com que a sua procura e oferta seja muito maior, aumentando deste modo a sua popularidade e consumo. Este pode ser circunstancial na maior parte das vezes, estando ligado a determinados acontecimentos como festas, ou ainda ser derivado da curiosidade. Porém, este uso casual pode muito bem ter por vezes outras finalidades que não as recreativas, como por exemplo, serem consumidas para aumentar o rendimento desportivo ou para estudar [2].

## **2. Piperazinas: Características**

### **2.1 Estrutura química e classificação**

As piperazinas são compostos que representam uma ampla classe química de substâncias com uma estrutura heterocíclica hexagonal que contém no anel saturado dois átomos de azoto em posições opostas (figura 4) [2, 5, 10].

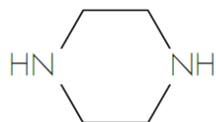


Figura 4. Estrutura química da piperazina.

Com base na natureza química dos substituintes na estrutura cíclica, as piperazinas são classificadas em dois grupos principais: as 1-benzilpiperazinas e as 1-fenilpiperazinas, que posteriormente podem também ser substituídas. Nas 1-fenilpiperazinas o átomo de azoto está ligado a um grupo fenilo, enquanto nas 1-benzilpiperazinas está ligado a um grupo benzilo. Um grupo metilo separa o anel aromático do grupo heterocíclico (figura 5) [2].

Piperazinas	Y	R1	R2	R3
1-benzilpiperazina (BZP)	CH <sub>2</sub>	H	H	H
1-(3,4-metilenodioxibenzil)piperazina (MDBP)	CH <sub>2</sub>	H	OCH <sub>2</sub> O	
1-(4-metoxifenil)piperazina (MeOPP)	—	H	H	OCH <sub>3</sub>
1-(3-clorofenil)piperazina (mCPP)	—	H	Cl	H
1-(3-trifluorometilfenil)piperazina (TFMPP)	—	H	CF <sub>3</sub>	H

Figura 5. Grupos de substituintes na estrutura química das drogas relacionadas com a piperazina [2].

Devido a terem uma estrutura semelhante à da piperidina (figura 6) - constituinte do alcalóide piperina encontrado na pimenta negra (*Piper nigrum*) - as piperazinas eram inicialmente consideradas como drogas naturais, sendo comercializadas como *natural* e *herbal highs*, facto que levou a afirmar-se que proporcionavam uma alternativa segura a substâncias ilícitas como as anfetaminas [23]. No entanto, as piperazinas não são compostos que ocorrem naturalmente mas sim substâncias puramente sintéticas [15, 25].

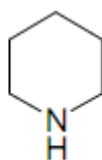


Figura 6. Estrutura química da piperidina.

A piperazina e os seus derivados são também importantes componentes cíclicos como matérias-primas na área industrial de materiais, tais como endurecedores de resinas epóxi, insecticidas, catalisadores uretano e antioxidantes [15].

## 2.2 Propriedades físico-químicas das piperazinas

Fisicamente as piperazinas são cristais incolores, vítreos e com cheiro característico. Todas as piperazinas em estudo são bases orgânicas, cujo valor da constante de ionização é superior a 8 (tabela 1) [2, 29]. A pH 7,4 e a 37 °C, a percentagem de ionização varia entre os 80, para os derivados com pKa mais baixo, e os 97% para aqueles cujo valor de pKa é mais elevado. Sendo assim, as piperazinas estão protonadas em condições fisiológicas [2].

Tabela 1. Dados físico-químicos das piperazinas estudadas [2].

Composto	MeOPP	BZP	mCPP	TFMPP
CAS <sup>(*)</sup>	38212-30-5	2759-28-6	6640-24-0	15532-75-9
Massa Molecular	192,26	176,26	196,68	230,23
Fórmula Molecular	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub>	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>2</sub>	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub>
Ponto de fusão (°C)	42-47	17-20	210-214	—
Ponto de ebulição (°C)	130	145 <sub>760mmHg</sub>	145-150 <sub>3mmHg</sub>	65-72 <sub>15mmHg</sub>
Pressão de vapor <sup>(**)</sup> (10 <sup>-3</sup> mmHg)	—	—	0,479	1,87
Solubilidade em água (mg/L)	—	2600	7310	—
pKa <sup>(***)</sup>	9,00	9,59	8,64/8,72	8,66

(\*) CAS: Chemical Abstracts Service;

(\*\*) a 25 °C;

(\*\*\*) a 37 °C.

A BZP pode estar disponível na forma de sal, como cloridrato (cristais sólidos), ou sob a forma de base; neste último caso é líquida e de cor verde-amarelado. Como base líquida é corrosiva, pelo que é principalmente comercializada na forma de cloridrato (BZP-2HCl) [29].

## 2.3 Farmacocinética

Após administração, os tóxicos (drogas ou fármacos) passam pelos seguintes processos no organismo: absorção, distribuição, biotransformação (metabolismo) e eliminação. Ao conjunto formado por estes processos dá-se o nome de farmacocinética.

Para produzirem os efeitos desejados é necessário que as piperazinas sejam introduzidas no organismo (administração), para que possam atingir a circulação sanguínea (absorção), alcançar células, tecidos e órgãos-alvo (distribuição) onde vão exercer a sua acção farmacológica. A biotransformação ou metabolismo destes compostos antecede a sua eliminação do organismo, por exemplo na urina [2].

### 2.3.1 Absorção

Absorção é o processo pelo qual um químico atravessa as várias barreiras membranares do organismo antes de entrar na corrente sanguínea. Os principais locais de entrada são o tracto gastrointestinal, os pulmões e a pele. Relativamente aos compostos em estudo, as piperazinas, estas são administradas na maior parte das vezes por via oral, na forma de comprimidos, cápsulas ou misturadas em bebidas, existindo algumas evidências de administração por via intravenosa (*i.v.*) ou nasal [17, 22, 24]. São absorvidas pelo tracto gastrointestinal de forma rápida, no entanto variável. As propriedades lipofílicas de alguns destes compostos permitem a sua passagem através das membranas biológicas facilitando a sua absorção [2].

A dose habitual para utilização recreativa de BZP é de um ou dois comprimidos, variando a dosagem entre 25 a 200 mg. Quanto aos seus efeitos, estes mantêm-se aproximadamente durante 6 a 8 horas após a administração de uma dose de 100 mg [18]. A concentração plasmática máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ) é alcançada em 75 minutos [30], sendo o tempo de semi-vida ( $t_{1/2}$ ) de 5,5 horas. Quanto aos seus metabolitos, a 4-hidroxi-benzilpiperazina (4-OH-BZP) e 3-hidroxi-benzilpiperazina (3-OH-BZP), as concentrações plasmáticas encontradas foram de 7 ng/mL ( $t_{m\acute{a}x}$  = 60 min.) e 13 ng/mL ( $t_{m\acute{a}x}$  = 75 min.), respectivamente [30].

Para a mCPP, as doses encontradas em comprimidos apreendidos variam de 2 a 46 mg, sendo que a  $C_{m\acute{a}x}$  é de 30,8 ng/mL e o  $t_{m\acute{a}x}$  de 120 minutos após administração oral de uma dose de 0,5 mg/Kg [2].

Estudos farmacocinéticos revelam que a biodisponibilidade (capacidade do composto atingir a circulação sanguínea na forma activa) da mCPP varia entre os 12 a 84% ou 14 a 108% [2], o que indica uma grande variabilidade interindividual.

O  $t_{1/2}$  é de 2,6 a 6,1 horas após administração oral, e 2,4 a 6,8 horas após administração por via *i.v.* [2].

Outra consideração importante relacionada com mCPP é o facto de que, no Homem, esta substância é um produto de biotransformação activo do fármaco antidepressivo trazodona, representando 0,15% da dose na urina após administração oral de 150 mg [2].

A mCPP, sendo uma droga administrada oralmente, é sujeita ao efeito de 1ª passagem no fígado onde é biotransformada antecipando a sua distribuição no organismo [2].

Para a TFMPP, a concentração plasmática máxima é de 24 ng/mL e é obtida 90 minutos após o consumo de uma dose oral de 60 mg [30], sendo o  $t_{1/2}$  de 66 minutos.

Quanto à MeOPP, a dose estimada para a sua utilização como substância recreativa é de 1mg/Kg [2].

### 2.3.2 Distribuição

Distribuição é o processo pelo qual os compostos absorvidos são distribuídos pelos vários órgãos podendo produzir efeitos, ser armazenados ou eliminados [31].

Uma vez absorvidas, as piperazinas distribuem-se entre os eritrócitos e o plasma, e neste último, entre a fracção aquosa e a proteica. A ligação da mCPP e TFMPP às proteínas plasmáticas é fraca, 30 a 40% [32, 33]. Para a BZP e MeOPP não existem dados publicados.

No geral, para as 1-arilpiperazinas, a razão entre as concentrações sanguíneas e plasmáticas (razão sangue/plasma) é próxima da unidade; por exemplo, para a mCPP é de 1,1, revelando uma distribuição equitativa entre os glóbulos vermelhos e o plasma. Estudos realizados em ratos revelam que o volume de distribuição (VD) da mCPP é de 4,0 L/kg e da TFMPP é de 16,2 L/kg, indicando assim uma distribuição tecidual extensa [32, 33].

Após administração *i.v.* as piperazinas distribuem-se em grande extensão nos rins, fígado e pulmões e em menor quantidade no coração e músculo-esquelético.

As concentrações encontradas no SNC são sempre mais elevadas quando comparadas com as concentrações no sangue [2].

### 2.3.3 Biotransformação e Eliminação

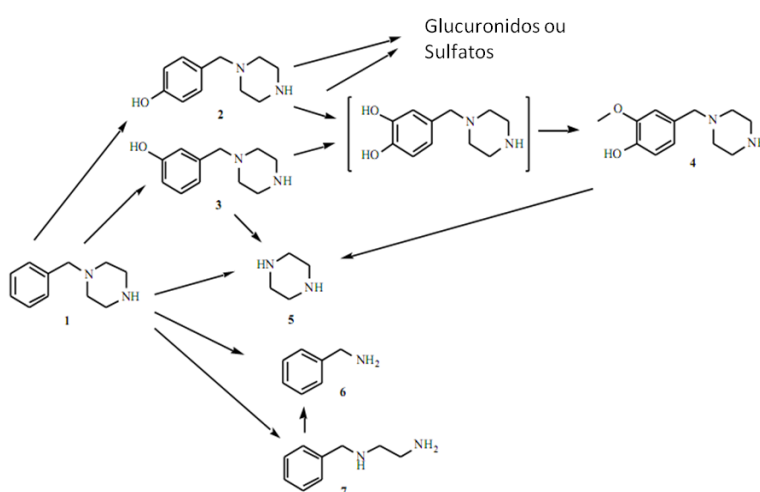
Biotransformação refere-se ao processo pelo qual os compostos lipofílicos (e como tal dificilmente excretados) são modificados quimicamente (metabolizados) no organismo através

de reacções enzimáticas, com formação de compostos mais hidrofílicos. Estes são mais rapidamente excretados na urina, saliva e suor, entre outros [31].

No que diz respeito ao processo de biotransformação das piperazinas, as principais reacções na Fase I são a hidroxilação aromática simples para a BZP, TFMP e mCPP, e O-desmetilação aromática para a MeOPP. Quanto à hidroxilação aromática esta consiste na introdução de grupos hidroxilo no anel aromático com posterior formação das respectivas hidroxi-piperazinas. Na reacção de O-desmetilação, dá-se a perda de um grupo metilo através da quebra da ligação éter-benzílica, transformando a MeOPP num metabolito hidroxilado [17, 34].

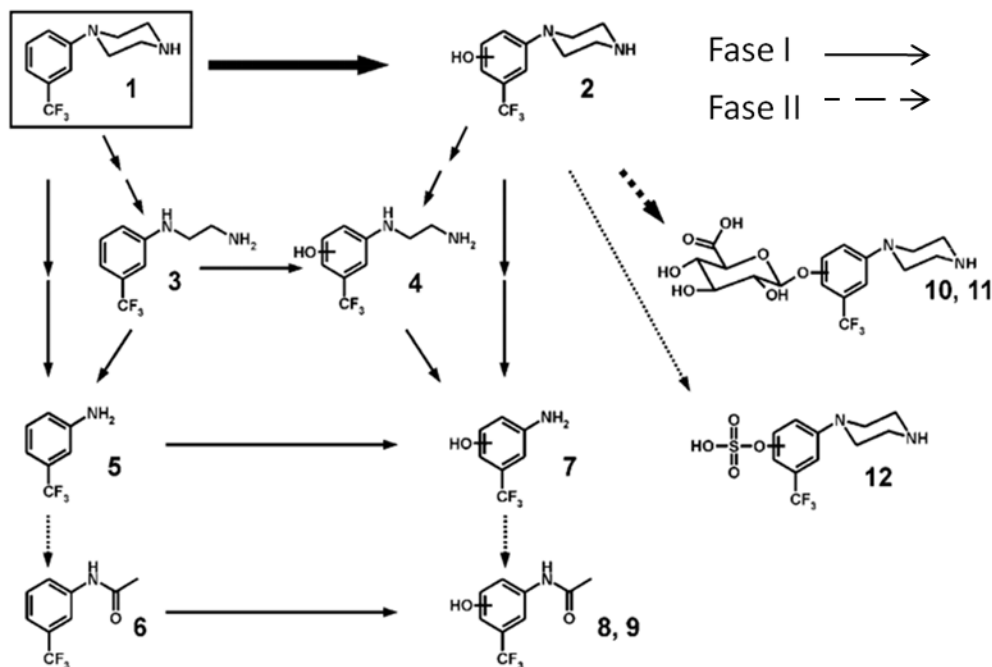
Nas reacções de Fase II, ocorre a conjugação com o ácido glucurónico (glucuronidação) ou com o radical sulfato dos metabolitos hidroxilados (sulfatação) através da uridina difosfato (UDP) glucuronosiltransferases (UGT) e sulfotransferases, respectivamente [35].

Ao contrário das outras piperazinas, a BZP não é extensivamente metabolizada, sendo eliminada na urina sob a forma inalterada. Apesar disso, a percentagem de BZP eliminada na urina nas 48 horas seguintes à sua administração representa 6,7% da dose consumida e passado esse tempo o composto já não é detectado [2]. No plasma pode ser detectada até 30 horas após o consumo de uma dose oral [36]. Staack *et al.* [37] referem que alguns metabolitos são excretados como conjugados de ácido sulfúrico e/ou glucurónico [15], sendo detectados na urina decorridas 48 horas após a sua administração, tendo-se que a 4-OH-BZP (figura 7) [34] e a 3-OH-BZP (figura 7) [34], representam respectivamente 0,43% e 0,02% da dose consumida [2].



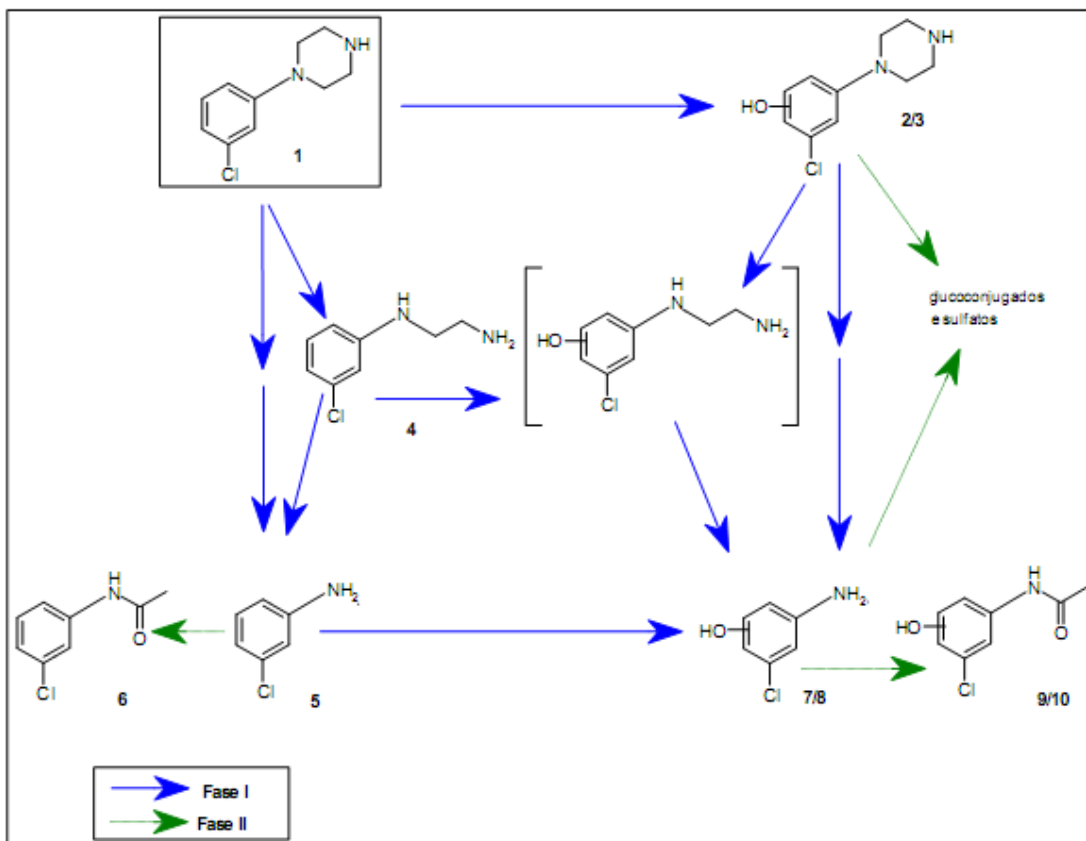
**Figura 7.** Representação esquemática do metabolismo da BZP: (1) BZP; (2) 4-OH-BZP; (3) 3-OH-BZP; (4) 1-(4-hidroxi-3-metoxi-benzil)piperazina; (5) piperazina; (6) benzilamina; (7) N-benziletilenodiamina [34].

Quanto à TFMPP (figura 8) [34], esta é largamente metabolizada pelo organismo e eliminada na urina sob a forma alterada [34, 37], representando 0,7% da dose administrada [2], sendo a 4-hidroxi-trifluorometilfenilpiperazina o seu metabolito principal [2, 21]. A principal reacção metabólica é a hidroxilação aromática a hidroxi-TFMPP seguida de glucuronidação parcial ou sulfatação. A degradação do heterociclo piperazínico através da dupla N-desalquilação leva à formação da N-(3-trifluorometilfenil)etilenodiamina ou da N-(3-trifluorometilfenil)-etilenodiamina (figura 8) [15, 34, 37].



**Figura 8.** Representação esquemática do metabolismo da TFMPP em ratos: (1) TFMPP; (2) hidroxi-trifluorometilfenilpiperazina (OH-TFMPP), 2 isómeros; (3) N-(3-trifluorometilfenil)etilenodiamina; (4) N-(hidroxi-3-trifluorometilfenil)etilenodiamina; (5) 3-trifluorometilanilina; (6) N-acetil-3-trifluorometilanilina; (7) hidroxi-3-trifluorometilfenilamino; (8,9) N-acetil-hidroxi-3-trifluorometilfenilamino; (10,11) conjugação com o ácido glucurónico e com sulfatos (12) [34].

Estudos realizados em urina de ratos confirmaram a descoberta de um extenso metabolismo da mCPP e da formação do hidroxi-mCPP (figura 9) como principal metabolito urinário [34]. À semelhança da BZP e TFMPP, a mCPP também sofre hidroxilação aromática seguida de degradação da piperazina heterocíclica por dupla N-desalquilação, dando origem a N-(3-clorofenil)etilenodiamina ou a 3-cloroanilina (figura 9) [2].



**Figura 9.** Representação esquemática do metabolismo da mCPP nos ratos: (1) mCPP; (2,3) hidroxiclороfenilpiperazina, 2 isómeros; (4) N-(3-clorofenil)etilenodiamina; (5) 3-cloroanilina; (6) N-acetil-3-cloroanilina; (7,8) hidroxil-3-cloroanilina; (9,10) N-acetil-hidroxil-3-cloroanilina [2].

A MeOPP, como as outras duas fenilpiperazinas, também é extensivamente metabolizada [34]. No entanto, o processo metabólico mais importante para este composto é a O-desmetilação do grupo metoxilo do anel aromático [2]. O produto formado, 1-(4-hidroxifenil)piperazina, é o seu metabolito mais abundante que é subsequentemente conjugado com o ácido glucurónico e sulfatos [2, 34].

De um modo geral, a biotransformação de tóxicos é realizada enzimaticamente, sendo as reacções da Fase I catalisadas por enzimas do citocromo P450 e que estão localizadas no retículo endoplasmático dos hepatócitos. O rim, o tracto gastrointestinal e os pulmões também podem apresentar capacidade metabólica [2]. O citocromo P450 apresenta na sua constituição várias isoenzimas, entre as quais a CYP 2D6, CYP 3A4 e a CYP 1A2 que são as principais envolvidas no metabolismo das piperazinas. No que respeita à hidroxilação aromática da mCPP e da TFMP e à O-desmetilação da MeOPP, estas são catalisadas exclusivamente pela CYP 2D6 [2].

Relativamente à eliminação destas drogas, a principal via é a renal, sendo eliminadas na urina sob a forma inalterada em quantidade reduzida, inferior a 1%, para os compostos menos hidrofílicos (mCPP e TFMPP) [2]. 24 horas após administração, verifica-se a presença na urina de 0,3% e 0,5% da dose administrada para a TFMPP e mCPP respectivamente [2, 23].

A TFMPP foi detectada em amostras de urina após 24 horas, sendo que 0,58% da dose foi excretada por esta via e 0,18% na forma inalterada. Os restantes 0,4% foram excretados sob a forma de N-glucuronido [38].

Quanto à BZP, são referidas percentagens que variam entre 5 e 30% na taxa de excreção urinária da droga na forma inalterada [39].

## 2.4 Mecanismo de acção das piperazinas

As piperazinas são classificadas como agonistas de acção indirecta das sinapses noradrenérgicas, dopaminérgicas e serotoninérgicas, provocando assim os mesmos efeitos neurotóxicos que as anfetaminas ou a MDMA [21]. Estas acções resultam da inibição da recaptação dos neurotransmissores [24, 37]. Desta forma, as piperazinas induzem lesões nos terminais nervosos serotoninérgicos. Os consumidores destas drogas de abuso apresentam uma redução significativa de receptores serotoninérgicos e do respectivo transmissor, comprovando os efeitos neurodegenerativos nos seres humanos [21].

De acordo com o mecanismo da acção biológica da MDMA, postula-se que as piperazinas actuam ao nível dos neurónios serotoninérgicos, promovendo a libertação da serotonina por substituição ao nível do transportador SERT (transportador pré-sináptico da serotonina) e apresentando diversas fases excitatórias. Na primeira fase, as piperazinas penetram nas vesículas sinápticas e impulsionam o fluxo de serotonina (figura 10). Na segunda fase, o aumento de serotonina deve-se à inibição da degradação metabólica do neurotransmissor pela MAO ao nível da mitocôndria. A terceira fase caracteriza-se por um conjunto de sinais celulares, tais como inibição da biossíntese e armazenamento da serotonina nas vesículas, estimulação da libertação da serotonina na fenda sináptica, estimulação dos receptores pós-sinápticos e inibição do sistema de captação neuronal da serotonina. Por fim, a quarta e última fase representa um estado de taquifilaxia, ou seja, um esgotamento das reservas de serotonina, induzindo as alterações psicóticas referidas anteriormente [40].



Figura 10. Imagem ilustrativa do mecanismo de acção de drogas de abuso do tipo das piperazinas. (Adaptado de [www.drugabuse.com](http://www.drugabuse.com))

Este modo de acção semelhante das piperazinas e das drogas estimulantes do tipo das anfetaminas apresenta o efeito desejado de euforia, estado e alerta e sociabilidade, alcançando assim a sua condição de *party pills* [15].

As propriedades psicoactivas de compostos contendo piperazina são causadas pela sua capacidade de se ligar aos receptores de serotonina, sendo que o mecanismo de acção molecular destas é responsável por um aumento de 5-HT no SNC envolvendo a inibição da recaptação sináptica do neurotransmissor pela BZP, TFMP e mCPP. A BZP liga-se a receptores 5-HT<sub>2A</sub> e causa leves efeitos alucinogénicos quando tomada em doses elevadas, enquanto a ligação a receptores 5-HT<sub>2B</sub> explica os efeitos secundários periféricos como dores de estômago e náuseas uma vez que este receptor está densamente disponível no intestino. Ao ligar-se aos receptores 5-HT<sub>3</sub>, a BZP causa efeitos secundários comuns como cefaleias, já que este receptor está envolvido no desenvolvimento das enxaquecas [24, 34, 37].

Os efeitos estimulantes da BZP devem-se em grande parte ao seu efeito sobre a transmissão neuronal dopaminérgica demonstrada pela actividade agonista nos receptores pós-sinápticos de dopamina (DA) [30]. Estudos em animais realizados por Bauman *et al.* [21] demonstram que a BZP estimula a libertação e inibe a recaptação da dopamina, serotonina (5-HT) e noradrenalina (NA), predominando os efeitos dopaminérgicos e serotoninérgicos. No entanto, a libertação de noradrenalina actua como antagonista do adrenoceptor  $\alpha_2$ , sendo esta uma possível causa de taquicardia e afins efeitos fisiológicos [30]. Durante estes estudos, verificou-se ainda que a BZP era menos potente que a MDMA, a metanfetamina, ou anfetamina [15, 21].

Quanto à TFMPP, esta tem efeitos similares ao LSD e, como este, também actua numa série de subtipos de receptores 5-HT, como por exemplo 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1C</sub> e 5-HT<sub>2</sub> [30]. Os seus efeitos são quase exclusivos do sistema serotoninérgico, e por esta razão tem sido amplamente utilizada como biomarcador da actividade da serotonina [23]. Como agonista do 5-HT<sub>1B</sub>, tem efeitos no sistema nervoso simpático, aparecendo em efeitos excitatórios que são acompanhados por hipertensão e taquicardia [23].

A mCPP é o composto mais estudado. O mecanismo de acção ocorre devido a ser agonista do receptor de serotonina pós-sináptico. A mCPP apresenta interacções agonistas dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, e/ou 5-HT<sub>1B</sub>. Têm sido também relacionados com este composto efeitos como libertação de serotonina através de mecanismos dependentes de transportadores (SERT), interacções agonistas e antagonistas com diferentes receptores de serotonina, inibição da recaptação de serotonina, ligeira libertação de dopamina, bem como interacções com receptores dopaminérgicos e adrenérgicos [20]. Os seus efeitos negativos, como ansiedade, dores de cabeça e perda de apetite são provavelmente mediados pela sua acção nos receptores 5-HT<sub>2C</sub> [41-43], enquanto os seus efeitos alucinogénicos em elevadas doses são causados pela activação do 5-HT<sub>2A</sub>.

Outros efeitos como náuseas e hipoactividade podem ser resultado do aumento da actividade do 5-HT<sub>2C</sub> e de uma estimulação de 5-HT<sub>3</sub> [44, 45].

Quando consumidas em conjunto, estas drogas são ainda responsáveis por elevados níveis de DA e 5-HT, um efeito semelhante ao da MDMA. Os níveis de DA e 5-HT libertados a partir de uma dose combinada de BZP e TFMPP são muito maiores do que os efeitos individuais de BZP e TFMPP sugerindo uma interacção farmacodinâmica em animais [15, 21].

Quanto à MeOPP, foi realizada uma pesquisa bibliográfica na base de dados bibliográficos de pesquisa científica *PubMed* (da National Library of Medicine) com a palavra chave “1-(4-methoxyphenyl)piperazine”, e nenhum dos artigos encontrados aborda a acção farmacológica do composto.

## 2.5 Efeitos tóxicos

As piperazinas, como drogas que são, para exercerem a sua acção farmacológica e para que consigam provocar uma resposta farmacodinâmica (principalmente no SNC), precisam de atravessar a barreira hematoencefálica. Assim, a sua actividade central é determinada pela velocidade e extensão com que conseguem penetrar no tecido nervoso, estando estes factores relacionados com as características lipofílicas dos compostos, a sua ligação às proteínas plasmáticas e a sua constante de ionização [2].

Como referido, devido ao seu modo de acção semelhante ao da MDMA, estudos em animais e humanos têm demonstrado que os efeitos farmacológicos da BZP são qualitativamente semelhantes aos das anfetaminas, embora com potência inferior, e podem originar taquicardia e aumento da pressão arterial sistólica [15, 23]. Consumidores de BZP descrevem efeitos como euforia, aumento do estado de alerta e um sentimento geral de bem-estar. A percepção das sensações, tais como cor, sabor ou a música também pode ser subjectivamente aumentada [15, 18].

No que diz respeito à TFMPP os efeitos são classificados como estando situados entre os da MDMA e os efeitos psicadélicos do LSD [5, 24, 34, 37].

Outros efeitos secundários são a desidratação, convulsões, náuseas leves a graves, sintomas gripais, rigidez do pescoço, cansaço, ansiedade, dores musculares, enxaqueca, bem como insónia, perda de apetite, ressaca severa após passados os efeitos, midríase, estado de alerta acentuado, prurido, confusão, agitação, tremor, distonia, tonturas, dor no peito, taquicardia, hipertermia, hipertensão arterial, palpitações, hiperventilação e problemas urinários (retenção) [15]. Os efeitos tóxicos mais graves associados com estas drogas incluem psicose, toxicidade renal e convulsões, agitação, hiponatremia, palpitações e ataques de pânico [15, 46].

As piperazinas apresentam por si próprias os efeitos acima referidos. No entanto, na maior parte das vezes os consumidores utilizam estas drogas em combinação, ou até mesmo uma combinação destas com outras drogas, com o objectivo de potenciarem os seus efeitos estimulantes, o que aumenta de igual forma os seus efeitos tóxicos.

A administração de uma mistura de BZP e TFMPP - uma combinação que ocorre várias vezes - origina efeitos entactogénicos (sensação de proximidade, de empatia, perda de praticamente todos os medos) semelhantes à MDMA, originando ainda efeitos secundários como insónia, ansiedade, náuseas e vómitos, dores de cabeça persistentes, sintomas gripais e algumas vezes psicose (pânico e paranóia extrema) [15, 18, 30]. Austin *et al.* descreveram um caso de psicose aguda quando a BZP foi administrada em conjunto com a cannabis [15].

Baumann *et al.* sugerem que a combinação de BZP e TFMPP leva à libertação de DA e 5-HT dos neurónios através de mecanismos dependentes de transportadores, criando experiências idênticas às que se observam aquando do consumo de MDMA, devido aos seus mecanismos semelhantes [15]. No entanto, a descoberta mais significativa desta pesquisa foi o sinergismo entre BZP e TFMPP, pelo que estas drogas quando tomadas em conjunto levam a uma maior libertação de DA do que quando a droga é consumida isoladamente [15]. Entre as experiências descritas pelos autores estavam uma sensação de rubor, ondas de euforia, e leves efeitos visuais (semelhante a uma dose baixa de mescalina ou LSD) [15].

Quando consumidas em conjunto com o álcool, os efeitos secundários das drogas tendem a ser significativamente agravados, sobretudo as cefaleias, náuseas e ressacas [15].

Outros efeitos secundários da administração de piperazinas em doses altas incluem alucinações, convulsões, e depressão do SNC [18].

No que diz respeito aos efeitos comportamentais, Baumann *et al.* descrevem a BZP como um potente estimulante locomotor que provoca aumentos na deambulação (andar em círculos), efeitos semelhantes aos das anfetaminas, o que não foi observado com a TFMPP [21]. A administração repetida de BZP produziu ainda um aumento da hiperactividade, movimentos involuntários da cabeça, comportamentos estereotipados e tempo de reacção diminuído [25]. Os problemas psicológicos descritos neste estudo foram perda de sono, de energia, pensamentos estranhos, alterações de humor, confusão e irritação [25]. Quanto aos efeitos atribuídos à mCPP, estes incluem efeitos psicológicos de natureza subjectiva, sentimentos positivos, em particular uma sensação de bem-estar, empatia, euforia [47], comparáveis aos efeitos positivos da MDMA, e os efeitos estimulantes e alucinogéneos são similares aos induzidos após consumo de MDMA, LSD e psilocibina.

Por outro lado, a mCPP induz também efeitos subjectivos negativos como a ansiedade, a confusão, disforia [4] e alterações súbitas do estado de ânimo [2, 48].

Em humanos esta droga desencadeia ansiedade, depressão, perda de noção da realidade e ataques de pânico em indivíduos saudáveis [49]. Em indivíduos com distúrbios psiquiátricos, a administração do composto agrava os sintomas da doença, uma vez que provoca ataques de pânico em pacientes com perturbações de pânico, obsessão em doentes obsessivo-compulsivos, agorafobia, sintomas positivos em doentes com esquizofrenia e induz sintomas físicos de ansiedade [2].

### 3. Microextração em seringa empacotada (MEPS)

#### 3.1 Introdução

A análise de amostras biológicas líquidas como por exemplo soro, plasma, sangue e urina, ou sólidas como o cabelo, por técnicas cromatográficas exige regra geral um pré-tratamento da amostra. Isto deve-se à sua incompatibilidade com os sistemas cromatográficos, ao facto de muitas das substâncias em análise se encontrarem em concentrações vestigiais e ainda à complexidade das matrizes envolvidas, que podem conter vários tipos de interferentes (e.g. ácidos, bases, sais, proteínas e outros compostos orgânicos) com propriedades semelhantes aos analitos de interesse [50, 51].

O objectivo de qualquer tratamento prévio de amostras é o isolamento do composto de interesse para que possa ser introduzido e separado num sistema cromatográfico com selectividade e sensibilidade adequadas [51].

Uma vez que os compostos a analisar se encontram em pequenas concentrações, a preparação da amostra permite ainda aumentar a sensibilidade por concentração dos analitos no extracto obtido; a preparação das amostras biológicas pode envolver ainda a hidrólise dos compostos conjugados e a precipitação das proteínas [52].

Os principais métodos descritos para o isolamento e concentração dos analitos em amostras biológicas são a extração líquido-líquido (LLE), a extração em fase sólida (SPE), a microextração em fase sólida (SPME) e a MEPS [53], sendo que para o isolamento e concentração das piperazinas, os principais métodos utilizados são a LLE e a SPE. A LLE é descrita como a técnica mais utilizada para a extração das piperazinas em amostras biológicas, embora a natureza polar destas drogas dificulte o processo [2].

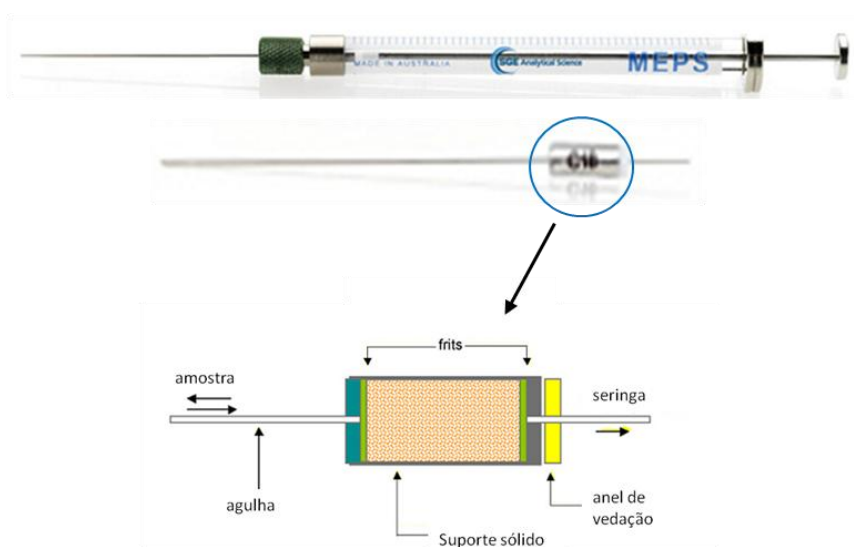
Por outro lado, as técnicas convencionais de preparação de amostras como a LLE ou a SPE requerem grandes volumes de amostra para analisar, requerendo também um elevado consumo de solventes orgânicos e de tempo. De facto, o passo limitante de qualquer determinação analítica é a preparação da amostra. Numa tentativa de ultrapassar estes problemas, têm surgido técnicas de microextração como uma promissora abordagem, tendo inclusivamente algumas delas vindo a ser aplicadas na determinação de drogas de abuso em amostras biológicas [51, 53].

Para a realização deste trabalho optou-se pela MEPS, uma vez que é uma técnica de extração que se encontra em franca expansão na preparação de amostras. Por outro lado, não existe na literatura científica qualquer trabalho realizado com esta técnica no isolamento e concentração de piperazinas.

## Determinação de novas drogas de abuso com recurso à microextração em seringa empacotada

A MEPS é uma técnica desenvolvida nos laboratórios da Astra Zeneca em 2004 [54, 55], sendo um método muito promissor para a extração de drogas e metabolitos a partir de amostras biológicas [54]. Esta técnica usa os princípios básicos da SPE para obter um processo simples, robusto e rápido, com um consumo mínimo de solventes e adsorventes, sendo considerada como a miniaturização da técnica convencional de SPE [55, 56].

O aparelho de extração da MEPS disponível comercialmente [57] consiste basicamente em duas partes, uma seringa de 100-250  $\mu\text{L}$  e um dispositivo cilíndrico (BIN - *Barrel Insert and Needle Assembly*) onde está empacotado aproximadamente 1 mg de um material sólido (fase estacionária), protegido por dois discos (*frits*) quimicamente inertes de politetrafluoroetileno (PTFE), polietileno ou estruturas de aço inoxidável (figura 11) [53, 58]. A extração ocorre no dispositivo cilíndrico, podendo a MEPS ser assim designada como uma pequena “coluna de cromatografia líquida inserida numa seringa” [59].



**Figura 11.** (A) Seringa de MEPS (250  $\mu\text{L}$ ) da SGE com coluna de extração; (B) Representação esquemática da coluna de extração [60].

A fase de extração da MEPS baseia-se num sistema de passagem dupla, no qual a amostra é aspirada várias vezes pela fase estacionária favorecendo a retenção dos analitos no suporte sólido. Após a extração, o material sólido é lavado com um solvente antes da eluição dos compostos alvo [55].

Esta técnica difere da SPE convencional pelo facto de que o suporte sólido onde ocorre a extracção está inserido directamente na seringa e não numa coluna separada; por outro lado, o volume de solvente usado na eluição dos analitos é de tal modo reduzido que pode ser injectado directamente em sistemas cromatográficos, como a cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida (LC), o que facilita assim o acoplamento *on-line* a estes sistemas [54]. Por outro lado, a preparação e análise de amostras pode ser efectuada recorrendo a um equipamento comum, não sendo portanto necessária qualquer modificação do sistema cromatográfico [55, 60].

Comparando com outras técnicas de extracção como a LLE e a SPE, a MEPS apresenta diversas vantagens. É uma técnica totalmente automatizada pois permite que os passos de processamento de amostras, extracção e injeção possam ser realizados *on-line* usando a mesma seringa. Tem ainda como vantagem o facto de ser uma técnica de extracção rápida, uma vez que permite preparar uma amostra em apenas dois ou três minutos [53].

No que diz respeito ao suporte sólido de MEPS, este pode ser reutilizado várias vezes após a etapa de lavagem. Uma coluna pode ser usada mais do que 100 vezes com amostras de plasma ou urina e mais de 400 vezes para amostras de água, o que não acontece com as colunas de SPE que são de uso único [54]. O consumo de solventes orgânicos tanto na solução de lavagem como na de eluição é mínimo, e tem um baixo custo por análise [54, 55, 61].

Ainda, a MEPS é uma técnica robusta, que pode ser aplicada não só a amostras mais complexas como plasma e urina, como também a amostras com conteúdo elevado de solventes orgânicos [53, 62]. Permite trabalhar com volumes de amostra muito mais reduzidos que a SPE ou a LLE [54]. Tem ainda como vantagens o facto de se obterem rendimentos de extracção elevados (60 - 90%) quando comparados por exemplo com a SPME (1 - 25%) [53, 63, 64].

### 3.1.1 Mecanismo de extracção

O objectivo principal da MEPS consiste na remoção dos compostos interferentes presentes numa matriz, permitindo simultaneamente o isolamento e a concentração selectiva dos analitos [61, 64]. A separação dos compostos existentes na amostra fundamenta-se no equilíbrio de distribuição do analito entre as duas fases envolvidas no processo extractivo: uma fase sólida, constituída por um sólido adsorvente e uma fase líquida, onde está contido o analito [2].

No processo de MEPS, faz-se passar a amostra líquida através de aspirações por uma coluna que contém no seu interior o sólido adsorvente; o analito é inicialmente retido pela fase sólida, ficando isolado da matriz, e os interferentes são eliminados por limpeza da coluna. De seguida o composto de interesse é eluído da coluna por intermédio de um solvente orgânico, obtendo-se um extracto que contém os analitos concentrados.

Existem quatro tipos básicos de mecanismos extractivos: fase reversa, fase normal, troca iónica e exclusão molecular, sendo que o modo de separação mais utilizado em MEPS é o de fase reversa. Num modo de separação de fase reversa a fase estacionária utilizada é apolar, ou seja, as partículas adsorventes são hidrofóbicas; como exemplos desta fase estacionária temos a sílica ligada a grupos octadecilsilano (C18), etilsilano (C2) ou octilsilano (C8) [50]. Os solventes de eluição geralmente utilizados são apolares, podendo no entanto ser usados solventes polares como metanol ou acetonitrilo.

No que toca à MEPS de troca iónica (SCX), e à semelhança do que acontece com a SPE, os suportes sólidos contêm grupos funcionais de troca catiónica ou aniónica que são responsáveis pelas interacções electrostáticas que acontecem entre os compostos ionizados e o adsorvente com grupo funcional de carga oposta [2, 65]. Neste tipo de mecanismo extractivo os solventes de eluição são soluções ácidas, básicas ou tampões de força iónica elevada, convertendo o analito iónico na sua forma molecular. Os iões com elevada selectividade para os grupos iónicos da fase estacionária, os contra-iões, vão competir com o analito para os locais da troca iónica, assegurando desta maneira a sua eluição [2].

Os mecanismos de retenção são idênticos aos envolvidos na HPLC [50], já que os materiais adsorventes usados na MEPS são na maioria dos casos, semelhantes aos encontrados nas colunas cromatográficas, sendo constituídos por sílica. A sílica é um material sólido, amorfo e poroso cuja superfície química é ocupada por grupos hidroxilo, designados de silanol (figura 12), que se encontram no final da cadeia do polímero e são os responsáveis pelas propriedades químicas da sílica e pela ligação dos vários compostos [66].

Na MEPS, os grupos silanol isolados são os principais responsáveis pela maior parte dos processos de adsorção, conseguindo reter fortemente os compostos com grupos funcionais polares e fazer com que a sua eluição seja muito mais difícil. As bases, em particular, são mais fortemente retidas, já que o silanol é um grupo ácido e as interacções ácido/base são similares às reacções de troca iónica [66].

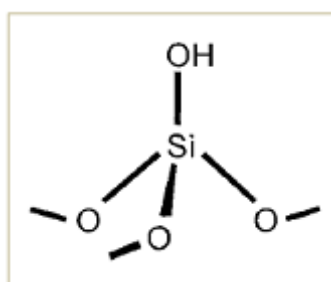
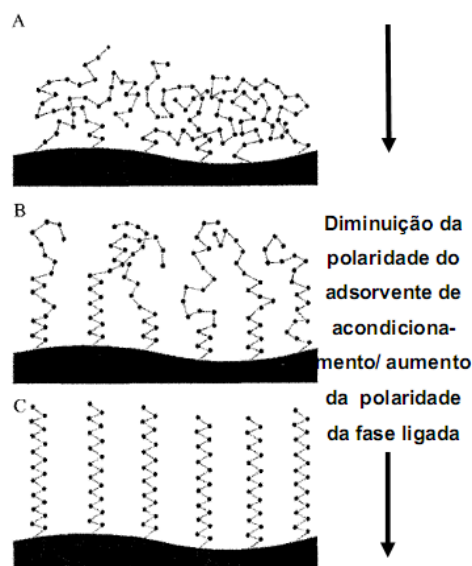


Figura 12. Silanol

### 3.1.2 Acondicionamento dos adsorventes

Para se obter uma maior eficiência no processo de extração, o material adsorvente deve ser previamente acondicionado, uma vez que, quando seco, o material com uma fase  $C_{18}$  ligada está orientado de maneira completamente aleatória para a superfície (figura 13-A) [66].



**Figura 13.** Três modelos de uma fase  $C_{18}$  ligada à sílica: (A) sem acondicionamento, (B) parcialmente acondicionada, (C) completamente acondicionada [66].

Um acondicionamento perfeito acontece quando o adsorvente fica completamente exposto, figura 13-C, permitindo a interação máxima entre o soluto e a fase orgânica ligada, acondicionamento este que pode ser conseguido ao utilizar solventes menos polares que o metanol, como por exemplo o acetonitrilo ou isopropanol [66].

As interações hidrofóbicas que se estabelecem entre os analitos, com características apolares e a fase estacionária ocorrem por intermédio de forças de dispersão/Van der Waals. A ruptura destas interações é conseguida através de solventes ou mistura de solventes com carácter apolar. Alguns solventes polares com características suficientemente apolares para romper a ligação apolar e, como tal, provocar a eluição do composto do adsorvente são o acetonitrilo e metanol [67].

### 3.1.3 Fases estacionárias usadas na MEPS

Como já foi referido anteriormente, existem semelhanças entre as fases estacionárias usadas na MEPS e na cromatografia líquida.

As fases estacionárias apolares utilizadas em MEPS são C18, C8, C2, SIL (sílica), sendo a C18 a mais popular entre elas. No entanto, esta situação alterou-se quando foram introduzidas no mercado fases estacionárias constituídas por sílica modificada com grupos funcionais dadores ou aceitadores de electrões, imobilizados na sua superfície.

A retenção do analito na superfície do adsorvente será tanto mais significativa quanto maior for a área superficial da fase estacionária, exigindo uma estrutura porosa. Devido a estes factores, a sílica apresenta-se como um adsorvente muito útil uma vez que ostenta estrutura porosa e rígida e apresenta uma área superficial elevada. Características como a estabilidade aos solventes, aquosos ou orgânicos, a grande diversidade dos grupos funcionais que podem ser ligados à sua superfície e a obtenção de extractos limpos constituem vantagens acrescidas da sua utilização. No entanto, a recuperação obtida é geralmente inferior quando comparada com adsorventes poliméricos, particularmente para analitos polares. Outra desvantagem é a fraca estabilidade fora de um intervalo reduzido de valores de pH.

Paralelamente ao que acontece na SPE, estes adsorventes poliméricos possuem características hidrofóbicas devido à sua natureza polimérica constituída por uma grande percentagem de carbono, o que lhes confere uma maior área superficial e maior capacidade quando comparados com as fases de sílica, podendo ainda ser aplicados numa gama alargada de pH [2].

Este tipo de fases estacionárias de natureza polimérica ou de sílica possui grupos funcionais aniónicos ou catiónicos ligados que podem ser fortes ou fracos consoante o seu estado de ionização face aos valores de pH [58]. No entanto, este tipo de fases é frequentemente aplicado em associação com fases estacionárias de fase reversa (extração de modo misto). Como exemplo disso temos a M1, uma fase estacionária simultaneamente apolar (80% de C8) e de troca catiónica forte (20% de SCX) baseada em sílica modificada com ácido sulfónico. Neste tipo de extração ocorrem dois mecanismos de retenção primários, onde uma única fase estacionária retém os analitos apolares por forças de Van der Waals e os compostos básicos por interações electrostáticas.

Para posterior eluição será necessário a utilização de um solvente orgânico adequado para eluir os compostos retidos por adsorção, e para aqueles que foram retidos por troca iónica a sua eluição será realizada com o auxílio de eluentes iónicos, ácidos ou básicos, mediante troca com um contra-íão presente no solvente ou por conversão à sua forma molecular [58].

Uma das mais promissoras aplicações desta fase estacionária de modo misto é o isolamento de drogas e metabolitos a partir de amostras de urina e sangue [58].

A tabela 2 resume os diferentes exemplos de fases estacionárias passíveis de utilização em MEPS.

Tabela 2. Fases estacionárias usadas em MEPS [50].

NÃO POLARES		
C18	Octadecilsilano	$\equiv \text{Si} - (\text{CH}_2)_{17} - \text{CH}_3$
C8	Octilsilano	$\equiv \text{Si} - (\text{CH}_2)_7 - \text{CH}_3$
C2	Etilsilano	$\equiv \text{Si} - \text{CH}_2 - \text{CH}_3$
POLARES		
SIL	Sílica	$\equiv \text{Si} - \text{OH}$
TROCA IÓNICA		
SCX	Benzenossulfonilpropilsilano	$\equiv \text{Si} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{SO}_3\text{H}^+$

### 3.1.4 Etapas do método de extracção

A MEPS compreende em geral as seguintes etapas: acondicionamento da fase estacionária, aspiração da amostra (adsorção do analito ao adsorvente), lavagem da fase estacionária (eliminação de interferentes), eluição dos analitos e posterior injeção no sistema cromatográfico, como se pode observar na figura 14.

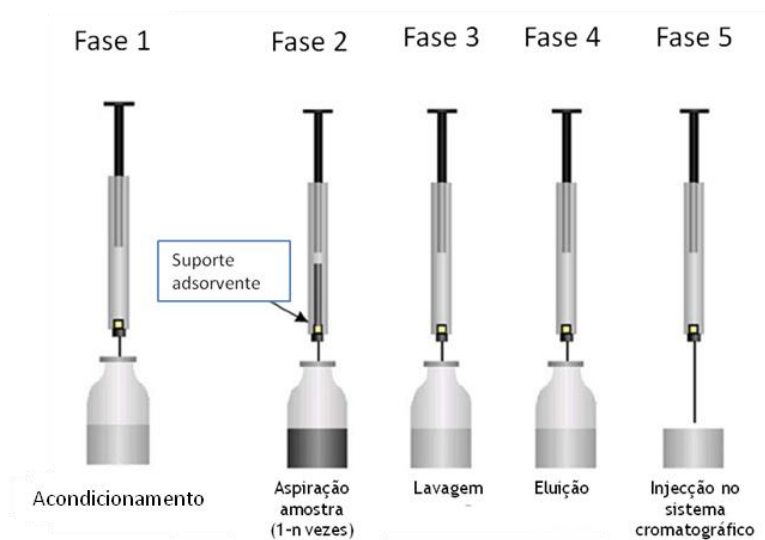


Figura 14. Etapas do processo de extração na MEPS [54].

Na etapa de acondicionamento da fase estacionária, o suporte sólido é activado com um solvente adequado, normalmente o metanol, que vai solvatar os grupos funcionais da fase estacionária permitindo assim a retenção dos analitos [53]. O ar presente na coluna é removido e os espaços vazios são preenchidos com solvente [58, 67]. Após passagem do solvente, é aplicada na coluna água ou tampões aquosos para equilibrar [58, 67].

De seguida a amostra que está diluída num solvente fraco (por exemplo, água) entra em contacto com a seringa sendo aspirada por esta, para que os analitos fiquem retidos na fase estacionária, retenção esta que ocorre por interações específicas com o adsorvente. Este processo pode ser repetido sucessivas vezes, de forma a concentrar os analitos no interior da seringa [53].

Na terceira etapa procede-se à lavagem da coluna com a finalidade de remover proteínas e outros interferentes que possam estar presentes na amostra. Os solventes usados nesta fase devem ser miscíveis com a fase estacionária, devendo ainda ter pouca afinidade para os analitos; são habitualmente utilizados água e tampões, para além de solventes orgânicos diluídos na solução de lavagem, de modo que a que se possa eliminar mais eficientemente os interferentes mais hidrofóbicos [58]. Este passo da extração é crítico, uma vez que o analito deve permanecer retido na fase estacionária e não ser eluído em conjunto com os interferentes.

Por último os analitos são eluídos com um solvente orgânico pelo qual têm afinidade, como por exemplo metanol, e injectados directamente no sistema cromatográfico [53]. O solvente ou mistura de solventes adequados devem ter capacidade de quebrar a interacção adsorvente - analito resultando na sua eluição. O solvente deve remover o menos possível outras substâncias sem interesse que estejam também adsorvidas na coluna [58, 67].

## 4. Análise de piperazinas em amostras biológicas

Na análise qualitativa e quantitativa de compostos orgânicos em matrizes biológicas, várias técnicas instrumentais têm sido desenvolvidas, em particular, as técnicas cromatográficas [50].

Tendo em conta que a amostra se apresenta como uma mistura constituída por compostos orgânicos diversos, sistemas cromatográficos como GC ou LC permitem separar os compostos orgânicos existentes na amostra. Ambos, em geral, envolvem a distribuição ou a partição dos analitos entre duas fases diferentes, uma fase estacionária e uma fase móvel. O estado físico desta última é o elemento de diferenciação entre as duas técnicas cromatográficas, respectivamente, um gás inerte e um líquido. No entanto, estas técnicas separativas não

permitem detectar os analitos, para tal, associam-se a sistemas de detecção como por exemplo: detector de ultravioleta (UV), electroquímico, de espectrometria de massa (MS), de fluorescência (FLD) [2].

No caso particular das piperazinas, estas podem ser analisadas pelas técnicas cromatográficas anteriormente mencionadas [2]. Na tabela 3, reúnem-se os vários métodos que têm sido publicados para a determinação deste tipo de compostos em amostras biológicas.

A pesquisa foi efectuada na base de dados da U.S. National Library of Medicine, National Institutes of Health (PubMed) utilizando as palavras-chave “*determination of piperazines in biological samples*”.

Determinação de novas drogas de abuso com recurso à microextração em seringa empacotada

Tabela 3. Revisão das metodologias analíticas que visam a determinação de piperazinas em amostras biológicas.

Referencia	Compostos	Amostra	Método de extração	Análise	Limite Quantificação (LOQ) /Limite Detecção (LOD)	Recuperação (%)
Wada, 2011	BZP, TFMPP	Plasma ratos (20 µL)	SPE	HPLC-FLD	LOQ: BZP-3 ng/mL, TFMPP- 15,2 ng/mL; LOD: 4,6 ng/mL	BZP-37,9 TFMPP- 49,8
Wolfhart, 2010	BZP, mCPP, MeOPP, TFMPP	Plasma (1 mL)	SPE	LC-MS/MS	LOD: BZP-5 ng/mL, MeOPP- 2,5ng/mL, mCPP-1ng/mL, TFMPP- 5ng/mL	BZP-72 MeOPP-90 mCPP-77 TFMPP-78
Guthery, 2010	BZP	Cabelo (20mg)	SPE	LC-MS/MS	--	--
Antia, 2010	BZP, TFMPP	Plasma (100 µL), urina (500µL)	--	LC-MS	LOQ: 10ng/mL	BZP - 94 TFMPP - 89
Barroso, 2010	TFMPP, mCPP, MeOPP	Cabelo (20mg)	SPE	GC-MS	LOQ: 0,05ng/mg	TFMPP - 96,5 mCPP - 97,2 MeOPP - 97,5
Dickson, 2010	BZP, TFMPP, mCPP	Urina (2mL)	LLE	GC-MS	LOQ/LOD: 0,025 mg/L	--
Mercolini, 2008	Trazodona e metabolitos (mCPP)	Plasma (--)	SPE	HPLC-UV	--	mCPP - 92%

Determinação de novas drogas de abuso com recurso à microextração em seringa empacotada

Patel, 2008	Trazodona e metabolitos (mCPP)	Plasma humano (500µL)	LLE	LC-MS/MS	LOD: Trazodona-10ng/mL, mCPP -0,2 ng/mL	mCPP - 83
Vorce, 2008	BZP, TFMPP	Urina (2mL)	LLE	LC-MS	LOQ/LOD: 0,1 mg/L	BZP - 97,8 TFMPP - 101,4
Wada, 2007	BZP, p-MeOPP, o-MeOPP	Plasma ratos (20 µL)	SPE	HPLC-FLD	LOQ: BZP-2 ng/mL LOD: BZP-0,57 ng/ml, p-MeOPP -47,7 ng/ml; o-MeOPP- 5,1 ng/ml	--
Tsutsumi, 2005	BZP, TFMPP	Urina humana (100 µL)	SPE	LC- MS	LOQ:10 ng/ml; LOD:5 ng/ml	BZP - 96 TFMPP - 99
Staack, 2002	BZP	Urina rato (5 mL)	LLE	GC-MS	--	--
Ming Yao, 2000	Nefazodona e metabolitos (mCPP)	Plasma (100 µL)	--	LC-MS	LOQ: 2 ng/mL	mCPP - 79
Ming Yao, 1998	Nefazodona, mCPP	Plasma (--)	LLE	LC-MS	LOQ: 2 ng/mL	mCPP - 86
Vatassery, 1997	Trazodona e metabolito (mCPP)	Plasma (500 µL)	LLE	HPLC-UV	--	mCPP - 74



## II. Parte experimental

### 1. Material e Métodos

#### 1.1 Padrões e reagentes

Os padrões de referência de dicloridrato de 1-benzilpiperazina, 1-(3-clorofenil)piperazina e cloridrato de 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina foram adquiridos à Lipomed (Arlesheim, Suíça); os padrões de dicloridrato de 1-(4-metoxifenil)piperazina e 1-(2-clorofenil)piperazina (oCPP - padrão interno) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).

O formato de amónio e o ácido acético (HPLC-grade) foram adquiridos à Sigma-Aldrich (Lisboa, Portugal). O metanol (Lichrosolv®) foi obtido através da Merck Co (Darmstadt, Alemanha). O hidróxido de amónio (NH<sub>4</sub>OH) (*pro analysis*) foi adquirido à J.T. Baker (Deventer, Holanda).

#### 1.2 Instrumentação

- Sistema de purificação de água Mili-Q Advantage A10® system da Millipore;
- Balança analítica da Sartorius - modelo CP225;
- Vortex Mixer da Labnet International - modelo 230V;
- Placa de agitação magnética da Selecta - modelo ASINCRO, J.P.;
- Câmara frigorífica da Dagard - refrigeração a 4 °C;
- Medidor de pH da Metrohm - modelo 744;
- Micropipetas automáticas da Gilson de 10, 100 e 1000 µL;
- Bomba de vácuo da GAST - modelo DOA-P505-BN (EUA);
- Câmara de congelação da Electrolux - modelo Inspire;
- Sistema de ultrasons da Elma - Transonic 460/H (Alemanha);
- Centrífuga Heraeus Multifuge IS-R- Thermo Electron Corporation, (Osterode, Alemanha);
- Agitador rotativo - modelo Movil-Rod, J.P. Selecta (Barcelona, Espanha);
- Seringa de MEPS (100-250 µL) da SGE - Analytical Science - Austrália, adquiridas à ILC (Porto, Portugal).

### 1.3 Materiais

- Colunas de MEPS SGE - Analytical Science, adquiridas à ILC (Porto);
- Fases estacionárias, C<sub>2</sub> (etilsilano), C<sub>8</sub> (octilsilano), C<sub>18</sub> (octadecilsilano), SIL (sílica não modificada) e M<sub>1</sub> (suporte troca catiónica - 80% C<sub>8</sub> e 20% SCX).

### 1.4 Soluções

As soluções padrão stock, individuais das substâncias em estudo, foram preparadas em metanol na concentração de 1 mg/mL. Para tal, pesaram-se 10 mg de cada composto e diluíram-se em metanol, num balão volumétrico de 10 mL de capacidade.

As soluções de trabalho destas substâncias nas concentrações de 10 e 1 µg/mL foram obtidas por diluição das respectivas soluções padrão stock em metanol. Todas estas soluções foram armazenadas a 4 °C e ao abrigo da luz.

Para preparação do formato de amónio 5 mM, pesaram-se 315,3 mg de formato de amónia e dissolvidas num balão volumétrico de 1000 mL com água MilliQ e a solução foi homogeneizada por inversão. Após preparada a solução esta foi filtrada sobre vácuo com filtros hidrofílicos de polipropileno de 0,2 µm de espessura e desgaseificada num banho ultrasónico.

Ácido acético 1% (100 mL): Pipetou-se 1 mL de ácido acético para um balão volumétrico de 100 mL de capacidade contendo 50 mL de água desionizada. Adicionou-se água até completar o volume e homogeneizou-se por inversão.

Amónia 5% em metanol (100 mL): Pipetaram-se 5 mL de NH<sub>4</sub>OH para um balão volumétrico de 100 mL de capacidade contendo 50 mL de metanol. Para obter o volume final de 100 mL adicionou-se metanol até aferir o balão e homogeneizou-se a solução por inversão.

Metanol 10% (100 mL): A um balão volumétrico de capacidade 100 mL, adicionou-se 10 mL de metanol e aferiu-se o volume com água desionizada. A solução foi homogeneizada por inversão.

## 1.5 Sistema cromatográfico e de detecção

Para a identificação dos compostos em estudo e a optimização do processo de extracção, a análise cromatográfica foi realizada usando um sistema de HPLC com uma bomba quaternária modelo 600, acoplado a um detector de fotodiodos (PDA) modelo 2996 e um injector manual com uma válvula *rheodyne* modelo 7725i e com um *loop* de 20 µL da Waters (Mildford, MA, EUA). A separação cromatográfica foi efectuada com uma coluna de fase reversa Xterra® MS C<sub>18</sub> de dimensões 150 x 4,6 mm i.d. e 0,5 µm de espessura da Waters (Ireland).

Para a validação do método usou-se um sistema *Ultra High-Performance Liquid Chromatography* (UPLC) modelo 1290, equipado com um detector de fotodiodos modelo 1260 e injector automático modelo 1260 da Agilent (Santa Clara CA, EUA). Os compostos foram separados numa coluna de fase reversa Zorbax 300 SB-C<sub>18</sub> (5 µm, 4,6x150 mm) da Agilent (Santa Clara CA, EUA) à temperatura ambiente (25 °C).

### 1.5.1 Condições cromatográficas

A fase móvel utilizada foi uma mistura de formato de amónio 5 mM (pH 6,4) e metanol na proporção 55:45 (v/v) tendo a eluição ocorrido em modo isocrático. O fluxo da fase móvel manteve-se constante a 0,8 mL/min. Os tempos de retenção (em minutos) foram de 3,9 para a MeOPP, 4,7 para a BZP, 7,5 para a mCPP e 10,7 para a TFMPP, obtendo-se uma boa separação cromatográfica.

O tempo total do cromatograma foi de 15 minutos. A detecção das piperazinas foi realizada aos seguintes comprimentos de onda; 204 nm para a BZP, 236 nm para a MeOPP, 208 nm para a mCPP e 246 nm para a TFMPP.

## 1.6 Amostras biológicas

As amostras de urina necessárias à prossecução deste trabalho foram obtidas a partir de voluntários do laboratório. Estas amostras foram refrigeradas a 4 °C.

## 1.7 Procedimento de extração otimizado

O procedimento de extração foi otimizado previamente, descrevendo-se de seguida as condições finais. Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  de urina foi fortificada com 25  $\mu\text{L}$  de padrão interno e diluída com 100  $\mu\text{L}$  de água desionizada. Agitou-se durante 30 segundos e procedeu-se à extração por MEPS.

Após acondicionamento prévio das colunas de extração com 250  $\mu\text{L}$  de metanol e 250  $\mu\text{L}$  de água, as amostras foram aspiradas 8 vezes pela seringa de extração MEPS. Após aspiração da amostra procedeu-se à lavagem da coluna com 250  $\mu\text{L}$  de ácido acético 1% e com 100  $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa de metanol a 10%. Os analitos foram eluídos com 50  $\mu\text{L}$  de uma solução metanólica de amónia a 5%.

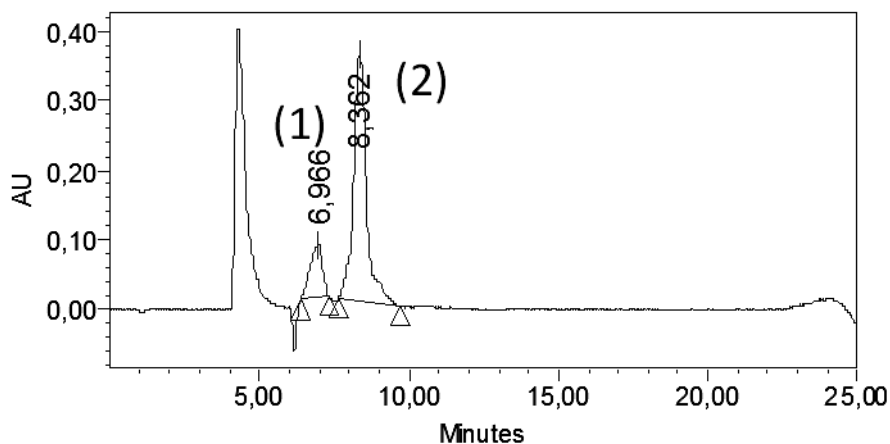
Após cada extração procedeu-se à lavagem da fase estacionária com 5x250  $\mu\text{L}$  de metanol e 4x250  $\mu\text{L}$  de água desionizada, evitando assim efeitos de *carryover* e acondicionando a coluna para a próxima extração.

## 2. Resultados e discussão

### 2.1. Optimização da fase móvel

Com a finalidade de melhorar a separação cromatográfica dos vários compostos em estudo, foi necessário otimizar a composição da fase móvel. Desta forma, e com base na literatura científica, foram avaliadas várias composições, usadas em estudos envolvendo derivados dos compostos em estudo, em modo isocrático e com diferentes fluxos [11, 18].

Inicialmente, foi experimentada uma fase móvel cuja composição era acetato de amónio 1mM, ácido fórmico e acetonitrilo (39:1:60, v/v/v) a um pH de 3,1 e com um fluxo de 0,5 mL/min. Usando esta fase móvel, como se pode observar na figura 15, não foi possível obter uma boa separação e identificação dos compostos, já que eluíam ao mesmo tempo.



**Figura 15.** Cromatograma das piperazinas em estudo utilizando uma fase móvel de acetato de amónia 1mM, ácido fórmico e acetonitrilo (39:1:60, v/v/v): (1) MeOPP, (2) mCPP e TFMP.

Posteriormente, optou-se por utilizar uma combinação de acetato de amónio 1 mM e metanol (40:60, v/v). Usando esta fase móvel voltou a não ser possível obter uma boa separação, uma vez que a BZP co-eluíu com a MeOPP (3,6 min) (figura 16).

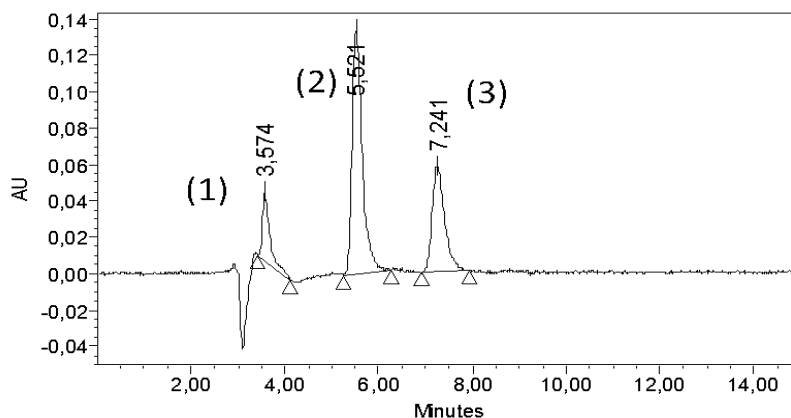


Figura 16. Cromatograma das piperazinas em estudo utilizando uma fase móvel de acetato de amónia 1mM e metanol (40:60, v/v): (1) MeOPP e BZP, (2) mCPP e (3) TFMPP.

Por modificação da fase móvel anterior, substituindo o acetato de amónio por formato de amónio, obteve-se uma boa separação cromatográfica das piperazinas (figura 17). A fase móvel usada foi formato de amónio 5 mM e metanol (55:45, v/v) a pH 6,4 e um fluxo de 0,8 mL/min. Os tempos de retenção dos compostos foram os seguintes (em minutos): 3,9 para a MeOPP, 4,7 para a BZP, 7,5 para a mCPP e 10,7 para a TFMPP.

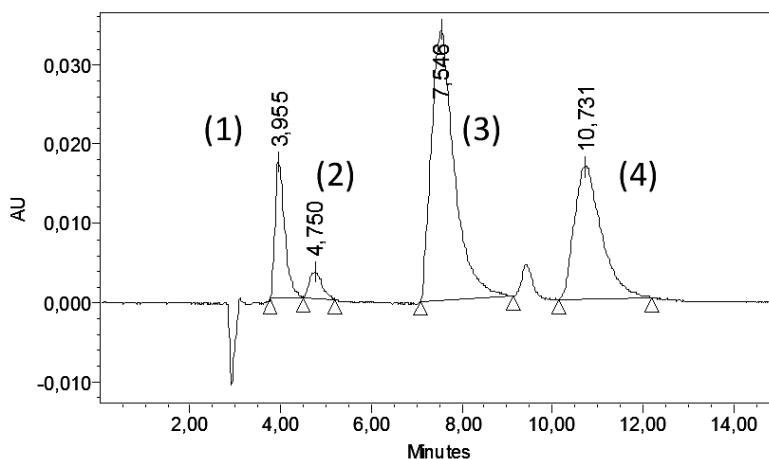
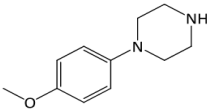
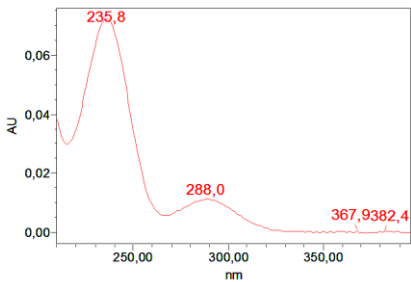
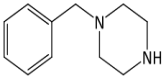
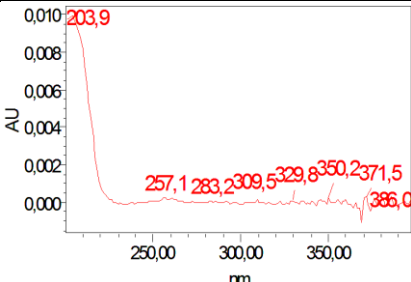
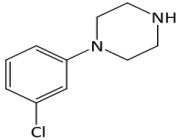
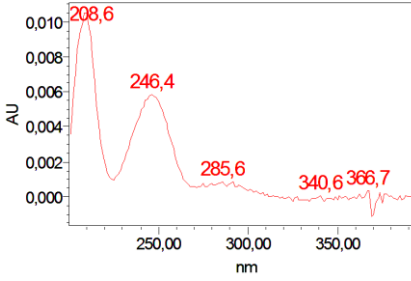
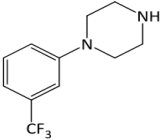
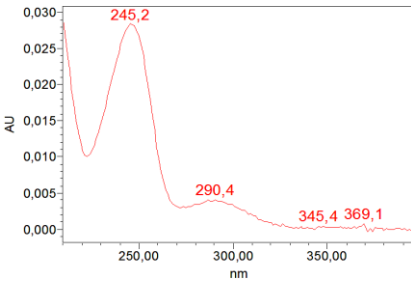


Figura 17. Cromatograma das piperazinas (5 µg/mL) de estudo utilizando uma fase móvel formato de amónio 5 mM e metanol (55:45, v/v): (1) MeOPP, (2) BZP, (3) mCPP e (4) TFMPP.

## 2.2. Identificação dos compostos

Estando a fase móvel otimizada, os compostos foram identificados com base nos seus tempos de retenção e espectro de absorção no UV. Na tabela 4 são apresentados os tempos de retenção, o espectro de absorção no UV e o comprimento de onda máximo de absorção para cada uma das piperazinas estudadas.

**Tabela 4.** Piperazinas em estudo e respectivos tempos de retenção e comprimento de onda máximo de absorção.

Piperazina	Tempo de retenção (min)	Espectro de absorção no UV
<p>MeOPP</p> 	3,9	 <p><math>\lambda_{\text{máx}} = 236</math> nm</p>
<p>BZP</p> 	4,7	 <p><math>\lambda_{\text{máx}} = 204</math> nm</p>
<p>mCPP</p> 	7,5	 <p><math>\lambda_{\text{máx}} = 208</math> nm</p>
<p>TFMPP</p> 	10,7	 <p><math>\lambda_{\text{máx}} = 246</math> nm</p>

### 2.3. Padrão interno

Na análise de substâncias em amostras biológicas é frequente recorrer-se à adição de um composto de concentração constante conhecida - padrão interno - à amostra para minimizar as perdas do analito durante o processo extractivo. Para que o seu comportamento durante todo o processo seja semelhante, o padrão interno deverá ter características físico-químicas o mais semelhantes possíveis aos analitos em estudo. Durante o desenvolvimento do método analítico descrito neste estudo foram testados vários compostos como possíveis padrões internos, como podemos ver na tabela 5. Para este efeito, foram testados compostos com probabilidade diminuta de aparecer em amostras procedentes de casos reais. O composto seleccionado para padrão interno foi a oCPP, um isómero da mCPP e cujo tempo de retenção foi de 5,5 min, conseguindo-se uma adequada separação cromatográfica de todos os compostos (figura 18).

Tabela 5. Compostos testados como padrão interno e respectivos tempos de retenção.

Composto	Tempo retenção (min)	Observações
1-(p-tolil)piperazina	3,6	Tempo de retenção muito próximo da BZP
Protriptilina	--	Não detectada
Atropina	3,2	Elui entre a MeOPP e a BZP, não permitindo a correcta resolução de picos
Piracetam	6,2	Co-elui com fase móvel
oCPP	5,5	Elui separadamente dos outros compostos

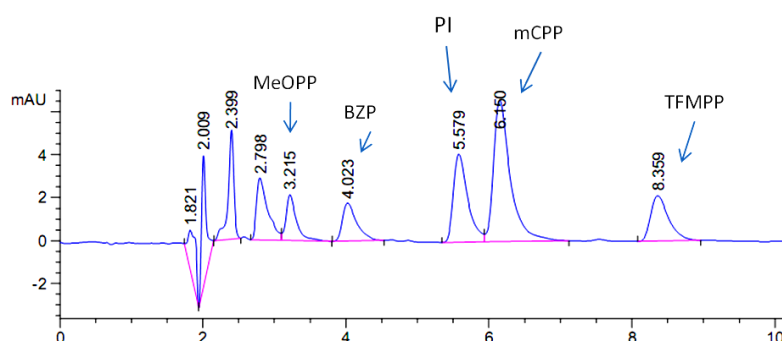


Figura 18. Cromatograma dos compostos de estudo e padrão interno a 10 µg/mL.

## 2.4. Optimização do procedimento de extracção

Uma vez que na literatura científica ainda não existia qualquer informação acerca da extracção de piperazinas por MEPS, e uma vez que esta apresenta várias vantagens em relação às outras técnicas preparativas (nomeadamente o baixo consumo de solventes orgânicos, tempo de extracção mais curto, menor volume de amostra usado e fácil automatização, entre outras) optou-se pela sua utilização no estudo que nos propusemos efectuar.

A eficiência extractiva da MEPS pode ser afectada por um grande número de variáveis experimentais como por exemplo o tipo de coluna, a diluição da amostra, aspiração da amostra pelo dispositivo e as percentagens de solventes na activação, lavagem e eluição dos analitos.

Com o fim de obter o melhor rendimento na extracção das piperazinas a partir das amostras de urina, recorreu-se ao desenho experimental ou *design of experiments* (DOE).

## 2.5. Desenho experimental - DOE

O desenvolvimento de um método analítico é uma das tarefas que mais tempo consome num laboratório e onde são gastos geralmente muitos recursos humanos e materiais. Quando se desenvolve um método existem várias opções que podem ser consideradas, como por exemplo o desenvolvimento do método usando a abordagem tentativa e erro ou a análise de um factor de cada vez (análise univariada). Neste último caso, a optimização do método envolve a mudança de um dos factores a ser analisado enquanto os outros se mantêm constantes. Este tipo de abordagem consome muito tempo, é muito trabalhoso, especialmente se existem muitas variáveis a avaliar e pode levar a conclusões inadequadas uma vez que as interacções entre os factores não são levadas em conta [68].

O DOE é uma poderosa ferramenta estatística que permite o planeamento de todo o processo, avaliando de forma multivariada os diversos factores intervenientes, minimizando os efeitos dos factores não controlados e o número de experiências. Com o uso desta abordagem multivariada, é possível obter simultaneamente os melhores resultados e um uso racional dos recursos, poupando tempo e dinheiro aos laboratórios.

A aplicação desta ferramenta estatística tem sido já usada com sucesso noutras áreas, mas a sua aplicação na área da toxicologia forense é muito escassa [68]. Para a realização deste estudo utilizou-se o programa estatístico MINITAB<sup>®</sup>, versão 15.

## 2.6. Factores que influenciam a MEPS

Os vários factores susceptíveis de influenciar a MEPS e analisados neste trabalho foram os seguintes: diluição da amostra, número de vezes que a amostra é aspirada pelo dispositivo de extracção, a percentagem de ácido acético e de metanol na lavagem e finalmente a percentagem de amónia em metanol ou só metanol na eluição dos analitos.

Para este estudo, foram testados cinco tipos de colunas (fase estacionária), quatro de fase reversa ( $C_2$ ,  $C_8$ ,  $C_{18}$ , SIL) e uma de modo misto ( $C_8$  e SCX -  $M_1$ ). De forma a seleccionar o melhor tipo de coluna, optou-se inicialmente por comparar as de fase reversa duas a duas, tendo a coluna de modo misto sido estudada isoladamente.

Para o estudo das colunas de modo reverso, usou-se o seguinte protocolo: usando cada coluna individualmente diluiu-se a amostra (1:2 ou 1:4), fazendo-se de seguida passar pela seringa por aspiração (2 ou 8 vezes); removeram-se os interferentes com uma solução aquosa de metanol (0 ou 10%) e por fim eluíram-se os analitos com 10 ou 100% de metanol (tabelas 6 e 7). No planeamento factorial  $2^k$  só é possível estudar o efeito de cada factor em dois níveis (baixo e alto), pelo que as colunas só puderam ser comparadas duas a duas. Deste modo, foram comparadas entre si as colunas  $C_2$  e  $C_8$ ; e  $C_{18}$  e SIL. De entre estas, seriam seleccionadas aquelas que originassem os melhores resultados, que depois seriam comparadas entre si da mesma maneira.

No que diz respeito à coluna de modo misto, todas as etapas do processo extractivo foram as mesmas, exceptuando a inclusão de um passo de activação com ácido acético (1 ou 5%) e na eluição dos analitos com 1 ou 5% de amónia em metanol.

Neste trabalho, e uma vez que o número de factores a otimizar era relativamente elevado, num planeamento factorial completo com dois níveis ( $2^5$ ) seriam necessárias 32 experiências, muitas das quais destinadas a avaliar interacções de até quinta ordem, que raramente se verificam na rotina laboratorial. Assim sendo, optou-se por um planeamento factorial fraccionado de resolução V ( $2^{5-1}$ ), no qual o número de experiências necessário é reduzido para metade, e onde são avaliadas apenas interacções de segunda ordem. Deste modo, obtém-se uma quantidade de informação semelhante com menos experiências, poupando tempo e dinheiro.

Como resposta, foi utilizada a relação entre as áreas dos picos de cada analito obtidas após extracção e as obtidas por injeção metanólica directa de uma mistura padrão com todos os compostos, para compensar eventuais diferenças na injeção ( $n=3$ ).

### 2.6.1. Colunas de fase reversa

A matriz experimental usada para o estudo das colunas C<sub>2</sub> e C<sub>8</sub>, bem como a resposta obtida para cada uma das condições experimentais apresenta-se de seguida.

**Tabela 6.** Matriz experimental e resultados das extracções com as colunas C<sub>2</sub> e C<sub>8</sub>.

Ordem experiência	Colunas	Dil. Amostra	Aspirações	% MeOH Lavagem	% MeOH Eluição	Resposta			
						MeOPP	BZP	mCPP	TFMPP
1	C8	4	2	10	10	1,11	0,10	0,03	0,01
2	C2	4	8	10	10	0	0,02	0,01	0,01
3	C8	2	8	10	10	1,68	0,11	0	0,01
4	C2	2	2	0	100	0	0,03	0,22	0,17
5	C8	2	8	0	100	1,86	0,07	0	0
6	C8	4	2	0	100	1,76	0,07	0	0,01
7	C8	4	8	10	100	0,24	0,15	0,03	0,01
8	C8	4	8	0	10	1,40	0,05	0,02	0
9	C2	2	8	10	100	0	0,03	0,20	0,17
10	C2	2	8	0	10	0	0,04	0,02	0,01
11	C8	2	2	10	100	0	0,17	1,69	1,04
12	C2	4	8	0	100	0	0,06	0,22	0,18
13	C2	4	2	0	10	0	0,02	0,02	0,00
14	C8	2	2	0	10	2,03	0,10	0,04	0,01
15	C2	4	2	10	100	0	0,03	0,16	0,15
16	C2	2	2	10	10	0	0,02	0,02	0,01

Apresentam-se na figura 19, os diagramas de Pareto obtidos. Nestes diagramas os efeitos de cada um dos factores dispõem-se por ordem decrescente de magnitude, sendo representados por barras horizontais.

Um efeito que exceda a linha vermelha representada (nível de significância de 5%) é considerado estatisticamente significativo, assumindo-se que tem influência na resposta.

## Determinação de novas drogas de abuso com recurso à microextração em seringa empacotada

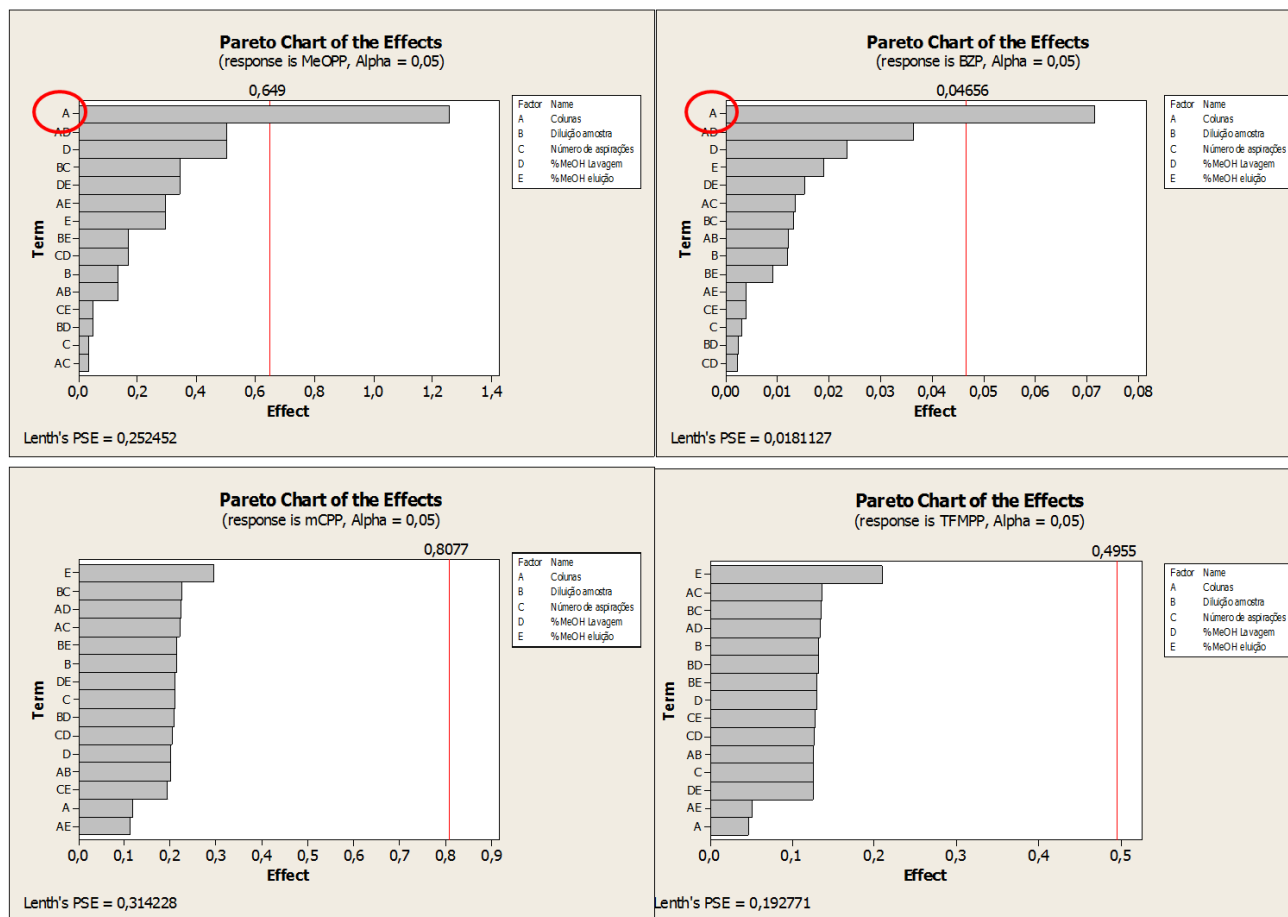


Figura 19. Diagramas de Pareto ilustrando os factores que influenciam o processo de extracção para cada composto individualmente, usando as colunas C<sub>8</sub> e C<sub>2</sub>. Encontram-se salientados com um círculo vermelho os parâmetros estatisticamente significativos.

Podemos verificar que o único parâmetro estatisticamente significativo para a MeOPP e BZP é o tipo de coluna, o que não acontece para os restantes compostos. Sendo assim, analisando os gráficos dos efeitos principais (figura 20), observamos que para todos os analitos as colunas C<sub>8</sub> originam melhores respostas, pelo que foi esta a coluna seleccionada para a continuação do trabalho.

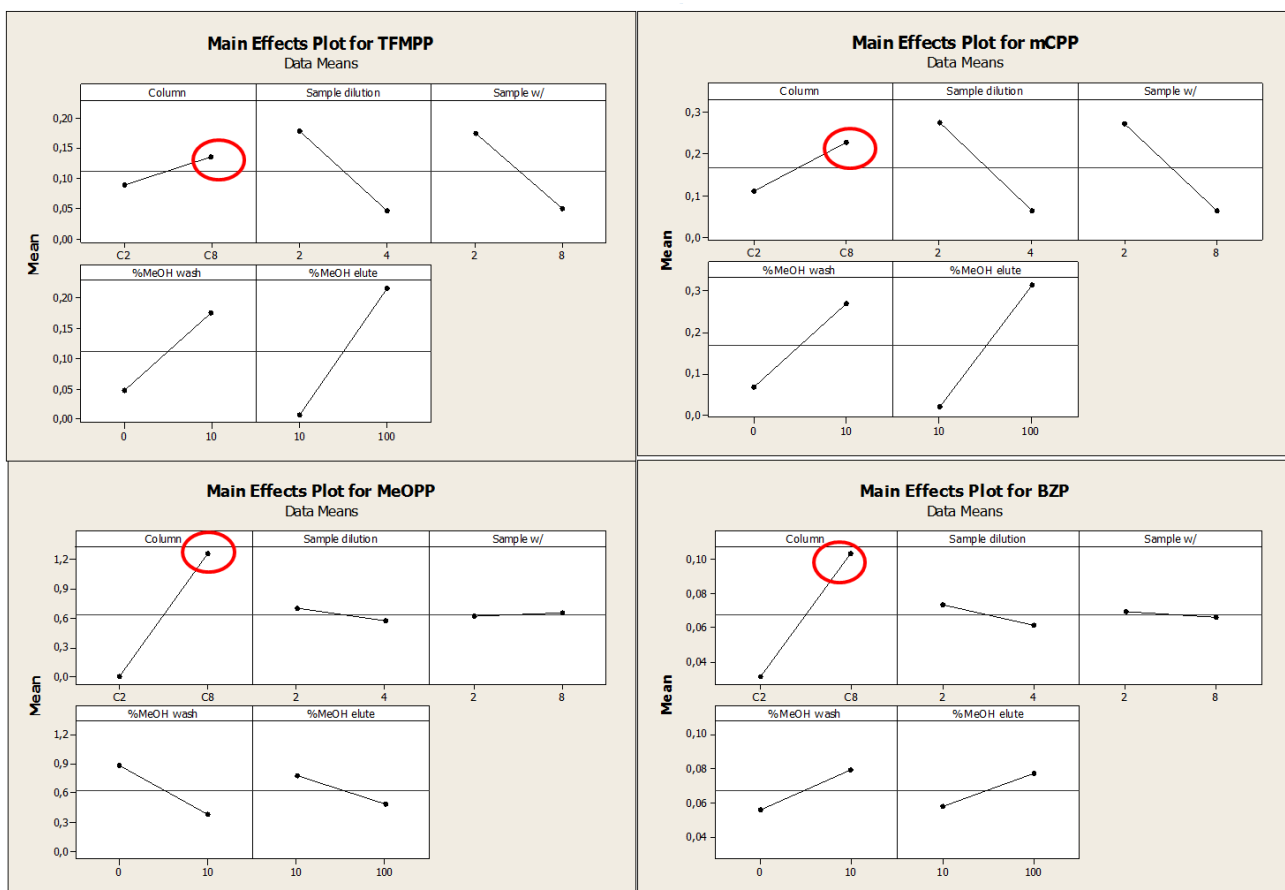


Figura 20. Gráfico dos efeitos principais. Com um círculo vermelho encontra-se assinalado para o factor “coluna” o nível que origina a melhor resposta, neste caso a coluna C<sub>8</sub>.

## Determinação de novas drogas de abuso com recurso à microextração em seringa empacotada

A matriz experimental usada para o estudo das colunas C<sub>18</sub> e SIL, bem como a resposta obtida para cada uma das condições experimentais apresenta-se de seguida.

Tabela 7. Matriz experimental e resultados das extracções com as colunas C<sub>18</sub> e SIL.

Ordem experiência	Colunas	Dil. Amostra	Aspirações	% MeOH Lavagem	% MeOH Eluição	Resposta			
						MeOPP	BZP	mCPP	TFMPP
1	C18	4	2	10	10	0,75	0,10	0,11	0,01
2	SIL	4	8	10	10	0	0	0	0
3	C18	2	8	10	10	2,27	0,22	0,11	0,01
4	SIL	2	2	0	100	0,10	0	0,04	0,06
5	C18	2	8	0	100	0,21	0	1,22	1,24
6	C18	4	2	0	100	0,24	0	0,95	0,95
7	C18	4	8	10	100	0,40	0	1,21	1,18
8	C18	4	8	0	10	0,96	0,14	0	0
9	SIL	2	8	10	100	0,08	0	0,03	0,07
10	SIL	2	8	0	10	0	0,03	0,01	0
11	C18	2	2	10	100	0,18	0	0,94	1,04
12	SIL	4	8	0	100	0,03	0,01	0,02	0,07
13	SIL	4	2	0	10	0	0	0	0
14	C18	2	2	0	10	1,71	0,24	0,12	0
15	SIL	4	2	10	100	0,03	0	0,01	0,05
16	SIL	2	2	10	10	0	0,02	0	0,01

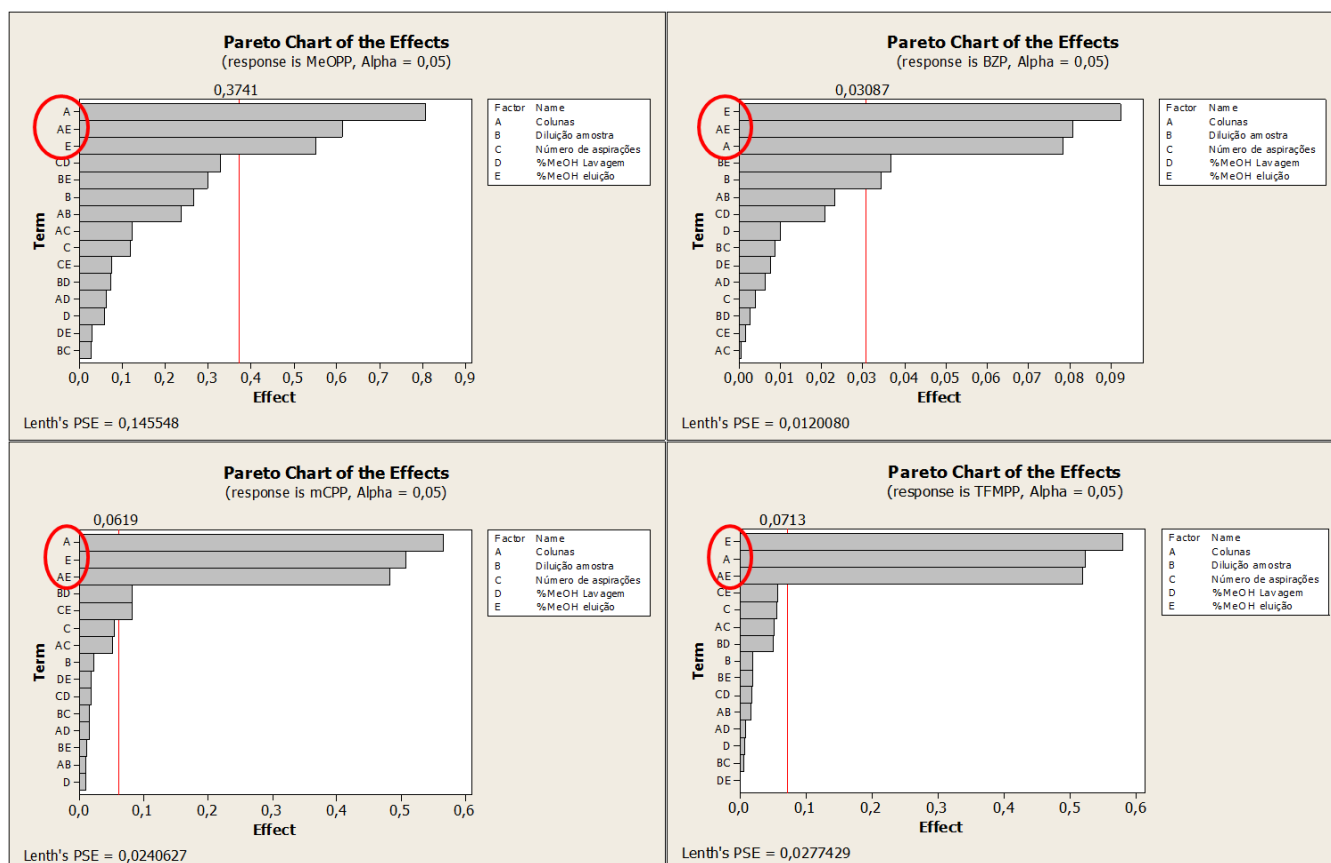


Figura 21. Diagramas de Pareto ilustrando os factores que influenciam o processo de extração para cada composto individualmente, usando as colunas C<sub>18</sub> e SIL. Encontram-se salientados com um círculo vermelho os parâmetros estatisticamente significativos.

Assim, por comparação das colunas C<sub>18</sub> e SIL, após análise da figura 21, pode-se afirmar que os únicos factores estatisticamente significativos para a resposta são as colunas, a percentagem de metanol na eluição e a interacção entre estes dois factores.

Na figura 22 apresentam-se os gráficos de interacções entre os vários factores para cada um dos compostos estudados.



Figura 22. Gráficos representativos das interacções entre os vários parâmetros para cada composto. Com um círculo vermelho encontram-se assinaladas as interacções estatisticamente significativas.

Analisando esta figura, podemos observar que entre o tipo de coluna e a percentagem de metanol na eluição existe uma interacção, isto é, a resposta relativamente a um factor depende do nível do outro; por exemplo, no caso da MeOPP, um aumento na percentagem de metanol na eluição leva à diminuição da resposta quando são utilizadas as colunas C<sub>18</sub>, ao passo que com as colunas SIL acontece o oposto, ainda que em menor escala.

Apesar desta diminuição da resposta observada para a MeOPP e BZP com o aumento da percentagem de metanol na eluição, as colunas C<sub>18</sub> originaram em geral melhores resultados que as colunas SIL, pelo que foram seleccionadas para a continuação do trabalho.

Deste modo, procedeu-se então à comparação das colunas C<sub>8</sub> e C<sub>18</sub> entre si.

Tabela 8. Matriz experimental e resultados das extracções com as colunas C<sub>8</sub> e C<sub>18</sub>.

Ordem experiência	Colunas	Dil. Amostra	Aspirações	% MeOH Lavagem	% MeOH Eluição	Resposta			
						MeOPP	BZP	mCPP	TFMPP
1	C18	4	2	10	10	0,65	0,07	0	0
2	C8	4	8	10	10	0,21	0,02	0	0
3	C18	2	8	10	10	0,45	0,04	0	0
4	C8	2	2	0	100	0,22	0,21	0,40	0,66
5	C18	2	8	0	100	0,18	0,19	0,57	0,86
6	C18	4	2	0	100	0,19	0,21	0,49	0,69
7	C18	4	8	10	100	0,28	0,32	0,60	0,88
8	C18	4	8	0	10	0,61	0,03	0	0
9	C8	2	8	10	100	0,22	0,22	0,55	0,76
10	C8	2	8	0	10	0,58	0,04	0	0
11	C18	2	2	10	100	0,14	0,22	0,26	0,30
12	C8	4	8	0	100	0,24	0,22	0,41	0,66
13	C8	4	2	0	10	0,29	0,02	0	0
14	C18	2	2	0	10	0,94	0,11	0	0
15	C8	4	2	10	100	0,24	0,19	0,35	0,46
16	C8	2	2	10	10	0,97	0,08	0	0

Na figura 23 apresenta-se o diagrama de Pareto para cada um dos analitos estudados. Verifica-se que o único factor estatisticamente significativo na resposta é a percentagem de metanol na eluição (excepto para a MeOPP). Analisando os gráficos dos efeitos principais (figura 24), observa-se, ainda que sem significado estatístico, que as respostas obtidas com as colunas C<sub>18</sub> foram ligeiramente melhores quando comparadas com as C<sub>8</sub>. Deste modo, foram estas as escolhidas para a prossecução do trabalho. Uma vez que o único factor com influência significativa na resposta foi a percentagem de metanol na eluição, foi possível otimizar este parâmetro de maneira univariada, isto é, mantendo todos os outros parâmetros no nível mais conveniente.

Determinação de novas drogas de abuso com recurso à microextração em seringa empacotada

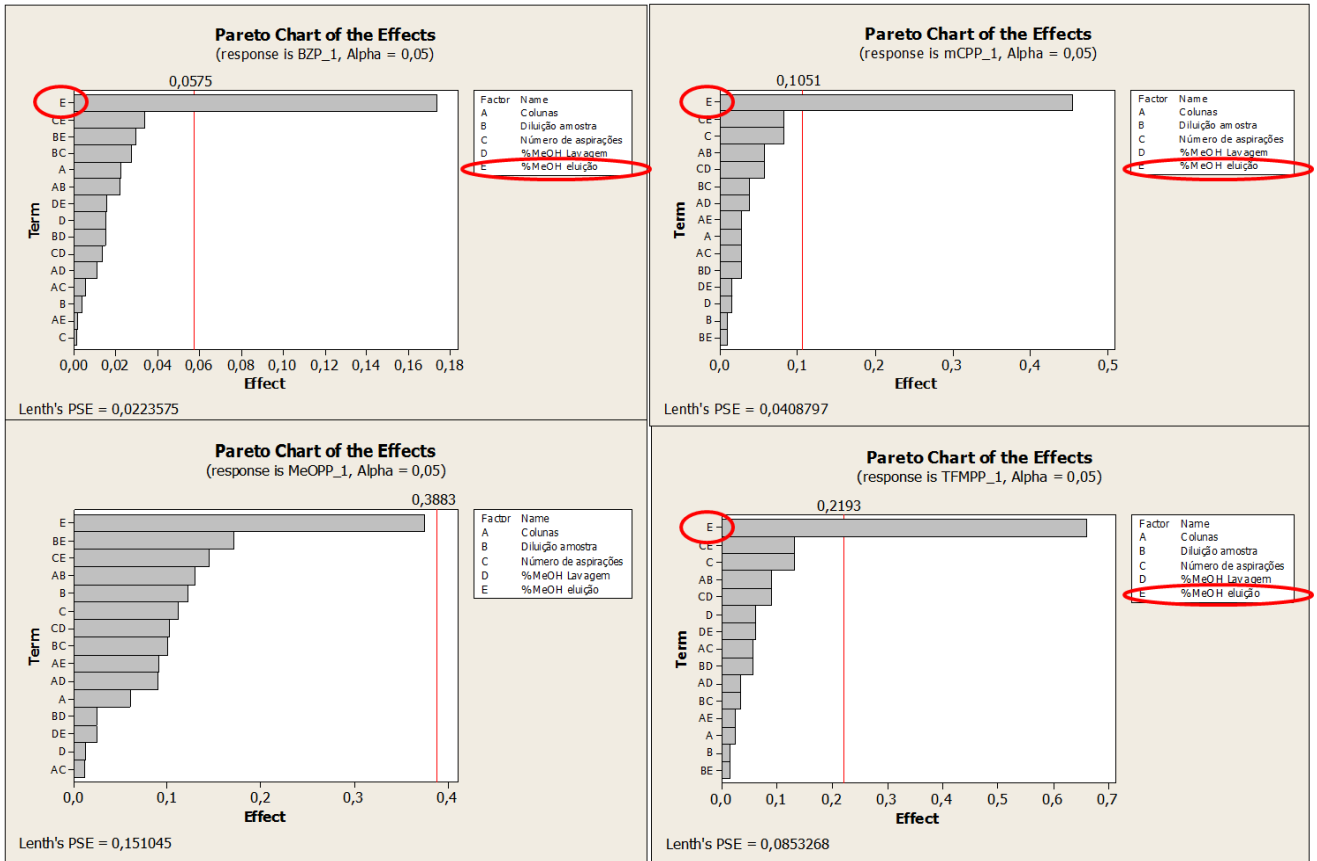


Figura 23. Diagramas de Pareto ilustrando os factores que influenciam o processo de extração para cada composto individualmente, usando as colunas C<sub>18</sub> e C<sub>8</sub>. Encontram-se salientados com um círculo vermelho os parâmetros estatisticamente significativos.

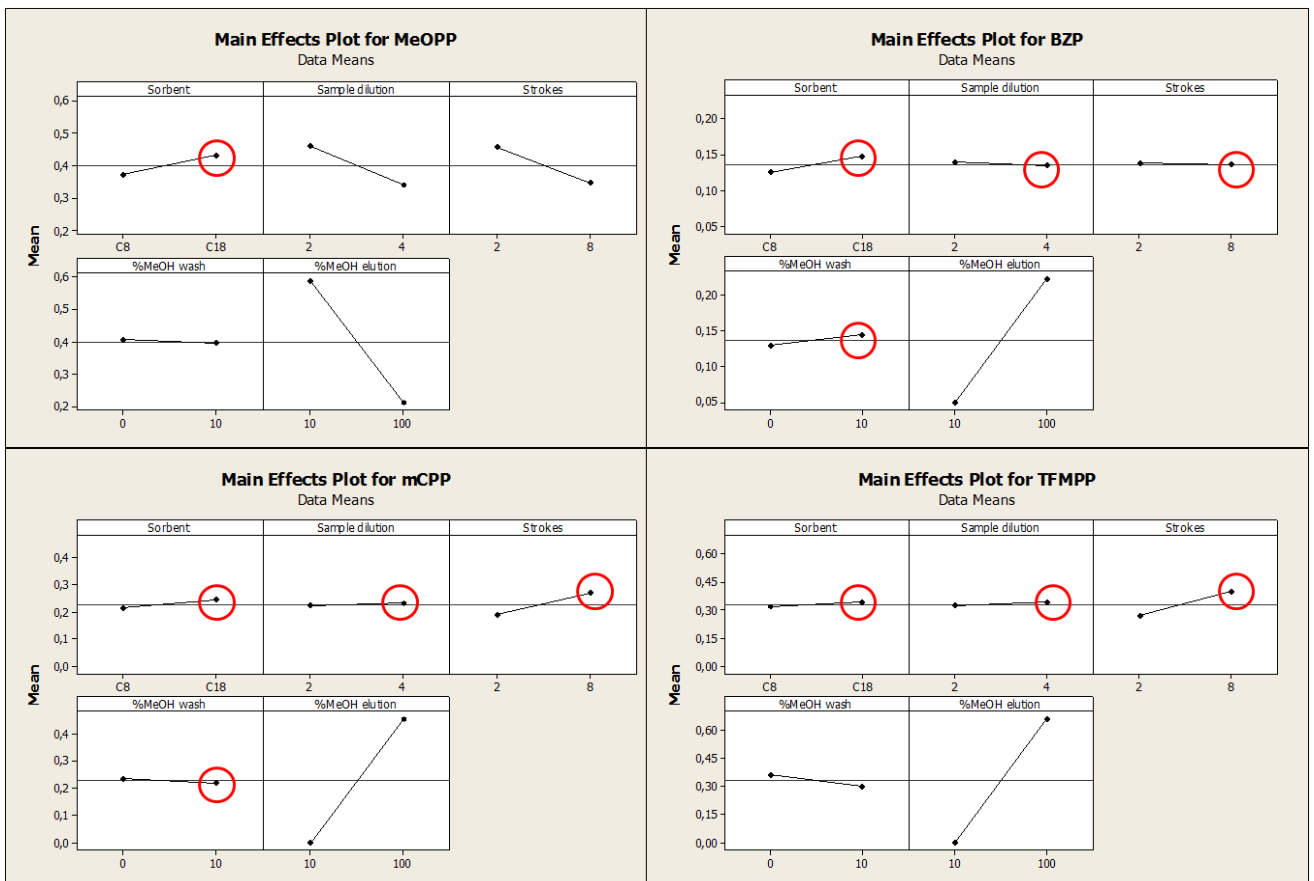


Figura 24. Gráfico dos principais efeitos dos factores susceptíveis de influenciar o processo de extração para cada composto. Os parâmetros que influenciam o processo de extração para cada analito encontram-se assinalados.

#### Determinação de novas drogas de abuso com recurso à microextração em seringa empacotada

Assim de 5 factores inicialmente estudados foram eliminados 4. Deste modo, demonstra-se o enorme potencial de *screening* do planeamento factorial no desenvolvimento e optimização do método extractivo, já que com um número reduzido de experiências permitiu otimizar o processo de extração com a finalidade de obter o maior rendimento de extração possível.

Para este estudo, os factores não significativos foram fixados nos seguintes níveis, já que foram aqueles que originaram os melhores resultados (figura 24): diluição da amostra (1:2), aspirações (8) e metanol na lavagem (10%); embora tenham pouco efeito significativo,

Uma vez fixados estes valores, variou-se percentagem de metanol na eluição (de 10 a 100%), tendo-se verificado que os melhores resultados eram obtidos quando a percentagem de metanol na eluição era de 100% como se pode constatar na tabela 9.

Tabela 9. Optimização da percentagem de metanol na eluição.

% MeOH Eluição	Resposta			
	MeOPP	BZP	mCPP	TFMPP
10	0	0,05	0	0
20	0	0,02	0	0,01
40	0,06	0,02	0,02	0,01
60	0,19	0,18	0,25	0,16
80	0,29	0,35	0,61	0,48
100	0,39	0,50	0,98	0,67

2.6.2. Colunas de modo misto

Relativamente à coluna de modo misto M<sub>1</sub> (C8+SCX) efectuou-se o mesmo tipo de experiências, obtendo-se os seguintes resultados:

Tabela 10. Matriz experimental e resultados das extracções com as colunas M<sub>1</sub>.

Ordem experiência	Dil. Amostra	Aspirações	% AcCOOH*	% MeOH Lavagem	% NH <sub>4</sub> OH* Eluição	Resposta			
						MeOPP	BZP	mCPP	TFMPP
1	4	8	5	100	5	0,27	0,37	0,46	0,35
2	4	2	5	10	5	0,44	0,30	0,71	0,71
3	4	2	1	100	5	0,62	0,34	0,96	0,86
4	2	8	1	100	5	0,71	0,32	1,18	0,96
5	2	8	5	10	5	0,59	0,33	0,80	0,72
6	2	2	5	10	1	0,33	0,57	0,73	0,65
7	2	2	1	10	5	0,54	0,32	0,70	0,72
8	4	8	1	100	1	0,07	0,38	0,48	0,38
9	4	8	5	10	1	0,32	0,61	1,03	0,91
10	2	8	5	100	1	0,76	0,54	0,99	1,02
11	4	2	5	100	1	0,57	0,50	0,64	0,53
12	4	2	1	10	1	0,07	0,53	0,89	0,72
13	2	8	1	10	1	0,75	0,54	1,05	0,94
14	2	2	5	100	5	0,69	0,40	1,04	0,82
15	4	8	1	10	5	1,02	0,38	1,43	1,36
16	2	2	1	100	1	0,02	0,07	0,23	0,20

\*AcCOOH -ácido acético; NH<sub>4</sub>OH -amónia

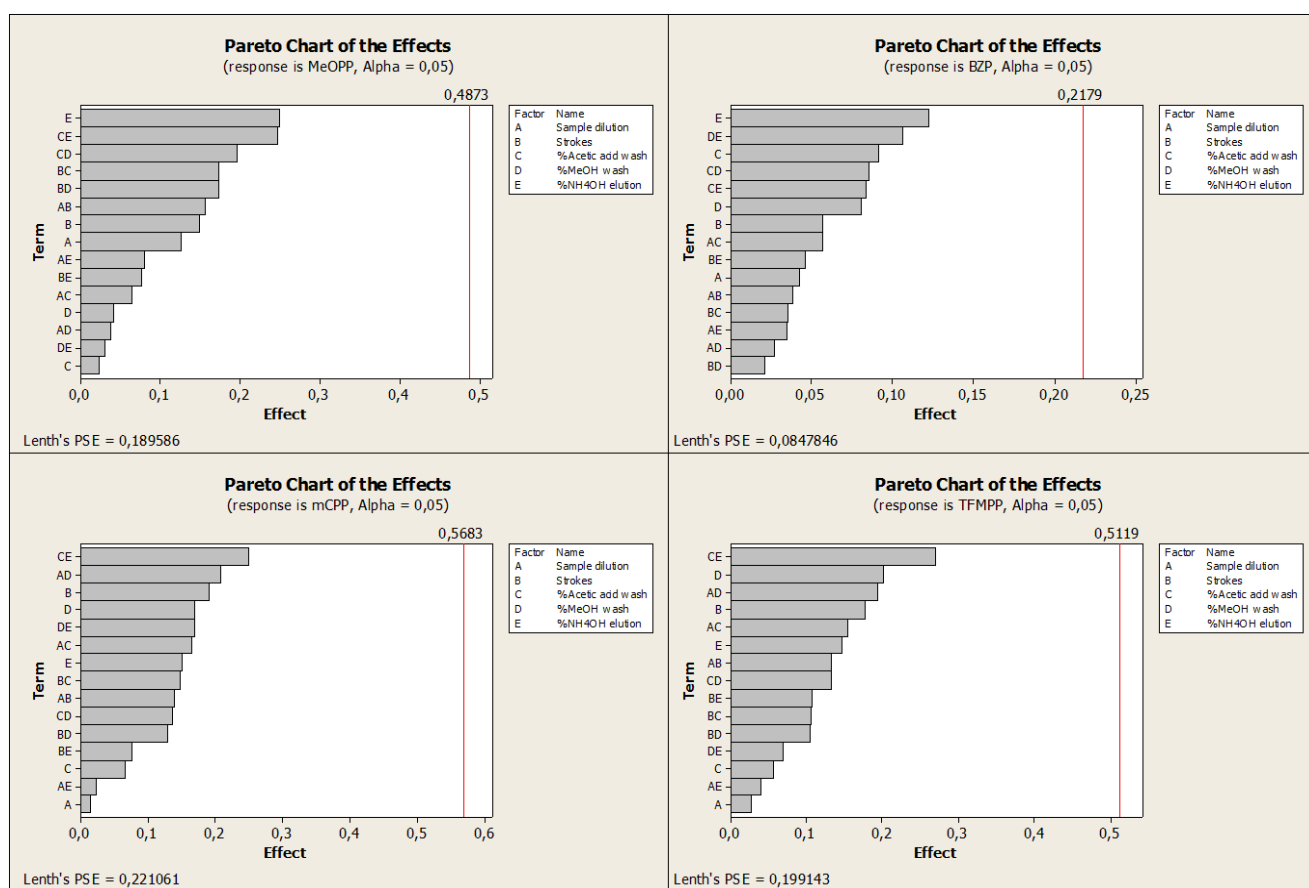


Figura 24. Diagramas de Pareto ilustrando os factores que influenciam o processo de extração para cada composto individualmente, usando as colunas M<sub>1</sub>.

## Determinação de novas drogas de abuso com recurso à microextração em seringa empacotada

Da análise dos diagramas de Pareto (figura 25), podemos concluir que nenhum dos factores tem influência estatisticamente significativa sobre a resposta nos níveis estudados. Deste modo, podem ser fixados nos níveis mais convenientes, pelo que se escolheram aqueles que originaram melhor resposta para a generalidade dos compostos: diluição da amostra (1:2), aspirações (8), ácido acético (1%), metanol na lavagem (10%) e percentagem de amónia em metanol (5%) para a eluição dos analitos (figura 26).

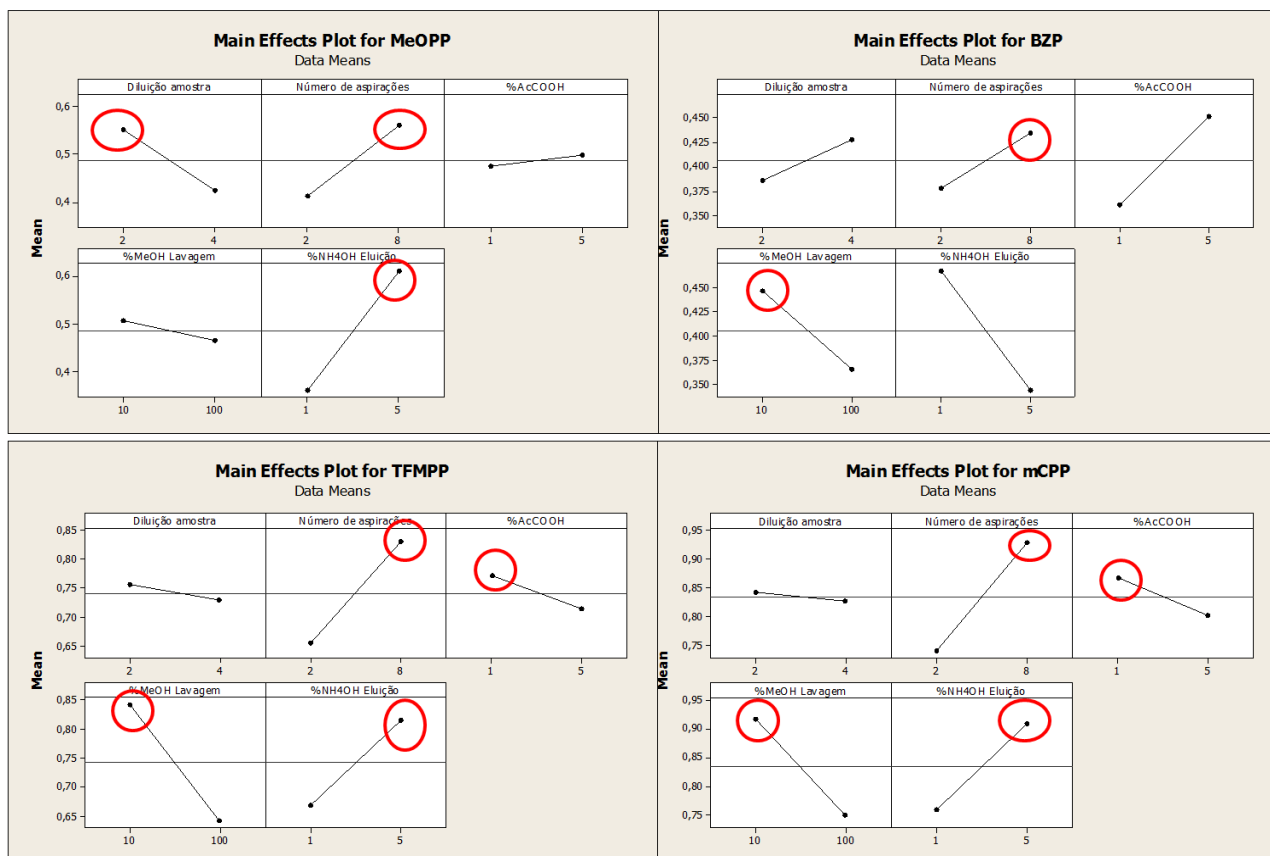


Figura 25. Gráfico dos principais efeitos dos factores susceptíveis de influenciar o processo de extração para cada composto.

Assim, e após optimização da extração com as colunas  $C_{18}$  e  $M_1$  e com o fim de seleccionar qual a fase estacionária mais adequada à extração das piperazinas, procedeu-se ao cálculo do rendimento de extração para cada composto. Para tal, foram analisadas amostras fortificadas a 2 e 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $n=6$ ) e as áreas dos picos cromatográficos foram comparadas com as obtidas por injeção de soluções metanólicas contendo a mesma quantidade de analito (100%). A fórmula utilizada foi a seguinte:

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Área do pico obtido por MEPS}}{\text{Área do pico na solução metanólica}} \times 100 \quad (1)$$

Como se pode constatar na tabela 11, a fase estacionária para a qual se obteve melhor eficiência extractiva foi a  $M_1$ , tendo sido obtidos rendimentos de 70-100% para a MeOPP, mCPP e TFMPP, e cerca de 50-60 % para a BZP.

Tabela 11. Recuperações das piperazinas utilizando as colunas  $C_{18}$  e  $M_1$  (n=6).

Recuperação (% $\pm$ SD)					
Tipo de coluna	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	MeOPP	BZP	mCPP	TFMPP
$M_1$	2	83 $\pm$ 5	61 $\pm$ 6	99 $\pm$ 9	100 $\pm$ 3
	4	74 $\pm$ 7	52 $\pm$ 5	95 $\pm$ 9	100 $\pm$ 8
$C_{18}$	2	4 $\pm$ 1	6.3 $\pm$ 1	78,8 $\pm$ 4	75 $\pm$ 4
	4	6 $\pm$ 1	10,9 $\pm$ 1	73 $\pm$ 4	82,6 $\pm$ 8

SD - Desvio padrão

Deste modo, o método otimizado foi então validado com as condições finais descritas na tabela 12.

Tabela 12. Condições finais de extração (coluna  $M_1$ ).

Diluição da amostra	1:2
Aspirações pelo dispositivo	8
% Acido acético (250 $\mu\text{L}$ )	1
% Metanol na lavagem (100 $\mu\text{L}$ )	10
% Amónia na eluição (50 $\mu\text{L}$ )	5

## 2.7. Validação do método

Com a finalidade de demonstrar que os processos analíticos se adequam ao fim a que se destinam, é necessário efectuar a validação do método. Deste modo, a metodologia otimizada foi validada através de um protocolo de validação de 5 dias, seguindo as normas aceites internacionalmente para a validação de métodos bioanalíticos, concretamente da *Food and Drug Administration* [69] e da *International Conference on Harmonization* [70].

Os parâmetros estudados foram a selectividade, linearidade e modelo de calibração, precisão e exactidão, limites de detecção e quantificação, recuperação e estabilidade.

### 2.7.1. Selectividade

A selectividade consiste na capacidade de um método analítico identificar o(s) analito(s) de forma inequívoca numa matriz complexa e na presença de outros componentes da amostra, quer endógenos quer exógenos [69]. Deste modo, foram analisadas *pools* de urinas brancas (amostras isentas dos analitos em estudo), tendo sido pesquisados interferentes nos tempos de retenção e comprimentos de onda ( $\lambda$ ) das piperazinas. Não foram observadas quaisquer interferências de constituintes da matriz aos tempos de retenção e  $\lambda$  seleccionados. Nas figuras 27 e 28 apresentam-se os cromatogramas obtidos após análise de uma amostra branca e de uma amostra fortificada a 10  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

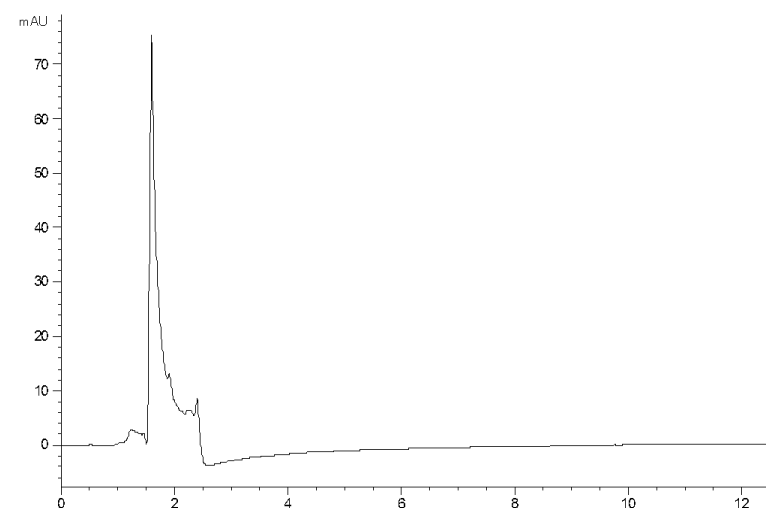


Figura 26. Cromatograma de uma amostra branca.

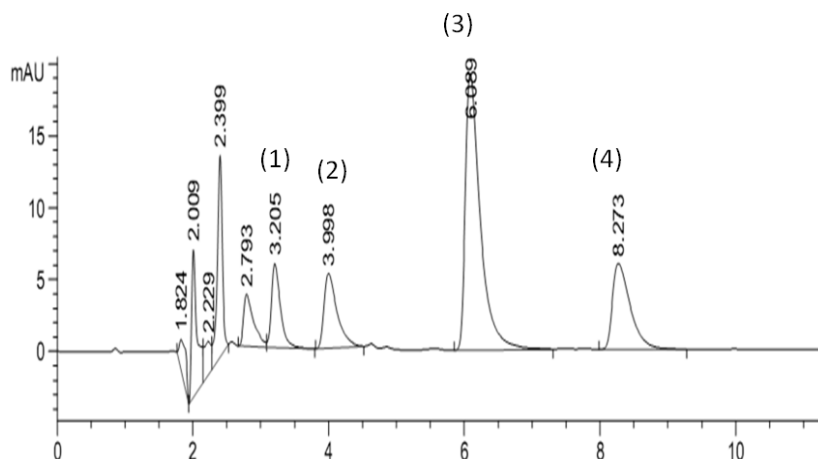


Figura 27. Cromatograma de uma amostra fortificada com os analitos em estudo a 10  $\mu\text{g/mL}$ . (1) MeOPP, (2) BZP, (3) mCPP e (4) TFMPP.

Adicionalmente, foram analisadas outras substâncias passíveis de ser encontradas em amostras reais, incluindo outras drogas de abuso [anfetaminas (anfetamina, metanfetamina, metilenodioxianfetamina, metilenodioximetanfetamina, metilbenzodioxililbutanamina, metildietanolamina), opiáceos (morfina, codeína, 6-acetilmorfina, tramadol), cocaína (cocaína, benzoilecgonina, ecgonina metil éster)], fármacos (piracetam, trazodona, cetoprofeno), alcalóides (papaverina, nicotina, narceína) e cafeína. Não foram observadas quaisquer interferências das substâncias estudadas aos tempos de retenção e  $\lambda$  seleccionados.

### 2.7.2. Linearidade e modelo de calibração

As curvas de calibração (relação de áreas entre o pico do analito e o do padrão interno vs concentração do analito) foram estabelecidas utilizando amostras de urina (100  $\mu$ L) fortificadas com concentrações crescentes de cada piperazina e analisadas pelo procedimento de extração anteriormente descrito (n=5). Foram então preparados 8 calibradores distribuídos uniformemente entre 0,1 e 5  $\mu$ g/mL. As concentrações estudadas foram 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4 e 5  $\mu$ g/mL. Cada calibrador foi quantificado na curva de calibração obtida para o cálculo do erro médio relativo (*bias*) (equação 2).

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

Ao estudar a linearidade assume-se que o desvio-padrão do erro para a variável é constante ao longo da gama de trabalho, isto é, há homogeneidade das variâncias. No entanto, isto nem sempre ocorre, observando-se muitas vezes que as variâncias não são homogéneas (heterocedasticidade). Deste modo, é comum recorrer-se a algumas opções na tentativa de os suprimir, como por exemplo diminuir a gama de trabalho ou aplicar o método dos mínimos quadrados ponderado [2].

Neste trabalho, devido à ampla gama de calibração utilizada, foi necessário aplicar factores de ponderação, já que os erros obtidos não permitiam a adequada quantificação dos analitos, principalmente na gama baixa.

Foram estudados seis factores de ponderação empíricos,  $\frac{1}{x}$ ;  $\frac{1}{x^2}$ ;  $\frac{1}{\sqrt{x}}$ ;  $\frac{1}{y}$ ;  $\frac{1}{y^2}$ ;  $\frac{1}{\sqrt{y}}$  e determinou-se qual seria o mais adequado para cada analito, tendo em conta o erro relativo para cada concentração [2].

Os factores de ponderação para os quais o erro relativo foi mais baixo foram  $1/x^2$  para a MeOPP e BZP,  $1/y$  para a mCPP e  $1/x$  para a TFMPP.

As curvas de calibração foram então obtidas por recurso à regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ponderados e, com base nestas, os valores de concentração foram calculados por interpolação, estando os resultados sumariados na tabela 13.

Tabela 13. Dados de linearidade para os compostos em estudo (n=5).

	Regressão	Gama trabalho (µg/mL)	Linearidade		R <sup>2</sup>	LLOQ (µg/mL)
			<i>m</i>	<i>b</i>		
MeOPP	1/x <sup>2</sup>	0,1-5	0,7008±0,05	-0,0290±0,01	0,9927±0,01	0,1
BZP	1/x <sup>2</sup>	0,1-5	0,4272±0,04	0,0387±0,07	0,9948±0,01	0,1
mCPP	1/y	0,1-5	2,4443±0,26	-0,0992±0,06	0,9948±0,01	0,1
TFMPP	1/x	0,1-5	1,1305±0,22	-0,0112±0,04	0,9960±0,01	0,1

*m* -declive; *b* -ordenada na origem; LLOQ –limite inferior de quantificação

Pode-se concluir, que o método descrito é linear na gama de trabalho utilizada para os compostos em estudo, uma vez que a análise de regressão linear ponderada mostrou valores de R<sup>2</sup> superiores a 0,99 para todos os compostos e o *bias* é considerado adequado, estando dentro do intervalo de ±15% da concentração nominal para todas as concentrações, excepto para o LLOQ para o qual se aceitaram ±20% [69].

Juntamente com cada curva de calibração foram preparadas amostras controlo a duas concentrações, 1,5 e 3,5 µg/mL.

### 2.7.3. Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LOD) de um método analítico é definido como a mais baixa concentração de analito presente numa amostra, claramente distinguível do branco, que pode ser detectada mas não necessariamente quantificada com um valor exacto. O LLOQ define-se como a mais baixa concentração de analito presente numa amostra que pode ser medida com uma precisão e exactidão aceitáveis, ou seja, com um coeficiente de variação inferior a 20% e *bias* num intervalo de ± 20% da concentração nominal [69, 70].

Para a determinação do LOD foram analisadas seis réplicas para a concentração de 0,05 µg/mL, verificando-se se era possível identificar os analitos.

No que diz respeito aos LLOQ, estes foram considerados a concentração mais baixa da curva de calibração, de acordo com os critérios anteriormente referidos.

Os limites de quantificação obtidos foram portanto 0,1 µg/mL para todos os analitos, valor muito satisfatório quando comparado com os obtidos por Vorce et al. [71] (0,1 µg/mL) utilizando LC-MS; foram superiores aos obtidos por Dickson et al. [72] (0,025 µg/mL) usando GC-MS, mas utilizando um volume de amostra consideravelmente superior (2 mL versus 100 µL). Quanto aos LOD, não foi possível identificar a BZP e a TFMP a concentrações inferiores ao respectivo LLOQ, pelo que este foi também o seu LOD; a MeOPP e a mCPP foram identificadas com sucesso a 0,05 µg/mL, sendo este o seu limite de detecção.

Quando comparados com limites publicados por outros autores [71, 73], os nossos valores são aceitáveis, uma vez que estão próximos dos já descritos para a determinação de piperazinas em urina, especialmente se tivermos em consideração que se usou um detector de fotodiodos, muito menos sensível que um detector de espectrometria de massa. Por outro lado, estes limites foram obtidos usando um volume reduzido de amostra (100 µL), em comparação com 500 µL [73] ou até mesmo 2 mL [71], que apresentaram valores de 0,01 µg/mL e 0,1 µg/mL, respectivamente, para o LLOQ.

#### 2.7.4. Precisão e exactidão

A precisão de um método analítico descreve o grau de concordância de resultados individuais de um analito quando o procedimento é aplicado repetidamente a múltiplas alíquotas de uma matriz biológica, sendo normalmente expressa em termos de coeficiente de variação (CV, %) [69].

Para avaliar a precisão existem duas medidas, a repetibilidade (ou precisão intradia) e reprodutibilidade (ou precisão interdia). A primeira é aquela na qual o método analítico é executado nas mesmas condições experimentais durante um período de tempo reduzido. A precisão interdia obtém-se quando vários factores (e.g. operador, dia, lote) são diversificados durante a execução do método.

Para determinar a precisão intradia, foram preparadas e analisadas no mesmo dia, seis réplicas de amostras de urina fortificadas com os analitos nas concentrações de 0,1; 0,25; 0,5; 1, 3 e 5 µg/mL.

O CV obtido na precisão intradia foi em regra inferior a 12% para todos os compostos a todas as concentrações, excepto para a BZP, tendo sido obtido um valor ligeiramente superior a uma das concentrações; quanto à exactidão, os valores de *bias* situaram-se dentro de um intervalo de ±15% da concentração nominal (tabela 14).

Tabela 14. Precisão intradia e exactidão (n=6).

Composto	Concentração (µg/mL)	Concentração calculada (µg/mL)	CV (%)	Bias (%)
MeOPP	0,1	0,10±0,01	6,44	4,27
	0,25	0,25±0,02	7,53	1,16
	0,5	0,47±0,02	3,89	-5,74
	1	1,01±0,03	2,74	1,34
	3	3,00±0,22	7,46	-0,09
	5	5,31±0,11	2,21	6,13
BZP	0,1	0,11±0,01	5,41	10,51
	0,25	0,28±0,02	7,63	11,68
	0,5	0,43±0,09	23,13	14,54
	1	0,92±0,11	12,01	-7,90
	3	2,93±0,23	7,79	-2,44
	5	5,33±0,04	0,80	6,44
mCPP	0,1	0,10±0,01	4,63	-1,63
	0,25	0,24±0,01	5,04	-5,35
	0,5	0,46±0,03	7,58	-7,85
	1	1,03±0,04	4,14	2,91
	3	3,08±0,15	4,89	2,51
	5	5,36±0,07	1,38	7,14
TFMPP	0,1	0,09±0,01	8,73	-8,24
	0,25	0,24±0,02	10,76	-2,27
	0,5	0,55±0,05	9,12	10,41
	1	1,06±0,08	7,74	6,45
	3	3,06±0,22	7,33	1,85
	5	5,09±0,05	1,13	1,86

A precisão interdia foi avaliada a oito concentrações, ao longo de um período de 5 dias (Tabela 15).

Tabela 15. Precisão interdia e exactidão (n=5).

Composto	Concentração (µg/mL)	Concentração calculada (µg/mL)	CV (%)	Bias (%)
MeOPP	0.1	0.10	2.81	-1.99
	0.25	0.24	5.57	2.67
	0.5	0.47	9.78	6.56
	1	1.01	7.63	-1.31
	2	2.01	6.42	-0.55
	3	2.94	9.44	1.91
	4	4.11	6.61	-2.73
BZP	5	5.20	4.77	-3.77
	0.1	0.10	2.99	0.34
	0.25	0.26	7.34	-2.75
	0.5	0.49	8.80	1.97
	1	0.95	5.12	5.40
	2	2.01	6.94	-0.47
	3	2.96	4.67	1.33
mCPP	4	4.11	5.70	-2.73
	5	5.13	2.38	-2.53
	0.1	0.11	11.00	6.80
	0.25	0.22	5.66	-4.98
	0.5	0.50	15.00	-3.85
	1	1.04	10.45	2.30
	2	2.04	5.70	5.52
TFMPP	3	2.95	7.72	-0.47
	4	3.99	8.05	-6.60
	5	5.08	2.25	2.88
	0.1	0.10	8.64	2.48
	0.25	0.24	8.35	3.63
	0.5	0.50	5.60	0.37
	1	1.03	9.62	-3.32
TFMPP	2	2.12	5.17	-5.78
	3	2.99	6.29	0.45
	4	4.08	2.47	-1.87
	5	4.82	3.08	3.82

Adicionalmente, a precisão combinada intra e interdia foi também avaliada, por análise das amostras controlo anteriormente referidas (1,5 e 3,5 µg/mL), analisadas em triplicado ao longo de 5 dias (15 medições) A tabela 16 resume os resultados obtidos para a precisão e exactidão.

Tabela 16. Precisão intra e interdia combinada (n=15).

Composto	Concentração (µg/mL)	Concentração calculada (µg/mL)	CV (%)	Bias (%)
MeOPP	1.5	1.48	7.10	-1.33
	3.5	3.46	9.23	-1.14
BZP	1.5	1.48	10.91	-1.33
	3.5	3.57	12.33	2.00
mCPP	1.5	1.49	14.80	-0.67
	3.5	3.41	7.51	-2.57
TFMPP	1.5	1.53	11.07	2.00
	3.5	3.69	14.71	5.43

### 2.7.5. Estabilidade

A estabilidade de uma substância numa amostra biológica pode ser afectada por vários factores, como as suas propriedades, as condições de armazenamento, as propriedades da matriz e ainda o tipo de embalagem, entre outros. Neste trabalho, a estabilidade das piperazinas foi avaliada em ciclos de congelação/descongelação, a curto prazo à temperatura do laboratório e ainda em amostras processadas [69].

#### 2.7.5.1. Estabilidade a ciclos de congelação/descongelação

Para estudar este parâmetro, as amostras de urina foram fortificadas com as piperazinas a dois níveis de concentração (1,5 e 3,5 µg/mL), sendo posteriormente congeladas por um período de 24 h. Posteriormente foram descongeladas e mantidas à temperatura do laboratório durante 2 h. Este processo foi repetido mais duas vezes, e após concluídos os três ciclos, as amostras foram extraídas e analisadas de acordo o método anteriormente descrito.

Os resultados obtidos foram então comparados com os obtidos em amostras preparadas e analisadas no mesmo dia (em termos de coeficiente de variação) tendo-se verificado que as concentrações mais altas não sofreram variações acima dos 10%, significando que são estáveis pelo menos durante três ciclos de congelação/descongelação. No entanto, para as concentrações mais baixas, esta variação foi superior para a MeOPP e TFMPP, apresentando CV superiores a 14%, o que parece indiciar uma maior instabilidade a baixas concentrações (Tabela 17).

Tabela 17. Estabilidade após ciclos de congelação/descongelação (n=3).

Composto	Concentração (µg/mL)	CV (%)
MeOPP	1,5	18,25
	3,5	10,49
BZP	1,5	9,41
	3,5	2,33
mCPP	1,5	4,69
	3,5	9,87
TFMPP	1,5	14,36
	3,5	1,09

### 2.7.5.2. Estabilidade em amostras processadas

A estabilidade dos analitos em amostras processadas foi estudada a dois níveis de concentração (1,5 e 3,5 µg/mL). Para tal, os extractos analisados num dia foram deixados durante 24 horas no injector automático e reinjectados no dia seguinte, tendo sido comparados (em termos de CV) com amostras extraídas e analisadas no próprio dia. Obteve-se uma variação inferior a 9% para todos os analitos nas duas concentrações, pelo que se pode afirmar que estes são estáveis em amostras processadas pelo menos durante 24 horas (Tabela 18).

Tabela 18. Estabilidade em amostras processadas (n=3).

Composto	Concentração (µg/mL)	CV (%)
MeOPP	1,5	8,14
	3,5	9,05
BZP	1,5	7,97
	3,5	9,31
mCPP	1,5	4,78
	3,5	9,35
TFMPP	1,5	8,96
	3,5	5,45

### 2.7.5.3. Estabilidade a curto prazo à temperatura do laboratório

A estabilidade dos analitos por um curto período de tempo à temperatura do laboratório também foi estudada a dois níveis de concentração (1,5 e 3,5 µg/mL). Para tal, amostras fortificadas às referidas concentrações foram deixadas à temperatura ambiente durante 24 horas, período após o qual foram extraídas e analisadas. Os valores obtidos foram comparados (em termos de CV) com os obtidos em amostras preparadas e analisadas no mesmo dia. Podemos concluir que os analitos são estáveis nas amostras à temperatura ambiente pelo menos durante 24 horas (Tabela 19).

Tabela 19. Estabilidade a curto prazo à temperatura do laboratório.

Composto	Concentração (µg/mL)	CV (%)
MeOPP	1,5	3,78
	3,5	1,58
BZP	1,5	1,96
	3,5	3,73
mCPP	1,5	3,68
	3,5	0,94
TFMPP	1,5	0,07
	3,5	0,29

### 2.7.6. Recuperação

A recuperação do método foi apresentada anteriormente (Tabela 11). Estes resultados são semelhantes ou superiores aos descritos por outros autores. De facto, Tsutsumi *et al.* em 2005 [24], obtiveram recuperações de 96% para a BZP e 99% para a TFMPP, utilizando como técnica de extração a SPE. Em 2008, Vorce *et al.* determinaram também BZP e TFMPP por LLE e a percentagem de recuperação foi de 97 para BZP% e 101% para a TFMPP.

### 2.7.7. Arrastamento (*carryover*)

A avaliação da existência de fenómenos de arrastamento (*carryover*) foi efectuada em simultâneo com o estudo da gama de trabalho. O *carryover* foi avaliado através de uma injeção no sistema cromatográfico de uma amostra de urina branca após a análise de amostras

fortificadas com piperazinas com concentração de 5 µg/mL (concentração mais elevada). Como se pode observar na figura 29, não foram observados efeitos de arrastamento.

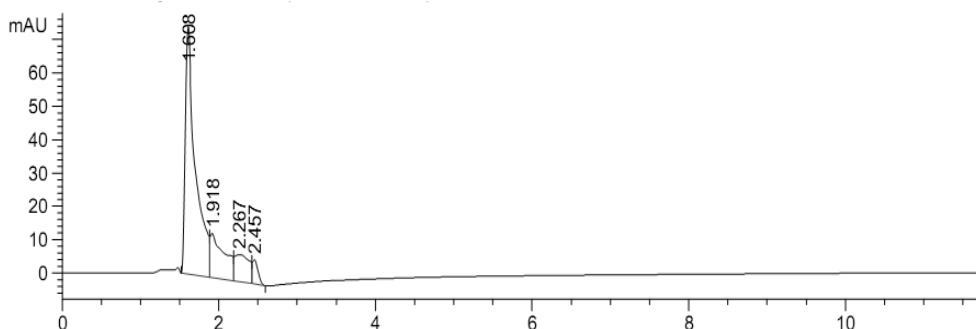


Figura 28. Cromatograma de uma amostra branca, que indica não existir *carryover*.

### 2.7.8. Aplicação do método a amostras reais

Como parte do processo de validação, a metodologia foi aplicada a uma amostra real, proveniente de um indivíduo em tratamento com antidepressivos (trazodona) que deu entrada no Serviço de Psiquiatria do Centro Hospitalar Cova da Beira, Covilhã. Deste modo, pode detectar-se a mCPP, que é um conhecido metabolito da trazodona. A amostra foi analisada pelo procedimento anteriormente descrito (em triplicado), tendo sido obtida a concentração de  $0,22 \pm 0,02$  µg/mL. A figura 30 mostra o cromatograma obtido por análise desta amostra.

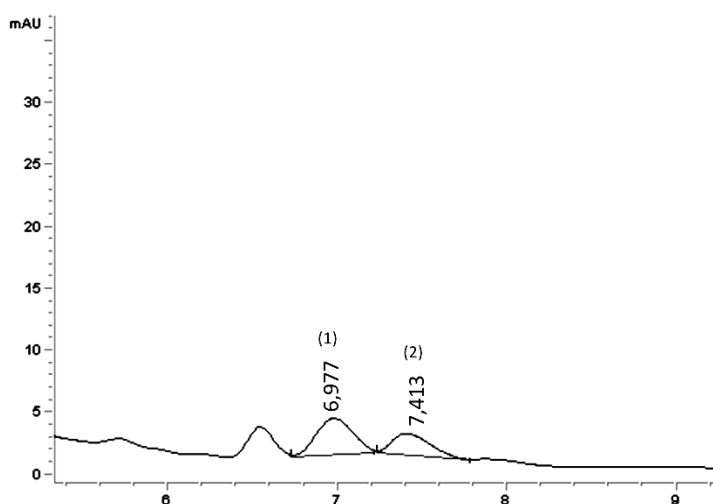


Figura 29. Cromatograma de amostra real (concentração de mCPP 0.22 µg/mL). (1) PI, (2) mCPP.



### III. Conclusões

1. Foi desenvolvido um método rápido e simples para a determinação de piperazinas em amostras de urina, utilizando a MEPS. Esta técnica revelou ser uma alternativa promissora para a quantificação dos analitos nesta amostra, devido à rapidez no processo de extração (1-3 minutos), redução significativa do volume de amostra (100  $\mu$ L), diminuição do consumo de solventes, possibilidade de reutilização da coluna por mais de 50 extrações e recuperações elevadas.
2. As condições cromatográficas estabelecidas permitiram uma rápida (inferior a 15 minutos) e adequada separação dos analitos, permitindo a identificação e quantificação simultâneas de MeOPP, BZP mCPP e TFMPP.
3. Os principais factores susceptíveis de influenciar o processo extractivo foram inicialmente optimizados com o objectivo de maximizar a recuperação, permitindo assim obter baixos limites de detecção e quantificação. Neste contexto, o planeamento factorial fraccionado revelou ser uma ferramenta útil na optimização da extração, diminuindo o número de experiências e permitindo obter uma significativa poupança de tempo e dinheiro.
4. O uso de fase estacionária de modo misto permitiu obter cromatogramas mais limpos e valores de recuperação elevados, na ordem dos 70 a 100% para a MeOPP, mCPP e TFMPP; e na ordem dos 50-60% para a BZP.
5. O método demonstrou ser selectivo, linear dentro da gama estudada, preciso e exacto, apresentando baixos limites de detecção e quantificação utilizando um volume de amostra de apenas 100  $\mu$ L.
6. É de salientar ainda que este é o primeiro estudo que permite identificar e quantificar piperazinas em amostras de urina com recurso à MEPS, sendo também a primeira vez que o desenho experimental foi utilizado na optimização de um processo extractivo por MEPS.



## IV. Bibliografia

1. OEDT (Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência). Relatório Anual 2010: A evolução da droga na Europa. [documento online]. 2010 [consultado 12 Jun 2011]
2. Costa, S., *Métodos de análise de piperazinas em fluidos biológicos*, in [Dissertação de Mestrado]. 2007, Universidade de Aveiro: Aveiro.
3. Elliott, S., Smith, C., *Investigation of the first deaths in the United Kingdom involving the detection and quantitation of the piperazines BZP and 3-TFMPP*. Journal of Analytical Toxicology, 2008. 32(2): p. 172-177.
4. Gijssman, H.J., Van Gerven, J., Tieleman, M.C., Schoemaker, R. C., Pieters, M., Ferrari, M.D., Cohen, A.F., Van Kempen, G.M.F., *Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of oral and intravenous meta-chlorophenylpiperazine in healthy volunteers*. Journal of Clinical Psychopharmacology, 1998. 18(4): p. 289.
5. Antia, U., *The Metabolism and Pharmacokinetics of BZP and TFMPP- "Party Pill" Drugs*, in Faculty of Medical and Health Sciences. 2009, The University of Auckland: Auckland.
6. Henriques, S., *Risco cultivado no consumo de novas drogas*. Sociologia, Problemas e Práticas, 2002: p. 63-85.
7. WHO (World Health Organization). World Health Organization Expert Committee on Drug Dependence. Sixteenth Report. Genève, Switzerland: WHO Technical Report Series 407. [documento online]. 1969 [consultado 10 Out 2010 ]. Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_407.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_407.pdf).
8. Filho, M.T., Yen, C.C., Santos, U.P., Muñoz, D.R., *Pulmonary alterations in cocaine users*. São Paulo Medical Journal, 2004. 122(1): p. 26-31.
9. Maes, M., Van West, D., De Vos, N., Westenberg, H., Van Hunsel, F., Hendriks, D., Cosyns, P., Scharpé, S., *Lower baseline plasma cortisol and prolactin together with increased body temperature and higher mCPP-induced cortisol responses in men with pedophilia*. Neuropsychopharmacology, 2001. 24(1): p. 37-46.
10. Lanaro, R., Costa, J.L., Filho, L. A.Z., Cazenave, S. O. S., *Identificação química da clorofenilpiperazina (CPP) em comprimidos apreendidos*. Química Nova, 2010. 33(3): p. 725-729.
11. Wohlfarth, A., Weinmann, W., Dresen, S., *LC-MS/MS screening method for designer amphetamines, tryptamines, and piperazines in serum*. Anal Bioanal Chemistry, 2010. 396: p. 2403-2414.
12. Beck, J., Morgan, P.A., *Designer drug confusion: a focus on MDMA*. Journal of drug education, 1986. 16(3): p. 287-302.
13. OEDT (Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência). Relatório Anual sobre a Evolução do Fenómeno da Droga na União Europeia-2001. [documento online]. 2001 [consultado 09 Mai 2011]. Disponível

em:[http://ar2001.emcdda.europa.eu/multimedia/Annual\\_Report\\_2001//ar01\\_pt.pdf](http://ar2001.emcdda.europa.eu/multimedia/Annual_Report_2001//ar01_pt.pdf).

14. Wohlfarth, A., Weinmann, W., *Bioanalysis of new designer drugs*. *Bioanalysis*, 2010. 2(5): p. 965-979.
15. Yeapa, C.W., Bianb, C. K., Abdullah, A. F. L., *A Review on Benzylpiperazine and Trifluoromethylphenylpiperazine: Origins, Effects, Prevalence and Legal Status*. *Health and the Environment Journal*, 2010. 1(2): p. 38-50.
16. Barroso, M., Costa, S., Dias, M., Vieira, D.N., Queiroz, J.A., López-Rivadulla, M., *Analysis of phenylpiperazine-like stimulants in human hair as trimethylsilyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 2010. 1217: p. 6274-6280.
17. Staack, R.F., Fritschi, G., Maurer, H. H., *New designer drug 1 (3 trifluoromethylphenyl) piperazine (TFMPP): gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/mass spectrometry studies on its phase I and II metabolism and on its toxicological detection in rat urine*. *Journal of mass spectrometry*, 2003. 38(9): p. 971-981.
18. Byrska, B., Zuba, D., Stanaszek, R. , *Determination of piperazine derivates in "Legal Highs"*. *Problems of Forensic Sciences* 2010. 81: p. 101-113.
19. de Boer, D., Bosman, I. J., Hidvégi, E., Manzoni, C., Benkö, A.A., dos Reys, L.J.A.L., Maes, R.A.A., *Piperazine-like compounds: a new group of designer drugs-of-abuse on the European market*. *Forensic Science International*, 2001. 121(1-2): p. 47-56.
20. Staack, R.F., Paul, L.D., Schmid, D., Roeder, G., Rolf, B., *Proof of a 1-(3-chlorophenyl)piperazine (mCPP) intake—Use as adulterant of cocaine resulting in drug-drug interactions?* *Journal of Chromatography B*, 2007. 855: p. 127-133.
21. Baumann, M.H., Clark, R.D., Budzynski, A.G., Partilla, J.S., Blough, B.E., Rothman, R.B., *N-substituted piperazines abused by humans mimic the molecular mechanism of 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, or 'Ecstasy')*. *Neuropsychopharmacology*, 2004. 30(3): p. 550-560.
22. Cohen, B.M.Z., Butler, R., *BZP-party pills: A review of research on benzylpiperazine as a recreational drug*. *International Journal of Drug Policy*, 2011. 22(2): p. 95-101.
23. Lin, J.C., Jan, R.K., Lee, H., Jensen, M.A., Kydd, R.R., Russell, B.R., *Determining the subjective and physiological effects of BZP combined with TFMPP in human males*. *Psychopharmacology* 2011. 214: p. 761-768.
24. Tsutsumi, H., Katagi, M., Miki, A., Shima, N., Kamata, T., Nishikawa, M., Nakajima, K., Tsuchihashi, H., *Development of simultaneous gas chromatography-mass spectrometric and liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometric determination method for the new designer drugs, N-benzylpiperazine (BZP), 1-(3-trifluoromethylphenyl)piperazine (TFMPP) and their main metabolites in urine*. *Journal of Chromatography B* 2005. 819: p. 315-322.
25. EMCDDA (The European Police Office Europol - The European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (Europol-EMCDDA)). *Report on the risk assessment of BZP in the framework of the Council decision on new psychoactive substances*. 2009 [consultado 27 Jan 2011].

26. Procuradoria-Geral Distrital de Lisboa Ministério Público. [consultado 8 junho 2011]. Disponível em: [http://www.pgdlisboa.pt/pgdl/leis/lei\\_mostra\\_articulado.php?nid=1099&tabela=leis&ficha=1&pagina=1](http://www.pgdlisboa.pt/pgdl/leis/lei_mostra_articulado.php?nid=1099&tabela=leis&ficha=1&pagina=1)
27. EMCDDA (The European Police Office Europol - The European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (Europol-EMCDDA)). *Joint Report on a new psychoactive substance: 1-benzylpiperazine (BZP). In accordance with Article 5 of Council Decision 2005/387/JHA on information exchange, risk assessment and control of new psychoactive substances.* [documento online]. 2007 [consultado 10 Feb 2011]. Disponível em: <http://www.emcdda.europa.eu/?nnodeID=1346>.
28. Hang, B.S., Rocco, V.J., Wilson, J., *Street Drugs BZP and TFMPP Can be Mistaken for Ecstasy.* *Clinical & Forensic Toxicology News*, 2009: p. 2-3.
29. Schürenkamp, J., Beike, J., Pfeiffer, H., Köhler, H., *Separation of positional CPP isomers by chiral HPLC-DAD of seized tablets.* *International Journal of Legal Medicine*, 2011. 125: p. 95-99.
30. Antia, U., Tingle, M.D., Russell, B.R., *Party pill' drugs-BZP and TFMPP.* *The New Zealand Medical Journal.* [documento online]. 2009 [consultado 23 Feb 2011] 122(1307). Disponível em: <http://www.nzma.org.nz/journal/123-1316/4177>.
31. Hakkinen, P.J., Wexler, P. M., Kennedy, G. S., *Encyclopedia of toxicology.* 2005. 4: p. 1, 81, 297, 299.
32. Caccia, S., Garattini, S., *1-arylpiperazines as active metabolites of (4-substituted aryl-1-piperazinyl) alkyl heterocyclic drugs.* *Acta Pharmacology Yugoslav*, 1990. 40: p. 441-460.
33. Caccia, S., Conti, I., Notarnicola, A., Urso, R., *Lipophilicity and disposition of 1-aryl-piperazines in the rat.* *Xenobiotica*, 1987. 17(5): p. 605-616.
34. Staack, R.F., Maurer, H.H., *Metabolism of designer drugs of abuse.* *Current Drug Metabolism*, 2005. 6(3): p. 259-274.
35. Maurer, H.H., Kraemer, T., Springer, D., Staack, R.F., *Chemistry, pharmacology, toxicology, and hepatic metabolism of designer drugs of the amphetamine (ecstasy), piperazine, and pyrrolidinophenone types: a synopsis.* *Therapeutic Drug Monitoring*, 2004. 26(2): p. 127.
36. Antia, U., Lee, H.S., Kydd, R.R., Tingle, M.D., Russell, B.R., *Pharmacokinetics of [ ] party pill'drug N-benzylpiperazine (BZP) in healthy human participants.* *Forensic Science International*, 2009. 186(1-3): p. 63-67.
37. Staack, R.F., Fritschi, G., Maurer, H.H., *Studies on the metabolism and toxicological detection of the new designer drug N-benzylpiperazine in urine using gas chromatography-mass spectrometry.* *Journal of Chromatography B*, 2002. 773(1): p. 35-46.
38. Antia, U., Tingle, M.D., Russell, B.R., *In vivo interactions between BZP and TFMPP (party pill drugs).* *Journal of the New Zealand Medical Association*, 2009. 122(1303): p. 29-38.
39. Parkin, A., Iain, D. H., Parsons, S., *Structures of piperazine, piperidine and morpholine.* *Acta Crystallographica*, 2004. 60: p. 219-227.

40. Helena, C., *Estudo da influência do metabolismo na toxicidade de derivados anfetamínicos: 4-MTA, 2C-B e MDMA.*, in *Tese de Doutoramento*. 2007, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto: Porto.
41. Broocks, A., Pigott, T.A., Hill, J.L., *Acute intravenous administration of ondansetron and m-CPP, alone and in combination, in patients with obsessive-compulsive disorder (OCD): behavioral and biological results*. *Psychiatry research*, 1998. 79(1): p. 11-20.
42. Samanin, R., Mennini, T., Ferraris, A., Bendotti, C., Borsini, F., Garattini, S., *m-Chlorophenylpiperazine: a central serotonin agonist causing powerful anorexia in rats*. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of Pharmacology*, 1979. 308(2): p. 159-163.
43. Kennett, G.A., Curzon, G., *Evidence that mCPP may have behavioural effects mediated by central 5-HT<sub>1C</sub> receptors*. *British Journal of Pharmacology*, 1988. 94(1): p. 137.
44. Walsh, A.E.S., Smith, K. A., Oldman, A. D., Williams, C., Goodall, E. M., Cowen, P. J., *m-Chlorophenylpiperazine decreases food intake in a test meal*. *Psychopharmacology*, 1994. 116(1): p. 120-122.
45. Stancampiano, R., Melis, M.R., Argiolas, A., *Penile erection and yawning induced by 5-HT<sub>1C</sub> receptor agonists in male rats: relationship with dopaminergic and oxytocinergic transmission*. *European Journal of Pharmacology*, 1994. 261(1-2): p. 149-155.
46. Butler, R.A., Sheridan, J.L., *Highs and lows: patterns of use, positive and negative effects of benzylpiperazine-containing party pills (BZP-party pills) amongst young people in New Zealand*. *Harm Reduction Journal*, 2007. 4(1): p. 18.
47. Hollander, E., Stein, D.J., DeCaria, C.M., Cohen, L., Saoud, J. B., Skodol, A. E., Kellman, D., Rosnick, L., Oldham, J.M., *Serotonergic sensitivity in borderline personality disorder: preliminary findings*. *American Journal of Psychiatry*, 1994. 151(2): p. 277.
48. Tancer, M., Johanson, C. E., *Reinforcing, subjective, and physiological effects of MDMA in humans: a comparison with d-amphetamine and mCPP*. *Drug and Alcohol Dependence*, 2003. 72(1): p. 33-44.
49. McCann, U.D., Eligulashvili, V., Mertl, M., Murphy, D. L., Ricaurte, G.A., *Altered neuroendocrine and behavioral responses to m-chlorophenylpiperazine in 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) users*. *Psychopharmacology*, 1999. 147(1): p. 56-65.
50. Queiroz, S.C.N., Collins, C. H., Jardim, I., *Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica*. *Quim. Nova*, 2001. 24(1): p. 68-76.
51. Kataoka, H., *Recent advances in solid-phase microextraction and related techniques for pharmaceutical and biomedical analysis*. *Current Pharmaceutical Analysis*, 2005. 1(1): p. 65-84.
52. Moffat, A.C., Osselton, M. D., Widdop, B., *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons* 2003. 2.

53. Gallardo, E., Costa, S., Barroso, M., *A microextração em fase sólida como técnica de preparação de amostras em química analítica e toxicologia: Teoria e aplicações*. Rev. Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde, 2009. 6: p. 105-124.
54. Novakova, L., Vlckova, H., *A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation*. Analytica Chimica Acta, 2009. 656(1-2): p. 8-35.
55. Jonsson, S., Hagberg, J., Van Bavel, B., *Determination of 2,4,6-Trichloroanisole and 2,4,6-Tribromoanisole in Wine Using Microextraction in Packed Syringe and Gas Chromatography-Mass Spectrometry*. Journal Agricultural Food Chemistry, 2008. 56: p. 4962-4967.
56. Mandrioli, R., Mercolini, L., Lateana, D., Boncompagni, G., Raggi, M.A., *Analysis of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma, urine and saliva by MEPS-LC-UV*. Journal of Chromatography B, 2011. 879: p. 167-173.
57. Morales-Cid, G., Cardenas, S., Simonet, B.M., Valcarcel, M., *Fully Automatic Sample Treatment by Integration of Microextraction by Packed Sorbents into Commercial Capillary Electrophoresis- Mass Spectrometry Equipment: Application to the Determination of Fluoroquinolones in Urine*. Analytical chemistry, 2009. 81(8): p. 3188-3193.
58. Thurman, E.M., Mills, M. S., *Solid-phase extraction: principles and practice*. 1998: Wiley New York.
59. Vlckova, H., Solichova, D., Bláha, M., Solich, P., Novakova, L., *Microextraction by packed sorbent as sample preparation step for atorvastatin and its metabolites in biological samples-Critical evaluation*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2011. 55 p. 301-308.
60. Abdel-Rehim, M., *New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications: I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 2004. 801(2): p. 317-321.
61. Abdel-Rehim, M., *Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis*. Journal of Chromatography A, 2010. 1217 p. 2569-2580.
62. Abdel Rehim, M., Altun, Z., Blomberg, L., *Microextraction in packed syringe (MEPS) for liquid and gas chromatographic applications. Part II—Determination of ropivacaine and its metabolites in human plasma samples using MEPS with liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Journal of mass spectrometry, 2004. 39(12): p. 1488-1493.
63. Abdel-Rehim, M., Skansen, P., Vita, M., Hassan, Z., Blomberg, L., Hassan, M., *Microextraction in packed syringe/liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry for quantification of olomoucine in human plasma samples*. Analytica Chimica Acta, 2005. 539(1-2): p. 35-39.
64. Abdel-Rehim, M., *Microextraction by packed sorbent in bioanalysis*. Bioanalysis, 2009. 1(4): p. 687-691.
65. Almeida, C., Rosário, P., Serôdio, P., Nogueira, J.M.F., *Novas perspectivas na preparação de amostras para análise cromatográfica*. Química, 2004. 95: p. 69-77.

66. Simpson, N.J.K., *Solid-phase extraction: principles, techniques, and applications*. 2000. N. J. K. Simpson. Harbor City, California, Marcel Dekker.
67. Telepchak, M.J., Chaney, G., *Forensic and Clinical Applications of Solid Phase Extraction*. H. Press. 2004. Totowa, New Jersey. .
68. Costa, S., Barroso, M., Castañera, A., Dias, M., *Design of experiments, a powerful tool for method development in forensic toxicology: application to the optimization of urinary morphine 3-glucuronide acid hydrolysis*. *Anal Bioanal Chem* 2010. 396: p. 2533-2542.
69. Food and Drug Administration: U.S. Department of Health and Human Services. Guidance for industry, bioanalytical method validation [documento online]. 2001 [consultado 28 Mai 2011].
70. ICH (International Conference on Harmonization) Validation of analytical methods: Methodology ICH Q2 B. [documento online]. 2005 [consultado 1 Jun 2011].
71. Vorce, S.P., Holler, J.M., Levine, B., Past, M.R., *Detection of 1-benzylpiperazine and 1-(3-trifluoromethylphenyl)-piperazine in urine analysis specimens using GC-MS and LC-ESI-MS*. *Journal of Analytical Toxicology*, 2008. 32(6): p. 444-450.
72. Dickson, A.J., Vorce, S.P., Holler, J.M., Lyons, T.P., *Detection of 1-Benzylpiperazine, 1-(3-Trifluoromethylphenyl)-piperazine, and 1-(3-Chlorophenyl)-piperazine in 3, 4-Methylenedioxymethamphetamine-Positive Urine Samples*. *Journal of analytical toxicology*, 2010. 34(8): p. 464-469.
73. Antia, U., Tingle, M.D., Russell, B.R., *Validation of an LC-MS method for the detection and quantification of BZP and TFMPP and their hydroxylated metabolites in human plasma and its application to the pharmacokinetics study of TFMPP in humans* *Journal of Forensic Sciences*, 2010. 55(5): p. 1311-1318.

## V. Anexos

### 1. Comunicações submetidas no âmbito desta tese

APLICAÇÃO DO DESIGN OF EXPERIMENTS (DOE) NA OPTIMIZAÇÃO DA EXTRACÇÃO DE PIPERAZINAS DE URINA POR MICROEXTRACÇÃO EM SERINGA EMPACOTADA

Moreno I.E.D., da Fonseca B.M., Magalhães A.R., Geraldès V., Queiroz J.A., Barroso M., Costa S., Gallardo E.

Jornadas Ibéricas de Toxicologia, Covilhã, Março de 2011.

DETERMINACIÓN DE PIPERACINAS EN MUESTRAS DE ORINA POR MICROEXTRACCIÓN EN ADSORBENTE EMPAQUETADO (MEPS) (comunicação oral aceite)

Moreno I.E.D., da Fonseca B.M., Magalhães A.R., Geraldès V., Queiroz J.A., Barroso M., Costa S., Gallardo E.

XIX Congreso Español de Toxicología, Vigo, Espanha, Julho de 2011.

ANALYTICAL APPROACH FOR DETERMINATION OF PIPERAZINES BY UPLC-DAD USING MICROEXTRACTION BY PACKED SORBENT (comunicação oral aceite)

I.E.D. Moreno, B. M. da Fonseca, A.R. Magalhães, M. Barroso, S. Costa, J.A. Queiroz, E. Gallardo

19<sup>th</sup> Triennial Meeting of the International Association of Forensic Sciences, 9<sup>th</sup> Triennial Meeting of World Police Medical Officers and the 5<sup>th</sup> Meeting of the Mediterranean Academy of Forensic Sciences 2011 Joint Meeting, Funchal, Setembro de 2011.

ULTRA HIGH PERFORMNACE LIQUID CHROMATOGRAPHY - DIODE ARRAY FOR DETERMINATION OF PIPERAZINES IN URINE (comunicação oral aceite)

Moreno I.E.D., da Fonseca B. M., Magalhães A.R., Barroso M., Costa S., Queiroz J.A., Gallardo E.

VI Annual CICS Symposium, Covilha, Julho 2011.

ANÁLISE DE PIPERAZINAS POR MICROEXTRACÇÃO EM SERINGA EMPACOTADA E HPLC/DAD EM AMOSTRAS DE URINA

Moreno I.E.D., da Fonseca B.M., Magalhães A.R., Geraldès V., Queiroz J.A., Barroso M., Costa S., Gallardo E.

Jornadas Ibéricas de Toxicologia, Covilhã, Março de 2011.

MICROEXTRACÇÃO EM SERINGA EMPACOTADA (MEPS), UMA NOVA METODOLOGIA PARA EXTRACÇÃO DE PIPERAZINAS A PARTIR DE AMOSTRAS DE URINA

Moreno I.E.D., da Fonseca B.M., Magalhães A.R., Geraldês V., Queiroz J.A., Barroso M., Costa S., Gallardo E.

Conferência Ibero-americana das Faculdades de Farmácia, Lisboa 2011.

## **2. Outras comunicações realizadas no decorrer desta tese**

DETERMINACIÓN DE NICOTINA, COTININA Y TRANS-HIDROXICOTININA EN SALIVA POR CROMATOGRÁFIA DE GASES/ESPECTROMETRIA DE MASAS EN TANDEM (comunicação oral aceite)

da Fonseca BM; Moreno IED; Magalhães AR; Geraldês V; Queiroz JA; Calheiros J; Barroso M; Gallardo, E.

XIX Congreso Español de Toxicología, Vigo, Espanha, Julho de 2011.

ANALYTICAL APPROACH TO THE DETERMINATION OF BIOMARKERS OF TOBACCO EXPOSURE IN ORAL FLUID (comunicação oral aceite)

da Fonseca BM; Moreno IED; Magalhães AR; Queiroz JA; Calheiros J; Barroso M; Gallardo E. VI Annual CICS Symposium, Covilhã, Julho 2011.

GAS CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY METHOD FOR THE QUANTITATION OF NICOTINE, COTININE AND TRANS-3-HIDROXICOTININE IN ORAL FLUID (comunicação em formato poster aceite)

B.M. da Fonseca, I.E.D. Moreno, A.R. Magalhães, J.A. Queiroz, J. Calheiros, M. Barroso, E. Gallardo

19th Triennial Meeting of the International Association of Forensic Sciences, 9th Triennial Meeting of World Police Medical Officers and the 5th Meeting of the Mediterranean Academy of Forensic Sciences 2011 Joint Meeting, Funchal, Setembro de 2011.

### 3. Trabalhos submetidos para publicação em revista indexada durante a realização deste trabalho

Determination of nicotine, cotinine and trans-3'-hydroxycotinine in oral fluid using solid-phase extraction and gas chromatography- tandem mass spectrometry.

B.M. da Fonseca, I.E.D. Moreno, A.R. Magalhães, M. Barroso, J.A. Queiroz, J. Calheiros, S. Ravara, E. Gallardo

Submetido para o Journal of Chromatography A (16 Julho de 2011).

Analysis of piperazine-type stimulants in human urine by microextraction in packed sorbent: the power of the factorial design approach in optimizing the whole extraction procedure. I.E.D. Moreno, B.M. da Fonseca, A.R. Magalhães, V.S. Geraldes, J.A. Queiroz, M. Barroso, S. Costa, E. Gallardo

Submetido para o Journal of Chromatography A (15 Julho de 2011).

Development and validation of a method for the determination of piperazines in human urine by means of microextraction by packed sorbent and ultra high performance liquid chromatography-diode array detection.

I.E.D. Moreno, B.M. da Fonseca, A.R. Magalhães, M. Barroso, S. Costa, J. A. Queiroz, E. Gallardo

Submetido para o Analytical Chemistry (19 Julho de 2011).