

PATRÍCIA RAQUEL REIS MOREIRA

ESTUDO ANALÍTICO DAS INTERAÇÕES METABÓLICAS ENTRE PIPERAZINAS UTILIZADAS COMO DROGAS DE ABUSO

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Medicina Legal submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientadora – Doutora Helena Maria Ferreira da Costa Ferreira Carmo

Categoria – Professora Auxiliar

Afiliação – Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Co-orientadora – Doutora Diana Cristina Dias da Silva

Categoria – Investigadora

Afiliação – Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Dedico este trabalho aos melhores pais do mundo, os meus.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente queria agradecer à Professora Doutora Maria José Pinto da Costa, Coordenadora do Mestrado em Medicina Legal, pela oportunidade e o privilégio de frequentar este Mestrado, que contribuiu imenso para a minha formação académica e científica. Queria também agradecer à Professora Doutora Maria de Lourdes Bastos, Diretora do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, a oportunidade de trabalhar no Laboratório de Toxicologia que providenciou todos os equipamentos e materiais necessários para a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Helena Carmo, presente em cada etapa, quero agradecer por te aceite ser minha orientadora bem como por todo o apoio, incentivo, amizade, empenho, dedicação e enorme saber científico com que me orientou e supervisionou durante a elaboração da dissertação. Agradeço não só a confiança que depositou em mim mas também o sentido de responsabilidade que me transmitiu em todas as etapas do trabalho.

À Doutora Diana Dias da Silva, minha co-orientadora, exemplo de organização e rigor, quero agradecer por me ter transmitido esses e outros valores, pela forma como me recebeu e auxiliou no laboratório e por todo o conhecimento científico que me transmitiu.

À Doutora Sara Cunha, do Laboratório de Bromatologia e Hidrologia, do Departamento de Ciências Químicas, da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, não tenho palavras para descrever o quanto lhe estou grata. Em primeiro lugar, quero agradecer-lhe por ter colocado à minha disposição o equipamento de GC/MS, por toda a assistência, apoio incansável, disponibilidade, paciência, e transmissão de conhecimento científico sobre a técnica analítica de GC/MS. Agradeço a sua colaboração no trabalho, as suas críticas, sugestões e amizade. Não posso deixar de falar na forma como me recebeu, bem como da sua boa disposição, palavras de ânimo nos momentos menos bons e sorrisos nas etapas bem conseguidas. O seu apoio foi determinante na realização deste trabalho.

À Cátia, quero agradecer pela sua disponibilidade, por me auxiliar sempre que precisei de algum material de urgência e por me ajudar sempre a encontrar uma solução para algum eventual problema que ocorresse no laboratório. À Cátia e à Margarida,

sempre preocupadas com o bem-estar de todos no laboratório, quero agradecer o carinho e companhia durante o tempo que estive no laboratório.

A todos os colaboradores do Laboratório de Toxicologia, quero agradecer pela ajuda, simpatia e companhia diária.

Às minhas colegas de laboratório, Bárbara, Teresa e Débora agradeço a amizade, companhia e bons momentos que também contribuíram para o sucesso desta etapa da minha vida. Agradeço em especial à Márcia pela amizade incondicional, apoio, incentivo, desabaços, pela companhia nas noitadas e fins-de-semana de trabalho, pela generosidade e pela disponibilidade para me ajudar em qualquer dúvida quer na etapa do trabalho laboratorial quer na etapa da escrita.

A todos os meus amigos quero deixar um obrigado especial por terem estado sempre presentes, não só nesta etapa mas em todos os momentos da minha vida.

À minha família, em especial aos meus pais quero agradecer pela motivação, suporte, carinho e dedicação transmitidos ao longo desta etapa. Obrigada por acreditarem em mim, sem vocês nada disto seria possível.

RESUMO

A 1-benzilpiperazina (BZP) e a 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina (TFMPP) são drogas de abuso, frequentemente administradas em simultâneo, quer de forma deliberada, para mimetizar os efeitos da 3,4-metilendioxi metanfetamina (*ecstasy*), ou inadvertidamente, como resultado da sua combinação nas pastilhas ingeridas pelos consumidores.

Considerando a frequência da administração concomitante de BZP e TFMPP no contexto forense, e o seu impacto toxicológico, considerou-se de extrema relevância o desenvolvimento e validação de um método que permitisse a determinação simultânea destas drogas em matrizes biológicas. Assim, no presente trabalho, foi desenvolvido, otimizado e validado um método de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC/MS) que permite a deteção e quantificação simultânea de BZP e TFMPP em três matrizes distintas (plasma, urina e meio de cultura). O método demonstrou alta sensibilidade e desempenho adequado para a separação e quantificação da BZP e TFMPP. De acordo com os resultados da validação analítica, o método apresentou linearidade, limites de deteção e quantificação, precisão e exatidão adequados para uma utilização científica, clínica e forense. Além disso, o método não apresentou interferências, possuindo uma eficiência extrativa aceitável.

Uma vez que a BZP e a TFMPP são quimicamente e mecanisticamente aparentadas, partilhando vias de metabolização e de destoxificação, pode-se antecipar que a combinação destas substâncias poderá exacerbar a gravidade e/ou alargar a gama dos efeitos tóxicos de cada uma, em virtude de alterações no perfil metabólico das substâncias quando administradas em simultâneo. Desta forma, a metodologia previamente validada foi aplicada para estudar as interações metabólicas em hepatócitos primários de rato expostos a misturas de BZP e TFMPP. Os resultados obtidos não evidenciaram sinais de competição metabólica, pelo contrário, a mistura parece favorecer o metabolismo de ambas as substâncias, especialmente no caso da BZP.

A metodologia analítica desenvolvida neste trabalho revelou potencial para aplicação direta para fins de investigação, e também para o controlo do abuso destas drogas em humanos.

Palavras-chave: Piperazinas, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC/MS), metabolismo, toxicocinética.

ABSTRACT

1-benzylpiperazine (BZP) and 1-(3-trifluoromethylphenyl)piperazine (TFMPP) are piperazine drugs of abuse often taken in combination, either deliberately to mimic the effects of 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (ecstasy), or inadvertently as a result of their combination in the party pills ingested by abusers.

Considering the frequency of the co-administration of BZP and TFMPP in the forensic context and its toxicological impact, it was found of utmost relevance to develop and validate a method that allows the simultaneous determination of these drugs. In the present work a gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) technique that allows the detection and simultaneous quantification of BZP and TFMPP in three different matrices (plasma, urine and culture medium) was developed, optimized, and validated. The method showed high sensitivity and adequate performance in the separation and quantification of BZP and TFMPP. According to the validation results, the method showed linearity, detection and quantitation limits, precision, and accuracy suitable for scientific, clinical and forensic applications. Moreover, the method showed lack of interferences and an acceptable extraction efficiency.

Because BZP and TFMPP are chemically and mechanistically similar, and consequently have the potential to disturb the metabolic and detoxifying pathways of one another, it is plausible that the combination of these substances will exacerbate the severity and/or widen the range of the toxic effects of the drugs individually. Thus, the previously validated method was applied to study the metabolic interactions that occur when primary rat hepatocytes are co-exposed to mixtures of BZP and TFMPP. The results of this study showed no evidence of metabolic competition, on the contrary, the mixture seems to enhance the metabolism of both substances, especially in the case of BZP.

The developed analytical methodology has direct application not only for research purposes but also for the control of drug abuse in humans.

Keywords: Piperazines, gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS), metabolism, toxicokinetics

ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação encontra-se dividida em seis partes. A primeira parte é uma introdução onde é feita uma revisão da informação disponível na literatura científica. A introdução sumariza o conhecimento sobre a toxicodinâmica e a toxicinética da BZP e da TFMPP, individualmente e em mistura, e ainda sobre as metodologias analíticas usadas até à presente data na identificação destas drogas. Na segunda parte estão apresentados os objetivos da dissertação. A terceira parte consiste nos materiais e métodos, onde é efetuada a descrição dos trabalhos experimentais e das metodologias usadas na sua realização. A quarta parte da dissertação consiste na apresentação dos resultados e na discussão dos mesmos. A quinta parte corresponde às conclusões finais e por último, na sexta parte, estão enumeradas as referências.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	v
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO.....	xii
ÍNDICE.....	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xvii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xx
ABREVIATURAS.....	xxiv
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Drogas sintéticas e os derivados piperazínicos.....	1
1.2 1-benzilpiperazina e 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina.....	2
1.2.1 Aparecimento e relevância terapêutica.....	2
1.2.2 Propriedades físico-químicas e síntese.....	3
1.2.3 BZP e TFMPP como drogas de abuso e legislação.....	4
1.2.4 Formas de apresentação e composição, prevalência e padrão de consumo.....	6
1.2.5 Efeitos resultantes do seu uso.....	7
1.2.6 Farmacodinâmica.....	9
1.2.7 Farmacocinética.....	9
1.3 Mistura de BZP e TFMPP.....	13
1.3.1 Efeitos resultantes do seu uso.....	13
1.3.2 Farmacodinâmica.....	14
1.3.3 Farmacocinética.....	15
1.4 Análise da BZP e TFMPP.....	16
1.4.1 Testes de rastreio.....	16
1.4.2 Técnicas cromatográficas.....	16
2 OBJETIVOS.....	24
3 MATERIAS E MÉTODOS.....	25
3.1 Padrões e reagentes.....	25
3.2 Preparação das soluções.....	25
3.3 Preparação das amostras.....	26
3.4 Preparação das amostras padrão.....	26
3.5 Otimização e desenvolvimento do método.....	26
3.5.1 Preparação das amostras.....	26
3.5.2 Efeito de matriz.....	28

3.5.3	Condições cromatográficas e equipamento	29
3.6	Validação do método	31
3.6.1	Preparação das amostras.....	31
3.6.2	Parâmetros de validação	32
3.6.3	Condições cromatográficas e equipamento	34
3.7	Prova de aplicabilidade: estudo das interações metabólicas entre a BZP e a TFMPP em hepatócitos primários de rato	34
3.8	Análise Estatística	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1	Otimização e desenvolvimento do método	37
4.1.1	Preparação das amostras.....	37
4.1.2	Escolha do PI	46
4.1.3	Efeito de matriz.....	48
4.1.4	Condições cromatográficas	50
4.2	Validação do método	51
4.2.1	Linearidade.....	51
4.2.2	Limite de detecção e quantificação.....	52
4.2.3	Estabilidade da amostra	54
4.2.4	Estabilidade da amostra derivatizada	57
4.2.5	Precisão	59
4.2.6	Eficiência da extração.....	64
4.2.7	Avaliação de interferências e especificidade	66
4.3	Prova de aplicabilidade: estudo das interações metabólicas entre a BZP e a TFMPP em hepatócitos primários de rato	66
5	CONCLUSÃO	70
6	REFERÊNCIAS	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Metabolismo da BZP proposto em ratos Wistar. 1 = BZP; 2 = 4-hidroxi-BZP; 3 = 3-hidroxi-BZP; 4 = 4-hidroxi-3-metoxi-BZP; 5 = piperazina; 6 = N-benzil-etilenodiamina; 7 = benzilamina (Staack et al. 2002).	11
Figura 2 - Metabolismo da TFMPP proposto em ratos Wistar. 1 = TFMPP; 2 = 4-hidroxi-TFMPP; 3 = N-(3-trifluorometilfenil)etilenodiamina; 4 = N-(hidroxi-3-trifluorometilfenil)etilenodiamina; 5 = 3-trifluorometilanilina; 6 = N-acetil-3-trifluorometilanilina; 7 = hidroxi-3-trifluorometilanilina; 8 = N-acetil-hidroxi-3-trifluorometilanilina (Staack et al. 2003).	13
Figura 3 - Programa de temperatura A aplicado ao forno da coluna para otimização da separação cromatográfica.....	29
Figura 4 - Programa de temperatura B aplicado ao forno da coluna para otimização da separação cromatográfica.....	30
Figura 5 - Cromatogramas obtidos com os diferentes processos de precipitação de proteínas testados. A: Precipitação de proteínas com TCA 20%. B: Sem precipitação de proteínas. C: Precipitação de proteínas com MeOH. A amarelo está representado o PI, a cor-de-rosa a BZP e a verde a TFMPP.	38
Figura 6 - Cromatogramas relativos a uma amostra branco (apenas com PI) de meio de cultura com (A) e sem (B) extração líquido-líquido usando hexano:acetato de etilo (9:1).40	
Figura 7 - Curvas de calibração de meio de cultura sem (A) e com (B) extração líquido-líquido usando éter <i>terc</i> -butilmetílico para a BZP e a TFMPP.	41
Figura 8 - Mecanismo genérico de derivatização usando TFAA e obtendo como derivados O-TFA, N-TFA e S-TFA (Monteiro 2012).	43
Figura 9 - Espectro de massa e padrão de fragmentação da BZP após derivatização com TFAA.	44

Figura 10 - Espectro de massa e padrão de fragmentação da TFMPP após derivatização com TFAA.....	45
Figura 11 - Espectro de massa e padrão de fragmentação do cloridrato de 4-hidroxi-3-metoxibenzilamina (PI ₁) após derivatização com TFAA.	45
Figura 12 - Espectro de massa e padrão de fragmentação da fenilpropanolamina (PI ₂) após derivatização com TFAA.	46
Figura 13 - Cromatogramas obtidos com cloridrato de 4-hidroxi-3-metoxibenzilamina (PI ₁) no meio de cultura. A: Extração com éter <i>terc</i> -butilmetílico. B: Sem extração com éter <i>terc</i> -butilmetílico.....	47
Figura 14 - Curvas de calibração da BZP e TFMPP obtidas para cada matriz e solvente (MeOH).....	49
Figura 15 - Cromatogramas obtidos para os programas de temperaturas A e B referidos na tabela 5.....	50
Figura 16 - Resultados do estudo das interações metabólicas entre a BZP e a TFMPP em hepatócitos primários de rato para as concentrações selecionadas das misturas A, B e C. Dado que os resultados obtidos não evidenciaram uma distribuição normal, estes foram comparados através do teste Kruskal-Wallis usando o GraphPad Prism versão 6.04.	68

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Estrutura química da piperazina e dos seus principais derivados usados como drogas de abuso.	2
Tabela 2 - Propriedades físico-químicas da BZP e da TFMPP (World Health Organization 2012).	4
Tabela 3 - Resumo das técnicas cromatográficas usadas na análise de piperazinas, nomeadamente da BZP e da TFMPP.	17
Tabela 4 - Diferentes tipos de extração para cada matriz.	28
Tabela 5 - Programas de temperatura A e B aplicados ao forno da coluna para otimização da separação cromatográfica.	30
Tabela 6 - Condições para monitorização das substâncias por GC/MS em modo SIM.	31
Tabela 7 - Concentrações de BZP e TFMPP ($\mu\text{g/mL}$) selecionadas para o estudo das interações metabólicas.	35
Tabela 8 - Resultados da recuperação para a BZP, TFMPP e PI em plasma, urina e meio de cultura resultantes de quatro extrações diferentes (A, B, C e D).	42
Tabela 9 - Curvas de calibração para a BZP e TFMPP em plasma, urina e meio de cultura ($n \geq 5$).	51
Tabela 10 - Resultados do LD e LQ (em $\mu\text{g/mL}$) para a BZP e TFMPP em plasma, urina e meio de cultura ($n \geq 5$).	53
Tabela 11 - Resumo dos resultados de LD e LQ (em $\mu\text{g/mL}$) do presente estudo e dos descritos na literatura para validações de métodos de doseamento de BZP e TFMPP em plasma por GC/MS e LC/MS.	53

Tabela 12 - Resumo dos resultados de LD e LQ (em µg/mL) do presente estudo e dos descritos na literatura para validações de métodos de doseamento de BZP e TFMPP em urina por GC/MS e LC/MS.	54
Tabela 13 - Resultados do estudo da estabilidade da BZP e TFMPP em amostras de plasma e urina.	55
Tabela 14 - Resultados do estudo da estabilidade da BZP e TFMPP em amostras de meio de cultura.	56
Tabela 15 - Resultados do estudo da estabilidade da BZP e TFMPP em amostra derivatizada extraída de plasma.	57
Tabela 16 - Resultados do estudo da estabilidade da BZP e TFMPP em amostra derivatizada extraída de urina.	58
Tabela 17 - Resultados do estudo da estabilidade da BZP e TFMPP em amostra derivatizada extraída de meio de cultura.	58
Tabela 18 - Precisão inter-dia para a BZP e TFMPP em plasma, urina e meio de cultura (<i>n</i> = 5).	60
Tabela 19 - Precisão intra-dia do método para a BZP e TFMPP em plasma, urina e meio de cultura (<i>n</i> = 5).	60
Tabela 20 - Precisão intra-dia do equipamento para a BZP e TFMPP em plasma, urina e meio de cultura (<i>n</i> = 5).	61
Tabela 21 - Resumo dos resultados de precisão inter-dia e intra-dia do presente estudo e dos descritos na literatura para validações de métodos de doseamento de BZP e TFMPP em plasma por GC/MS e LC/MS.	62
Tabela 22 - Resumo dos resultados de precisão inter-dia e intra-dia do presente estudo e dos descritos na literatura para validações de métodos de doseamento de BZP e TFMPP em urina por GC/MS e LC/MS.	63

Tabela 23 - Resultados da eficiência da extração para a BZP e TFMPP em plasma, urina e meio de cultura ($n \geq 5$)	64
--	----

ABREVIATURAS

5-HT - Serotonina

AC - Modelo de adição de concentrações para a previsão de efeitos de mistura

BZP - 1-benzilpiperazina

BZP.2HCl - 1-benzilpiperazina na forma de sal cloridrato

CD - Detetor de quimioluminescência

COMT - Catecol-O-metil-transferase

CYP450 - Citocromo P 450

DA - Dopamina

DAD - Detetor de díodos

DIB-Cl - Cloreto de 4-(4,5-difenil-1H-imidazole-2-il)benzoílo

DIV-145 - Befuralina

EGYT-475 - Piberalina

EI-MS - Espectrometria de massa com ionização por impacto de elétrons

EMCDDA - Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência

ESI-MS - Espectrometria de massa com ionização por electrospray

EUA - Estados Unidos da América

FD - Detetor de fluorescência

GC - Cromatografia gasosa

GC/MS - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

HFBA - Ácido heptafluorobutírico anidro

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

IA - Modelo das ações independentes para a previsão de efeitos de mistura

IR-MS - Espectrometria de massa de razões isotópicas

IT-MS - Espectrometria de massa com detetor *ion trap*

LC - Cromatografia líquida

LD - Limite de deteção

LLE - Extração líquido-líquido

LQ - Limite de quantificação

LSD - Dietilamida do ácido lisérgico

mCPP - 1-(3-clorofenil)piperazina;

M⁺ - Ião molecular

MDBP - 1-(3,4-metilenodioxil)benzilpiperazina

MDMA - 3,4-metilendioximetanfetamina

MeOH – Metanol

MeOPP - 1-(4-metoxifenil)-piperazina
MEPS - Microextração em seringa empacotada
MPMP - 1-(metil-4-fenilmetil)-piperazina
MS - Espectrometria de massa
MS/MS - Espectrometria de massa em tandem
MSTFA - N-metil-N-(trimetilsil)-trifluoroacetamida
MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
m/z - Razão massa/carga
NA - Noradrenalina
NPD - Detetor de nitrogénio-fósforo
OH-BZP - Hidroxi-benzilpiperazina
OH-TFMPP - Hidroxi-1-(3-trifluorometilfenil)piperazina
pCPP - 1-(4-clorofenil)piperazina
PFPA - Anidrido pentafluoropropiónico
pFPP - 1-(4-fluorofenil)piperazina
pH - Potencial de hidrogénio
PI - Padrão interno
pKa - Logaritmo do inverso da constante de acidez ($=\log 1/k_a$)
PPZ - Piperazina
R² - Coeficiente de correlação ao quadrado
[Ru(bipy)₃]³⁺ - Tris(2,2'-bipiridina)ruténio(III)
rpm - Rotações por minuto
SIM - Monotorização seletiva de iões
SNC - Sistema nervoso central
SPE - Extração em fase sólida
SULT - Sulfotransferase
T_{1/2} - Tempo de semi-vida
TCA - Ácido tricloroacético
TEA - Trietilamina
TFAA - Anidrido Trifluoroacético
TFMPP - 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina
TMS - Trimetilclorosilano
UGT - Uridina difosfato glucuroniltransferase
UPLC - Cromatografia líquida de ultra eficiência
UV - Detetor de ultravioleta

1 INTRODUÇÃO

1.1 Drogas sintéticas e os derivados piperazínicos

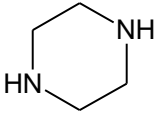
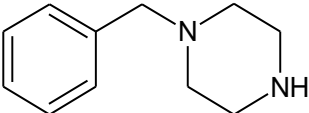
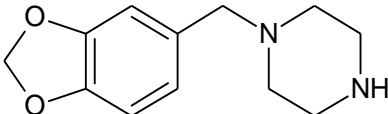
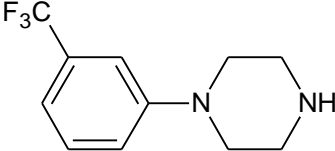
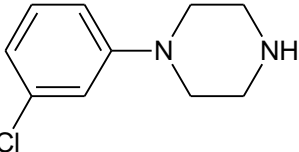
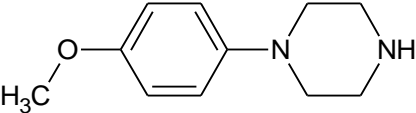
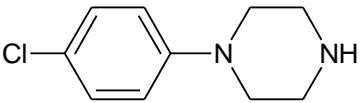
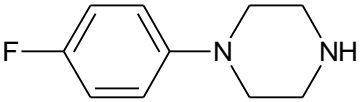
Atualmente o consumo de drogas considera-se um dos principais problemas de saúde pública e, nos últimos anos, tem-se verificado a síntese de novas moléculas, designadas por drogas sintéticas (*designer drugs*). Estas substâncias são um grupo heterogêneo de substâncias psicoativas de origem sintética obtidas a partir da modificação da estrutura química de alguns produtos naturais ou medicamentos (Mustata et al. 2009). Estas drogas foram criadas para contornar a lei vigente, uma vez que uma substância, depois de proibida, rapidamente é substituída por novos compostos que aparecem no mercado (Winstock and Ramsey 2010; Zawilska 2011). Frequentemente são utilizadas por consumidores jovens em contextos de festas e discotecas como alternativas às drogas ilícitas (Berney-Meyer et al. 2012; Staack and Maurer 2005). Apesar de serem consideradas seguras, diversos estudos indicam que o seu consumo implica sérios riscos para a saúde (Maurer et al. 2004). Hoje, estas drogas sintéticas são compradas principalmente em *websites* na internet, no entanto, anteriormente, podiam ser adquiridas nas chamadas *smart shops* (Zawilska 2011).

Neste contexto, os derivados piperazínicos surgiram na década de 1990 como uma nova classe de drogas sintéticas e como alternativas tidas como seguras e legais para as anfetaminas (Staack and Maurer 2005). Os derivados piperazínicos são vendidos como *ecstasy* ou com nomes como "Rapture", "Frenzy", "Bliss", "Charge", "Herbal ecstasy", "A2", "Legal X" ou "Legal E" (Arbo et al. 2012; Davies et al. 2010). Normalmente, são consumidos na forma de cápsulas, comprimidos ou pílulas, mas também podem aparecer em mistura ou em combinação com outras drogas de abuso, como 3,4-metilendioxi metanfetamina (MDMA, *ecstasy*) e cocaína (Staack et al. 2007).

De acordo com a sua estrutura química, os derivados piperazínicos podem ser divididos em dois grupos: as benzilpiperazinas e as fenilpiperazinas, sendo a 1-benzilpiperazina (BZP) e a 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina (TFMPP), as substâncias mais consumidas desses grupos, respetivamente (Lin et al. 2011; Wada et al. 2012). Outros exemplos de substâncias pertencentes às benzilpiperazinas incluem a 1-(3,4-metilenodioxibenzil)piperazina (MDBP) e pertencentes às fenilpiperazinas: a 1-(3-clorofenil)piperazina (mCPP), a 1-(4-metoxifenil)piperazina (MeOPP), a 1-(4-clorofenil)piperazina (pCPP) e a 1-(4-fluorofenil)piperazina (pFPP) (Arbo et al. 2012) (tabela 1).

Os compostos piperazínicos são derivados da piperazina, que é quimicamente constituída por um anel de 6 átomos contendo dois átomos de azoto em posições opostas e quatro carbonos distribuídos entre os dois átomos de azoto (Vorce et al. 2008).

Tabela 1 - Estrutura química da piperazina e dos seus principais derivados usados como drogas de abuso.

Nome	Abreviatura	Estrutura química
Piperazina	PPZ	
1-benzilpiperazina	BZP	
1-(3,4-metilenodioxibenzil)piperazina	MDBP	
1-(3-trifluorometilfenil)piperazina	TFMPP	
1-(3-clorofenil)piperazina	mCPP	
1-(4-metoxifenil)piperazina	MeOPP	
1-(4-clorofenil)piperazina	pCPP	
1-(4-fluorofenil)piperazina	pFPP	

1.2 1-benzilpiperazina e 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina

1.2.1 Aparecimento e relevância terapêutica

A BZP foi sintetizada pela primeira vez, em 1944, como um agente anti-helmíntico para gado pelos laboratórios "Welcome & Co" no Reino Unido. No entanto, devido à sua falta de eficácia e efeitos secundários nunca foi usada para esta finalidade. Mais tarde, em 1970, a BZP foi testada pelos mesmos laboratórios, como um potencial agente antidepressivo. No entanto, nunca foi comercializada como um antidepressivo,

possivelmente devido às suas semelhanças com as anfetaminas. Na década de 1980, dois derivados da BZP foram novamente testados como agentes antidepressivos, nomeadamente a piberalina (conhecida como EGYT-475 e comercializada como Trebilet) e a befuralina (DIV-145). Ambos foram considerados inadequados para fins terapêuticos na fase II dos ensaios clínicos, porque se descobriu que eram pró-fármacos, sendo a BZP um dos seus metabolitos ativos (Kerr and Davis 2011; Monteiro et al. 2013).

Nos anos 70, a TFMPP foi identificada como um metabolito de dois compostos, a antrofenina, usada como um analgésico e anti-inflamatório, e a fluprazina, usada para a diminuição de comportamentos agressivos. A antrofenina foi comercializada com o nome comercial de Stakane, mas foi substituída por compostos mais recentes com melhores resultados terapêuticos (Rodgers et al. 1992; World Health Organization 2012). A TFMPP constitui parte da estrutura química de outros compostos com potencial farmacológico como a terciprazina e o frabuprofeno (Staack et al. 2003).

No mercado farmacêutico estão disponíveis alguns produtos que contêm a estrutura molecular das piperazinas, tais como antipsicóticos (olanzapina, clozapina), antidepressivos (nefazodona, trazodona), fármacos para o tratamento da disfunção erétil (sildenafil, verdenafil) e antibióticos (ciprofloxacina) (Vorce et al. 2008).

1.2.2 Propriedades físico-químicas e síntese

A BZP e a TFMPP são bases orgânicas, cujo valor da constante de ionização (pKa) é superior a 8 (Bishop et al. 2005).

A BZP é uma arilpiperazina sem estereoisómeros e pode estar disponível na forma de sal cloridrato (BZP.2HCl) ou sob a forma de base livre. Como base é líquida, corrosiva e de cor verde-amarelada. O sal cloridrato é um sólido branco, solúvel em água, e irritante para os olhos, sistema respiratório e pele (Schep et al. 2011; World Health Organization 2012). A TFMPP é uma arilpiperazina e não tem estereoisómeros, mas apresenta três isómeros relacionados com a mudança de posição do radical trifluorometilo nas posições 2-, 3- e 4- (Staack et al. 2003; World Health Organization 2012). A abreviatura TFMPP geralmente corresponde ao isómero 3-TFMPP (Elliott and Smith 2008). As propriedades físico-químicas da BZP e da TFMPP encontram-se resumidas na tabela 2.

A BZP é um composto completamente sintético e está disponível por diversos fornecedores químicos (comercializada, por exemplo, pelo laboratório Sigma-Aldrich). A síntese química é relativamente simples, e consiste na reação do monocloridrato de piperazina com o cloreto de benzilo. Relativamente à TFMPP, esta é uma substância totalmente sintética e está também disponível em vários fornecedores de químicos. A

síntese química tem como ponto de partida provavelmente o monoclóridrato ou dicloridrato de piperazina (World Health Organization 2012).

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas da BZP e da TFMPP (World Health Organization 2012).

Composto	BZP	TFMPP
CAS	2759-28-6 (base livre); 5321-63-1 (sal cloridrato)	15532-75-9
Massa molecular (g/mol)	176,26 (base livre); 249,19 (sal cloridrato)	230,23
Fórmula molecular	C ₁₁ H ₁₆ N ₂ (base livre); C ₁₁ H ₁₆ N ₂ ·2HCl (sal cloridrato)	C ₁₁ H ₁₃ F ₃ N ₂
Ponto de fusão (°C)	17-20 (base livre) 289-292 (sal cloridrato)	-
Ponto de ebulição (°C)	143-146 (base livre)	65-72
pKa	9,59	8,66

1.2.3 BZP e TFMPP como drogas de abuso e legislação

A BZP surgiu como droga de abuso na Nova Zelândia, no início da década de 1990, mas o primeiro caso de abuso foi relatado na Califórnia, em 1996 (Kerr and Davis 2011). No que diz respeito à TFMPP o primeiro caso de abuso foi descrito na década de 1990 nos Estados Unidos e na Escandinávia, juntamente com a BZP (World Health Organization 2012).

A Nova Zelândia desenvolveu um mercado legal de BZP e de TFMPP desde 2000 até 2008. A partir de 2005, foi proibida a venda de BZP a menores de 18 anos. No entanto, a partir de 2008, o governo da Nova Zelândia aprovou uma legislação que tornou a BZP e outros derivados piperazínicos, como a TFMPP, completamente ilegais (Cohen and Butler 2011; Kerr and Davis 2011).

No ano de 2002, nos Estados Unidos, a BZP e TFMPP foram colocadas temporariamente na lista 1 (*Schedule I*) da Lei das Substâncias Controladas (*Controlled Substances Act*), devido ao aumento do consumo destas duas substâncias. Em 2004, a BZP foi definitivamente incluída nesta lista. A partir desta data, a BZP tornou-se completamente ilegal. No entanto, a TFMPP foi removida dessa lista mantendo-se assim até aos dias de hoje (World Health Organization 2012).

A BZP é proibida em todos os estados australianos. Victoria foi o último estado em que foi legal, mas mudou a sua classificação em 2006. Assim, a partir de 2006, a BZP e os derivados piperazínicos, incluindo a TFMPP tornaram-se ilegais na Austrália (Freye

2010). Em 2003, as autoridades japonesas também começaram a controlar estas duas substâncias (Tsutsumi et al. 2006). Recentemente, em 2012, no Canadá, a BZP e TFMPP tornaram-se completamente proibidas (Government of Canada 2012).

Na Europa, o uso da BZP como droga recreativa foi detetado pela primeira vez na Suécia em 1999, e desde então o seu mercado estendeu-se a vários países (Wikström et al. 2004). Em 2007 foi relatada à Europol e/ou ao Observatório Europeu da Droga e da Toxicoddependência (EMCDDA) a apreensão de produtos com BZP em 13 Estados-Membros da União Europeia (incluindo a Bélgica, Dinamarca, Finlândia, França, Alemanha, Grécia, Irlanda, Malta, Países Baixos, Portugal, Espanha, Suécia e Reino Unido) e na Noruega (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction 2009). Na verdade, também foi relatada a aquisição de pastilhas de *ecstasy* quando, na realidade, continham BZP (Wood et al. 2008). As preocupações crescentes em torno desta substância psicoativa levaram a que, em 2007, o Conselho da União Europeia solicitasse ao EMCDDA uma avaliação dos riscos da BZP (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction 2007). Esta avaliação dos riscos da BZP, apesar de clarificar o seu perigo para a saúde, mostrou falta de informação sobre os seus efeitos farmacológicos e toxicológicos em seres humanos, a sua atividade sobre o sistema nervoso central (SNC), a possível variabilidade individual na expressão da sua toxicidade devido a polimorfismos genéticos na metabolização enzimática e interações com outras drogas. Como resultado, foi recomendado aos Estados-Membros o desenvolvimento de medidas de controlo adequadas (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction 2009). Mais tarde, em 2008, a decisão do Conselho da União Europeia foi publicada, referindo que todos os Estados-Membros deviam aplicar medidas de controlo à BZP em conformidade com a legislação nacional e reduzir os riscos conhecidos até à data, no prazo de um ano (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction 2008). Embora tenha sido um passo importante, outras substâncias da mesma família, como a TFMPP comumente usada em combinação com a BZP, não são totalmente controladas. Por exemplo, a TFMPP é controlada na Dinamarca desde 2005 e na Suécia, desde 2006, mas não é controlada na Holanda (World Health Organization 2012).

Além de ser usada como droga de abuso, a BZP também foi usada como agente dopante em cavalos de corrida e atletas (Kerr and Davis 2011), no entanto foi proibida em 2007 pela Agência Mundial Anti-Doping (World Anti-Doping Agency 2007).

Em Portugal, em 2009, a Lei nº18/2009, de 11 de Maio, procede à décima sexta alteração ao Decreto-Lei nº15/93, de 22 de Janeiro, que aprova o regime jurídico aplicável ao tráfico e consumo de estupefacientes e substâncias psicotrópicas, acrescentando a BZP à tabela II-A. Presentemente, a TFMPP não está incluída em nenhuma das tabelas anexas a este Decreto-Lei.

1.2.4 Formas de apresentação e composição, prevalência e padrão de consumo

As piperazinas são principalmente comercializadas sob a forma de comprimidos, mas também na forma de cápsulas (Sheridan and Butler 2010). Os comprimidos têm várias formas, cores e dimensões, sendo por vezes impressos com símbolos atrativos. Embora menos frequentemente, podem ainda ser encontradas na forma de pó ou líquido (Tsutsumi et al. 2005; Yeap et al. 2010), sendo que neste último caso são consumidas por via intravenosa com o fim de obter um efeito mais rápido. No que concerne ao uso intravenoso das piperazinas, esta forma de consumo é muito dolorosa devido à alcalinidade da solução (Gee et al. 2005).

Estas drogas têm nomes bastante apelativos, a BZP é designada por "A2", "Legal X", "Legal E", "Frenzy" ou outros, enquanto "X4" ou "Molly" são as designações atribuídas à TFMPP (World Health Organization 2012).

As doses de BZP por comprimido podem variar, sendo que a dose de um comprimido pode variar entre 50 e 200mg, embora tenha havido relatos do aumento dos níveis de BZP por comprimido, uma vez que já foram encontrados comprimidos que continham 1000mg de BZP (Cohen and Butler 2011). A TFMPP é geralmente vendida em mistura, em doses que variam entre 5 e 100mg (Antia et al. 2010). A dose pode variar de acordo com os efeitos desejados pelos consumidores.

Estas duas drogas são frequentemente consumidas em associação com o objetivo de aumentar os efeitos subjetivos de cada uma das substâncias e promover efeitos entactogénicos semelhantes aos da MDMA (Elliott and Smith 2008; Lin et al. 2011). De facto, não raras vezes, a mistura de BZP e TFMPP é vendida, de forma enganosa, como *ecstasy* (Sheridan et al. 2007; Simmler et al. 2014; Wilkins et al. 2008; Wood et al. 2008). Habitualmente, as formas comercializadas contêm maior quantidade de BZP e as razões de BZP:TFMPP podem ir desde 2:1 até 10:1 (Arbo et al. 2012; Cohen and Butler 2011; Thompson et al. 2006). A mistura mais frequente é a de BZP:TFMPP numa razão de 2:1 (100mg de BZP e 50mg de TFMPP) conhecida por "Bliss" (Antia et al. 2010). Outros nomes para esta mistura são "Charge", "Rapture" e "Exodus" (Austin and Monasterio 2004).

Estas pastilhas contendo misturas de piperazinas são muitas vezes consumidas em combinação com outras drogas de abuso, incluindo *ecstasy*, cocaína, anfetaminas e cetamina (Yeap et al. 2010). Também há relatos da combinação destas pastilhas com álcool, tabaco e cannabis (Wilkins et al. 2008). Estas combinações das pastilhas com outras substâncias normalmente têm funções específicas, tais como aumentar ou prolongar os efeitos estimulantes, permitir um maior consumo de álcool desde que foi reportado que estas pastilhas aumentam a sobriedade, e aliviar os efeitos negativos provocados pela ingestão das pastilhas (Butler and Sheridan 2007).

A quantidade de pastilhas ingerida por episódio de consumo é normalmente de 2 a 3 unidades, no entanto existem relatos do consumo de 8 ou mais pastilhas (Cohen and Butler 2011). A quantidade consumida depende dos efeitos e rapidez desejados, do contexto de utilização, e da experiência do consumidor (Butler and Sheridan 2007). A ingestão de elevadas quantidades destas pastilhas resulta da ideia de que estas drogas são seguras e legais, o que leva o consumidor a subestimar os seus riscos.

A Nova Zelândia é o maior consumidor deste tipo de pastilhas, por isso a grande maioria do conhecimento sobre seu uso advém de informações obtidas neste país. Assim, de acordo com os estudos realizados na Nova Zelândia, a maioria dos consumidores é do sexo masculino e tem idades compreendidas entre os 18 e os 29 anos (Cohen and Butler 2011).

Em Portugal, não há informações específicas sobre estas pastilhas contendo misturas destas duas piperazinas, no entanto, o “Inquérito Nacional ao Consumo de Substâncias Psicoativas na População Geral – 2012”, onde foram realizadas 6000 entrevistas à população geral (entre os 15 e os 74 anos de idade), coordenado por Casimiro Balsa, faz referência às *designer drugs*, uma vez que foi realizado antes do novo enquadramento legal sobre as mesmas. No que diz respeito às *designer drugs*, o estudo conclui que 0,4% dos inquiridos experimentou estas substâncias. Trata-se de um comportamento que se concentra mais nos grupos etários jovens, particularmente entre os 15-24 (1%), 25-34 (0,8%) e 35-44 (0,3%) anos. O meio de obtenção mais usual destas substâncias era através das *smart shops* (44%), seguido da internet (12,5%) (Balsa et al. 2014).

1.2.5 Efeitos resultantes do seu uso

A BZP é normalmente consumida com outras piperazinas, no entanto também pode ser consumida isoladamente devido ao seu efeito estimulante. Tendo em consideração o seu modo de ação semelhante à MDMA, estudos em animais e humanos têm demonstrado que os efeitos farmacológicos da BZP são qualitativamente semelhantes aos das anfetaminas. Os principais efeitos adversos da BZP relatados pelos seus consumidores são insónias, dores de cabeça e náuseas (Kerr and Davis 2011; Wilkins 2006; Wilkins et al. 2008). A perceção das sensações como o sabor, a cor e a música também podem estar subjetivamente reforçadas (Nikolova and Danchev 2008).

Outros efeitos adversos associados ao uso de BZP são: ressaca, pupilas dilatadas, secura da boca, sudorese, desidratação, extremo estado de alerta, prurido, confusão, agitação, tremor, distonia, tonturas, ansiedade, alterações de humor (euforia e disforia), pensamentos estranhos, vômitos, dores no peito, taquicardia, bruxismo e trismo, midríase, hipertensão, palpitações, ataques de pânico, colapso, hiperventilação,

hipertermia, cansaço, problemas com a retenção de urina e perda de apetite (Butler and Sheridan 2007; Gee et al. 2005; Nikolova and Danchev 2008; Wilkins 2006; Wilkins et al. 2008).

Os efeitos mais graves associados ao consumo de BZP incluem psicose, toxicidade renal e falência de vários órgãos, acidose metabólica e respiratória, coagulação intravascular disseminada, rabdomiólise, convulsões, intervalo QT prolongado e hiponatremia (Gee et al. 2010; Gee et al. 2005; Nikolova and Danchev 2008).

Casos fatais relacionados com o uso isolado de BZP e em mistura com outras piperazinas não estão relatados. No entanto, existem casos fatais nos quais a BZP foi consumida com outras drogas e/ou álcool (Elliott and Smith 2008).

Uma pesquisa na Nova Zelândia concluiu que 2% dos consumidores de BZP seriam dependentes desta droga, enquanto 98% seriam não-dependentes (Brennan et al. 2007). Apesar disso, seria errado considerar a BZP como uma droga que não causa dependência tendo em conta a sua semelhança com a MDMA. Outra pesquisa mostra que um quinto dos consumidores revela tolerância e sintomas de abstinência (Thompson et al. 2006).

A TFMPP não é medicinalmente útil, mas é vendida como uma alternativa legal às drogas ilícitas, como a dietilamida do ácido lisérgico (LSD) e a MDMA. Isto deve-se ao facto de ter propriedades semelhantes aos efeitos estimulantes da *ecstasy*, mas em doses maiores promover efeitos alucinogénicos (Nikolova and Danchev 2008; Wood et al. 2008). A TFMPP provoca apenas efeitos ligeiros e raramente é administrada por si só, por isso tem havido pouca investigação sobre os seus efeitos quando administrada isoladamente (Nikolova and Danchev 2008). No entanto, há relatos de que os principais efeitos da TFMPP são ansiedade, confusão, disforia e sentimentos de autoconfiança (Jan et al. 2010; Lin et al. 2011).

No que concerne a efeitos mais graves provocados pelo consumo de TFMPP, verificou-se que não induz taquicardia, mas desenvolve bradicardia e hipotensão arterial em ratos (King and Holtman 1990). Por outro lado, também em ratos, a TFMPP não alterou a atividade psicomotora (Baumann et al. 2005).

Existem poucos casos de mortes que envolveram TFMPP, mas em nenhum deles a TFMPP foi encontrada sozinha (Elliott and Smith 2008).

No que diz respeito ao potencial da TFMPP induzir um consumo abusivo, estudos em animais mostraram que a TFMPP não conduziu à autoadministração, ao contrário da BZP, tendo-se mesmo verificado efeitos aversivos (Lin et al. 2011; Nikolova and Danchev 2008). Portanto, parece improvável que a TFMPP possua um potencial de abuso ou

dependência. Este facto pode explicar o porquê da TFMPP dificilmente se encontrar disponível para consumo isoladamente (Wood et al. 2008).

1.2.6 Farmacodinâmica

No que diz respeito ao sistema adrenérgico, dois estudos *in vitro*, um que usou a artéria pulmonar de coelhos e outro o córtex cerebral de ratos, revelaram que a BZP aumenta a libertação de noradrenalina (NA) e impede a sua recaptação. Estes dois estudos constituíam parte de uma avaliação da ação da piberalina enquanto fármaco, cujo metabolito é a BZP (Magyar et al. 1986; Szücs et al. 1986). Assim, a BZP revelou aumentar a libertação de noradrenalina e impedir a sua recaptação neuronal, resultado da ativação dos recetores adrenérgicos α e β (Schep et al. 2011).

Relativamente aos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico, também durante os estudos de avaliação da piberalina concluiu-se que a BZP bloqueia a recaptação de serotonina (5-HT) em ratos e tem efeitos agonistas no recetor 5-HT1. Estes estudos também mostraram que a BZP não tem efeito nos recetores 5-HT2 (Magyar et al. 1986; Tekes et al. 1986). Estudos mais recentes realizados em ratos demonstraram que *in vitro* a BZP aumentou a libertação do substrato do transportador de dopamina (DA), e *in vivo* a BZP conduziu a um aumento extracelular de dopamina e serotonina, sendo o aumento de dopamina mais pronunciado (Baumann et al. 2004; Baumann et al. 2005).

Em conclusão, de forma semelhante ao que acontece com outras drogas de abuso, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a BZP interfere com a neurotransmissão das monoaminas, inibindo a recaptação e estimulando a libertação de dopamina, serotonina e noradrenalina.

A TFMPP não parece exercer nenhuma atividade adrenérgica ou dopaminérgica (Fantegrossi et al. 2005; Herndon et al. 1992). No entanto, quando administrada isoladamente provoca um aumento seletivo de serotonina. Assim, estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que a TFMPP se liga aos recetores de serotonina no cérebro (Auerbach et al. 1991; Baumann et al. 2005; Cunningham and Appel 1986; Pettibone and Williams 1984) e impede a sua recaptação (Auerbach et al. 1990). A TFMPP é relativamente seletiva para os recetores 5-HT1 e 5-HT2 e pouco seletiva para os recetores 5-HT3 (Baumann et al. 2005; Cunningham and Appel 1986; Robertson et al. 1992).

1.2.7 Farmacocinética

O metabolismo da BZP foi estudado pela primeira vez, em 2002, por Staack e seus colaboradores (figura 1). Nesse estudo utilizaram urina de ratos Wistar após administração de uma única dose de 50mg/kg administrada por intubação gástrica, e os

resultados foram comparados com amostras reais de urina humana obtidas para análise toxicológica. Tendo em conta os metabolitos encontrados no estudo, tem sido proposto que a BZP sofre hidroxilação e desalquilação, via citocromo P 450 (CYP450), como reações de fase I. Segundo este estudo, os metabolitos 4-hidroxi-BZP e 3-hidroxi-BZP são formados por hidroxilação simples do anel aromático da BZP, e a 4-hidroxi-3-metoxi-BZP é formada por dupla hidroxilação do anel aromático da BZP seguida de metilação, reação de fase II, que é catalizada pela catecol-O-metil-transferase (COMT) (Staack et al. 2002). O envolvimento da COMT foi posteriormente confirmado por estudos *in vitro* feitos por Maurer e seus colaboradores (Maurer et al. 2000). Além disso, a degradação do heterociclo piperazínico por dupla N-desalquilação conduz à formação da benzilamina e da N-benzil-etilenodiamina, enquanto a reação de desalquilação do carbono benzílico da BZP conduz à formação da piperazina, outro metabolito da BZP. Além da piperazina, por esta via metabólica também pode ser formado o benzaldeído, que pode ser adicionalmente oxidado a ácido benzóico (Staack et al. 2002).

Os metabolitos da BZP podem ainda ser alvo de metabolismo de fase II, em que as enzimas uridina difosfato glucuroniltransferase (UGT) e sulfotransferase (SULT) são responsáveis pela formação conjugados glucoronídeos e/ou sulfatos, respetivamente (Jancova et al. 2010).

Um estudo em ratos Wistar com o objetivo de estudar o metabolismo da BZP, usou a urina das primeiras 48 horas após administração intraperitoneal de uma única dose de 5mg/kg para analisar o perfil de excreção da BZP e dos seus principais metabolitos (4-hidroxi-BZP e 3-hidroxi-BZP). O estudo mostrou que 25% da BZP foi excretada como 4-hidroxi-BZP, apenas 2% foi eliminada como e 3-hidroxi-BZP e 6,7% foi excretada na forma de BZP inalterada. A 4-hidroxi-BZP revelou-se o principal metabolito em ratos corroborando o que foi descrito por Staack e colaboradores (2002). Após 48 horas, aproximadamente 33% da dose administrada foi eliminada, 80% na forma de metabolito e 20% na forma inalterada, ao contrário do que foi relatado por Staack e colaboradores (2002), em que a BZP foi principalmente excretada na urina na sua forma inalterada (Tsutsumi et al. 2006).

O único estudo sobre a farmacocinética da BZP em humanos reportou as concentrações da BZP e dos seus principais metabolitos (3-hidroxi-BZP e 4-hidroxi-BZP) no plasma e na urina 24 horas após a administração oral de uma única dose de 200mg (BZP.2HCl). Ao contrário do que tinha sido descrito nos estudos realizados em animais, as concentrações de 3-hidroxi-BZP foram superiores às de 4-hidroxi-BZP neste estudo em humanos. A análise da urina mostrou que aproximadamente 6% da dose total da BZP foi eliminada na sua forma inalterada e apenas 0,11% foi excretada na forma de metabolitos (3-hidroxi-BZP e 4-hidroxi-BZP). Neste estudo, também foi identificada a

presença de metabolitos sulfatados, 51% de O-sulfato e 30% de N-sulfato, sendo portanto a maior forma de excreção da BZP (Antia et al. 2009a).

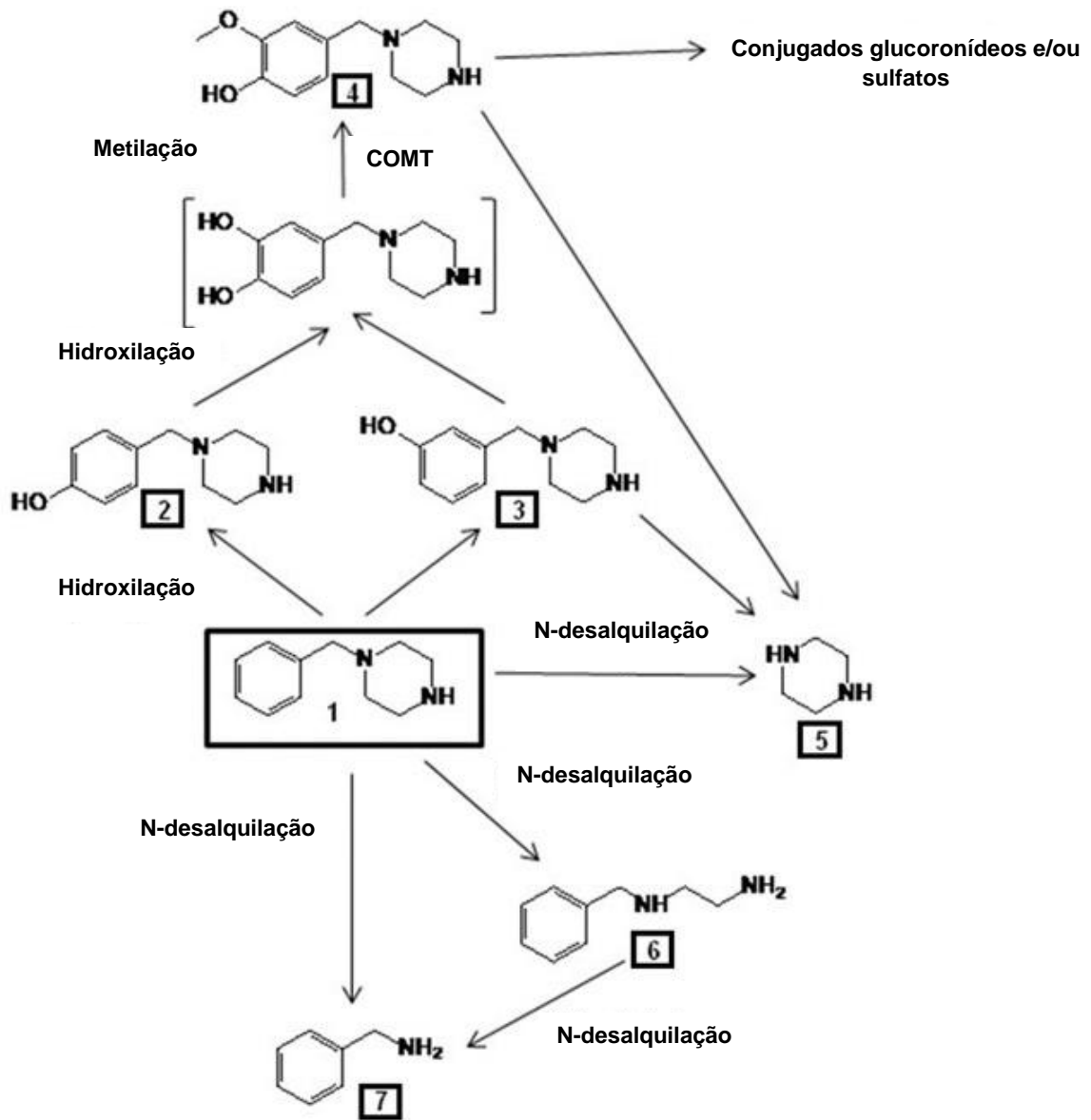


Figura 1 - Metabolismo da BZP proposto em ratos Wistar. 1 = BZP; 2 = 4-hidroxi-BZP; 3 = 3-hidroxi-BZP; 4 = 4-hidroxi-3-metoxi-BZP; 5 = piperazina; 6 = N-benzil-etilendiamina; 7 = benzilamina (Staack et al. 2002).

O metabolismo da TFMPP foi estudado pela primeira vez, em 2003, por Staack e seus colaboradores (figura 2). Nesse estudo utilizaram urina de ratos Wistar após administração de uma única dose de 50mg/kg por intubação gástrica. Ao contrário da BZP, a TFMPP é extensivamente metabolizada e é excretada quase exclusivamente na forma de metabolitos. A principal reação metabólica é a hidroxilação aromática que resulta na formação de 4-hidroxi-TFMPP seguida de glucoronidação parcial ou sulfatação. Este metabolito hidroxilado pode ainda levar à formação de N-(hidroxi-3-trifluorometilfenil)etilenodiamina ou de hidroxi-3-trifluorometilanilina. A degradação do heterociclo piperazínico por dupla N-desalquilação leva à formação de N-(3-trifluorometilfenil)etilenodiamina ou de 3-trifluorometilanilina. Como reação de fase II foi reportada a N-acetilação parcial das anilinas, que conduz à formação de outros metabolitos (Staack et al. 2003; Staack and Maurer 2005).

Tendo em conta que TFMPP é metabolizada pelas enzimas hepáticas do CYP450, um estudo *in vivo* usando ratos Wistar como metabolizadores extensivos e ratos fêmeas Dark-Agouti como metabolizadores pobres para a CYP2D6 identificou a CYP2D6 como responsável por 80,9% do metabolismo da TFMPP. A CYP1A2 e a CYP3A4 foram reconhecidas como responsáveis por 11,5% e 7,6% do metabolismo, respetivamente (Maurer et al. 2004; Staack et al. 2004).

Estudos *in vitro* em microssomas hepáticos humanos mostraram que a TFMPP segue as mesmas vias de metabolização demonstradas nas experiências com ratos. Este estudo mostrou a participação do CYP450, nomeadamente das isoenzimas CYP2D6, CYP1A2 e CYP3A4 (Staack et al. 2004).

A farmacocinética da TFMPP também foi estudada em humanos após administração oral de uma única dose de 60mg. No plasma, 90 minutos após a administração, a TFMPP foi detetada com concentração máxima de 24,1ng/mL. Apenas um metabolito, 4-hidroxi-TFMPP, foi detetado no plasma, 90 minutos após a administração, com a concentração máxima de 20,2ng/mL. As análises de urina mostraram que a TFMPP é excretada principalmente na sua forma conjugada, provavelmente na forma de N-glucoronídeo, representando 70% da TFMPP excretada. O metabolito 4-hidroxi-TFMPP foi excretado essencialmente como conjugado, cerca de 90%, e também provavelmente na forma de N-glucoronídeo. A quantidade total de TFMPP excretada na urina foi menos de 1% da dose administrada, o que, tal como para a BZP, sugere também uma baixa biodisponibilidade, outras vias de excreção ou ligação a proteínas (Antia et al. 2010).

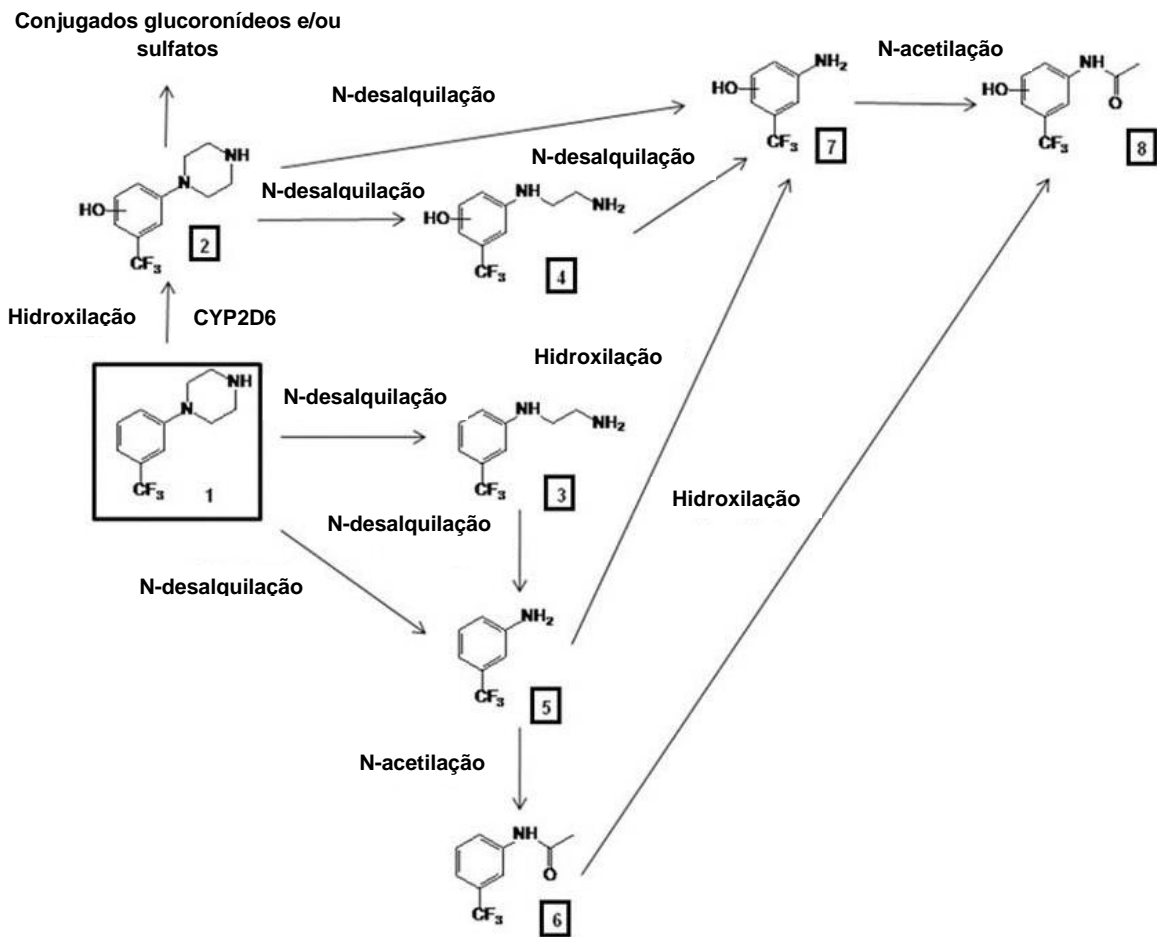


Figura 2 - Metabolismo da TFMP proposto em ratos Wistar. 1 = TFMP; 2 = 4-hidroxi-TFMP; 3 = N-(3-trifluorometilfenil)etilenodiamina; 4 = N-(hidroxi-3-trifluorometilfenil)etilenodiamina; 5 = 3-trifluorometilanilina; 6 = N-acetil-3-trifluorometilanilina; 7 = hidroxi-3-trifluorometilanilina; 8 = N-acetil-hidroxi-3-trifluorometilanilina (Staack et al. 2003).

1.3 Mistura de BZP e TFMP

1.3.1 Efeitos resultantes do seu uso

Um estudo de Wilkins e colaboradores (2008) sobre os efeitos da BZP e TFMP consumidas em associação em humanos mostrou que os efeitos físicos mais relatados foram insónias (54%), dores de cabeça (26%) e náuseas (21%). No que concerne aos efeitos psicológicos mais relatados foram irritabilidade (12%), confusão (11%), ansiedade (10%), depressão (10%), paranoia (9%) e alucinações auditivas (9%) (Wilkins et al. 2008).

Os efeitos da BZP combinada com a TFMP também foram investigados por Lin e colaboradores (2011). Foi realizado um estudo em homens adultos após a administração oral de uma dose de 100mg de BZP e 30mg de TFMP. A administração da mistura revelou um aumento da pressão arterial sistólica e diastólica e cardiomegalia. Também

se verificou o aumento do estado de vigor/atividade, autoconfiança, disforia e efeitos semelhantes às anfetaminas (Lin et al. 2011).

Em 2010, foi realizado um estudo com 35 voluntários para avaliar os efeitos da associação BZP/TFMPP por si só e em combinação com álcool. A associação BZP/TFMPP por si só melhorou significativamente o desempenho de condução, por meio da diminuição do desvio padrão do teste "Standard deviation of lateral position". A BZP/TFMPP também aumentou a frequência cardíaca e a pressão arterial e provocou dificuldades em adormecer. No entanto, foram detetados efeitos graves associados ao consumo da mistura BZP/TFMPP sozinha ou em combinação com álcool, tais como agitação, ansiedade, alucinações, vômitos, insónias e enxaquecas. Estes efeitos foram apresentados por 4 em 10 indivíduos no grupo ao qual foi administrada a mistura e 3 em 7 indivíduos no grupo ao qual foi administrada a mistura em associação com álcool (Thompson et al. 2010).

Wood e colaboradores (2008) relatam o caso de três jovens adultos do sexo masculino que ingeriram quatro comprimidos que pensavam conter *ecstasy* quando na verdade continham BZP e TFMPP. Eles apresentaram sintomas dissociativos, agitação com bruxismo, náuseas e características de toxicidade simpaticomimética (taquicardia e pupilas dilatadas) (Wood et al. 2008).

No que diz respeito ao potencial da mistura BZP/TFMPP provocar um efeito de recompensa, um estudo em macacos rhesus, reportou que a combinação das duas substâncias diminui as propriedades de reforço comparativamente à BZP isoladamente (Fantegrossi et al. 2005).

1.3.2 Farmacodinâmica

Estudos *in vivo* realizados com machos Sprague-Dawley avaliaram os efeitos da associação destas duas drogas nos níveis de dopamina e serotonina extracelular no *nucleus accumbens*. Os ratos receberam, por via intravenosa, duas injeções de droga sequenciais: a primeira injeção no tempo zero (3mg/kg), seguida da segunda injeção (10mg/kg) administrada 60 minutos mais tarde. Este estudo revelou que o consumo simultâneo de BZP e TFMPP conduz a um aumento extracelular dos níveis de dopamina e serotonina, simulando os efeitos da MDMA. Após a administração de uma dose de 3mg/kg de BZP/TFMPP, os níveis de dopamina e serotonina eram similares aos produzidos após a administração de uma dose de 1mg/kg de MDMA. Quando foi administrada a dose de 10mg/kg de BZP/TFMPP verificou-se o aumento dos níveis de dopamina e de serotonina de 1280% e 870%, respectivamente. Para esta dose mais elevada, o estudo também mostrou que a associação BZP/TFMPP promoveu um aumento de dopamina extracelular superior à soma dos efeitos de cada substância

individualmente (376% BZP e 130% TFMPP). O mesmo não se verificou na quantidade de serotonina libertada, uma vez que a quantidade de serotonina extracelular induzida pela associação BZP/TFMPP foi similar à soma dos efeitos de cada substância individualmente (Baumann et al. 2004; Baumann et al. 2005).

1.3.3 Farmacocinética

O metabolismo destas substâncias é passível de ser afetado pela sua administração simultânea. Um estudo *in vitro* que utilizou microsomas hepáticos humanos revelou que tanto a TFMPP como a BZP são metabolizadas pelas mesmas enzimas do CYP450 (CYP2D6, CYP1A2 e CYP3A4). Neste estudo demonstrou-se, efetivamente, que a TFMPP inibiu o metabolismo da BZP em aproximadamente 60% e a BZP inibiu o metabolismo da TFMPP em 91% (Antia et al. 2009c).

Num outro estudo realizado em humanos, após a coadministração oral de uma única dose de BZP (100mg) e TFMPP (30mg), verificou-se que a formação de metabolitos era inibida para ambas as substâncias. No que diz respeito à TFMPP, no plasma não foram detetados metabolitos. Na urina foi detetada TFMPP e o seu metabolito N-glucoronídeo, no entanto o metabolito 4-hidroxi-TFMPP não foi detetado. No que concerne à BZP, no plasma foi detetado o metabolito 4-hidroxi-BZP, mas o metabolito 3-hidroxi-BZP não foi encontrado. Na urina, foi detetada BZP e o seu metabolito 4-hidroxi-BZP, no entanto o metabolito 3-hidroxi-BZP também não foi detetado. Além disso também se sugere a presença dos metabolitos N-sulfato e O-sulfato da BZP (Antia et al. 2009b).

Assim, comparando este estudo com outro, já referido anteriormente, realizado com plasma de voluntários humanos, aos quais foi administrada uma dose de 60mg de TFMPP (Antia et al. 2010), verifica-se uma pequena alteração dos parâmetros farmacocinéticos da TFMPP. No primeiro estudo, a concentração máxima obtida foi de 28ng/mL, 75 minutos após a administração, com um T_{1/2} de eliminação de 2,3 horas e não foram detetados metabolitos no plasma. No segundo estudo, a concentração máxima obtida foi de 24,1ng/mL, 90 minutos após a administração, com um T_{1/2} de eliminação de 2,04 horas, o metabolito 4-hidroxi-TFMPP conseguiu ser detetado. Com a exceção da perda do metabolito 3-hidroxi-BZP, não se verifica alterações na farmacocinética da BZP quando comparada com estudos onde foi administrada sozinha (Antia et al. 2009a). A limitação na interpretação dos resultados destes estudos reside nas diferentes doses administradas isoladamente e em combinação.

Mais tarde, Wada e colaboradores (2012) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar o perfil plasmático em ratos Wistar, após a administração de uma única dose de BZP e TFMPP isoladamente e em mistura. A dose para administração isolada de BZP e

de TFMPP foi de 2mg/kg, e para a administração em mistura 2mg/kg de cada substância foi combinada. Este estudo revelou que as concentrações plasmáticas de BZP após administração isolada foram semelhantes às concentrações plasmáticas da BZP em mistura. No entanto, as concentrações de TFMPP após administração em mistura tenderam a ser superiores quando comparadas com a administração da TFMPP isolada (Wada et al. 2012).

1.4 Análise da BZP e TFMPP

Vários métodos têm sido descritos para a análise da BZP e TFMPP, os seus metabolitos e outras piperazinas. Desde testes de rastreio (testes colorimétricos e imunoensaios) até técnicas cromatográficas [cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida (LC)] acopladas à espectrometria de massa (MS), as duas técnicas mais usadas para detetar e quantificar estes compostos em diferentes matrizes.

1.4.1 Testes de rastreio

Os testes colorimétricos e os imunoensaios são comumente usados para detetar rapidamente drogas em amostras biológicas e materiais apreendidos. Enquanto os imunoensaios se baseiam em reações específicas (reações antigénio-anticorpo), os testes colorimétricos são menos específicos e sensíveis, o que pode levar à obtenção de resultados falsos positivos e negativos.

A BZP e a TFMPP foram analisadas utilizando testes colorimétricos, tais como o teste de Simon, Marquis, X-Checker® e de Dragendorff, e os resultados foram semelhantes aos obtidos com outros estimulantes como as anfetaminas (Inoue et al. 2004).

No que diz respeito aos imunoensaios, tem sido descrita reatividade cruzada quando as piperazinas são analisadas por testes disponíveis para a deteção de anfetaminas, nomeadamente Roche Abuscreen Online® Amphetamine, Dade-Behring Syva® Emit® II Plus Amphetamine (Vorce et al. 2008), Abbott® TDx Amphetamine/Methamphetamine II (Staack et al. 2002), e EMIT® d.a.u.® Amphetamines (de Boer et al. 2001). Presentemente, não estão comercialmente disponíveis imunoensaios para a deteção de piperazinas (Peters and Martinez-Ramirez 2010).

1.4.2 Técnicas cromatográficas

As técnicas cromatográficas (nomeadamente GC e LC) são as mais usadas e descritas para a deteção e quantificação de derivados piperazínicos, nomeadamente da BZP e da TFMPP. A tabela 3 resume as técnicas cromatográficas usadas na análise de piperazinas, nomeadamente da BZP e da TFMPP.

Tabela 3 - Resumo das técnicas cromatográficas usadas na análise de piperazinas, nomeadamente da BZP e da TFMPP.

Método	Matriz	Preparação da amostra	Derivatização	Derivados piperazínicos	Referência
GC/MS	Cápsulas	LLE com éter <i>terc</i> -butilmetílico	TFAA e acetato de etilo (1:1), 30min a 65 °C	BZP, TFMP e MeOPP	(de Boer et al. 2001)
GC/NPD	Cápsulas	LLE com éter <i>terc</i> -butilmetílico		BZP, TFMP e MeOPP	(de Boer et al. 2001)
GC/MS	Urina	Hidrólise enzimática e LLE com diclorometano/isopropanol/acetato de etilo (1:1:3)	Anidrido acético-piridina (1:1), 10min sob irradiação do micro-ondas TFFA e acetato de etilo (1:1), 5min sob irradiação do micro-ondas HFBA, 5min sob irradiação do micro-ondas Diazometano em éter dietílico, 15min à temperatura ambiente	BZP, benzilamina, N-benzil-etilenodiamina, piperazina, 3-hidroxi-BZP, 4-hidroxi-BZP e 4-hidroxi-3-metoxi-BZP	(Staack et al. 2002)

Método (continuação)	Matriz	Preparação da amostra	Derivatização	Derivados piperazínicos	Referência
GC/MS	Plasma	SPE: MeOH e H ₂ O para acondicionamento da coluna, H ₂ O, HCl e MeOH para lavagem e MeOH/NH ₄ OH (98:2) para eluição	HFBA, 5min sob irradiação do micro-ondas	BZP, TFMPP, mCPP, MeOPP e MDBP	(Peters et al. 2003)
GC/MS	Sangue, soro, saliva e urina	Extração com um tampão alcalino	HFBA (extração e derivatização num único passo)	BZP	(Kankaanpää et al. 2004)
GC/MS	Sangue e urina	LLE com acetato de etilo (sangue) e isooctano (urina)	TFFA, 15min a 60 °C	BZP	(Wikström et al. 2004)
GC/MS	Urina	Hidrólise enzimática, SPE com OSAIS HLB (MeOH e H ₂ O para acondicionamento da coluna, 5% de MeOH em H ₂ O para lavagem e MeOH para eluição), SPE com OASIS MCX (MeOH e H ₂ O para acondicionamento da coluna, HCl, H ₂ O e MeOH para lavagem e 5% de NH ₄ OH em MeOH para eluição), LLE com clorofórmio/2-propanol (3:1)	TFAA e acetato de etilo (1:1), 1h a 60 °C	BZP, TFMPP, 4-hidroxi-TFMPP, 3-hidroxi-BZP e 4-hidroxi-BZP	(Tsutsumi et al. 2005)

Método (continuação)	Matriz	Preparação da amostra	Derivatização	Derivados piperazínicos	Referência
HPLC/ESI-MS	Urina	Hidrólise enzimática, SPE com OSAIS HLB (MeOH e H ₂ O para acondicionamento da coluna, 5% de MeOH em H ₂ O para lavagem e MeOH para eluição), SPE com OASIS MCX (MeOH e H ₂ O para acondicionamento da coluna, HCl, H ₂ O e MeOH para lavagem e 5% de NH ₄ OH em MeOH para eluição), LLE com clorofórmio/2-propanol (3:1)		BZP, TFMPP, 4-hidroxi-TFMPP, 3-hidroxi-BZP e 4-hidroxi-BZP	(Tsutsumi et al. 2005)
GC/MS	Urina	SPE com MeOH, H ₂ O e tampão fosfato para acondicionamento da coluna, H ₂ O, 20% de acetonitrilo em H ₂ O, ácido acético, hexano e MeOH para lavagem e diclorometano/isopropanol/NaOH (78:20:2) para eluição		BZP e TFMPP	(Vorce et al. 2008)
HPLC/ESI-MS	Urina	LLE com 1-clorobutano		BZP e TFMPP	(Vorce et al. 2008)
HPLC/DAD	Plasma, sangue e urina	LLE com 1-clorobutano		BZP e TFMPP	(Elliott and Smith 2008)

Método <i>(continuação)</i>	Matriz	Preparação da amostra	Derivatização	Derivados piperazínicos	Referência
HPLC/MS	Plasma, sangue e urina	LLE com 1-clorobutano		BZP e TFMPP	(Elliott and Smith 2008)
GC/MS	Cápsulas e comprimidos			BZP, mCPP, MeOPP e MDBP	(Takahashi et al. 2009)
HPLC/DAD	Cápsulas e comprimidos			BZP, mCPP, MeOPP e MDBP	(Takahashi et al. 2009)
UPLC/MS	Urina	SPE com MeOH e HCl para acondicionamento da coluna, HCl para lavagem e 5% de NH ₄ OH em MeOH para eluição		BZP	(Badoud et al. 2010)
GC/MS	Urina	LLE com 1-clorobutano	PFPA e acetato de etilo (1:1), 15min a 70 °C	BZP, TFMPP e mCPP	(Dickson et al. 2010)
GC/MS	Cabelo	Lavagem com diclorometano, H ₂ O e MeOH, SPE com MeOH e H ₂ O para acondicionamento da coluna, H ₂ O, HCl, diclorometano/MeOH (70:30) e hexano para lavagem e diclorometano/isopreopanol (80:20) para eluição	MSTFA com 5% TMS, 30min a 80 °C	TFMPP, mCPP e MeOPP	(Barroso et al. 2010)

Método (continuação)	Matriz	Preparação da amostra	Derivatização	Derivados piperazínicos	Referência
HPLC/MS/MS	Soro	SPE com MeOH e tampão fosfato para acondicionamento da coluna, H ₂ O, ácido acético e MeOH para lavagem e diclorometano/isopropanol/25% NH ₄ OH (80:20:2) para eluição		BZP, TFMPP, mCPP, MeOPP e MDBP	(Wohlfarth et al. 2010)
HPLC/ESI-MS	Plasma e urina	Precipitação das proteínas do plasma com ZnSO ₄ e hidrólise enzimática da urina		BZP, TFMPP, 4-OH-TFMPP, 3-OH-BZP e 4-OH-BZP	(Antia et al. 2010)
HPLC/MS/MS	Urina	Diluição da urina com a fase móvel (1:4)		BZP, TFMPP e mCPP	(Bell et al. 2011)
HPLC/MS/MS	Sangue	LLE com tampão acetato de amónia, SPE com MeOH e tampão acetato de amónia para acondicionamento da coluna, tampão acetato de amónia, ácido fórmico 2% e MeOH para lavagem e 5% NH ₄ OH em acetato de etilo/MeOH (70:25) para eluição		BZP	(Dowling and Regan 2011)

Método (continuação)	Matriz	Preparação da amostra	Derivatização	Derivados piperazínicos	Referência
HPLC/FD	Plasma	SPE com H ₂ O e acetonitrilo para acondicionamento da coluna, acetonitrilo/H ₂ O (40:60) para lavagem e acetonitrilo para eluição	DIB-Cl, 30min à temperatura ambiente	BZP e TFMPP	(Wada et al. 2012)
HPLC/DAD	Urina	MEPS		BZP, TFMPP, mCPP e MeOPP	(Moreno et al. 2012)
HPLC/MS/MS	Cabelo	Lavagem com H ₂ O, acetona e hexano, extração com MeOH e HCl (ultra-sons)		BZP, TFMPP e mCPP	(Rust et al. 2012)
UPLC/IT-MS	Urina, soro e sangue	SPE com MeOH e tampão fosfato para acondicionamento da coluna, H ₂ O, HCl e MeOH para lavagem e diclorometano/isopropanol/NaOH (77:20:3) para eluição		BZP e TFMPP	(Johnson and Botch-Jones 2013)
HPLC/UV	Cápsulas e comprimidos			BZP e TFMPP	(Young et al. 2013)
HPLC/MS/MS	Amostras de águas residuais	SPE com tampão, ácido acético e MeOH para lavagem e 96% diclorometano/isopropanol (80:20)/4% NH ₄ OH para eluição		BZP e TFMPP	(Chen et al. 2013)

Método (<i>continuação</i>)	Matriz	Preparação da amostra	Derivatização	Derivados piperazínicos	Referência
HPLC/CD	Comprimidos		[Ru(bipy) ₃] ³⁺	BZP, TFMPP, mCPP, MeOPP e outros	(Waite et al. 2013)
HPLC/MS/MS	Urina	SPE com MeOH e H ₂ O para acondicionamento da coluna, H ₂ O/MeOH (50:50)/2% NH ₄ OH para lavagem e ácido fórmico em MeOH para eluição		TFMPP, MeOPP, MDBP, pFPP e pCPP	(Montesano et al. 2013)
GC/EI-MS	Comprimidos, pós e plantas	LLE com MeOH		BZP, TFMPP, MPMP, pFPP e mCPP	(Maciów-Głąb et al. 2013)
HPLC/IR-MS	Comprimidos			BZP e TFMPP	(Beckett et al. 2015)

Abreviaturas: CD (detetor de quimioluminescência), DAD (detetor de díodos), DIB-Cl (cloreto de 4-(4,5-difenil-1H-imidazole-2-il)benzoilo), EI-MS (espectrometria de massa com ionização por impacto de elétrons), ESI-MS (espectrometria de massa com ionização por electrospray), FD (detetor de fluorescência), GC (cromatografia gasosa), HFBA (ácido heptafluorobutírico anidro), HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência), IR-MS (espectrometria de massa de razões isotópicas), IT-MS (espectrometria de massa com detetor *ion trap*), LLE (extração líquido-líquido), MeOH (metanol), MEPS (microextração em seringa empacotada), MPMP (1-(metil-4-fenilmetil)-piperazina), MS (espectrometria de massa), MS/MS (espectrometria de massa em tandem), MSTFA (N-metil-N-(trimetilsil)-trifluoroacetamida), NPD (detetor de nitrogénio-fósforo), PFPA (anidrido pentafluoropropiónico), [Ru(bipy)₃]³⁺ (tris(2,2'-bipiridina)ruténio(III)), SPE (extração em fase sólida), TFAA (anidrido trifluoroacético), TMS (trimetilclorosilano), UPLC (cromatografia líquida de ultra eficiência), UV (detetor de ultravioleta).

2 OBJETIVOS

Considerando a frequência da administração concomitante de BZP e TFMPP no contexto forense e o seu impacto toxicológico, considerou-se de extrema relevância o primeiro objetivo deste trabalho: otimizar e validar um método de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC/MS) que permite a quantificação simultânea destas drogas em três matrizes diferentes (plasma, urina e meio de cultura).

O segundo objetivo deste trabalho foi aplicar a metodologia previamente validada à avaliação das interações metabólicas que ocorrem quando hepatócitos primários de rato são expostos a misturas de BZP e TFMPP em concentrações que promovem diferentes níveis de citotoxicidade.

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Padrões e reagentes

A 1-benzilpiperazina (BZP, 99,3% de pureza) foi obtida da Chemos GmbH (Regenstauf, Alemanha) e a 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina (TFMPP, 98% de pureza) foi adquirida à Alfa Aesar (Karlsruhe, Alemanha). O cloridrato de 4-hidroxi-3-metoxibenzilamina (padrão interno, PI₁) (98% de pureza) e a fenilpropanolamina (padrão interno, PI₂) foram adquiridos à Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri).

O metanol (MeOH) (HPLC-grade) foi fornecido pela Chem-Lab (Zedelgem, Bélgica). O acetato de etilo e o hexano (HPLC-grade) foram fornecidos pela Fisher Scientific (Loughborough, Reino Unido). O ácido clorídrico (HCl) (37%), a solução de amónia (25%) (NH₄OH), o acetato de sódio trihidratado (C₂H₃NaO₂·3H₂O), o ácido tricloroacético (TCA) e o ácido fórmico foram adquiridos à Merck (Darmstadt, Alemanha). A trietilamina (TEA) e o éter *terc*-butilmetílico foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri). O hidróxido de sódio (NaOH) foi obtido da VWR (Leuven, Belgium).

O detergente usado na lavagem do material de vidro da marca Extran MA 01 também foi adquirido à Merck (Darmstadt, Alemanha).

Para a hidrólise enzimática foi utilizada β -Glucuronidase *Helix pomatia* do tipo 2 e para a reação de derivatização foi utilizado anidrido trifluoroacético (TFAA), ambos fornecidos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri). O meio de cultura celular utilizado foi o Williams' Medium E também obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri). Este meio foi suplementado com solução de antibiótico Pen/Strep (10,000U/mL de penicilina, 10,000U/mL de estreptomicina) adquirida à Invitrogen Corporations (Paisley, Reino Unido), com insulina bovina, dexametasona, gentamicina e funzizone fornecidos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri).

3.2 Preparação das soluções

As soluções *stock* das substâncias em estudo (BZP, TFMPP, PI₁ e PI₂) foram preparadas em MeOH na concentração de 1mg/mL. Todas as soluções padrão intermédias foram obtidas a partir da diluição desta solução *stock*, também em MeOH. Todas estas soluções foram armazenadas a -20 °C.

Para a preparação das restantes soluções necessárias procedeu-se do seguinte modo:

- Tampão acetato de sódio 0,2M (pH 5,2): pesaram-se 2,72g de acetato de sódio, dissolveram-se em 100mL de água desionizada e ajustou-se o pH com HCl.

- Hidróxido de sódio 1M: pesaram-se 40g de NaOH que se dissolveram em 1000mL de água desionizada.

- Ácido clorídrico 0,1M (1000mL): utilizando uma proveta mediram-se 8,29mL de HCl, adicionou-se água desionizada até completar o volume, e homogeneizou-se por inversão.

- Solução de 5% de amónia em MeOH (100mL): utilizando uma proveta mediram-se 22mL da solução de amónia, adicionou-se MeOH até perfazer o volume de 100mL, e homogeneizou-se por inversão.

3.3 Preparação das amostras

Plasma humano: as amostras de plasma foram obtidas a partir do sangue de voluntários do laboratório, saudáveis e sem história de consumo de drogas. O sangue foi recolhido para tubos de heparina e foi centrifugado a 2150rpm durante 10min numa centrífuga da marca eppendorf (Hamburg, Alemanha) e modelo Centrifuge 5810R. Após a centrifugação, o plasma foi recolhido e foi efetuada uma mistura com as amostras de todos os indivíduos. Estas amostras foram congeladas a -80 °C.

Urina humana: as amostras de urina foram obtidas a partir de indivíduos saudáveis e sem história de consumo de drogas. Foi também efetuada uma mistura com todas as amostras de urina, que foi conservada a -80 °C.

Meio de cultura: o meio de cultura utilizado foi o meio usado na exposição dos hepatócitos primários de rato, o Williams' Medium E com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio, em pó, e adequado para a cultura de células. O meio de cultura foi preparado no laboratório, suplementado (1% de Pen/Strep, 5µg/mL de insulina bovina, 50µM de dexametasona, 100µg/mL de gentamicina e 2,5µg/mL de fungizone) e conservado a 4 °C.

3.4 Preparação das amostras padrão

Às amostras isentas dos compostos em estudo de cada matriz (designadas por amostras branco de matriz) adicionou-se a quantidade de solução padrão necessária para obter as concentrações finais pretendidas.

3.5 Otimização e desenvolvimento do método

3.5.1 Preparação das amostras

3.5.1.1 Precipitação das proteínas nas amostras de plasma

Com o objetivo de remover as proteínas plasmáticas, nas amostras de plasma procedeu-se à precipitação de proteínas. Deste modo, foram testadas amostras padrão com precipitação de proteínas com MeOH ou com TCA (20%) e amostras padrão sem precipitação de proteínas. Os respetivos cromatogramas foram comparados.

Para a precipitação de proteínas com MeOH: às amostras padrão de plasma adicionou-se MeOH numa proporção de 1:1, procedeu-se à centrifugação (13000rpm x 15min, 4 °C) e à posterior recolha do sobrenadante.

Para a precipitação de proteínas com TCA (20%): às amostras padrão de plasma adicionou-se TCA (20%) numa proporção de 1:1, procedeu-se à centrifugação (13000rpm x 15min, 4 °C) e à posterior recolha do sobrenadante.

As centrifugações foram executadas numa centrífuga da marca Heraeus (Hanau, Alemanha) e modelo Biofuge Fresco.

3.5.1.2 Extração líquido-líquido nas amostras de meio de cultura

Na tentativa de purificar as amostras do meio de cultura foram testadas duas extrações líquido-líquido, uma com hexano:acetato de etilo (9:1) e outra com éter *terc*-butilmetílico.

Para a extração com hexano:acetato de etilo (9:1): foram realizadas 3 extrações líquido-líquido consecutivas com 3mL de hexano:acetato de etilo (9:1). A fase orgânica foi descartada após agitação em *vortex* e centrifugação da amostra (2456rpm x 5min). Para retirar quaisquer vestígios da fase orgânica as amostras foram secas em corrente de azoto e submetidas a extração em fase sólida (SPE). Foram comparados os cromatogramas obtidos de amostras padrão com e sem extração líquido-líquido.

Para a extração com éter *terc*-butilmetílico: foram realizadas 3 extrações líquido-líquido consecutivas com 1mL de éter *terc*-butilmetílico precedidas de uma alcalinização da amostra (pH 11) com NaOH 1M. A fase orgânica foi recolhida após agitação em *vortex* e centrifugação da amostra (4000rpm x 5min). De seguida, as 3 frações de fase orgânica recolhidas foram secas em corrente de azoto e o resíduo obtido foi dissolvido em 3mL de tampão de acetato de sódio 0,2M (pH 5,2) e submetido a SPE. Foram comparadas as curvas de calibração realizadas com e sem esta extração líquido-líquido.

3.5.1.3 SPE

A SPE foi realizada utilizando colunas OASIS MCX® 1cm³ (30mg) adquiridas na Waters (Milford, MA) e uma câmara com controlo de vácuo fornecida pela Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri), modelo Visiprep Solid Phase Extraction Manifold, com capacidade para 12 colunas.

Após a extração, os extratos foram recolhidos para frascos de vidro silanizado de 4 mL com tampas de plástico revestidas internamente com septos. Depois de recolhidos, os extratos foram completamente secos em corrente de azoto utilizando um evaporador da marca Stuart (Staffordshire, Reino Unido) e modelo SBHCONC/1. Para eliminar

quaisquer resíduos de água, evitando interferências na reação de derivatização, os tubos foram deixados abertos no exsiccador com pentóxido de fósforo (P₂O₅) durante a noite.

Foram testadas quatro extrações diferentes para cada matriz (tabela 4) e foi avaliado o rendimento extrativo de cada uma, através de testes de recuperação.

Tabela 4 - Diferentes tipos de extração para cada matriz.

	Ordem de eluição
Extração A	1- Amostra 2- Lavagem: 2 x 1mL de HCl 0,1M e 2 x 1mL de MeOH 3- Eluição: 2 x 1mL de 5% NH ₄ OH em MeOH
Extração B	1- Acondicionamento: 1mL de MeOH e 1mL de H ₂ O desionizada 2- Amostra 3- Lavagem: 2 x 1mL de HCl 0,1M e 2 x 1mL de MeOH 3- Eluição: 2 x 1mL de 5% NH ₄ OH em MeOH
Extração C	1- Amostra + 10µL HCl 5M 2- Lavagem: 2 x 1mL de HCl 0,1M em 5% MeOH; 2 x 1mL de MeOH e 1,5mL de TEA em MeOH 3- Eluição: 2 x 1mL de 5% NH ₄ OH em MeOH
Extração D	1- Acondicionamento: 1mL de MeOH e 1mL de H ₂ O desionizada 2- Amostra 3- Lavagem: 1mL de Ácido Fórmico 2%; 1mL de MeOH e 1mL de 55% MeOH em H ₂ O / 2% NH ₄ OH 4- Eluição: 1mL de 80% MeOH em H ₂ O / 2% NH ₄ OH

3.5.2 Efeito de matriz

Para verificar a existência ou não de efeito de matriz, foram executadas pelo menos 5 curvas de calibração independentes para cada matriz e foi calculada a média do declive. Para isso foram preparadas amostras padrão de BZP e TFMPP em concentrações finais de 0,016µg/mL, 0,08µg/mL, 0,4µg/mL, 2µg/mL e 10µg/mL. Juntamente com estas amostras padrão, uma amostra branco (sem analitos mas com PI) também foi analisada. Foi determinada a linearidade pela avaliação das curvas de regressão linear (razão entre a área do pico de cada analito e a área do pico do PI em função da concentração do analito) e pelo coeficiente de correlação ao quadrado (R²). Para avaliar o efeito de matriz foram comparadas as curvas de calibração obtidas nas matrizes e as curvas de calibração obtidas em solvente (MeOH).

3.5.3 Condições cromatográficas e equipamento

Para a identificação e quantificação dos compostos em estudo, a análise cromatográfica foi realizada usando um cromatógrafo gasoso da Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EUA), modelo 6890N, equipado com injetor *split-splitless*¹ e associado a um detetor de massa da Agilent Technologies (Santa Clara, CA, Estados Unidos), modelo 5975. O *software* usado no controlo, aquisição e tratamento de dados foi o Agilent MSD Productivity ChemStation for GC and GC/MSD Systems fornecido pela Agilent Technologies (Santa Clara, CA, Estados Unidos). A injeção do extrato derivatizado foi efetuada pelo injetor automático GC Sampler 80 da Agilent Technologies (Santa Clara, CA, Estados Unidos). A injeção foi realizada em modo *splitless*² com pulso de pressão (40psi) a 250 °C e o volume de injeção foi de 1 µL.

Para a separação cromatográfica foi utilizada a coluna capilar Agilent J&W DB-5ms com 30m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e 0,25µm de espessura da fase estacionária. A coluna foi fornecida pela Agilent Technologies (Santa Clara, CA, Estados Unidos). O gás de arraste utilizado foi o Hélio a um fluxo constante de 1mL/min.

Relativamente ao forno da coluna foram testados diferentes gradientes de temperaturas, dois dos quais se encontram representados nas figuras 3 e 4 e na tabela 5. Os cromatogramas obtidos para cada gradiente de temperaturas foram avaliados e comparados.

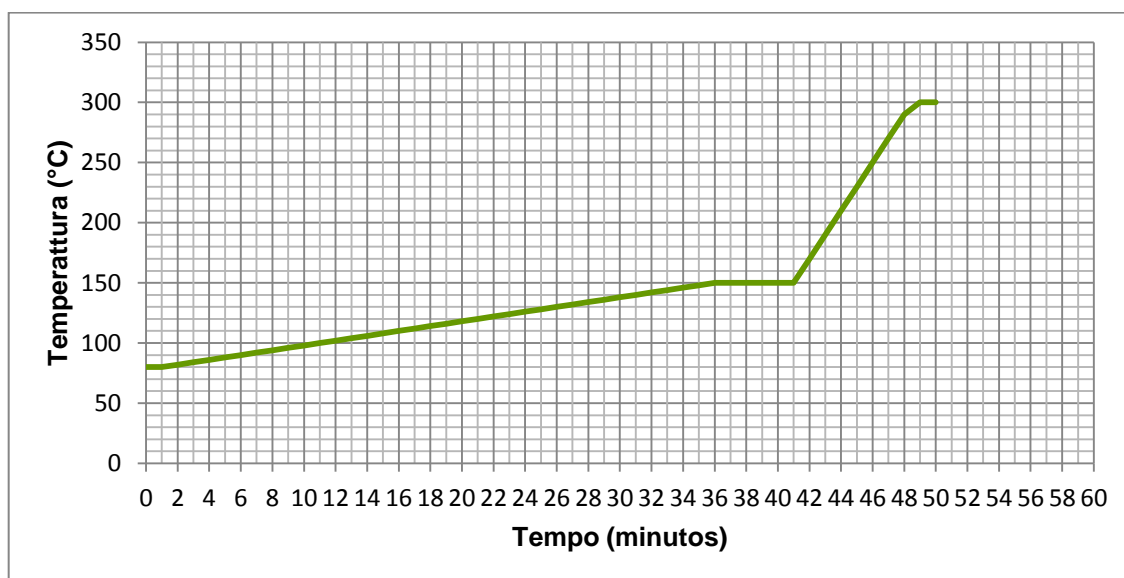


Figura 3 - Programa de temperatura A aplicado ao forno da coluna para otimização da separação cromatográfica.

¹ **Split-splitless** - Termo usado para designar os injetores que permitem o uso da técnica de injeção com divisão do fluxo (*split*) ou, alternativamente, da técnica de injeção sem divisão do fluxo (*splitless*).

² **Splitless** - Termo usado para designar a ausência de divisão do fluxo gasoso durante a injeção num sistema de cromatografia gasosa.

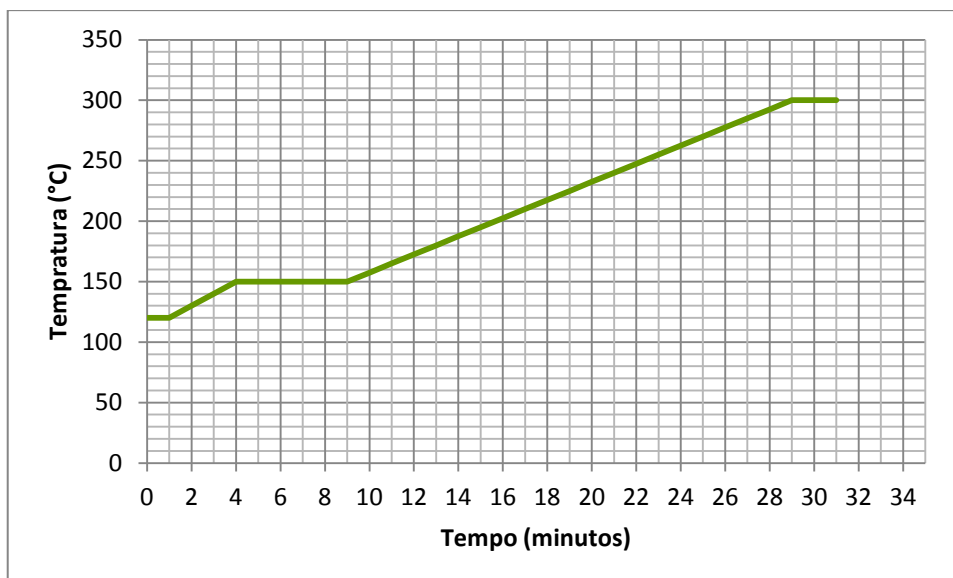


Figura 4 - Programa de temperatura B aplicado ao forno da coluna para otimização da separação cromatográfica.

Tabela 5 - Programas de temperatura A e B aplicados ao forno da coluna para otimização da separação cromatográfica.

Programa A	Programa B
<ul style="list-style-type: none"> - Temperatura inicial de 80 °C mantida durante 1min; - Incremento de 2 °C/min até 150 °C permanecendo a essa temperatura durante 5min; - Incremento de 20 °C/min até 300 °C permanecendo nessa temperatura durante 2min; - Tempo total: 51min. 	<ul style="list-style-type: none"> - Temperatura inicial de 120 °C mantida durante 1min; - Incremento de 10 °C/min até 150 °C permanecendo a essa temperatura durante 5min; - Incremento de 7,5 °C/min até 300 °C permanecendo nessa temperatura durante 2min; - Tempo total: 31min.

A temperatura da linha de transferência foi de 280 °C. A detecção foi feita por impacto eletrônico a 70Ev, numa gama de massas de razão massa/carga (m/z) 50 a m/z 600. Para a identificação dos compostos em estudo e caracterização dos espectros foi utilizado o modo *full scan* e para quantificação das substâncias em estudo foi utilizado o modo de monitorização seletiva de iões (SIM).

A seleção dos iões a monitorizar foi realizada tendo em conta a sua especificidade e a sua abundância no espectro de massa. Foram escolhidos em média 4 iões para cada substância, dentre esses iões foi escolhido um ião de quantificação (o mais abundante e não sujeito a interferências), sendo os restantes iões de confirmação (tabela 6). O tempo de monitorização foi de 30 a 80ms por ciclo e o detetor foi mantido desligado durante os

primeiros 3min, para proteger a fonte iônica das perturbações originadas pela passagem do excesso de solvente.

Tabela 6 - Condições para monitorização das substâncias por GC/MS em modo SIM.

Substância	Intervalo de tempo (min)	Tempo de retenção (min)	Íon de quantificação (m/z)	Íões de confirmação (m/z)
PI ₂	3-6	3,5	140	117; 203; 230
PI ₁	6-9,5	6,85	345	69; 216; 232; 248
BZP	9,5-31	11,2	272	91; 175;181
TFMPP	9,5-31	11,4	326	173; 200; 229

3.6 Validação do método

3.6.1 Preparação das amostras

3.6.1.1 Precipitação das proteínas nas amostras de plasma

A precipitação das proteínas nas amostras de plasma foi realizada com MeOH conforme descrito anteriormente na parte da otimização do método.

3.6.1.2 Hidrólise enzimática

Para a hidrólise enzimática foram utilizados 500µL de amostra, aos quais se adicionaram 10µL de PI₁ (100µg/mL) nas amostras de plasma e urina ou 10µL de PI₂ (50µg/mL) nas amostras de meio de cultura, 500µL de tampão de acetato de sódio 0,2M (pH 5,2) e 25µL de β –Glucuronidase. De seguida, as amostras foram incubadas durante a noite a 37 °C.

3.6.1.3 Extração líquido-líquido nas amostras de meio de cultura

A extração líquido-líquido nas amostras hidrolisadas de meio de cultura foi realizada com éter *terc*-butilmetílico conforme o descrito anteriormente na parte da otimização do método.

3.6.1.4 SPE

A extração realizada foi a Extração A descrita anteriormente na parte da otimização do método.

3.6.1.5 Reação de derivatização com TFAA

Aos frascos contendo o resíduo seco foram adicionados 50µL de acetato de etilo e 50µL de TFAA. De seguida, os frascos foram fechados, tendo em atenção se as tampas usadas continham septos, de maneira a evitar perdas por evaporação durante o aquecimento. Após aplicar o *vortex* ao extrato, as amostras foram aquecidas, num bloco de aquecimento da marca Stuart (Staffordshire, Reino Unido) e modelo SBH130D/3. As amostras foram aquecidas a 70 °C durante 30min e deixadas arrefecer até à temperatura ambiente. Posteriormente, a mistura foi seca em corrente de azoto e o resíduo obtido foi dissolvido em 100µL de acetato de etilo.

As amostras foram analisadas por GC/MS (cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa) começando sempre por injetar acetato de etilo e posteriormente as amostras, sendo que as amostras padrão foram injetadas por ordem crescente de concentração.

3.6.2 Parâmetros de validação

3.6.2.1 Linearidade

Foram preparadas e injetadas amostras padrão de BZP e TFMPP em concentrações finais de 0,016µg/mL, 0,08µg/mL, 0,4µg/mL, 2µg/mL e 10µg/mL (plasma e urina) e de 0,625µg/mL, 1,25µg/mL, 2,5µg/mL, 5µg/mL e 10µg/mL (meio de cultura) para avaliar a linearidade do método. Juntamente com estas amostras padrão uma amostra branco (sem analitos mas com PI) também foi analisada. A linearidade do método foi determinada pela avaliação das curvas de regressão linear (razão entre a área do pico de cada analito e a área do pico do PI interno em função da concentração do analito) e pelo coeficiente de correlação ao quadrado (R^2). Foram obtidas pelo menos cinco curvas de calibração independentes e foi calculada a média do declive.

3.6.2.2 Limite de deteção e quantificação

Para determinar a sensibilidade do método, a amostra padrão de cada matriz com a concentração de 0,016µg/mL (plasma e urina) e de 0,625µg/mL (meio de cultura) foi progressivamente diluída com plasma, urina ou meio de cultura branco para determinar o limite de deteção (LD) e o limite de quantificação (LQ). Uma razão sinal-ruído de 3 foi considerada aceitável para estimar o LD. O LQ foi estimado com base numa relação sinal-ruído de 10. A concentração correspondente a estes critérios foi injetada pelo menos cinco vezes e foi calculado o coeficiente de variação (CV%) dos valores obtidos.

3.6.2.3 Estabilidade da amostra

A estabilidade das amostras padrão foi avaliada em três níveis de concentração (0,016µg/mL, 0,4µg/mL e 10µg/mL para o plasma e urina e 0,625µg/mL, 2,5µg/mL e 10µg/mL para o meio de cultura). As amostras padrão preparadas foram mantidas a 4 °C e -20 °C e processadas após 0, 7 e 30 dias para o plasma e urina e após 0 e 7 dias para o meio de cultura. A estabilidade foi avaliada comparando o sinal das amostras padrão processadas no dia 0 com o sinal das amostras padrão processadas 7 e 30 dias depois, através da análise do coeficiente de variação.

3.6.2.4 Estabilidade da amostra derivatizada

A estabilidade das amostras padrão derivatizadas foi avaliada em três níveis de concentração (0,016µg/mL, 0,4µg/mL e 10µg/mL para o plasma e urina e 0,625µg/mL, 2,5µg/mL e 10µg/mL para o meio de cultura). Estas amostras padrão foram mantidas a 4 °C e injetadas durante 5 dias. A estabilidade foi avaliada comparando o sinal das amostras padrão injetadas no dia 0 com o sinal das amostras padrão injetadas nos 5 dias seguintes, através da análise do coeficiente de variação.

3.6.2.5 Precisão

A precisão (inter-dia e intra-dia) foi avaliada usando amostras padrão de cada matriz em três níveis de concentração (0,016µg/mL, 0,4µg/mL e 10µg/mL para o plasma e urina e 0,625µg/mL, 2,5µg/mL e 10µg/mL para o meio de cultura) através da análise do coeficiente de variação dos valores obtidos.

Precisão inter-dia: foi determinada através da análise, em cinco dias diferentes, de amostras padrão em três níveis de concentração (0,016µg/mL, 0,4µg/mL e 10µg/mL para o plasma e urina e 0,625µg/mL, 2,5µg/mL e 10µg/mL para o meio de cultura).

Precisão intra-dia do método: foi determinada extraíndo cinco vezes, no mesmo dia, a mesma amostra padrão em três níveis de concentração (0,016µg/mL, 0,4µg/mL e 10µg/mL para o plasma e urina e 0,625µg/mL, 2,5µg/mL e 10µg/mL para o meio de cultura).

Precisão intra-dia do equipamento: foi determinada injetando cinco vezes, no mesmo dia, a mesma amostra padrão em três níveis de concentração (0,016µg/mL, 0,4µg/mL e 10µg/mL para o plasma e urina e 0,625µg/mL, 2,5µg/mL e 10µg/mL para o meio de cultura).

3.6.2.6 Eficiência da extração

A eficiência de extração para cada analito foi testada pelo menos cinco vezes para três níveis de concentração (0,016µg/mL, 0,4µg/mL e 10µg/mL para o plasma e urina e 0,625µg/mL, 2,5µg/mL e 10µg/mL para o meio de cultura).

As amostras padrão extraídas foram preparadas adicionando os analitos ao branco de cada matriz. Estas amostras padrão foram extraídas e antes da evaporação foi adicionado o PI. As amostras padrão controle consistiram na extração de brancos de cada matriz, sendo que os analitos e o PI foram adicionados depois da extração e antes da evaporação. A eficiência da extração foi estimada pela comparação entre a razão da área dos picos (analito vs. PI) das amostras padrão extraídas e das amostras padrão controle. Os ensaios da eficiência da extração foram efetuados pelo menos cinco vezes para cada matriz.

3.6.2.7 Avaliação de interferências e especificidade

A fim de avaliar a presença de interferências cromatográficas, várias amostras branco de cada matriz foram preparadas e injetadas, sendo assim verificada a presença ou não de interferências nos tempos de retenção dos compostos estudados. Os cromatogramas das amostras padrão foram então comparados com os cromatogramas obtidos nas amostras branco.

3.6.3 Condições cromatográficas e equipamento

As condições cromatográficas e o equipamento utilizados na validação do método foram os mesmos já descritos na parte da otimização do método, sendo que o programa de temperatura utilizado foi o Programa B.

3.7 Prova de aplicabilidade: estudo das interações metabólicas entre a BZP e a TFMPP em hepatócitos primários de rato

Como já foi referido anteriormente, a BZP e a TFMPP partilham algumas vias metabólicas, o que pode levar à competição entre elas por transportadores membranares, enzimas, proteínas plasmáticas, entre outros. Isto pode originar alterações no metabolismo das substâncias quando administradas em associação. Por este motivo, foi realizado um estudo para avaliar esta possível interação ao nível do metabolismo.

Um estudo anterior, realizado por da Silva (2014), estudou a citotoxicidade da BZP, da TFMPP, e de três misturas diferentes destas substâncias em hepatócitos primários de rato, pelo ensaio do MTT. Este estudo também tentou prever a citotoxicidade das misturas através de dois modelos farmacológicos, o modelo de “adição

de concentrações” (AC) e o modelo de “ação independente” (AI). O cálculo da previsão da citotoxicidade das misturas foi efetuado após a caracterização dos compostos isoladamente. Assim, com base nos resultados da toxicidade individual de cada substância foram testadas as seguintes misturas:

- Mistura A ou Mix EC50: ambas as substâncias estavam presentes na proporção das concentrações que provocam 50% do seu efeito máximo de mortalidade celular;

- Mistura B ou Mix EC01: ambas as substâncias estavam presentes na proporção das concentrações que individualmente não produzem toxicidade significativa (1% de mortalidade);

- Mistura C ou Mix 2:1: a BZP e a TFMPP estavam presentes na proporção em que comumente são consumidas no mercado ilícito, na razão de 2:1, respetivamente.

Neste estudo de da Silva (2014), os resultados mostraram que, em algumas concentrações das misturas, o efeito de mortalidade celular observado no ensaio de MTT foi bem previsto pelos modelos matemáticos, no entanto noutras concentrações isso não aconteceu (da Silva 2014), sugerindo uma possível interação metabólica entre a BZP e a TFMPP. Por este motivo, neste presente trabalho utilizaram-se os sobrenadantes após incubação com a substância individualmente e em mistura para diferentes níveis de citotoxicidade, que se encontravam congelados a -80 °C. Foram selecionadas as concentrações para as quais o efeito observado no ensaio de MTT foi bem previsto pelos modelos matemáticos (EC10 da mistura A, EC15 da mistura B e EC10 da mistura C) e as concentrações para as quais o efeito observado no ensaio de MTT se desviou do previsto pelos modelos matemáticos (EC60 da mistura A, EC80 da mistura B e EC60 da mistura C), de forma a investigar a possível influência de uma interação metabólica nos desvios às previsões observados. As concentrações (µg/mL) selecionadas para o estudo das interações metabólicas encontram-se descritas na tabela 7.

Tabela 7 - Concentrações de BZP e TFMPP (µg/mL) selecionadas para o estudo das interações metabólicas.

	Mistura A (EC50) (µg/mL)		Mistura B (EC01) (µg/mL)		Mistura C (2:1) (µg/mL)	
	EC60	EC10	EC80	EC15	EC60	EC10
Mistura	326,19	161,33	236,80	93,52	106,66	48,27
BZP	303,17	149,82	181,55	70,50	65,22	35,25
TFMPP	23,02	11,51	55,25	23,02	41,44	23,02

Para cada mistura, foram analisados dois ou mais sobrenadantes das concentrações selecionadas para o estudo. Em paralelo analisaram-se dois ou mais

sobrenadantes resultantes da incubação com as substâncias individualmente nas mesmas concentrações em que estavam presentes nas misturas.

3.8 Análise Estatística

A análise estatística da otimização e validação do método foi efetuada com o programa GraphPad Prism versão 6.04 (GraphPad Software, São Diego, California, EUA). Foi utilizado o teste de Grubbs para calcular eventuais *outliers*.

A análise estatística da prova de aplicabilidade (estudo das interações metabólicas entre a BZP e a TFMPP em hepatócitos primários de rato) foi efetuada com o programa GraphPad Prism versão 6.04 (GraphPad Software, São Diego, California, EUA). Os resultados obtidos foram sujeitos a 3 testes de normalidade, nomeadamente o Teste de Kolmogorov-Smirnov, o Teste D'Agostino-Pearson e o Teste de Shapiro-Wilk. No entanto, os resultados não evidenciaram uma distribuição normal, por isso foram comparados através do Teste Kruskal-Wallis.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização e desenvolvimento do método

4.1.1 Preparação das amostras

O processo analítico consiste em várias etapas que, normalmente, permitem aumentar a sensibilidade e a especificidade do método. A seleção das diferentes técnicas a utilizar depende da finalidade da análise, do tipo de amostra, dos compostos de interesse, das concentrações, do equipamento, entre outros aspetos. A preparação das amostras é muito importante uma vez que permite a eliminação dos efeitos da matriz bem como de determinados compostos que interferem na especificidade e sensibilidade do método. Permite aumentar a sensibilidade e melhorar a deteção dos analitos. A preparação das amostras incluiu a precipitação de proteínas, a adição de um padrão interno, a hidrólise enzimática, a extração, a derivatização, entre outras etapas (Flanagan et al. 2008).

4.1.1.1 Precipitação das proteínas nas amostras de plasma

A técnica de GC/MS tem-se tornado uma das mais usadas para a deteção de fármacos e outros analitos em matrizes biológicas. A precipitação de proteínas é normalmente usada para uma limpeza simples e rápida da amostra e para permitir a determinação da fração total de fármacos e analitos. É um procedimento usado como uma técnica de preparação das amostras precursora a outros métodos. A precipitação é útil, uma vez que pode ser usada para desnaturar a proteína, destruindo a sua capacidade de ligação aos fármacos e outros analitos, dependendo do mecanismo de ligação (Chamberlain 1995). A investigação sobre a precipitação de proteínas é bastante extensa. Muitos investigadores têm usado a precipitação de proteínas na deteção de fármacos e outros analitos em soro e plasma. Muitas vezes, o solvente utilizado para precipitar as proteínas e os volumes ótimos de precipitante diferem entre protocolos, até mesmo quando se trata da análise dos mesmos analitos (Polson et al. 2003).

Foram avaliadas duas técnicas de precipitação de proteínas por comparação dos cromatogramas (figura 5).

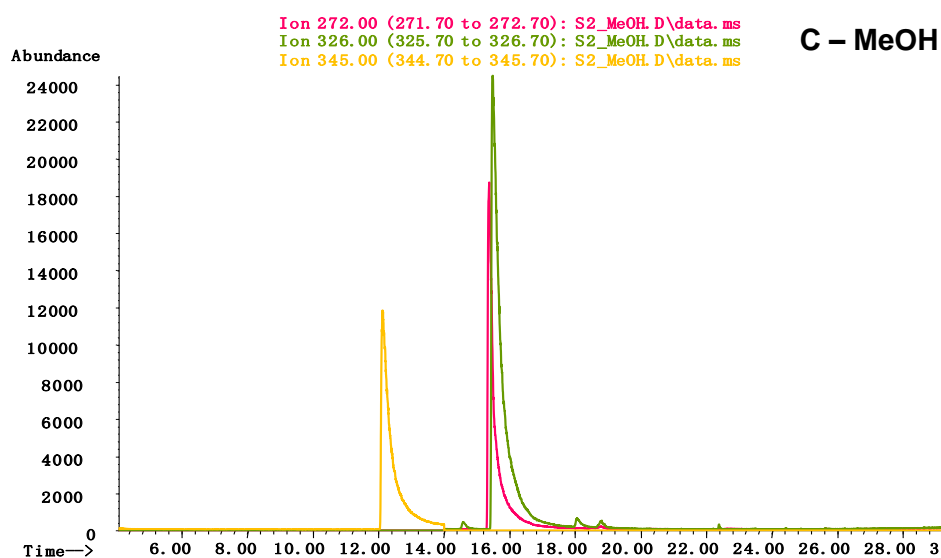
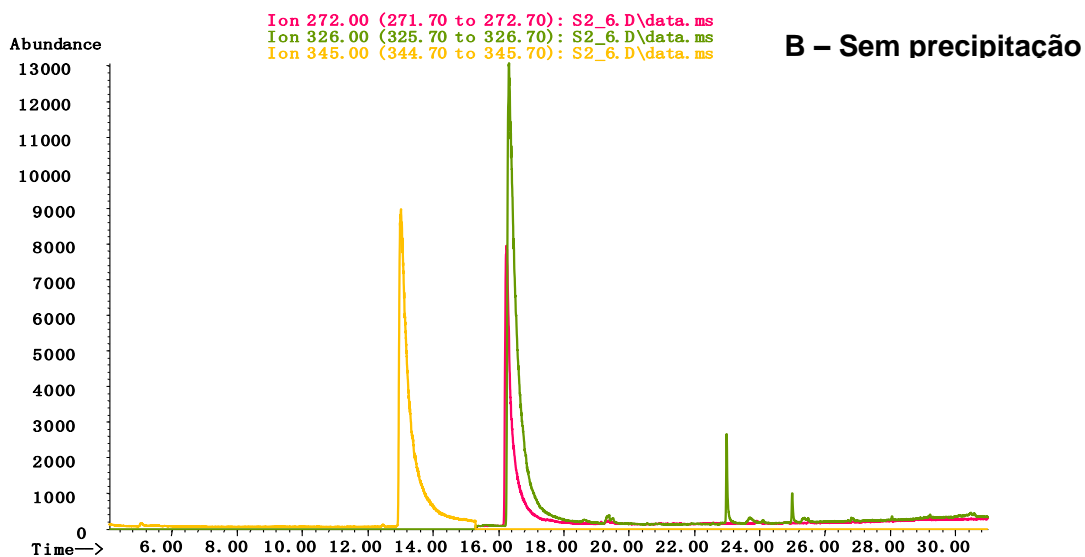
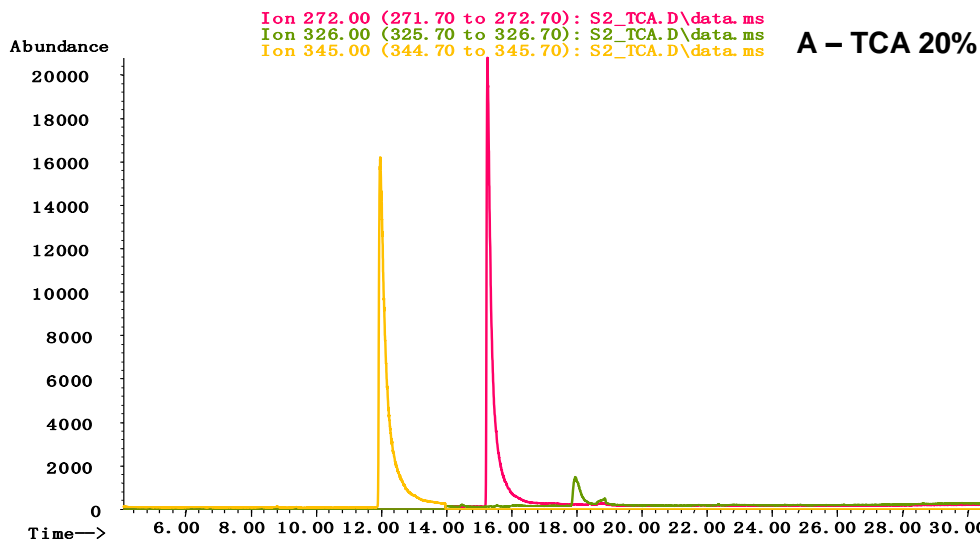


Figura 5 - Cromatogramas obtidos com os diferentes processos de precipitação de proteínas testados. A: Precipitação de proteínas com TCA 20%. B: Sem precipitação de proteínas. C: Precipitação de proteínas com MeOH. A amarelo está representado o PI, a cor-de-rosa a BZP e a verde a TFMPP.

Os resultados obtidos permitem concluir que as amostras com precipitação de proteínas utilizando MeOH e TCA obtiveram melhores resultados para o PI relativamente às amostras sem precipitação. No que concerne à BZP, os cromatogramas relativos a amostras em que foram usados agentes precipitantes (MeOH e TCA) revelam melhores resultados relativamente ao cromatograma representativo da amostra sem precipitação de proteínas. No que diz respeito à TFMPP é evidente que a eficiência da precipitação com TCA é muito baixa, e que a precipitação com MeOH é muito elevada. Assim, podemos concluir que a melhor técnica a ser utilizada para estes três compostos é a precipitação com MeOH. Efetivamente, os solventes orgânicos são os precipitantes de proteínas mais amplamente usados na análise de fármacos e outros analitos (Chamberlain 1995).

4.1.1.2 Hidrólise enzimática

A hidrólise dos conjugados antes da extração e da análise por GC/MS é necessária, especialmente nas amostras de urina, uma vez que não é possível analisar diretamente os conjugados glucuronídeos e sulfatos porque normalmente não são voláteis. Além disso, tem sido descrita a eliminação da BZP e da TFMPP como conjugados glucuronídeos e sulfatos, tanto em humanos (Antia et al. 2009a; Antia et al. 2010), como em animais (Staack et al. 2003; Staack and Maurer 2005; Tsutsumi et al. 2006). Por conseguinte, a hidrólise enzimática tem sido usada em estudos do metabolismo da BZP e da TFMPP (Tsutsumi et al. 2005). Neste estudo, foi utilizada a β -Glucuronidase *Helix pomatia* do tipo 2, uma vez que tem uma atividade de sulfatase e glucuronidase. A otimização das condições da hidrólise não foi realizada, mas Tsutsumi e colaboradores (2005) descreveram que a hidrólise de sulfatos e glucuronídeos da BZP e da TFMPP, em amostras de urina de rato, foi completa com um tempo de incubação de 12h a 37 °C (Tsutsumi et al. 2005), e estas foram as condições selecionadas para efetuar o presente estudo.

4.1.1.3 Extração líquido-líquido no meio de cultura

A escolha da extração líquido-líquido foi baseada na análise da linha de base dos cromatogramas e na linearidade obtida das curvas de calibração. Muitos solventes e misturas de solventes são usados para este tipo de extração incluindo hexano, éter *tert*-butilmetílico, diclorometano, ciclo-hexano, álcool isoamílico, entre outros.

Um dos principais problemas deste trabalho foi a baixa sensibilidade do método para a TFMPP no meio de cultura e a sua consequente falta de linearidade. Por isso, o motivo pelo qual se tentou otimizar uma extração líquido-líquido antes da SPE foi o aumento da sensibilidade à TFMPP no meio de cultura. Assim, comparando um branco

da matriz sem extração líquido-líquido com um branco da matriz sujeito a extração líquido-líquido com hexano:acetato de etilo (9:1) não se verifica melhoria na linha de base do cromatograma no tempo de retenção da TFMPP (figura 6), por isso este procedimento foi excluído. É importante referir que nas amostras sem esta extração, apesar da sensibilidade do PI estar reduzida a metade, os interferentes no tempo de retenção da TFMPP são menores.

Relativamente à extração líquido-líquido com éter *terc*-butilmetílico, comparando as curvas de calibração obtidas com e sem extração das amostras e os respetivos R^2 (figura 7), pode-se concluir que esta extração remove eficientemente os interferentes que estão presentes na matriz, uma vez que a linearidade da TFMPP foi significativamente melhorada. No entanto, a sensibilidade à BZP parece ter sido reduzida ainda que em muito pequena extensão. Por estas razões, a extração líquido-líquido com éter *terc*-butilmetílico foi escolhida.

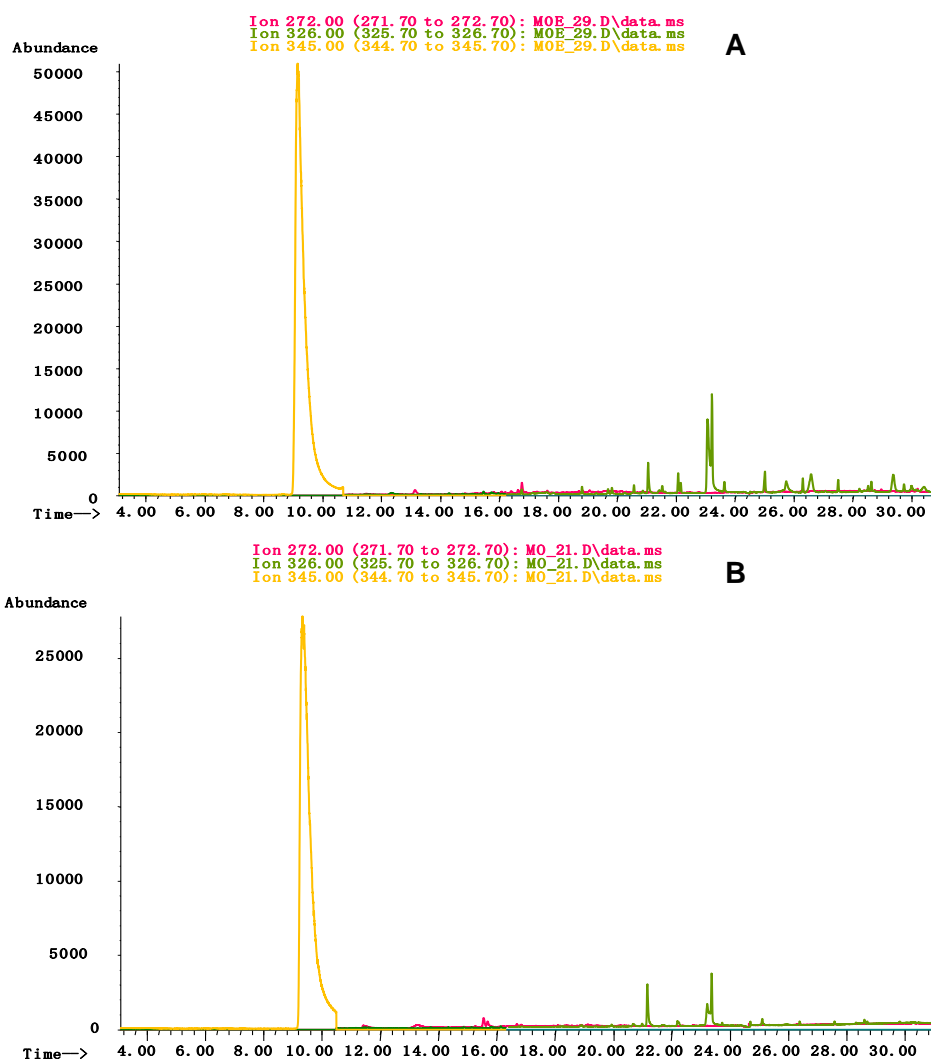


Figura 6 - Cromatogramas relativos a uma amostra branco (apenas com PI) de meio de cultura com (A) e sem (B) extração líquido-líquido usando hexano:acetato de etilo (9:1).

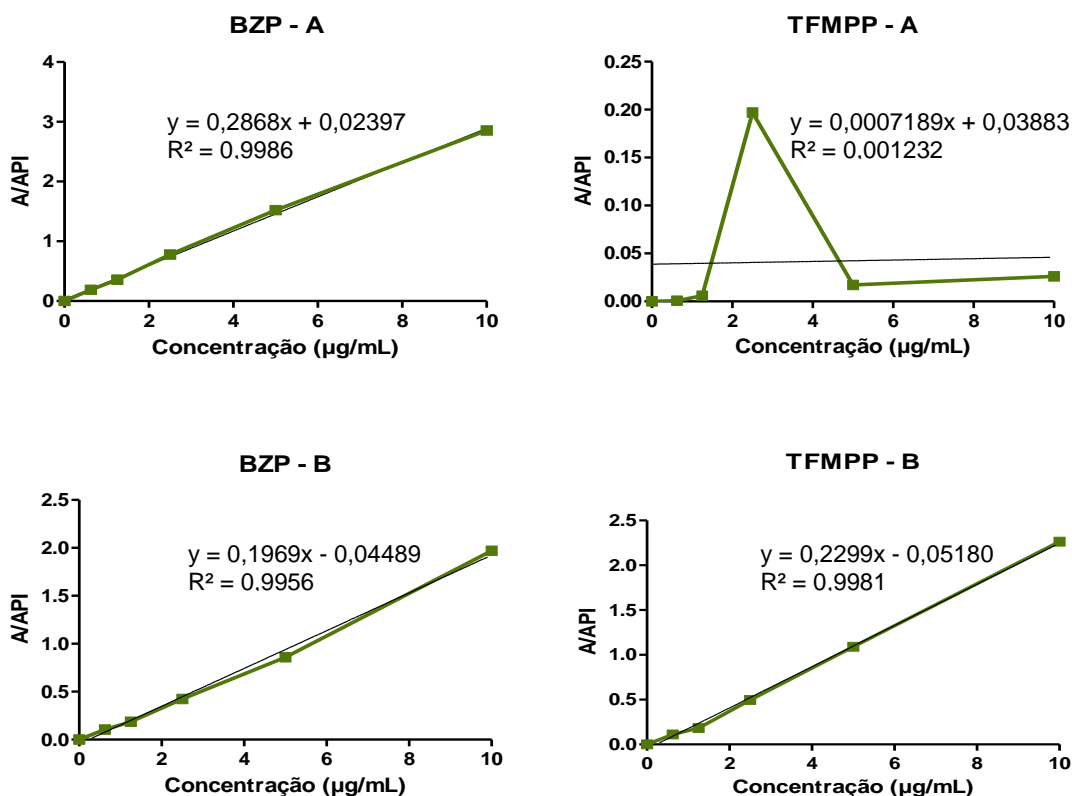


Figura 7 - Curvas de calibração de meio de cultura sem (A) e com (B) extração líquido-líquido usando éter *tert*-butilmetílico para a BZP e a TFMPP.

4.1.1.4 SPE

O tipo de colunas escolhido foi baseado num estudo realizado por Tsutsumi e colaboradores (2005), que concluiu que a extração usando colunas OASIS MCX® teve maior taxa de recuperação para a BZP e a TFMPP comparativamente com outros tipos de colunas e métodos extrativos (Tsutsumi et al. 2005). Assim, foram escolhidas as colunas OASIS MCX® e os solventes para realizar as extrações foram selecionados tendo em conta o método para a extração de compostos básicos recomendado pela marca.

A SPE é um método em que é utilizado o vácuo e um suporte sólido que retém as substâncias de interesse e permite que as substâncias interferentes sejam removidas com os solventes de lavagem apropriados. As substâncias de interesse retidas são depois recuperadas por eluição com um solvente adequado.

Embora uma parte significativa dos interferentes seja removida com uma extração líquido-líquido, há certos componentes das matrizes que apenas são removidos com a SPE. Estes interferentes podem contribuir para o efeito de matriz, divergência nas curvas de calibração e baixa reprodutibilidade. Neste contexto, a SPE é uma etapa muito importante que minimiza significativamente estas interferências. No entanto, o tipo de solventes utilizados nesta extração pode influenciar significativamente a quantidade de

analitos que é recuperada após a extração. Assim, foram testadas quatro extrações diferentes para cada matriz, já referidas anteriormente na tabela 4, e foi avaliado o rendimento extrativo de cada uma, através de testes de recuperação (tabela 8).

Tabela 8 - Resultados da recuperação para a BZP, TFMPP e PI em plasma, urina e meio de cultura resultantes de quatro extrações diferentes (A, B, C e D).

Matriz	Extração	Recuperação (%)		
		BZP	TFMPP	PI
Plasma	A	97	70	122
	B	60	56	73
	C	75	14	98
	D	33	99	6
Urina	A	104	118	93
	B	105	68	88
	C	52	15	92
	D	24	47	2
Meio de cultura	A	97	18	77
	B	73	46	103
	C	61	0	63
	D	39	46	2

Extração A: 1- Amostra; 2- Lavagem com HCl 0,1M e MeOH; 3- Eluição com 5% NH₄OH em MeOH

Extração B: 1- Acondicionamento com MeOH e H₂O; 2- Amostra; 3- Lavagem com HCl 0,1M e MeOH; 3- Eluição com 5% NH₄OH em MeOH

Extração C: 1- Amostra + 10µL HCl 5M; 2- Lavagem com HCl 0,1M em 5% MeOH, MeOH e TEA em MeOH; 3- Eluição com 5% NH₄OH em MeOH

Extração D: 1- Acondicionamento com MeOH e H₂O; 2- Amostra; 3- Lavagem com Ácido Fórmico 2%, MeOH e 55% MeOH em H₂O / 2% NH₄OH; 4- Eluição com 80% MeOH em H₂O / 2% NH₄OH

Tendo em conta os resultados obtidos é possível concluir que a extração com melhores resultados para as três matrizes e para todos os compostos em estudo é a extração A. No entanto, a TFMPP evidencia baixa taxa de recuperação no meio de cultura, porque no momento da otimização desta etapa ainda não se tinha otimizado a extração líquido-líquido com éter *terc*-butilmetílico antes da SPE. Mediante os resultados obtidos também podemos concluir que o acondicionamento prévio da coluna com água e MeOH não tem influência significativa na taxa de recuperação (comparando as extrações A e B). Na extração C foi utilizada a TEA como solvente de lavagem, a TEA foi usada tendo em vista a remoção de interferentes com a TFMPP nos brancos de urina. No

entanto, os resultados mostram baixa eficiência extrativa da TFMPP relativamente à extração C. No que diz respeito à extração D, é possível concluir que a última etapa de lavagem com 2% NH_4OH eluiu os analitos, resultando na baixa recuperação dos mesmos.

4.1.1.5 Reação de derivatização

Para realizar uma análise de cromatografia gasosa é necessário que os compostos de interesse sejam voláteis e estáveis nas elevadas temperaturas necessárias para a análise. No entanto, para alguns compostos não é possível realizar uma análise diretamente devido à sua baixa volatilidade e/ou estabilidade térmica. Nestes casos é necessária uma reação de derivatização. A derivatização também pode ser realizada para aumentar a eficiência cromatográfica e aumentar a deteção dos compostos. As três reações de derivatização mais comuns são a sililação, a acetilação e a alquilação. De acordo com os estudos disponíveis, a acetilação usando TFAA tem sido a técnica mais utilizada para a derivatização da BZP e da TFMPP (de Boer et al. 2001; Tsutsumi et al. 2005). O TFAA é o mais volátil e reativo dos anidridos e, além disso, durante a reação de derivatização não se formam subprodutos ácidos, o que diminui a possibilidade de dano da coluna (Sigma-Aldrich 1997). Assim, o processo de derivatização escolhido recorre ao uso de TFAA e acetato de etilo, cujo mecanismo genérico da reação está representado na figura 8.

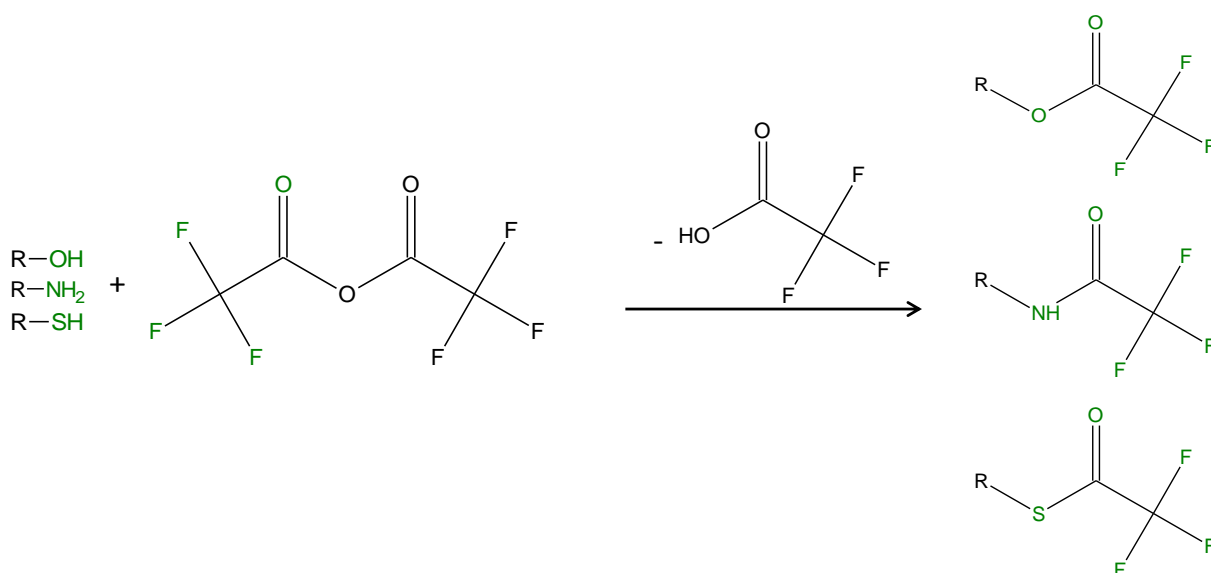


Figura 8 - Mecanismo genérico de derivatização usando TFAA e obtendo como derivados O-TFA, N-TFA e S-TFA (Monteiro 2012).

A otimização das condições da reação de derivatização não foi realizada, mas tendo em conta os resultados de de Boer e colaboradores (2001) que realizaram a reação de derivatização da BZP e da TFMPP a 65 °C durante 30min (de Boer et al. 2001), e os resultados de Monteiro (2012) em que a derivatização da BZP foi máxima para um volume de 50µL de TFAA, a 70 °C durante 30min (Monteiro 2012), selecionaram-se estas últimas condições para efetuar o presente estudo.

Nas figuras 9-12 estão representados os espectros de massa e os padrões de fragmentação da BZP, TFMPP, cloridrato de 4-hidroxi-3-metoxibenzilamina (PI₁) e fenilpropanolamina (PI₂) após derivatização com TFAA.

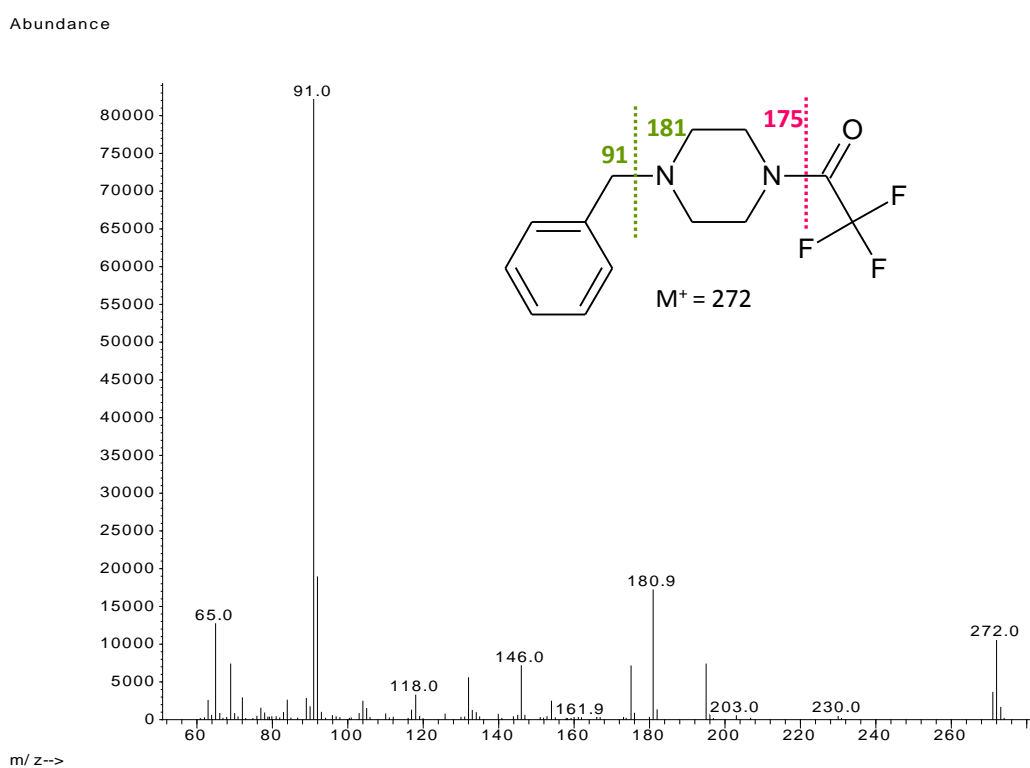


Figura 9 - Espectro de massa e padrão de fragmentação da BZP após derivatização com TFAA.

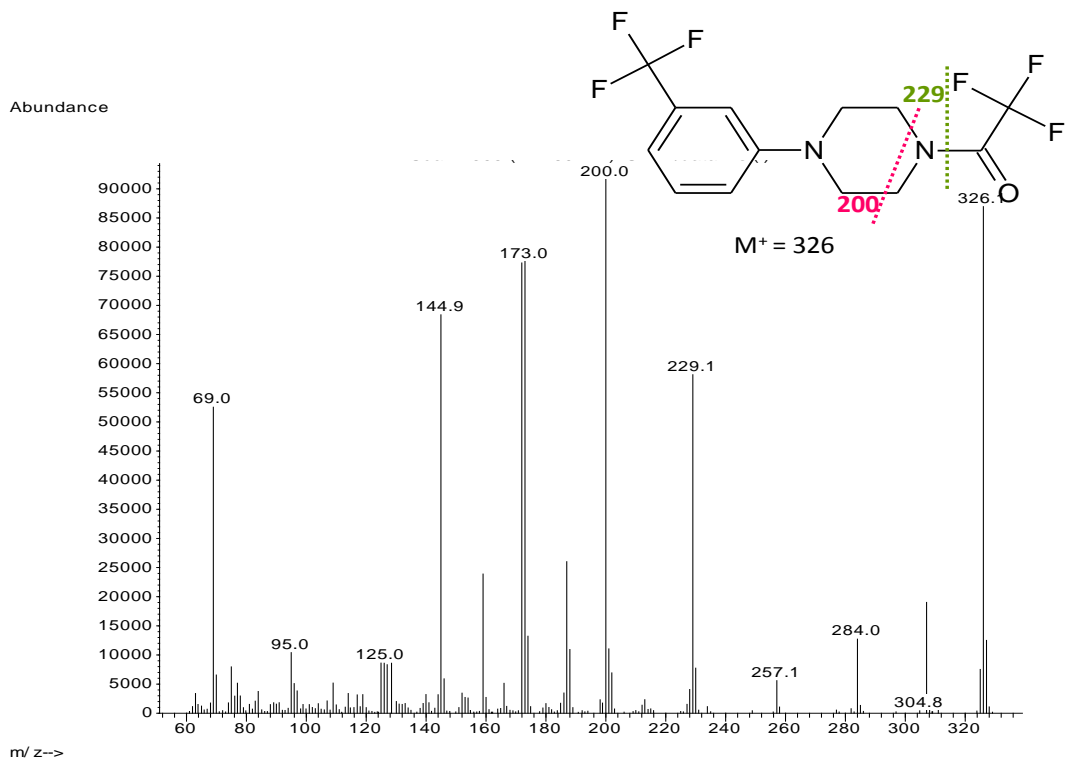


Figura 10 - Espectro de massa e padrão de fragmentação da TFMPF após derivatização com TFAA.

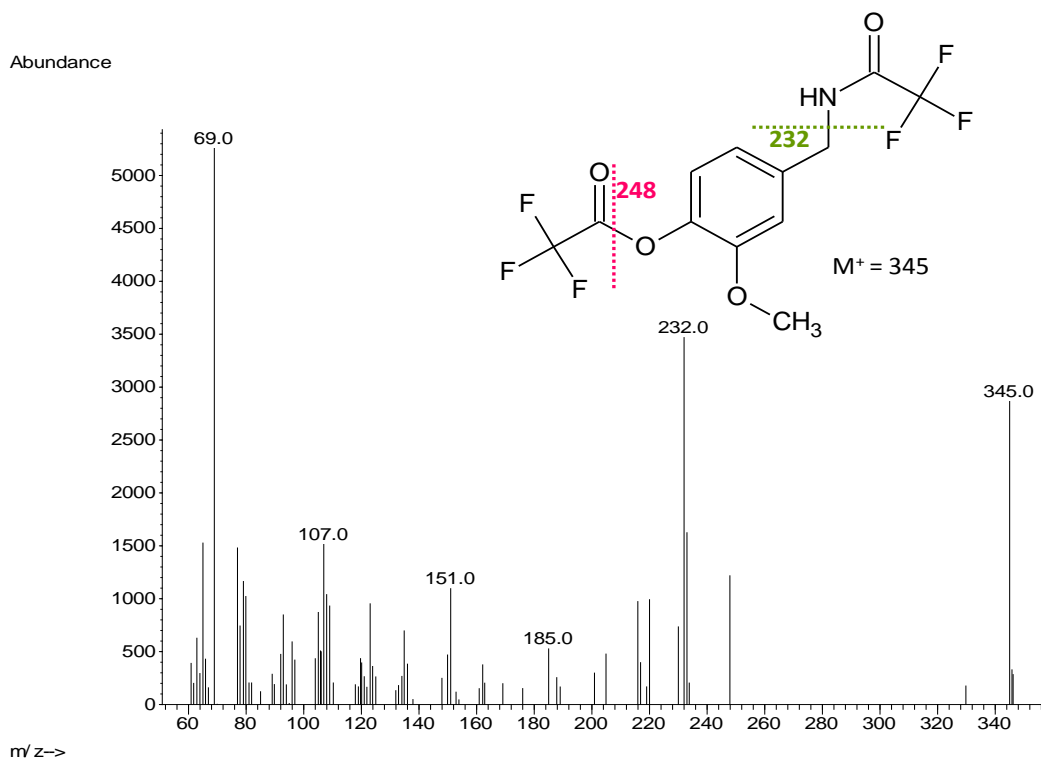


Figura 11 - Espectro de massa e padrão de fragmentação do cloridrato de 4-hidroxi-3-metoxibenzilamina (PI_1) após derivatização com TFAA.

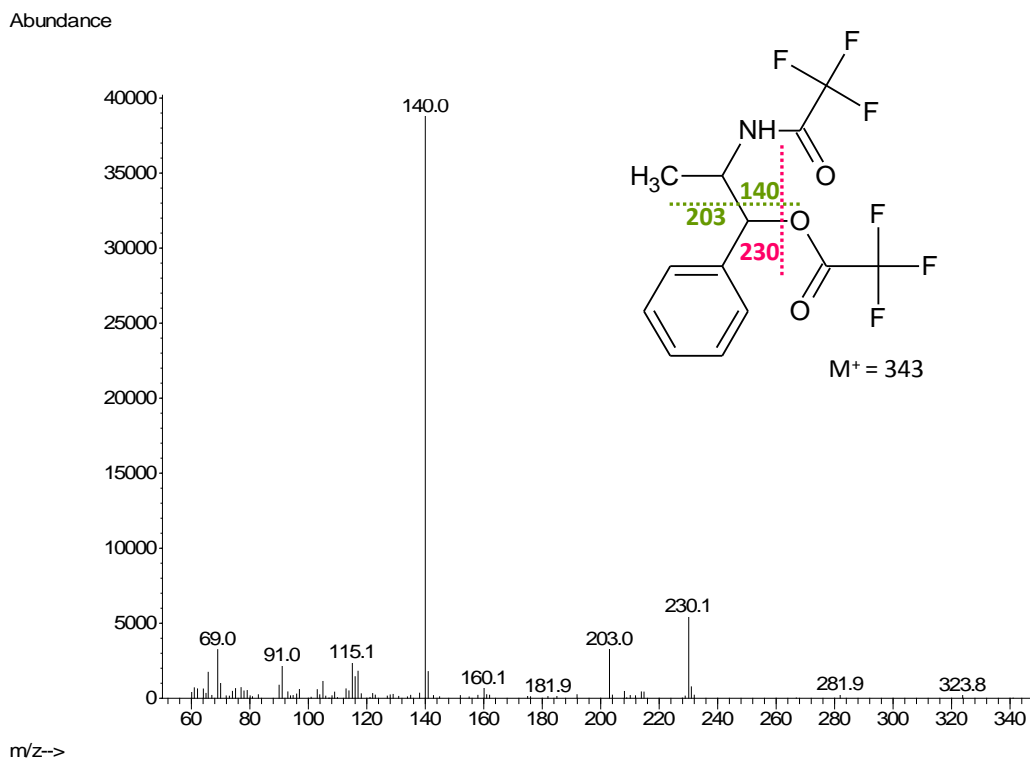


Figura 12 - Espectro de massa e padrão de fragmentação da fenilpropranolamina (PI₂) após derivatização com TFAA.

4.1.2 Escolha do PI

A utilização de um PI ajuda a reduzir os erros sistemáticos que afetam a precisão e a reprodutibilidade, conferindo mais confiança nos resultados obtidos, sendo uma boa prática em análise cromatográfica. O PI deve satisfazer alguns requisitos, tais como: ter propriedades físicas e químicas similares aos analitos para que durante a preparação e análise da amostra se comporte de forma semelhante, a resposta do detetor deve ser semelhante à dos analitos, não deve co-eluir com os analitos e nem contribuir para o aumento do tempo de análise e deve ainda ser estável tanto em solução como durante a análise. Os análogos deuterados dos compostos são cada vez mais preferidos como PI porque têm um comportamento muito semelhante aos analitos, apesar de serem normalmente mais caros, e para alguns compostos nem estarem disponíveis (Flanagan et al. 2008). No que concerne à BZP e à TFMPP, a utilização de análogos deuterados tem sido descrita na literatura, por exemplo a TFMPP-d₄ e a BZP-d₇ (Bassindale and Berezowski 2011; Dickson et al. 2010), mas outros derivados piperazínicos têm sido mais utilizados como padrões internos nos estudos quantitativos de BZP e TFMPP (de Boer et al. 2001; Tsutsumi et al. 2005; Vorce et al. 2008). Uma vez que um dos objetivos deste trabalho é desenvolver um método sensível para ser usado na área clínica e forense, o padrão interno selecionado não deve ser uma substância que é utilizada como droga de abuso. Por essa razão, todos os derivados piperazínicos foram excluídos, e a utilização

do cloridrato de 4-hidroxi-3-metoxibenzilamina (PI₁) como padrão interno foi avaliada. Este padrão interno mostrou ter um comportamento extrativo e cromatográfico no plasma e na urina semelhante aos analitos. Além disso o seu tempo de retenção também se mostrou adequado. No entanto, no que diz respeito ao meio de cultura, a extração com éter *terc*-butilmetílico prejudicou de forma drástica a sensibilidade a este padrão interno (figura 13), por isso outro composto, a fenilpropanolamina (PI₂), foi avaliado como PI a ser utilizado no meio de cultura. A fenilpropanilamina mostrou ter um comportamento extrativo e cromatográfico semelhante aos analitos no meio de cultura, e o seu tempo de retenção também se mostrou adequado, por estas razões foi selecionada como PI a ser utilizado no meio de cultura.

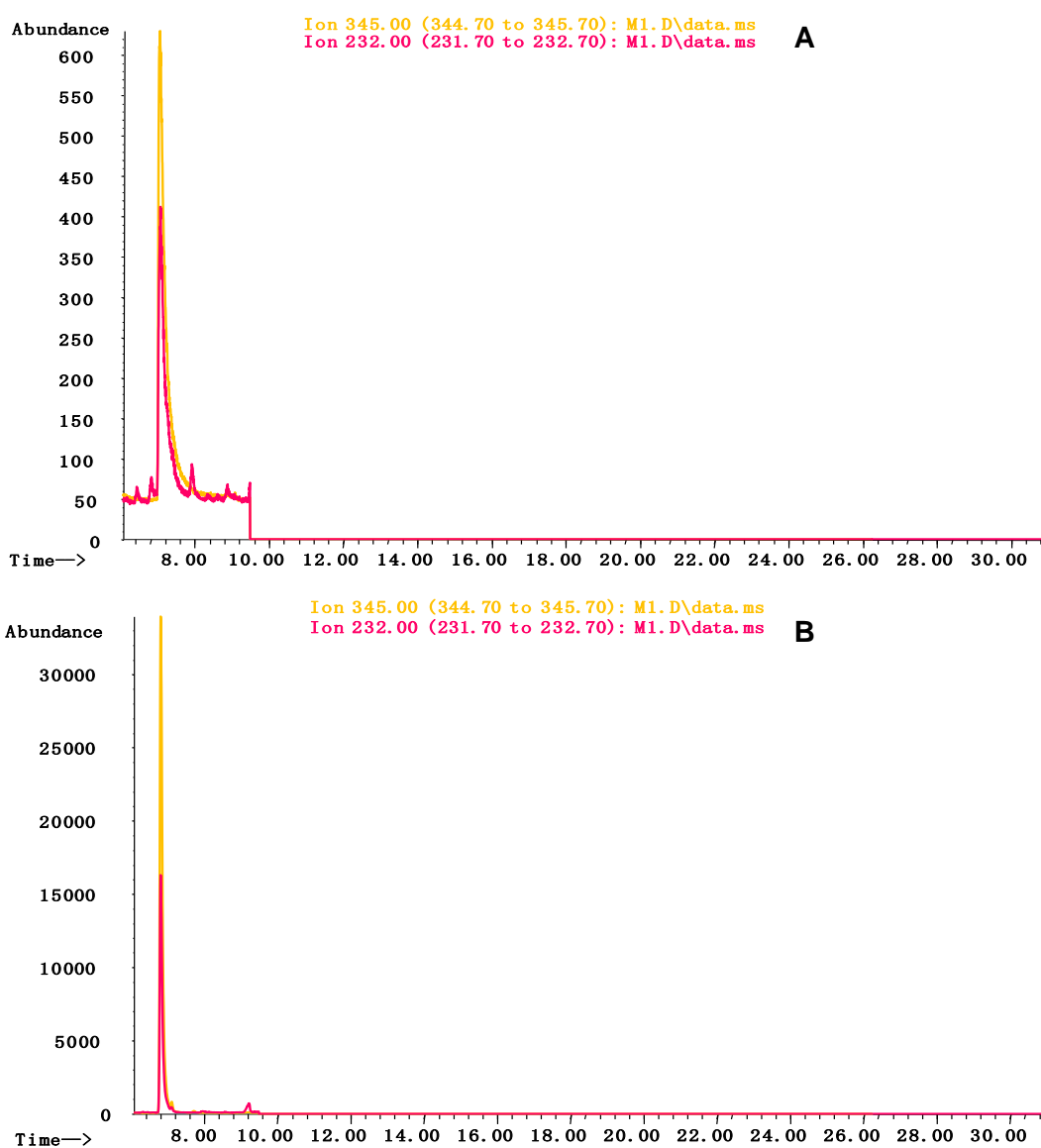


Figura 13 - Cromatogramas obtidos com cloridrato de 4-hidroxi-3-metoxibenzilamina (PI₁) no meio de cultura. A: Extração com éter *terc*-butilmetílico. B: Sem extração com éter *terc*-butilmetílico.

4.1.3 Efeito de matriz

O efeito de matriz é uma das maiores fontes de erro nos métodos analíticos. Por isso é um aspeto importante a considerar na análise de fármacos e outros analitos em matrizes tão variadas como as estudadas neste trabalho. O efeito de matriz resulta da presença de substâncias provenientes da amostra conduzindo a um comportamento cromatográfico impossível de simular e prever. Estas variações de matriz têm impacto em todas as etapas da análise cromatográfica (injeção, separação, deteção) e podem prejudicar a qualidade dos resultados obtidos por: mascarar os picos dos compostos de interesse (falsos negativos); identificar falsamente impurezas como substâncias (falsos positivos); aumentar ou diminuir o sinal analítico do detetor.

No sistema cromatográfico, a parte mais importante no que diz respeito ao efeito de matriz é o injetor. Durante a injeção pode ocorrer a degradação e/ou adsorção de certas substâncias. Quando os extratos da amostra são injetados, as substâncias co-extraídas tendem a ocupar os locais ativos do injetor (principalmente no *liner*³), o que diminui o efeito referido de degradação e/ou adsorção, fazendo com que as substâncias sejam transportadas em maior quantidade para a coluna cromatográfica aumentando, conseqüentemente, o sinal analítico obtido na matriz, comparativamente com o que é obtido em solvente.

O efeito de matriz está, claramente, relacionado com a estrutura química das substâncias e com a natureza da matriz a analisar.

Embora menos estudada, a diminuição do sinal analítico provocada pelo efeito de matriz tem sido referenciada em matrizes com elevados teores de lípidos e em que as substâncias de interesse são de natureza lipofílica.

Para evitar o aumento ou diminuição do sinal analítico provocado pelo efeito de matriz, podem ser tomadas diversas medidas. Por exemplo, a desativação do *liner* e a utilização de materiais adsorventes no *liner* são algumas delas. No entanto, a aplicação dessas medidas em termos práticos é complicada. A medida mais recomendada e mais fácil de utilizar é validar o método em matriz original ou em matriz sintética na impossibilidade de obtenção da matriz original, em vez de se usarem solventes. Contudo, esta medida tem alguns entraves como a reduzida estabilidade de algumas substâncias na matriz e o aumento da contaminação do injetor, da coluna e do detetor. Esta contaminação é provocada pelo aumento do número de injeções com matriz, o que pode levar a uma diminuição da resposta cromatográfica (Cunha 2007).

³ *Liner* - Peça de vidro de formato cilíndrico, aberto nas duas extremidades, colocada no interior do sistema cromatográfico.

Tendo em conta o número de matrizes em que se pretendia validar o método, foi testado o efeito de matriz. Quando comparamos as diferentes curvas de calibração em matriz e em solvente (MeOH) foi observado um significativo efeito de matriz, especialmente para a TFMPP (figura 14). Por isso, o método foi validado para cada matriz separadamente.

Observamos também que o meio de cultura é a matriz que apresenta menor declive nas curvas de calibração da TFMPP, ou seja, parece haver diminuição do sinal analítico, e tendo em consideração o que foi referido anteriormente e o facto do meio de cultura ser uma matriz rica em lípidos, esta pode ser uma explicação para essa diminuição. Este facto também explica o sucesso da extração líquido-líquido com éter *terc*-butilmetílico.

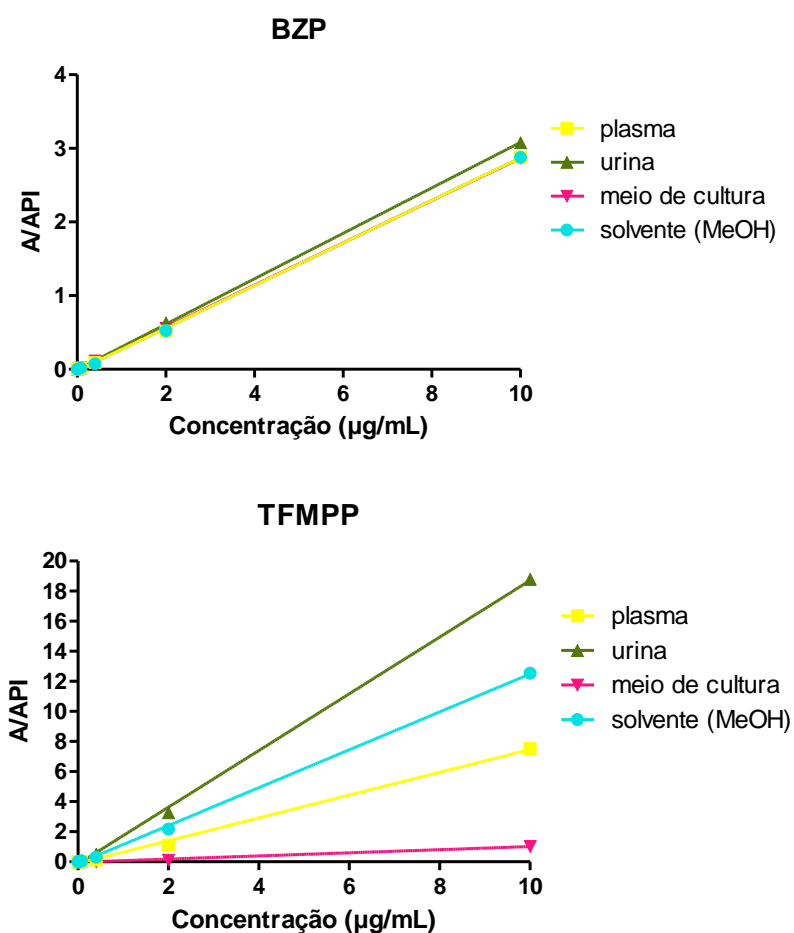


Figura 14 - Curvas de calibração da BZP e TFMPP obtidas para cada matriz e solvente (MeOH).

4.1.4 Condições cromatográficas

No que diz respeito ao processo cromatográfico, foram testados programas de temperaturas para obter uma separação eficiente da BZP e da TFMPP. Os resultados obtidos para dois dos programas testados estão representados na figura 15. Comparando os dois programas, podemos verificar que o programa A não permite uma boa separação cromatográfica, ao contrário do programa B que se mostrou mais eficiente.

A coluna utilizada mostrou-se adequada para a separação das substâncias em estudo, obtendo-se um baixo efeito de *bleeding*⁴.

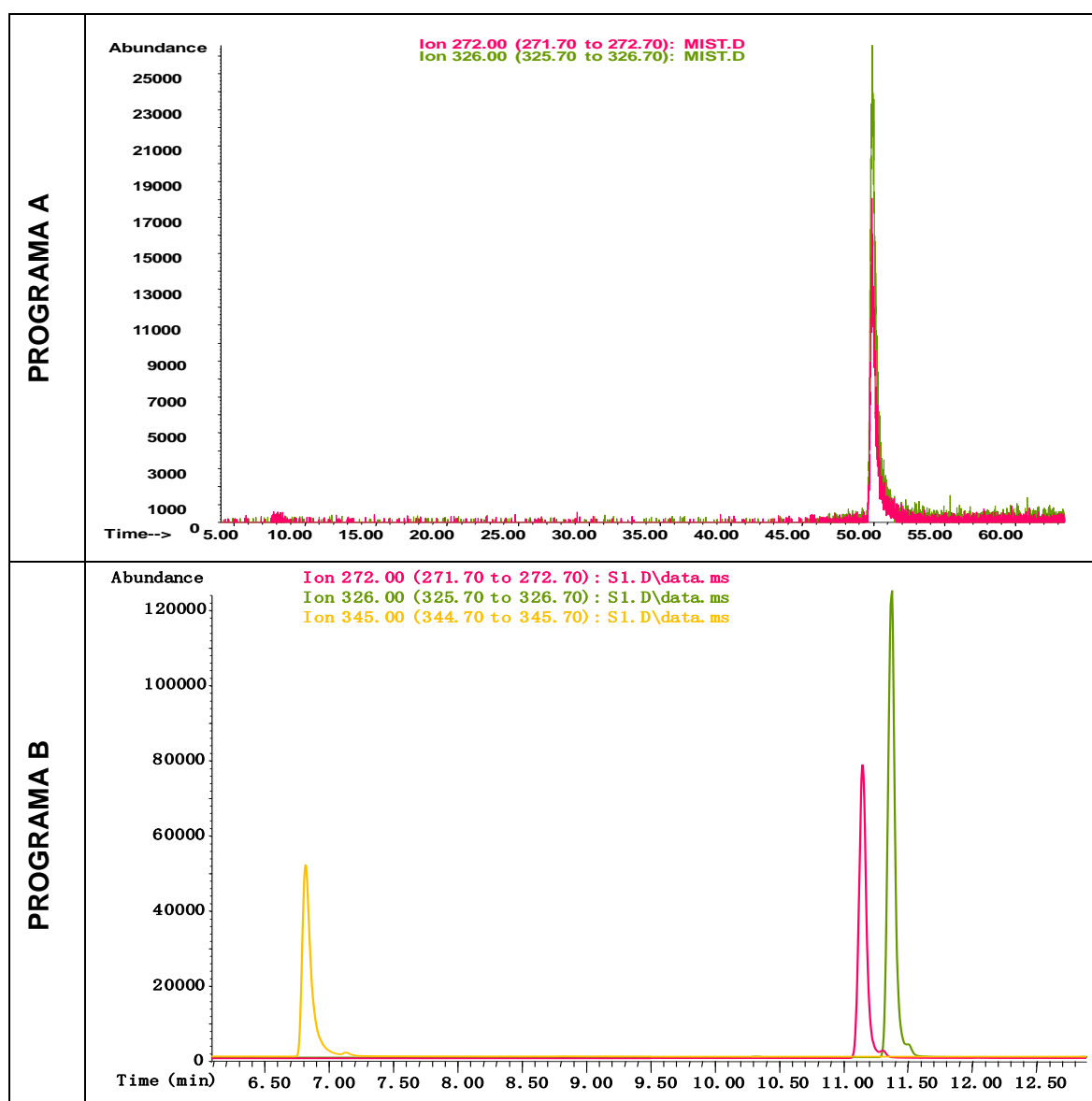


Figura 15 - Cromatogramas obtidos para os programas de temperaturas A e B referidos na tabela 5.

⁴ **Bleeding** - Fenómeno caracterizado pela saída da coluna e conseqüente chegada ao detetor de pequenas porções da fase estacionária das colunas capilares que se traduz num incremento da linha de base dos cromatogramas.

4.2 Validação do método

4.2.1 Linearidade

As curvas de calibração do método foram satisfatoriamente lineares para todos os analitos entre os 0-10µg/mL. Esta gama de linearidade foi observada para as três matrizes em estudo. O critério mínimo para a aceitabilidade da linearidade de um método é o de ter uma curva de regressão linear com um coeficiente de correlação ao quadrado de 0,99 ou superior (Vorce et al. 2008), e neste caso os coeficientes de correlação ao quadrado obtidos foram sempre superiores a 0,99 (tabela 9).

Tabela 9 - Curvas de calibração para a BZP e TFMPP em plasma, urina e meio de cultura ($n \geq 5$).

Matriz	Substância	Equação	Gama (µg/mL)	R ²
Plasma	BZP	$y = 0,1391 - 0,00635x$	0-10	0,9996
	TFMPP	$y = 0,2147 - 0,01388x$	0-10	0,9993
Urina	BZP	$y = 0,3233 + 0,00010x$	0-10	1,0000
	TFMPP	$y = 0,5118 - 0,01997x$	0-10	0,9996
Meio de cultura	BZP	$y = 0,1970 - 0,03478x$	0-10	0,9983
	TFMPP	$y = 0,2140 - 0,03845x$	0-10	0,9986

No que concerne ao plasma, um método de GC/MS foi previamente validado por Peters e colaboradores (2003) para a BZP e para a TFMPP, sendo que a concentração mais alta validada foi de 1µg/mL e o R² obtido foi 0,981-0,999 e 0,996-1,000 para a BZP e a TFMPP, respetivamente (Peters et al. 2003). Contudo, também foram validados métodos de LC/MS em plasma para a BZP e para a TFMPP. Antia e colaboradores, em 2010, validaram um método cuja concentração mais elevada foi de 0,05µg/mL para as duas substâncias e o R² foi de 0,9724 para a BZP e de 0,9849 para a TFMPP (Antia et al. 2010). Um método de cromatografia líquida com detetor de fluorescência (LC/FD) também foi validado por Wada e colaboradores, em 2012, cuja concentração mais alta da gama foi de 1µg/mL para a BZP (R² = 0,997) e 2µg/mL para a TFMPP (R² = 0,999) (Wada et al. 2012).

Concluindo, no que diz respeito ao plasma, a linearidade obtida no método de GC/MS aqui apresentado para a BZP (R² = 0,9996) e para a TFMPP (R² = 0,9993) apresenta algumas melhorias relativamente aos outros métodos previamente validados. Quanto à concentração mais alta da gama, a utilizada no presente método (10µg/mL) é mais elevada comparativamente aos outros métodos, o que constitui uma mais-valia, uma vez que a gama de linearidade é muito ampla, o que contribui para uma diminuição

nos erros causados pelas diluições necessárias a possíveis amostras com concentrações acima da gama validada.

Na literatura está descrito um método de GC/MS validado em urina para a BZP, no qual a concentração mais alta da gama foi de 5µg/mL e o $R^2 > 0,98$ (Kankaanpää et al. 2004). Alguns métodos de LC/MS também foram validados em urina para a BZP e para a TFMPP. Tsutsumi e colaboradores, em 2005, validaram um método de LC/MS em que a concentração mais alta da gama utilizada foi de 10µg/mL e o R^2 foi de 0,999 para ambas as substâncias (Tsutsumi et al. 2005). Outra validação de Vorce e colaboradores, em 2008, utilizou como concentração mais alta da gama 5µg/mL para a BZP e 10µg/mL para a TFMPP cujo R^2 foi de 0,9991 e 0,9990, respectivamente (Vorce et al. 2008).

Assim, relativamente à urina é possível então concluir que a linearidade obtida com o presente método de GC/MS para a BZP ($R^2 = 1,0000$) e para a TFMPP ($R^2 = 0,9996$) apresenta melhorias relativamente aos outros métodos previamente validados. No que diz respeito à concentração mais alta da gama, a utilizada no presente método (10µg/mL) é mais elevada comparativamente aos outros métodos, o que constitui uma mais-valia pelas razões já enumeradas anteriormente.

O meio de cultura celular é uma matriz em que estas duas substâncias ainda não tinham sido estudadas, sendo que não existem dados na literatura para efetuar uma possível comparação entre métodos analíticos.

4.2.2 Limite de deteção e quantificação

O limite de deteção (LD) define-se como a menor concentração da substância que pode ser detetada. Os LD para os dois analitos foram de 0,004µg/mL no plasma e 0,002µg/mL na urina. No que diz respeito ao meio de cultura, o LD para a BZP foi de 0,156µg/mL e para a TFMPP foi de 0,312µg/mL.

O limite de quantificação (LQ) define-se como a menor concentração da substância que pode ser quantificada com exatidão e precisão aceitáveis. Os LQ para os dois analitos foram de 0,016µg/mL no plasma e 0,008µg/mL na urina. No que concerne ao meio de cultura, o LQ para a BZP foi de 0,312µg/mL e para a TFMPP foi de 0,625µg/mL.

Os critérios para a aceitabilidade dos LD e LQ seguem os mesmos critérios da exatidão e da precisão, sendo que o coeficiente de variação deve ser menor que 20% (Peters et al. 2003). Os resultados obtidos cumprem estes critérios, mesmo quando se tratam de concentrações tão baixas.

Os resultados obtidos relativamente ao LD e LQ para a BZP e TFMPP em plasma, urina e meio de cultura encontram-se descritos na tabela 10.

Tabela 10 - Resultados do LD e LQ (em µg/mL) para a BZP e TFMPP em plasma, urina e meio de cultura ($n \geq 5$).

Matriz	LD (µg/mL) (CV%)		LQ (µg/mL) (CV%)	
	BZP	TFMPP	BZP	TFMPP
Plasma	0,004 (11%)	0,004 (12%)	0,016 (13%)	0,016 (12%)
Urina	0,002 (12%)	0,002 (11%)	0,008 (4%)	0,008 (6%)
Meio de cultura	0,156 (18%)	0,312 (21%)	0,312 (20%)	0,625 (15%)

Relativamente ao plasma, o método de GC/MS previamente validado por Peters e colaboradores (2003) para a BZP e para a TFMPP obteve como LQ 0,005µg/mL e como LD 0,001µg/mL para ambas as substâncias, valores inferiores aos obtidos no presente trabalho (LQ = 0,016µg/mL e LD = 0,004µg/mL) (Peters et al. 2003).

No que diz respeito aos métodos de LC/MS validados em plasma para a BZP e para a TFMPP, Antia e colaboradores, em 2010, obtiveram como LQ 0,005µg/mL para ambas as substâncias, valor mais sensível quando comparado com o LQ obtido na presente validação (Antia et al. 2010). Na validação de Wada e colaboradores, em 2012, o LQ foi de 0,003µg/mL (BZP) e de 0,0152µg/mL (TFMPP), e o LD da BZP e da TFMPP foi de 0,0009µg/mL e de 0,0046µg/mL, respetivamente (Wada et al. 2012). Neste caso, os valores de LQ e LD obtidos para a BZP são consideravelmente melhores em comparação com os obtidos no presente método, mas para a TFMPP os valores são semelhantes.

Concluindo, no que diz respeito ao plasma, os valores de LQ e LD para as duas substâncias são superiores relativamente aos outros métodos previamente validados. Ou seja, este método é menos sensível quando comparado com os outros. Estes resultados encontram-se representados na tabela 11.

Tabela 11 - Resumo dos resultados de LD e LQ (em µg/mL) do presente estudo e dos descritos na literatura para validações de métodos de doseamento de BZP e TFMPP em plasma por GC/MS e LC/MS.

Estudo	LD (µg/mL)		LQ (µg/mL)	
	BZP	TFMPP	BZP	TFMPP
Presente	0,004	0,004	0,016	0,016
(Peters et al. 2003)	0,001	0,001	0,005	0,005
(Antia et al. 2010)	-	-	0,005	0,005
(Wada et al. 2012)	0,0009	0,0046	0,003	0,0152

Em 2004, o método de GC/MS validado por Kankaanpää e colaboradores em urina para a BZP obteve como LQ 0,2µg/mL, valor muito superior ao obtido no presente método (0,008µg/mL), no entanto não foi determinado o LD (Kankaanpää et al. 2004).

Relativamente aos métodos de LC/MS que foram validados em urina para a BZP e para a TFMPP, Tsutsumi e colaboradores, em 2005, obtiveram um LQ para as duas substâncias de 0,002µg/mL, valor inferior ao obtido no presente método (0,008µg/mL), contudo também não determinaram o LD (Tsutsumi et al. 2005), ao contrário do presente método cujo LD determinado para as duas substâncias nesta matriz foi de 0,002µg/mL. Outra validação de Vorce e colaboradores, em 2008, obteve como LQ e LD 0,10µg/mL para as duas substâncias, no entanto o presente método obteve valores inferiores para ambos os parâmetros (Vorce et al. 2008).

Assim, no que concerne à urina, é possível concluir que o LD e o LQ obtidos no presente método de GC/MS para a BZP e para a TFMPP apresentam melhorias relativamente aos outros métodos previamente validados, com exceção do método de LC/MS validado por Tsutsumi e colaboradores, em 2005, que obteve melhor LQ. Estes resultados encontram-se representados na tabela 12.

Tabela 12 - Resumo dos resultados de LD e LQ (em µg/mL) do presente estudo e dos descritos na literatura para validações de métodos de doseamento de BZP e TFMPP em urina por GC/MS e LC/MS.

Estudo	LD (µg/mL)		LQ (µg/mL)	
	BZP	TFMPP	BZP	TFMPP
Presente	0,002	0,002	0,008	0,008
(Kankaanpää et al. 2004)	-	-	0,2	-
(Tsutsumi et al. 2005)	-	-	0,002	0,002
(Vorce et al. 2008)	0,10	0,10	0,10	0,10

Na literatura, em relação ao meio de cultura para estas duas substâncias não existem valores destes dois parâmetros que possibilitem efetuar uma comparação.

4.2.3 Estabilidade da amostra

A estabilidade das amostras foi avaliada comparando o sinal das amostras processadas no dia 0 com o sinal das amostras mantidas em diferentes temperaturas de armazenamento processadas 7 e 30 dias depois, através da análise do coeficiente de variação, sendo que se considerou um coeficiente de variação até 20% aceitável.

Os resultados da estabilidade das amostras de plasma e urina encontram-se descritos na tabela 13. Podemos concluir que após 7 dias, nas amostras de plasma e urina, os dois compostos são estáveis para as três concentrações testadas a ambas as

temperaturas (4 °C e -20 °C). Depois de 30 dias, nas amostras de plasma, os dois compostos são estáveis para as três concentrações a -20 °C, no entanto, a 4 °C a concentração mais baixa de TFMPP (0,016µg/mL) não é estável, embora a BZP seja. Nas outras duas concentrações, os dois compostos são estáveis a 4 °C. Nas amostras de urina, as duas substâncias são estáveis para as três concentrações a -20 °C após 30 dias. No entanto, nas amostras de urina, a BZP é estável em todas as concentrações testadas a 4 °C após 30 dias, com a exceção da concentração mais alta (10µg/mL). A TFMPP só é estável na concentração intermédia (0,4µg/mL). Assim, é possível concluir que as duas substâncias são estáveis em amostras de plasma e urina mesmo após 30 dias de armazenamento das mesmas, principalmente se forem conservadas a -20 °C. Os resultados mais preocupantes no que diz respeito à estabilidade das amostras nestas duas matrizes são para a TFMPP, a 4 °C, após 30 dias de armazenamento.

Relativamente ao meio de cultura, os resultados da estabilidade das amostras encontram-se na tabela 14. A estabilidade nas amostras de meio de cultura apenas foi avaliada 7 dias depois, e é possível concluir que os dois compostos são estáveis em todas as concentrações a ambas as temperaturas, com exceção da BZP na concentração mais elevada (10µg/mL) quando conservada a 4 °C.

Tabela 13 - Resultados do estudo da estabilidade da BZP e TFMPP em amostras de plasma e urina.

		Concentração (µg/mL)	Estabilidade em amostras de plasma (CV%)		Estabilidade em amostras de urina (CV%)	
			BZP	TFMPP	BZP	TFMPP
Dia 7	4 °C	0,016	6	9	9	11
		0,4	16	7	12	16
		10	6	6	15	14
	-20 °C	0,016	6	6	7	12
		0,4	9	4	9	15
		10	10	13	15	13
Dia 30	4 °C	0,016	22	112	11	53
		0,4	3	16	25	10
		10	6	22	45	33
	-20 °C	0,016	7	24	26	23
		0,4	1	5	9	9
		10	1	9	20	8

Para cada concentração foi injetada uma amostra padrão.

Tabela 14 - Resultados do estudo da estabilidade da BZP e TFMPP em amostras de meio de cultura.

		Concentração (µg/mL)	Estabilidade em amostras de meio de cultura (CV%)	
			BZP	TFMPP
Dia 7	4 °C	0,625	15	4
		2,5	17	15
		10	30	15
	-20 °C	0,625	8	8
		2,5	15	16
		10	23	12

Para cada concentração foi injetada uma amostra padrão.

Não existem na literatura resultados suficientes que permitam elaborar uma discussão sobre a estabilidade da amostra destas duas substâncias na urina e no meio de cultura. No entanto, relativamente ao plasma, a estabilidade da amostra foi já previamente estudada. Peters e colaboradores, em 2003, estudaram a estabilidade da BZP e da TFMPP no plasma em amostras sujeitas a três ciclos de congelação-descongelação, sendo que em cada ciclo as amostras foram congeladas a -20 °C durante 21h, descongeladas, e mantidas à temperatura ambiente durante 3h. A BZP e a TFMPP mostraram-se estáveis nas duas concentrações testadas (0,025µg/mL e 0,9µg/mL) (Peters et al. 2003). Outro estudo realizado por Antia e colaboradores, em 2010, estudou a estabilidade da BZP e da TFMPP no plasma em diferentes concentrações (0,005; 0,01; 0,02 e 0,05µg/mL) e condições de conservação. A estabilidade das substâncias nas amostras de plasma foi investigada pela comparação entre amostras preparadas no dia e amostras sujeitas a diferentes condições de conservação, através de testes de recuperação. A BZP e a TFMPP nas amostras de plasma conservadas à temperatura ambiente durante 24h mostraram-se estáveis, sendo a recuperação >90% para a TFMPP e >95% para a BZP. Nas amostras sujeitas a três ciclos de congelação-descongelação (em cada ciclo as amostras foram congeladas a -20 °C durante 24h, seguidas de descongelação à temperatura ambiente) as duas substâncias também se mostraram estáveis, sendo a recuperação >90% para a BZP e >95% para a TFMPP. A estabilidade da BZP e da TFMPP nas amostras de plasma conservadas a -20 °C durante 3 meses foi >90% para as duas substâncias (Antia et al. 2010). Assim, apesar das condições de conservação definidas para avaliar a estabilidade da amostra apresentarem diferenças comparativamente às usadas na validação do presente método, é possível concluir que em todos os estudos a BZP e a TFMPP apresentam estabilidade no plasma quando conservadas a -20 °C.

4.2.4 Estabilidade da amostra derivatizada

Relativamente à estabilidade da amostra derivatizada esta foi avaliada comparando o sinal das amostras injetadas no dia 0 com o sinal das amostras injetadas nos 5 dias seguintes através da análise do coeficiente de variação. Foi considerado aceitável um coeficiente de variação até 20%.

Os coeficientes de variação relativos à estabilidade das amostras de plasma derivatizadas estão representados na tabela 15. Os resultados da tabela permitem concluir que a BZP e a TFMPP em concentrações baixas (0,016µg/mL) são estáveis até 2 dias depois da derivatização. Em concentrações intermédias (0,4µg/mL) e altas (10µg/mL), a BZP e a TFMPP são estáveis até 4 dias depois da derivatização.

Na tabela 16 estão descritos os resultados da estabilidade das amostras de urina derivatizadas. A BZP e a TFMPP são estáveis, em todas as concentrações testadas, até 2 dias após a derivatização.

No que concerne ao meio de cultura, os resultados do estudo da estabilidade das amostras derivatizadas está representado na tabela 17, e é possível concluir que a BZP e a TFMPP são estáveis, em todas as concentrações testadas, até pelo menos 5 dias após a derivatização.

As amostras de meio de cultura derivatizadas são muito mais estáveis do que as amostras de plasma e urina derivatizadas, isto pode ser explicado por diferenças inerentes a cada matriz, e devido à utilização de um padrão interno diferente, uma vez que o padrão interno utilizado nas amostras de meio de cultura após derivatização mostrou ser mais estável que o padrão interno utilizado nas amostras de plasma e urina após derivatização. Assim, é recomendado que os extratos sejam analisados logo após a derivatização.

Tabela 15 - Resultados do estudo da estabilidade da BZP e TFMPP em amostra derivatizada extraída de plasma.

	Concentração (µg/mL)	Estabilidade em amostra derivatizada extraída de plasma (CV%)	
		BZP	TFMPP
Dia 1	0,016	8	4
	0,4	0	7
	10	2	3
Dia 2	0,016	18	9
	0,4	3	4
	10	5	3

Dia 3	0,016	61	54
	0,4	12	2
	10	9	6
Dia 4	0,016	126	134
	0,4	22	18
	10	11	8
Dia 5	0,016	139	139
	0,4	43	39
	10	17	15

Para cada concentração foi injetada uma amostra padrão.

Tabela 16 - Resultados do estudo da estabilidade da BZP e TFMPP em amostra derivatizada extraída de urina.

	Concentração (µg/mL)	Estabilidade em amostra derivatizada extraída de urina (CV%)	
		BZP	TFMPP
Dia 1	0,016	6	2
	0,4	7	6
	10	7	7
Dia 2	0,016	13	14
	0,4	15	15
	10	14	15
Dia 3	0,016	93	72
	0,4	28	26
	10	24	27
Dia 4	0,016	92	117
	0,4	54	53
	10	52	72

Para cada concentração foi injetada uma amostra padrão.

Tabela 17 - Resultados do estudo da estabilidade da BZP e TFMPP em amostra derivatizada extraída de meio de cultura.

	Concentração (µg/mL)	Estabilidade em amostra derivatizada extraída de meio de cultura (CV%)	
		BZP	TFMPP
Dia 1	0,625	4	7
	2,5	2	1

	10	2	1
Dia 2	0,625	3	2
	2,5	5	7
	10	1	2
Dia 3	0,625	0	1
	2,5	3	9
	10	8	4
Dia 4	0,625	4	8
	2,5	1	3
	10	0	3
Dia 5	0,625	12	15
	2,5	1	9
	10	2	0

Para cada concentração foi injetada uma amostra padrão.

Na literatura não existem resultados suficientes que permitam elaborar uma discussão sobre a estabilidade da amostra derivatizada destas duas substâncias na urina e no meio de cultura. Contudo, relativamente ao plasma, a estabilidade da amostra derivatizada foi já previamente estudada. Peters e colaboradores, em 2003, estudaram a estabilidade da BZP e da TFMPP no plasma em amostras derivatizadas, sendo as amostras injetadas em intervalos de tempo de 3,3h durante 30h, e não foi encontrada nenhuma indicação de instabilidade nas amostras derivatizadas para nenhum dos compostos (Peters et al. 2003). Os resultados desse estudo estão de acordo com os obtidos no presente trabalho, uma vez que a BZP e a TFMPP se mostraram estáveis até 2 dias após derivatização nas amostras de plasma para todas as concentrações testadas.

4.2.5 Precisão

A precisão expressa em coeficiente de variação não deve exceder os 15% (Vorce et al. 2008), e tendo em conta os resultados obtidos podemos concluir que este método mostrou precisão (inter-dia e intra-dia) satisfatória, uma vez que os valores do coeficiente de variação nunca ultrapassaram os 15%.

A precisão inter-dia foi inferior ou igual a 14% em todas as concentrações testadas das duas substâncias e em todas as matrizes (tabela 18). No plasma variou entre 6% e 11%, na urina entre 8% e 14% e no meio de cultura entre 8% e 12%.

A precisão intra-dia do método também foi determinada, em todas as concentrações testadas dos dois analitos e em todas as matrizes, tendo sido sempre

inferior ou igual a 15% (tabela 19). No plasma variou entre 4% e 5%, na urina entre 3% e 10% e no meio de cultura entre 1% e 12%.

No que concerne à precisão intra-dia do equipamento, esta foi inferior ou igual a 7% em todas as concentrações testadas das duas substâncias e em todas as matrizes (tabela 20). No plasma variou entre 0,6% e 2%, na urina entre 2% e 7% e no meio de cultura entre 1% e 4%.

Tabela 18 - Precisão inter-dia para a BZP e TFMPP em plasma, urina e meio de cultura ($n = 5$).

Matriz	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão inter-dia (CV%)	
		BZP	TFMPP
Plasma	0,016	6	11
	0,4	9	11
	10	9	11
Urina	0,016	11	14
	0,4	12	8
	10	13	8
Meio de cultura	0,625	11	11
	2,5	12	8
	10	11	8

Tabela 19 - Precisão intra-dia do método para a BZP e TFMPP em plasma, urina e meio de cultura ($n = 5$).

Matriz	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão intra-dia do método (CV%)	
		BZP	TFMPP
Plasma	0,016	5	6
	0,4	4	13
	10	9	15
Urina	0,016	6	3
	0,4	6	8
	10	9	10
Meio de cultura	0,625	1	7
	2,5	8	12
	10	5	11

Tabela 20 - Precisão intra-dia do equipamento para a BZP e TFMPP em plasma, urina e meio de cultura ($n = 5$).

Matriz	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão intra-dia do equipamento (CV%)	
		BZP	TFMPP
Plasma	0,016	2	0,8
	0,4	2	2
	10	0,6	1,3
Urina	0,016	2	3
	0,4	3	3
	10	7	7
Meio de cultura	0,625	4	3
	2,5	1	4
	10	2	4

No plasma, o método de GC/MS validado por Peters e colaboradores (2003) para a BZP e para a TFMPP avaliou a precisão inter-dia para várias concentrações e os resultados obtidos para a BZP foram de 10% (0,01 $\mu\text{g/mL}$), 10,7% (0,025 $\mu\text{g/mL}$), 11,9% (0,5 $\mu\text{g/mL}$) e 13,4% (0,9 $\mu\text{g/mL}$), e para a TFMPP foram de 6,9% (0,01 $\mu\text{g/mL}$), 8,1% (0,025 $\mu\text{g/mL}$), 9,1% (0,5 $\mu\text{g/mL}$) e 11,3% (0,9 $\mu\text{g/mL}$). Quanto à precisão intra-dia desse método, os resultados obtidos para a BZP foram de 10% (0,01 $\mu\text{g/mL}$), 9,9% (0,025 $\mu\text{g/mL}$), 5,7% (0,5 $\mu\text{g/mL}$) e 10,5% (0,9 $\mu\text{g/mL}$), e para a TFMPP foram de 3,6% (0,01 $\mu\text{g/mL}$), 8% (0,025 $\mu\text{g/mL}$), 3,2% (0,5 $\mu\text{g/mL}$) e 3,6% (0,9 $\mu\text{g/mL}$) (Peters et al. 2003). Ao comparar as concentrações 0,01 $\mu\text{g/mL}$ e 0,5 $\mu\text{g/mL}$ desse estudo com as concentrações 0,016 $\mu\text{g/mL}$ e 0,4 $\mu\text{g/mL}$ do presente método, respectivamente, é possível concluir que a precisão (inter-dia e intra-dia) para a BZP é consideravelmente melhor no presente método, ao contrário do que acontece com a TFMPP.

No que diz respeito aos métodos de LC/MS validados em plasma para a BZP e para a TFMPP, Antia e colaboradores, em 2010, obtiveram como precisão inter-dia para a BZP valores <8,96% (0,005 $\mu\text{g/mL}$), <9,71% (0,01 $\mu\text{g/mL}$), <8,96% (0,015 $\mu\text{g/mL}$), <2,13% (0,02 $\mu\text{g/mL}$) e <5,87% (0,05 $\mu\text{g/mL}$), e para a TFMPP valores <8,85% (0,005 $\mu\text{g/mL}$), <4,43% (0,01 $\mu\text{g/mL}$), <6,78% (0,015 $\mu\text{g/mL}$), <5,48% (0,02 $\mu\text{g/mL}$) e <2,87% (0,05 $\mu\text{g/mL}$). Relativamente à precisão intra-dia do método, os resultados para a BZP revelaram precisão de 11,11% (0,005 $\mu\text{g/mL}$), 11,11% (0,01 $\mu\text{g/mL}$), 2,52% (0,015 $\mu\text{g/mL}$), 3,68% (0,02 $\mu\text{g/mL}$) e 7,48% (0,05 $\mu\text{g/mL}$), e para a TFMPP de 6,75% (0,005 $\mu\text{g/mL}$), 6,75% (0,01 $\mu\text{g/mL}$), 3,91% (0,015 $\mu\text{g/mL}$), 2,80% (0,02 $\mu\text{g/mL}$) e 2,16% (0,05 $\mu\text{g/mL}$) (Antia et al. 2010). Comparando a concentração 0,016 $\mu\text{g/mL}$ do presente método com as concentrações 0,01 $\mu\text{g/mL}$ e 0,015 $\mu\text{g/mL}$ desse estudo, é possível

concluir que os resultados da precisão inter-dia e intra-dia são semelhantes para ambas as substâncias, apresentando até valores ligeiramente menores no presente método.

Na validação de Wada e colaboradores, em 2012, a precisão inter-dia obtida para a BZP foi de 4,8% (0,05µg/mL) e 3,7% (0,5µg/mL), e para a TFMPP foi de 4,5% (0,1µg/mL) e 4,4% (1µg/mL). Quanto à precisão intra-dia, esta foi de 6,3% (0,05µg/mL) e 4,8% (0,5µg/mL) para a BZP e de 9,1% (0,1µg/mL) e 7,6% (1µg/mL) para a TFMPP (Wada et al. 2012).

Tabela 21 - Resumo dos resultados de precisão inter-dia e intra-dia do presente estudo e dos descritos na literatura para validações de métodos de doseamento de BZP e TFMPP em plasma por GC/MS e LC/MS.

Estudo	Concentração (µg/mL)	Precisão inter-dia (CV%)		Precisão intra-dia do método (CV%)	
		BZP	TFMPP	BZP	TFMPP
Presente (n = 5)	0,016	6	11	5	6
	0,4	9	11	4	13
	10	9	11	9	15
(Peters et al. 2003) (n = 8 x 2 replicados)	0,01	10	6,9	10	3,6
	0,025	10,7	8,1	9,9	8
	0,5	11,9	9,1	5,7	3,2
	0,9	13,4	11,3	10,5	3,6
(Antia et al. 2010) (n = 3)	0,005	<8,96	<8,85	11,11	6,75
	0,01	<9,71	<4,43	11,11	6,75
	0,015	<8,96	<6,78	2,52	3,91
	0,02	<2,13	<5,48	3,68	2,80
	0,05	<5,87	<2,87	7,48	2,16
(Wada et al. 2012) (n = 5)	0,05	6,3	-	4,8	-
	0,5	4,8	-	3,7	-
	0,1	-	9,1	-	4,5
	1	-	7,6	-	4,4

Resumindo, quanto ao plasma, os valores da precisão inter-dia e intra-dia da BZP são visivelmente melhores no presente método comparativamente com o método de GC/MS validado por Peters e colaboradores, e comparativamente aos outros dois estudos, algumas concentrações do presente método também apresentam melhores resultados. No que concerne à TFMPP, os valores da precisão inter-dia e intra-dia do presente método são sempre mais elevados comparativamente aos outros métodos

previamente validados. Este facto deve-se muito provavelmente ao método, contudo é importante referir e salvaguardar que estas comparações envolvem diferentes concentrações e diferentes números de amostras utilizados para validar cada um dos métodos. Estes resultados encontram-se representados na tabela 21.

Em 2004, o método de GC/MS validado por Kankaanpää e colaboradores em urina para a BZP obteve como precisão inter-dia 8,9% (0,5µg/mL) e 8,8% (0,2µg/mL), sendo estes valores semelhantes aos obtidos no presente método 12% (0,4µg/mL) e 11% (0,016µg/mL). No que diz respeito à precisão intra-dia do método, estes investigadores obtiveram um CV% de 5,7% (2µg/mL), 3,8% (0,5µg/mL) e 7,5% (0,2µg/mL) (Kankaanpää et al. 2004), sendo estes valores também semelhantes aos obtidos no presente trabalho: 6% (0,4µg/mL e 0,016µg/mL).

Relativamente aos métodos de LC/MS que foram validados na urina para a BZP e para a TFMPP, Tsutsumi e colaboradores, em 2005, obtiveram uma precisão intra-dia para a BZP de 4,8% (1µg/mL) e 3,2% (0,2µg/mL), para a TFMPP a precisão obtida foi de 6,4% (1µg/mL) e 6,9% (0,2µg/mL) (Tsutsumi et al. 2005). Outra validação de Vorce e colaboradores, em 2008, obteve como precisão inter-dia valores <13,7% para a BZP e <11,8% para a TFMPP, no que concerne à precisão intra-dia do método, esta foi <5,3% para a BZP e <2,9% para a TFMPP (Vorce et al. 2008).

Tabela 22 - Resumo dos resultados de precisão inter-dia e intra-dia do presente estudo e dos descritos na literatura para validações de métodos de doseamento de BZP e TFMPP em urina por GC/MS e LC/MS.

Estudo	Concentração (µg/mL)	Precisão inter-dia (CV%)		Precisão intra-dia do método (CV%)	
		BZP	TFMPP	BZP	TFMPP
Presente (n = 5)	0,016	11	14	6	3
	0,4	12	8	6	8
	10	13	8	9	10
(Kankaanpää et al. 2004) (n = 10)	0,2	8,8	-	7,5	-
	0,5	8,9	-	3,8	-
	2	-	-	5,7	-
(Tsutsumi et al. 2005) (n = 5)	0,2	-	-	3,2	6,9
	1	-	-	4,8	6,4
(Vorce et al. 2008) (n = 7/5 x 5 concentrações)		<13,7	<11,8	<5,3	<2,9

Assim, no que concerne à urina é possível concluir que a precisão inter-dia do presente método apresenta semelhanças relativamente aos outros métodos previamente

validados. Relativamente à precisão intra-dia, os valores também são semelhantes, contudo o presente método revela alguns valores ligeiramente mais elevados, principalmente em relação aos métodos de LC/MS. Esta diferença pode dever-se, entre outros fatores, ao facto de nos métodos de LC/MS não usarem derivatização, o que implica menos variabilidade no processo, e conseqüentemente maior precisão. Estes resultados encontram-se resumidos na tabela 22.

Na literatura não existem resultados que permitam elaborar uma discussão sobre a precisão inter-dia e intra-dia destas duas substâncias no meio de cultura.

4.2.6 Eficiência da extração

As recuperações para a BZP e TFMPP, nas três concentrações testadas, em todas as matrizes encontram-se descritas na tabela 23.

No plasma foram obtidas extrações com eficiências entre 79% e 96%, na urina entre 90% e 108%, e no meio de cultura entre 76% e 101%.

Os limites para este parâmetro são de $100 \pm 20\%$, o que está de acordo com todos os resultados obtidos, exceto na concentração mais alta ($10\mu\text{g/mL}$) da BZP no meio de cultura, cuja eficiência da extração foi de 76%.

Tabela 23 - Resultados da eficiência da extração para a BZP e TFMPP em plasma, urina e meio de cultura ($n \geq 5$).

Matriz	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Eficiência da extração (%)	
		BZP	TFMPP
Plasma	0,016	95	85
	0,4	84	79
	10	96	89
Urina	0,016	101	108
	0,4	97	93
	10	90	102
Meio de cultura	0,625	91	99
	2,5	81	101
	10	76	85

Quanto às amostras de plasma, a recuperação da BZP obtida por Peters e colaboradores (2003) foi de 98% ($0,025\mu\text{g/mL}$) e 93% ($0,9\mu\text{g/mL}$), e a recuperação da TFMPP foi de 96% ($0,025\mu\text{g/mL}$) e 92% ($0,9\mu\text{g/mL}$) (Peters et al. 2003). Apesar das concentrações estudadas nesse estudo e no presente método não serem as mesmas, o método validado por Peters e colaboradores, apresenta melhor taxa de recuperação para

a BZP e para a TFMPP. É importante referir, que apesar dos solventes serem os mesmos, o tipo de colunas utilizado na extração do método desse estudo (HXC) não é o mesmo utilizado no presente trabalho (MCX), o que poderá ser uma eventual explicação para estes resultados.

No método de LC/MS para a quantificação de BZP e TFMPP em plasma, validado por Antia e colaboradores (2010), no que diz respeito ao parâmetro da recuperação esta foi investigada pela comparação de amostras preparadas em tampão (0,005; 0,01; 0,02 e 0,05µg/mL) com amostras de plasma sujeitas apenas a precipitação de proteínas. Os resultados obtidos por ordem crescente de concentrações para a BZP foram de 94,61%, 92,50%, 99,82% e 91,51%, e para a TFMPP foram de 90,36%, 79,54%, 96,56% e 94,99%. Os valores obtidos nesse estudo são comparáveis aos obtidos no presente trabalho.

No que diz respeito à validação em plasma realizada por Wada e colaboradores (2012), os resultados relativos à eficiência da extração da BZP (37,9% - 0,05µg/mL) e da TFMPP (49,8% - 1µg/mL) foram muito mais baixos do que os obtidos no presente método (Wada et al. 2012).

Relativamente às amostras de urina, a eficiência da extração da BZP obtida por Kankaanpää e colaboradores (2004) foi de 88% (0,5µg/mL), e comparando este valor com o obtido no presente método 97% (0,4µg/mL) é possível verificar que a eficiência extrativa do presente método é superior (Kankaanpää et al. 2004). O método validado por Tsutsumi e colaboradores (2005) apresenta valores de recuperação para a BZP de 100% (10µg/mL) e 81% (1µg/mL), e de 113% (10µg/mL) e 62% (1µg/mL) para a TFMPP. Assim, verifica-se que relativamente à concentração de 10µg/mL a recuperação de ambos os compostos é melhor nesse estudo possivelmente devido ao facto de se utilizar uma extração líquido-líquido antes da SPE, o que não se verifica para as concentrações mais baixas, sendo as recuperações do presente estudo melhores relativamente ao estudo de Tsutsumi e colaboradores (Tsutsumi et al. 2005). O trabalho realizado por Vorce e colaboradores (2008) apresenta resultados muito semelhantes aos obtidos no presente trabalho, sendo que a recuperação para a BZP foi de 97,8% e de 101,4% para a TFMPP (Vorce et al. 2008). No entanto, é preciso referir que esse estudo apenas apresenta a recuperação relativa a uma gama de concentrações (0,10-5µg/mL) e não relativamente a uma concentração específica. Além disso, o tipo de extração também é diferente, uma vez que a extração utilizada nesse estudo foi a extração líquido-líquido.

De um modo geral, a eficiência extrativa do presente método em plasma e urina para a BZP e para a TFMPP apresenta valores muito semelhantes ou superiores aos existentes na literatura. Relativamente ao meio de cultura, não existem resultados na literatura.

4.2.7 Avaliação de interferências e especificidade

Várias amostras branco de cada matriz foram preparadas e injetadas para avaliar as interferências cromatográficas. Nas três matrizes estudadas, não foram detetados picos interferentes nos tempos de retenção dos analitos nem dos padrões internos.

Estes resultados estão de acordo com os descritos na literatura, uma vez que para o plasma e para a urina, nenhuma validação de método para as duas substâncias apresenta interferências (Antia et al. 2010; Kankaanpää et al. 2004; Peters et al. 2003; Vorce et al. 2008). Relativamente ao meio de cultura não é possível efetuar qualquer comparação.

4.3 Prova de aplicabilidade: estudo das interações metabólicas entre a BZP e a TFMPP em hepatócitos primários de rato

A validação deste método analítico para a quantificação simultânea de BZP e TFMPP em meio de cultura celular permitiu a sua aplicação para a investigação de eventuais interações metabólicas entre as duas substâncias, através da análise de amostras provenientes de um estudo *in vitro* realizado com hepatócitos primários de rato previamente realizado no laboratório de Toxicologia da FFUP (da Silva 2014). Nesse estudo *in vitro*, procedeu-se à incubação das células hepáticas com a BZP e com a TFMPP isoladamente e em mistura. Foram comparados os efeitos citotóxicos e verificou-se, para algumas das condições experimentais testadas, que os resultados poderiam eventualmente ser explicados por uma interação metabólica entre as drogas, isto é, quando incubadas em simultâneo a extensão do metabolismo poderia ser diferente quando comparado à exposição isolada à mesma concentração e desta forma modificar o efeito citotóxico observado (da Silva 2014). Deste modo, escolheram-se sobrenadantes provenientes das referidas incubações para diferentes concentrações de BZP e TFMPP e que apresentavam diferentes níveis de citotoxicidade. Foram estudadas três misturas diferentes (A, B e C) que foram preparadas combinando as drogas em razões proporcionais ao respetivo efeito citotóxico (na mistura A foram combinadas numa razão proporcional ao EC50, isto é, 50% do efeito de mortalidade celular; na mistura B foram combinadas numa razão proporcional ao EC01, isto é, 1% do efeito de mortalidade celular, o que corresponde à ausência de citotoxicidade; e na mistura C foram combinadas na razão correspondente à mistura mais frequentemente consumida em cenários reais de abuso, adotando-se uma proporção de BZP:TFMPP 2:1). Os hepatócitos foram então incubados com diferentes concentrações destas três misturas que produziram diferentes níveis de citotoxicidade. Em paralelo, as substâncias foram incubadas isoladamente em concentrações iguais ou muito próximas às que

apresentavam na mistura. Nos sobrenadantes dessas incubações procedemos à quantificação da BZP e TFMPP para investigar se os níveis de composto-pai seriam diferentes após metabolização da substância isoladamente ou em mistura, o que demonstraria a interação metabólica suspeitada. Os resultados encontram-se representados na figura 16.

Após análise dos dados, verificou-se que os resultados obtidos com as concentrações mais elevadas de mistura B (que produziram 80% de mortalidade celular; EC80) não estavam de acordo com os resultados obtidos para as restantes concentrações. Este facto poderá ser atribuído ao elevado nível de citotoxicidade que poderá comprometer significativamente a capacidade metabólica dos hepatócitos. Por este motivo, estes resultados e as discrepâncias observadas não foram considerados relevantes.

Relativamente à BZP na mistura A (para as concentrações que produziram 10% e 60% de mortalidade; EC10 e EC60) não se verificaram diferenças entre as concentrações detetadas após incubação com a substância individualmente e em mistura, ou seja, não existem alterações significativas na concentração do composto-pai o que não indicia haver alteração no metabolismo. Estes resultados estão de acordo com dois estudos realizados com voluntários humanos por Antia e colaboradores (Antia et al. 2009a; Antia et al. 2009b). Comparando o primeiro estudo em que foi administrada, por via oral, uma única dose de BZP (200mg) (Antia et al. 2009a), com o segundo estudo em que foi coadministrada, também por via oral, uma única dose de BZP (100mg) e de TFMPP (30mg) (Antia et al. 2009b), não se verificaram alterações na farmacocinética da BZP resultantes da administração simultânea das duas drogas. Os mesmos resultados foram observados por Wada e colaboradores (2012) quando avaliaram o perfil plasmático de BZP em ratos Wistar, após a administração de uma única dose de BZP (2mg/kg) e TFMPP (2mg/kg) isoladamente e em mistura (2mg/kg de cada substância). Este estudo revelou que as concentrações plasmáticas de BZP após administração isolada foram semelhantes às concentrações plasmáticas da BZP em mistura (Wada et al. 2012).

No entanto, na mistura B (para as concentrações que causaram 15% de mortalidade celular; EC15) e na mistura C (EC10 e EC60), a quantidade de BZP detetada após incubação com a substância isoladamente foi significativamente maior que a quantidade de BZP detetada após incubação em mistura, o que indica que a mistura poderá, nestes casos, favorecer significativamente o metabolismo da BZP. Estes resultados não estão de acordo com os estudos anteriores já referidos, no entanto poderão explicar alguns desvios observados na resposta citotóxica observada (da Silva 2014).

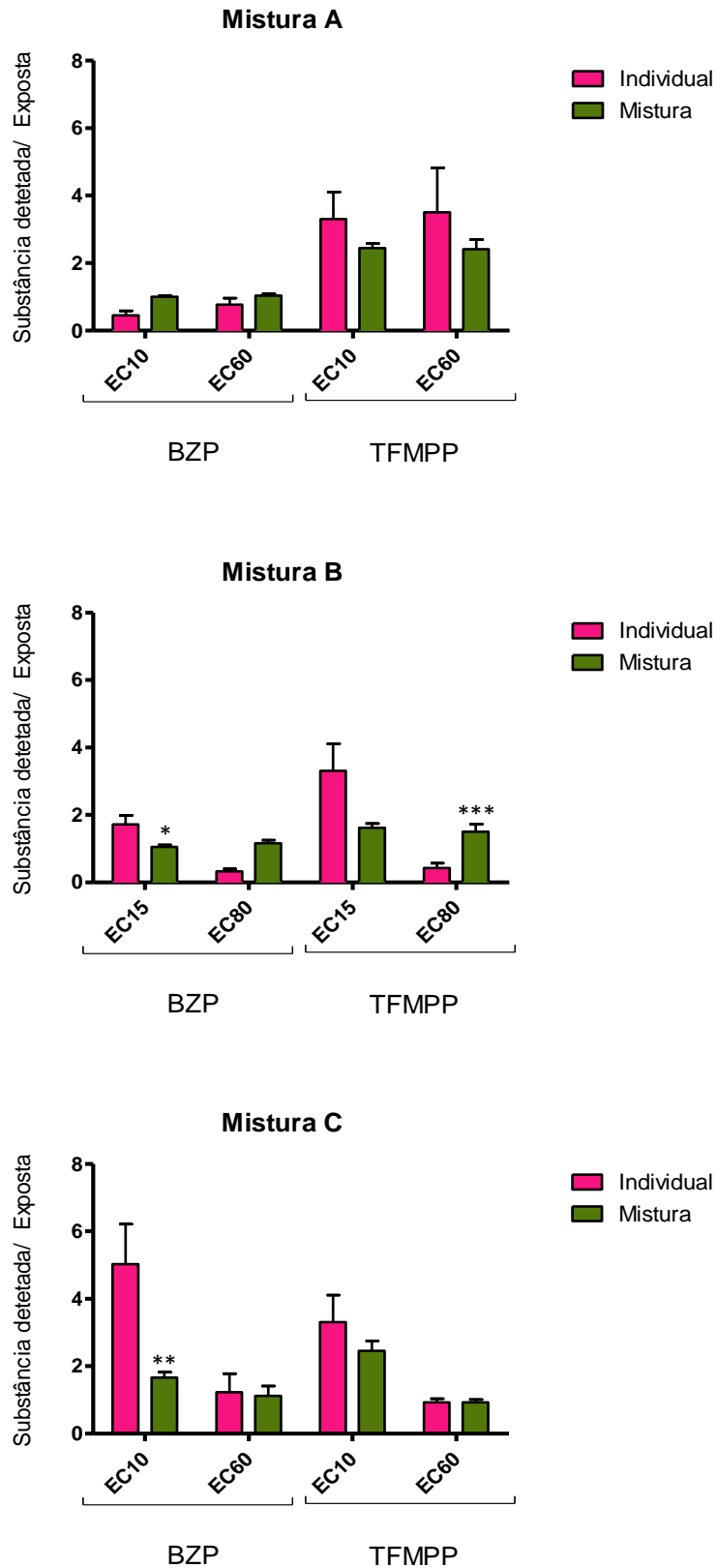


Figura 16 - Resultados do estudo das interações metabólicas entre a BZP e a TFMP em hepatócitos primários de rato para as concentrações selecionadas das misturas A, B e C. Dado que os resultados obtidos não evidenciaram uma distribuição normal, estes foram comparados através do teste Kruskal-Wallis usando o GraphPad Prism versão 6.04.

No que diz respeito à TFMPP, na mistura A (EC10 e EC60), na mistura B (EC15) e na mistura C (EC10 e EC60), a quantidade de TFMPP detetada após incubação individual foi sempre superior à quantidade detetada de TFMPP quando incubada em mistura, o que sugere que a mistura poderá favorecer a metabolização da TFMPP. No entanto, estes resultados não apresentaram significado estatístico, pelo que estas conclusões terão que ser confirmadas com experiências adicionais. De facto, estes resultados foram inesperados uma vez que contrariaram os obtidos no estudo já anteriormente referido de Wada e colaboradores, em que as concentrações plasmáticas de TFMPP após administração em mistura a ratos Wistar tenderam a ser superiores quando comparadas com a administração da TFMPP isoladamente, sugerindo um fenómeno de inibição metabólica (Wada et al. 2012). Também não estão de acordo os estudos realizados por Antia e colaboradores com voluntários humanos (Antia et al. 2009b; Antia et al. 2010). Comparando o primeiro estudo em que foi coadministrada por via oral uma única dose de BZP (100mg) e TFMPP (30mg) (Antia et al. 2009b), com o segundo estudo em que foi administrada uma dose de 60mg de TFMPP (Antia et al. 2010) verifica-se uma pequena alteração nos parâmetros farmacocinéticos da TFMPP, sendo que a concentração da TFMPP em mistura também se revelou mais elevada, sugerindo uma vez mais uma inibição do metabolismo e não o seu favorecimento.

Pelo contrário, o estudo *in vitro* realizado com hepatócitos primários de rato (da Silva 2014) sugere então que, apesar das enzimas de metabolização da BZP e da TFMPP serem as mesmas, não há sinais de competição metabólica. No entanto, com o método analítico que aplicamos apenas foi possível proceder à quantificação de composto-pai (BZP e TFMPP) e, não sendo possível detetar e quantificar metabolitos, as informações a retirar são necessariamente limitadas. Para averiguar corretamente se a extensão de metabolização da BZP e da TFMPP pode ser alterada em mistura seria então necessária a quantificação dos seus metabolitos, permitindo obter melhores conclusões.

Considerando que os resultados obtidos para as concentrações mais elevadas, com níveis de mortalidade celular muito elevados, foram discrepantes dos resultados obtidos para as restantes concentrações, seria então pertinente repetir este estudo *in vitro* de interações metabólicas utilizando condições experimentais de baixo nível de toxicidade e tentando quantificar simultaneamente as drogas e os seus principais metabolitos.

5 CONCLUSÃO

Este método de GC/MS foi desenvolvido, otimizado e validado com sucesso. O método demonstrou alta sensibilidade e desempenho adequado para a detecção e quantificação simultânea de BZP e TFMPP nas três matrizes estudadas (plasma, urina e meio de cultura), recorrendo apenas a um padrão interno em cada uma delas. Assim, este método provou ser uma alternativa otimizada aos métodos anteriormente publicados na literatura.

O método apresentou linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão adequados para uma utilização científica, clínica e forense. Além disso, o método revelou baixas interferências e eficiência extrativa bastante aceitável.

Os padrões internos selecionados revelaram-se adequados e são relativamente fáceis de obter, o que evita o recurso à síntese ou aquisição de padrões deuterados.

Utilizando um padrão interno disponível comercialmente o método demonstrou ter alta sensibilidade e linearidade para uma gama ampla de concentrações. Este facto é especialmente importante para as aplicações clínicas e/ou forenses do método.

A metodologia analítica desenvolvida tem aplicação direta não só para fins de investigação, mas também para o controlo do abuso de drogas em humanos.

O método foi aplicado com sucesso, sendo que os resultados obtidos no estudo das interações metabólicas entre a BZP e a TFMPP em hepatócitos de rato, permitiu concluir que apesar das enzimas de metabolização da BZP e da TFMPP serem as mesmas, não há sinais de competição metabólica, pelo contrário, a mistura parece favorecer o metabolismo de ambas as substâncias, sendo este favorecimento significativo no caso da BZP. No entanto, a confirmação destes resultados preliminares carece ainda de uma investigação experimental mais profunda.

6 REFERÊNCIAS

- Antia U, Lee H, Kydd R, Tingle M, Russell B (2009a) Pharmacokinetics of 'party pill' drug N-benzylpiperazine (BZP) in healthy human participants. *Forensic science international* 186(1):63-67
- Antia U, Tingle MD, Russell BR (2009b) In vivo interactions between BZP and TFMPP (party pill drugs). *The New Zealand medical journal* 122(1303):29-38
- Antia U, Tingle MD, Russell BR (2009c) Metabolic interactions with piperazine-based 'party pill' drugs. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 61(7):877-82
- Antia U, Tingle MD, Russell BR (2010) 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 pharmacokinetic study of TFMPP in Humans. *Journal of forensic sciences* 55(5):1311-1318
- Arbo M, Bastos M, Carmo H (2012) Piperazine compounds as drugs of abuse. *Drug and alcohol dependence* 122(3):174-185
- Auerbach S, Rutter J, Juliano P (1991) Substituted piperazine and indole compounds increase extracellular serotonin in rat diencephalon as determined by in vivo microdialysis. *Neuropharmacology* 30(4):307-311
- Auerbach SB, Kamalakannan N, Rutter JJ (1990) TFMPP and RU24969 enhance serotonin release rat hippocampus. *European journal of pharmacology* 190(1):51-57
- Austin H, Monasterio E (2004) Acute psychosis following ingestion of 'Rapture'. *Australasian Psychiatry* 12(4):406-408
- Badoud F, Grata E, Perrenoud L, Saugy M, Rudaz S, Veuthey J-L (2010) Fast analysis of doping agents in urine by ultra-high-pressure liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry. II: Confirmatory analysis. *Journal of Chromatography A* 1217(25):4109-4119
- Balsa C, Vital C, Urbano C (2014) *Inquérito Nacional ao Consumo de Substâncias Psicoativas na População Geral: Portugal 2012*.
- Barroso M, Costa S, Dias M, Vieira D, Queiroz J, López-Rivadulla M (2010) Analysis of phenylpiperazine-like stimulants in human hair as trimethylsilyl derivatives by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217(40):6274-6280
- Bassindale T, Berezowski R (2011) Quantitative analysis of hair samples for 1-benzylpiperazine (BZP) using high-performance liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry (LC-MS/MS) detection. *Analytical and bioanalytical chemistry* 401(6):2013-2017

- Baumann MH, Clark RD, Budzynski AG, Partilla JS, Blough BE, Rothman RB (2004) Effects of "Legal X" piperazine analogs on dopamine and serotonin release in rat brain. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1025:189-97
- Baumann MH, Clark RD, Budzynski AG, Partilla JS, Blough BE, Rothman RB (2005) N-substituted piperazines abused by humans mimic the molecular mechanism of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, or 'Ecstasy'). *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 30(3):550-60
- Beckett NM, Cresswell SL, Grice DI, Carter JF (2015) Isotopic profiling of seized benzylpiperazine and trifluoromethylphenylpiperazine tablets using $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ stable isotopes. *Science & Justice* 55(1):51-56
- Bell C, George C, Kicman AT, Traynor A (2011) Development of a rapid LC-MS/MS method for direct urinalysis of designer drugs. *Drug testing and analysis* 3(7-8):496-504
- Berney-Meyer L, Putt T, Schollum J, Walker R (2012) Nephrotoxicity of recreational party drugs. *Nephrology* 17(2):99-103
- Bishop SC, McCord BR, Gratz SR, Loeliger JR, Witkowski MR (2005) Simultaneous separation of different types of amphetamine and piperazine designer drugs by capillary electrophoresis with a chiral selector. *Journal of forensic sciences* 50(2):326-35
- Brennan KA, Lake B, Hely LS, et al. (2007) N-benzylpiperazine has characteristics of a drug of abuse. *Behavioural pharmacology* 18(8):785-790
- Butler RA, Sheridan JL (2007) 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* 4(1):18
- Chamberlain J (1995) *The Analysis of Drugs in Biological Fluids* 2nd Edition. CRC press
- Chen C, Kostakis C, Irvine RJ, White JM (2013) Increases in use of novel synthetic stimulant are not directly linked to decreased use of 3, 4-methylenedioxy-N-methylamphetamine (MDMA). *Forensic science international* 231(1):278-283
- Cohen BM, Butler R (2011) BZP-party pills: a review of research on benzylpiperazine as a recreational drug. *International Journal of Drug Policy* 22(2):95-101
- Cunha SCdS (2007) *Segurança e Autenticidade de Azeitonas e Azeites Varietais*. Universidade do Porto
- Cunningham K, Appel J (1986) Possible 5-hydroxytryptamine₁ (5-HT₁) receptor involvement in the stimulus properties of 1-(m-trifluoromethylphenyl) piperazine (TFMPP). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 237(2):369-377

- da Silva MJLF (2014) Avaliação da influência do metabolismo na interação toxicológica entre duas piperazinas correntemente utilizadas como drogas de abuso, a Benzilpiperazina (BZP) e a 1-(3-trifluorometilfenil) piperazina (TFMPP). Universidade do Porto
- Davies S, Wood DM, Smith G, et al. (2010) Purchasing 'legal highs' on the Internet—is there consistency in what you get? *QJM: monthly journal of the Association of Physicians* 103(7):489-93
- de Boer D, Bosman IJ, Hidvégi E, et al. (2001) Piperazine-like compounds: a new group of designer drugs-of-abuse on the European market. *Forensic science international* 121(1):47-56
- Dickson AJ, Vorce SP, Holler JM, Lyons TP (2010) Detection of 1-benzylpiperazine, 1-(3-trifluoromethylphenyl)-piperazine, and 1-(3-chlorophenyl)-piperazine in 3, 4-methylenedioxymethamphetamine-positive urine samples. *Journal of analytical toxicology* 34(8):464-469
- Dowling G, Regan L (2011) A new mixed mode solid phase extraction strategy for opioids, cocaine, amphetamines and adulterants in human blood with hybrid liquid chromatography tandem mass spectrometry detection. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 54(5):1136-1145
- Elliott S, Smith C (2008) 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* 32(2):172-7
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2007) New drug under formal scrutiny. Council asks EMCDDA to assess risks of BZP. Disponível em: http://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att_27522_EN_BZPriskassessmantFINAL.pdf. Acedido em 20-07-2015
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2008) Council decision: 'Appropriate controls' for BZP. New drug BZP to be placed under control across the EU. Acedido em: http://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att_49695_EN_BZPDecision2008FinalEN.pdf. Acedido em 20-07-2015
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2009) Report on the risk assessment of BZP in the framework of the Council decision on new psychoactive substances, vol 8. Office for Official Publications of the European Communities
- Fantegrossi WE, Winger G, Woods J, Woolverton W, Coop A (2005) Reinforcing and discriminative stimulus effects of 1-benzylpiperazine and trifluoromethylphenylpiperazine in rhesus monkeys. *Drug and alcohol dependence* 77(2):161-168

- Flanagan RJ, Taylor AA, Watson ID, Whelpton R (2008) Fundamentals of analytical toxicology. John Wiley & Sons 95-8; 309-34
- Freye E (2010) Benzylpiperazine (BZP) as a Designer Drug Pharmacology and Abuse of Cocaine, Amphetamines, Ecstasy and Related Designer Drugs. Springer Netherlands 211-213
- Gee P, Jerram T, Bowie D (2010) Multiorgan failure from 1-benzylpiperazine ingestion—legal high or lethal high? *Clinical toxicology* 48(3):230-233
- Gee P, Richardson S, Woltersdorf W, Moore G (2005) Toxic effects of BZP-based herbal party pills in humans: a prospective study in Christchurch, New Zealand. *The New Zealand medical journal* 118(1227):U1784
- Government of Canada (2012) Regulations Amending the Food and Drug Regulations (Schedule to Part J — BZP and TFMPP). Disponível em: <http://gazette.gc.ca/rp-pr/p2/2012/2012-04-11/html/sor-dors65-eng.html#archived> Acedido em 14-07-2015
- Herndon J, Pierson M, Glennon RA (1992) Mechanistic investigation of the stimulus properties of 1-(3-trifluoromethylphenyl) piperazine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 43(3):739-748
- Inoue H, Iwata YT, Kanamori T, et al. (2004) Analysis of benzylpiperazine-like compounds. *日本鑑識科学技術学会誌* 9(2):165-184
- Jan RK, Lin JC, Lee H, et al. (2010) Determining the subjective effects of TFMPP in human males. *Psychopharmacology* 211(3):347-353
- Jancova P, Anzenbacher P, Anzenbacherova E (2010) Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomedical Papers* 154(2):103-116
- Johnson RD, Botch-Jones SR (2013) The stability of four designer drugs: MDPV, mephedrone, BZP and TFMPP in three biological matrices under various storage conditions. *Journal of analytical toxicology* 37(2):51-55
- Kankaanpää A, Gunnar T, Ariniemi K, Lillsunde P, Mykkänen S, Seppälä T (2004) Single-step procedure for gas chromatography–mass spectrometry screening and quantitative determination of amphetamine-type stimulants and related drugs in blood, serum, oral fluid and urine samples. *Journal of Chromatography B* 810(1):57-68
- Kerr J, Davis L (2011) Benzylpiperazine in New Zealand: brief history and current implications. *Journal of the Royal Society of New Zealand* 41(1):155-164
- King KA, Holtman JR, Jr. (1990) Characterization of the effects of activation of ventral medullary serotonin receptor subtypes on cardiovascular activity and respiratory motor outflow to the diaphragm and larynx. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 252(2):665-74

- Lin JC, Jan RK, Kydd RR, Russell BR (2011) Subjective effects in humans following administration of party pill drugs BZP and TFMPP alone and in combination. *Drug testing and analysis* 3(9):582-585
- Maciów-Głąb M, Rojek S, Kula K, Kłys M (2013) " New designer drugs" in aspects of forensic toxicology. *Archiwum medycyny sądowej i kryminologii* 64(1):20-33
- Magyar K, Fekete MI, Tekes K, Török TL (1986) The action of trelibet, a new antidepressive agent on [3 H] noradrenaline release from rabbit pulmonary artery. *European journal of pharmacology* 130(3):219-227
- Maurer HH, Bickeboeller-Friedrich J, Kraemer T (2000) Gas chromatographic–mass spectrometric procedures for determination of the catechol-O-methyltransferase (COMT) activity and for detection of unstable catecholic metabolites in human and rat liver preparations after COMT catalyzed in statu nascendi derivatization using S-adenosylmethionine. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 739(2):325-335
- Maurer HH, Kraemer T, Springer D, Staack RF (2004) Chemistry, pharmacology, toxicology, and hepatic metabolism of designer drugs of the amphetamine (ecstasy), piperazine, and pyrrolidinophenone types: a synopsis. *Therapeutic drug monitoring* 26(2):127-131
- Monteiro MS (2012) Development and validation of a gas chromatography/mass spectrometry method for simultaneous quantification of benzylpiperazine and its metabolites: Application to a pilot toxicokinetic study in mice. Universidade do Porto
- Monteiro MS, de Lourdes Bastos M, De Pinho PG, Carvalho M (2013) Update on 1-benzylpiperazine (BZP) party pills. *Archives of toxicology* 87(6):929-947
- Montesano C, Sergi M, Moro M, et al. (2013) Screening of methylenedioxyamphetamine-and piperazine-derived designer drugs in urine by LC–MS/MS using neutral loss and precursor ion scan. *Journal of Mass Spectrometry* 48(1):49-59
- Moreno I, Da Fonseca B, Barroso M, Costa S, Queiroz J, Gallardo E (2012) Determination of piperazine-type stimulants in human urine by means of microextraction in packed sorbent and high performance liquid chromatography-diode array detection. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 61:93-99
- Mustata C, Torrens M, Pardo R, Perez C, Psychonaut Web Mapping G, Farre M (2009) [Spice drugs: cannabinoids as a new designer drugs]. *Adicciones* 21(3):181-6
- Nikolova I, Danchev N (2008) Piperazine based substances of abuse: a new party pills on bulgarian drug market. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 22(2):652-655

- Peters FT, Martinez-Ramirez JA (2010) Analytical toxicology of emerging drugs of abuse. *Therapeutic drug monitoring* 32(5):532-539
- Peters FT, Schaefer S, Staack RF, Kraemer T, Maurer HH (2003) Screening for and validated quantification of amphetamines and of amphetamine-and piperazine-derived designer drugs in human blood plasma by gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry* 38(6):659-676
- Pettibone DJ, Williams M (1984) Serotonin-releasing effects of substituted piperazines in vitro. *Biochemical pharmacology* 33(9):1531-1535
- Polson C, Sarkar P, Incedon B, Raguvaran V, Grant R (2003) Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 785(2):263-275
- Robertson DW, Bloomquist W, Wong DT, Cohen ML (1992) mCPP but not TFMPP is an antagonist at cardiac 5HT₃ receptors. *Life sciences* 50(8):599-605
- Rodgers RJ, Cole JC, Cobain MR, et al. (1992) Anxiogenic-like effects of fluprazine and eltoprazine in the mouse elevated plus-maze: profile comparisons with 8-OH-DPAT, CGS 12066B, TFMPP and mCPP. *Behavioural pharmacology* 3(6):621-634
- Rust KY, Baumgartner MR, Dally AM, Kraemer T (2012) Prevalence of new psychoactive substances: A retrospective study in hair. *Drug testing and analysis* 4(6):402-408
- Schep LJ, Slaughter RJ, Vale JA, Beasley DM, Gee P (2011) The clinical toxicology of the designer "party pills" benzylpiperazine and trifluoromethylphenylpiperazine. *Clinical toxicology* 49(3):131-41
- Sheridan J, Butler R (2010) "They're legal so they're safe, right?" What did the legal status of BZP-party pills mean to young people in New Zealand? *International Journal of Drug Policy* 21(1):77-81
- Sheridan J, Sheridan J, Butler R, et al. (2007) Legal piperazine-containing party pills—a new trend in substance misuse. *Drug and alcohol review* 26(3):335-343
- Sigma-Aldrich (1997) Perfluoro Acid Anhydrides (Product Specification). Disponível em: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Aldrich/General_Information/tfaa.pdf Acedido em 10-08-2015
- Simmler LD, Rickli A, Schramm Y, Hoener MC, Liechti ME (2014) Pharmacological profiles of aminoindanes, piperazines, and pipradrol derivatives. *Biochemical pharmacology* 88(2):237-244
- Staack RF, Fritschi G, Maurer HH (2002) 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* 773(1):35-46

- Staack RF, Fritschi G, Maurer HH (2003) 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 : JMS* 38(9):971-81
- Staack RF, Maurer HH (2005) Metabolism of designer drugs of abuse. *Current drug metabolism* 6(3):259-74
- Staack RF, Paul LD, Schmid D, Roider G, Rolf B (2007) Proof of a 1-(3-chlorophenyl) piperazine (mCPP) intake—Use as adulterant of cocaine resulting in drug–drug interactions? *Journal of Chromatography B* 855(2):127-133
- Staack RF, Paul LD, Springer D, Kraemer T, Maurer HH (2004) Cytochrome P450 dependent metabolism of the new designer drug 1-(3-trifluoromethylphenyl) piperazine (TFMPP): In vivo studies in Wistar and Dark Agouti rats as well as in vitro studies in human liver microsomes. *Biochemical pharmacology* 67(2):235-244
- Szücs Z, Szentendrei T, Fekete M (1986) The effect of EGYT-475 (Trelibet) and its metabolites on the potassium-stimulated 3H-noradrenaline release from cortical slices of rat brain. *Polish journal of pharmacology and pharmacy* 39(2):185-193
- Takahashi M, Nagashima M, Suzuki J, Seto T, Yasuda I, Yoshida T (2009) Creation and application of psychoactive designer drugs data library using liquid chromatography with photodiode array spectrophotometry detector and gas chromatography–mass spectrometry. *Talanta* 77(4):1245-1272
- Tekes K, Tóthfalusi L, Malomvölgyi B, Herman F, Magyar K (1986) Studies on the biochemical mode of action of EGYT-475, a new antidepressant. *Polish journal of pharmacology and pharmacy* 39(2):203-211
- Thompson I, Williams G, Aldington S, et al. (2006) Report for the Ministry of Health: the benzylpiperazine (BZP)/trifluoromethylphenylpiperazine (TFMPP) and alcohol safety study. Wellington, New Zealand
- Thompson I, Williams G, Caldwell B, et al. (2010) Randomised double-blind, placebo-controlled trial of the effects of the 'party pills' BZP/TFMPP alone and in combination with alcohol. *Journal of psychopharmacology* 24(9):1299-308
- Tsutsumi H, Katagi M, Miki A, et al. (2006) Metabolism and the urinary excretion profile of the recently scheduled designer drug N-benzylpiperazine (BZP) in the rat. *Journal of analytical toxicology* 30(1):38-43
- Tsutsumi H, Katagi M, Miki A, et al. (2005) 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* 819(2):315-322
- Vorce SP, Holler JM, Levine B, Past MR (2008) Detection of 1-benzylpiperazine and 1-(3-trifluoromethylphenyl)-piperazine in urine analysis specimens using GC-MS and LC-ESI-MS. *Journal of analytical toxicology* 32(6):444-50
- Wada M, Yamahara K, Ikeda R, Kikura-Hanajiri R, Kuroda N, Nakashima K (2012) Simultaneous determination of N-benzylpiperazine and 1-(3-trifluoromethylphenyl)piperazine in rat plasma by HPLC-fluorescence detection and its application to monitoring of these drugs. *Biomedical chromatography : BMC* 26(1):21-5
- Waite RJ, Barbante GJ, Barnett NW, Zammit EM, Francis PS (2013) Chemiluminescence detection of piperazine designer drugs and related compounds using tris (2, 2'-bipyridine) ruthenium (III). *Talanta* 116:1067-1072
- Wikström M, Holmgren P, Ahlner J (2004) A2 (N-benzylpiperazine) a new drug of abuse in Sweden. *Journal of analytical toxicology* 28(1):67-70
- Wilkins C (2006) Legal Party Pill Use in New Zealand: Prevalence of Use, Availability, Health Harms and 'gateway Effects' of Benzylpiperazine (BZP) and Trifluoromethylphenylpiperazine (TFMPP). Centre for Social and Health Outcomes Research and Evaluation & Te Rōpu Whāriki
- Wilkins C, Sweetsur P, Girling M (2008) Patterns of benzylpiperazine/trifluoromethylphenylpiperazine party pill use and adverse effects in a population sample in New Zealand. *Drug Alcohol Rev* 27(6):633-9
- Winstock AR, Ramsey JD (2010) Legal highs and the challenges for policy makers. *Addiction* 105(10):1685-7
- Wohlfarth A, Weinmann W, Dresen S (2010) LC-MS/MS screening method for designer amphetamines, tryptamines, and piperazines in serum. *Analytical and bioanalytical chemistry* 396(7):2403-2414
- Wood DM, Button J, Lidder S, Ramsey J, Holt DW, Dargan PI (2008) Dissociative and sympathomimetic toxicity associated with recreational use of 1-(3-trifluoromethylphenyl) piperazine (TFMPP) and 1-benzylpiperazine (BZP). *Journal of medical toxicology : official journal of the American College of Medical Toxicology* 4(4):254-7
- World Anti-Doping Agency (2007) The World Anti-Doping Code - The 2007 Prohibited List International Standard. Disponível em: https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/WADA_Prohibited_List_2007_EN.pdf
Acedido em 20-07-2015

- World Health Organization (2012) WHO Expert Committee on Drug Dependence: thirty-fifth report. World Health Organization
- Yeap C, Bian C, Abdullah A (2010) A review on benzylpiperazine and trifluoromethylphenylpiperazine: origins, effects, prevalence and legal status. *Health Environ J* 1(2):38-50
- Young SA, Thrimawithana TR, Antia U, et al. (2013) Pharmaceutical quality of “party pills” raises additional safety concerns in the use of illicit recreational drugs. *NZMJDiGeST*:19
- Zawilska JB (2011) "Legal highs" - new players in the old drama. *Current drug abuse reviews* 4(2):122-30