

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO
ALEGRE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Gabriela Ramos Borges

**Desenvolvimento de um novo método
bioanalítico para a determinação de drogas
de abuso em fluido oral utilizando *Dried
Oral Fluid Spot* associado à placa de 24-
poços por LC-MS/MS**

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre
2022

Gabriela Ramos Borges

**Desenvolvimento de um novo método
bioanalítico para a determinação de drogas
de abuso em fluido oral utilizando *Dried
Oral Fluid Spot* associado à placa de 24-
poços por LC-MS/MS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Franco de Oliveira

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Sarah Eller Franco de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Josias de Oliveira Merib

Porto Alegre
2022

Catálogo na Publicação

Borges, Gabriela Ramos

Desenvolvimento de um novo método bioanalítico para a determinação de drogas de abuso em fluido oral utilizando Dried Oral Fluid Spot associado à placa de 24-poços por LC-MS/MS / Gabriela Ramos Borges. -- 2022.

99 p. : il., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2022.

Orientador(a): Prof. Dr. Tiago Franco de Oliveira ;
coorientador(a): Prof^a. Dr^a. Sarah Eller Franco de Oliveira, Prof. Dr. Josias de Oliveira Merib.

1. substâncias estimulantes. 2. fluido oral. 3. dried oral fluid spot. 4. LC-MS/MS. 5. análises confirmatórias.
I. Título.

AGRADECIMENTOS

À UFCSPA e ao Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde por proverem toda a estrutura e ensino qualificados, possibilitando a realização deste trabalho.

Ao Centro de Pesquisas em Álcool e Drogas (HCPA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela doação das amostras, enriquecendo o trabalho aqui desenvolvido.

Aos professores de toxicologia da UFCSPA que acompanham minha trajetória desde a graduação, em especial aos professores Tiago Franco de Oliveira, Sarah Eller e Josias Merib.

Ao meu orientador, Tiago, agradeço imensamente por todo o aprendizado, e principalmente, por todas as oportunidades às quais vêm transformando minha trajetória acadêmica e profissional, desde aquela primeira aula lá em 2018. Muito obrigada pelo voto de confiança.

À coorientadora Sarah, por me guiar nesse universo que é a toxicologia analítica, sempre com zelo e compreensão. Agradeço ao coorientador Josias, por todos os ensinamentos e apoio.

Aos meus colegas, e grandes amigos, do grupo de pesquisa Espectrometria de Massas e da Central Analítica por todo o companheirismo. Em especial aos amigos Bruno, Giovanna, Camila, Carolina e Dora que acompanharam intensamente todo o processo e não me deixaram desanimar.

Especialmente, agradeço aos meus pais, Eloisa Ramos Borges e Marco Antônio Duarte Borges, por todo o apoio nos momentos difíceis, mas principalmente, por nunca me deixarem duvidar da importância que a educação exerce na trajetória das pessoas. Muito obrigada por esperançarem os meus sonhos. Agradeço também ao meu irmão Miguel Ramos Borges por cada palavra de incentivo e afeto.

Aos meus avós Selma Duarte Borges e Antônio Carlos da Silva Borges por estarem sempre comigo, torcendo com tanto carinho por cada conquista.

A todos os meus amigos e familiares, que de alguma forma estiveram ao meu lado.

Meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

O uso de substâncias psicoativas, em especial as drogas de abuso, representa um grave problema socioeconômico e de saúde pública. O consumo de drogas está associado ao aumento das ocorrências de patologias e injúrias, incluindo manifestações neuropsiquiátricas e overdoses. Nesse contexto, o desenvolvimento de novas técnicas para a detecção de drogas de abuso em matrizes biológicas não convencionais, como o fluido oral, pode ser uma importante ferramenta para verificação do uso dessas substâncias. Este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um novo método bioanalítico utilizando *dried oral fluid spot* (DOFS) para a determinação de cocaína, benzoilecgonina, éster metil ecgonina, cocaetileno, hidroxicoína, anfetamina, metanfetamina, MDMA, MDA, MDEA, femproporex, fenciclidina e cetamina em fluido oral por cromatografia líquida e espectrometria de massas em tandem. As amostras de fluido oral foram coletadas por expectoração e diluídas na proporção 1:1 (v:v) em água ultrapura. Os parâmetros críticos para a eficiência do DOFS foram avaliados por análises univariadas e multivariadas e as melhores condições foram escolhidas. Assim, uma alíquota de 100 µL de amostra foi pipetada no papel filtro, alocada em uma placa de 24-poços, seca durante 60 min, e os analitos foram extraídos com 250 µL do solvente extrator (acetonitrila e metanol; 1:3; v:v). A extração completa foi realizada em placas de 24-poços, possibilitando a análise de várias amostras simultaneamente. O método foi validado de acordo com recomendações internacionais (ANSI/ASB Standard 036) e em seguida a metodologia desenvolvida foi aplicada em 86 amostras de fluido oral. As curvas de calibração foram construídas na faixa de 1 – 100 ng/mL e os coeficientes de determinação (r^2) foram superiores a 0,99 para todos os analitos; os valores de limite de quantificação obtidos variaram de 1 a 5 ng/mL; Precisão intra-corridas foi de 3,05 a 13,01%; Precisão entre-corridas foi de 1,97 a 8,13%. O estudo de supressão/ganho de ionização indicou uma variação de -16,20 a 16,60%. Um total de 86% amostras positivas foi encontrado, sendo majoritariamente COC, BE, EME o que aponta para a aplicabilidade da metodologia proposta. Adicionalmente, os resultados obtidos podem colaborar para o fortalecimento de ações de toxicovigilância, minimizando as subnotificações associadas ao consumo destas substâncias.

Keywords: Fluido oral, Substâncias estimulantes, análises confirmatórias, Dried oral fluid spot, LC–MS/MS.

ABSTRACT

The use of psychoactive substances, especially drugs of abuse, represents a serious socioeconomic and health problem. Drug use is associated with an increase in the occurrence of pathologies and injuries, including neuropsychiatric manifestations and overdoses. In this context, the development of new techniques for the detection of drugs of abuse in unconventional biological matrices, such as oral fluid, can be an important tool to verify the use of these substances. This work aimed to develop and validate a new bioanalytical method using dried oral fluid spot (DOFS) for the determination of cocaine, benzoylecgonine, ecgonine methyl ester, cocaethylene, hydroxycocaine, amphetamine, methamphetamine, MDMA, MDA, MDEA, fenproporex, phencyclidine, and ketamine in oral fluid by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. Oral fluid samples were collected by expectoration and diluted 1:1 in ultrapure water. Critical parameters for DOFS efficiency were evaluated by univariate and multivariate analyses and the best conditions were chosen. Thus, an aliquot of 100 μ L of sample was pipetted onto filter paper, placed in a 24-well plate, dried for 60 min, and the analytes were extracted with 250 μ L of extracting solvent (acetonitrile and methanol; 1:3; v:v). The complete extraction was performed in 24-well plates, allowing the analysis of several samples simultaneously. The method was validated according to international recommendations (ANSI/ASB Standard 036) and then the developed methodology was applied to 86 real samples of oral fluid. The calibration curves were constructed in a range of 1 – 100 ng/mL and the coefficients of determination (r^2) were higher than 0.99 for all analytes; the limit of quantification values obtained ranged from 1 to 5 ng/mL; Within-run precision was from 3.05 to 13.01%; Between-run precision was from 1.97 to 8.13%; Bias ranged between -19.7 and 9.6%; Ionization suppression/enhancement study indicated a variation from -16.20 to 16.60%; A total of 86% positive samples were found, with the majority being detected COC, BE, EME, which points to the applicability of the proposed methodology. Additionally, the results obtained can contribute to the strengthening of drug surveillance actions, minimizing underreporting associated with the consumption of these substances.

Keywords: Oral fluid; Stimulant substances; Confirmatory tests; Dried oral fluid spot; LC-MS/MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de ação da cocaína, atuando na inibição pré-sináptica dos transportadores de noradrenalina (NAT), dopamina (DAT) e serotonina (SERT).....	14
Figura 2 - Representação toxicocinética do mecanismo de biotransformação da cocaína.....	16
Figura 3 - Estrutura química de substâncias pertencentes à classe dos estimulantes tipo anfetaminas (ATS).....	17
Figura 4 - Representação da biotransformação de metanfetamina, femproporex e dietilpropiona, gerando anfetamina.....	19
Figura 5 - Representação dos produtos formados em função da biotransformação do MDMA.....	20
Figura 6 – Estruturas químicas das substâncias fenciclidina e cetamina.....	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características físico-químicas das drogas de abuso abordadas neste trabalho..... 24

Tabela 2 – Revisão da literatura: metodologias desenvolvidas para análises quantitativas de drogas de abuso, estimulantes e alucinógenos, em fluido oral..... 30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-AM	Acetilmorfina
AEC	Anhidroecgonina
AEME	Metilecgonidina
AMP	Anfetamina (do inglês: <i>Amphetamine</i>)
APCI	Ionização química por pressão atmosférica (do inglês: <i>atmospheric pressure chemical ionization</i>)
ATS	Estimulantes tipo anfetaminas (do inglês: <i>Amphetamine tipe stimulants</i>)
BE	Benzoilecgonina
CE	Cocaetileno
COC	Cocaína
COC-OH	Hidroxicocaína (COC-OH)
COMT	O-metiltransferase
c-PPC	cis-1-(1-fenil-4-hidroxi- ciclohexil)piperidina
CYP	Citocromo P-450
DBS	<i>Dried Blood Spot</i>
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva (do inglês: <i>dispersive liquid-liquid microextraction</i>)
DOFS	<i>Dried Oral Fluid Spot</i>
DUID	Direção Sob a Influência de Drogas (do inglês, <i>Driving Under the Influence of Drugs</i>)
EC	Ecgonina
EEE	Éster etil ecgonina
EMCDDA	Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência (do inglês: <i>European Monitoring Center for Drugs and Drug Addiction</i>)
EME	Éster metil ecgonina
ESI	Ionização por eletrospray (do inglês: <i>Eletrospray Ionization</i>)
FEMP	Femproporex

GC	Cromatografia gasoso (do inglês: <i>gas chromatography</i>)
HHA	Hidroxianfetamina
HHMA	Hidroximetanfetamina
HMA	Hidroximetoxianfetamina
HMMA	Hidroximetoximetanfetamina
IHME	Instituto de Métricas e Avaliação em Saúde (do inglês: <i>Institute for Health Metrics and Evaluation</i>)
III LENAD	III Levantamento Nacional de Álcool e Drogas
KET	Cetamina
LC	Cromatografia líquida (do inglês: <i>liquid chromatography</i>)
LLE	Extração líquido-líquido (do inglês: <i>liquid-liquid extection</i>)
LLOQ	Menor limite de quantificação (do inglês: <i>lower limit of quantification</i>)
LOQ	Limite de quantificação (do inglês: <i>limit of quantification</i>)
MAO	Monoamina oxidase
MDA	3,4-metilenedioxiamfetamina
MDA	3,4-metilenodioxianfetamina
MDEA	3,4-metilenodioxietilamfetamina
MDMA	3,4-metilenodioximetanfetamina
MDMA	3,4-metilenodioximetanfetamina
MEPS	Microextração por sorbente empacotado (o inglês: <i>Microextraction by Packet Sorbent</i>)
MET	Metanfetamina
MRM	Monitoramento de reações múltiplas (MRM, do inglês; <i>multiple reaction monitoring</i>)
MS	Espectrometria de massas (do inglês: <i>mass spectrometry</i>)
MS/MS	Eespectrometria de massas em <i>tandem</i> (do inglês: <i>mass spectrometry tandem</i>)
NCOC	Norcocaína
NMDA	N-metil-D-aspartato

NPS	Nova Substância Psicoativa (do inglês: <i>New Psychoactive Substances</i>)
PCHP	1-(1-fenciclohexil) -4-hidroxipiperidina
PCP	Fenciclidina
PCP	Fenciclidina (do inglês: <i>phencyclidine</i>)
SAMHSA	<i>Substance Abuse and Mental Health Services Administration</i>
SPE	Extração em fase sólida (do inglês: <i>solid phase extraction</i>)
SPME	Extração em fase sólida (do inglês: <i>Solid Phase Microextraction</i>)
TDAH	Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade
THC	Δ^9 -Tetrahydrocanabinol
t-PPC	trans-1-(1-fenil-4-hidroxi- ciclohexil)piperidina
UNODC	Escritório das Nações Unidas Sobre Drogas e Crimes (do inglês: <i>United Nations Office on Drugs and Crimes</i>)

SUMÁRIO

1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
1.1 DROGAS DE ABUSO: COCAÍNICOS, ANFETAMÍNICOS, CETAMINA E FENCICLIDINA	13
1.2 ANÁLISES TOXICOLÓGICAS: FLUIDO ORAL.....	22
1.3 <i>DRIED ORAL FLUID SPOT</i>	26
2 OBJETIVOS	37
2.1 OBJETIVO GERAL	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
3 REFERÊNCIAS.....	38
4 MANUSCRITO	46
5 CONCLUSÃO	84
6 ANEXOS	85
6.1 ANEXO I – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	85
6.2 ANEXO II – NORMAS PARA SUBMISSÃO DE TRABALHOS NA REVISTA CIENTÍFICA <i>FORENSIC TOXICOLOGY</i>	90
6.3 ANEXO III – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO NA REVISTA CIENTÍFICA <i>FORENSIC TOXICOLOGY</i>	97

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 DROGAS DE ABUSO: COCAÍNA E PRODUTOS RELACIONADOS, ANFETAMÍNICOS, CETAMINA E FENCICLIDINA

O uso de substâncias psicoativas, em especial as drogas de abuso, representam um grave problema socioeconômico e de saúde pública (THOMAIDIS *et al.*, 2022). O consumo de drogas está associado a modulação de parâmetros de saúde pública, contribuindo para mudanças nos padrões de morbidade e mortalidade. Um levantamento realizado pelo Instituto de Métricas e Avaliação em Saúde (IHME, do inglês: *Institute for Health Metrics and Evaluation*) estima que em 2019, foram relatadas 494 mil mortes relacionadas direta ou indiretamente ao uso de drogas, indicando um considerável aumento (17,5%) na última década (IHME, 2020). Dados apresentados no Relatório Mundial sobre Drogas 2021, indicam que 275 milhões de pessoas utilizaram drogas ilícitas em 2019, representando um aumento global de 22% entre 2010 e 2019. A previsão para os próximos anos é que países menos desenvolvidos e com menor poder econômico sofram os maiores impactos com relação ao aumento de usuários, países subdesenvolvidos devem apresentar um crescimento de 10% no número de usuários de drogas, considerando o crescimento populacional (UNODC, 2021).

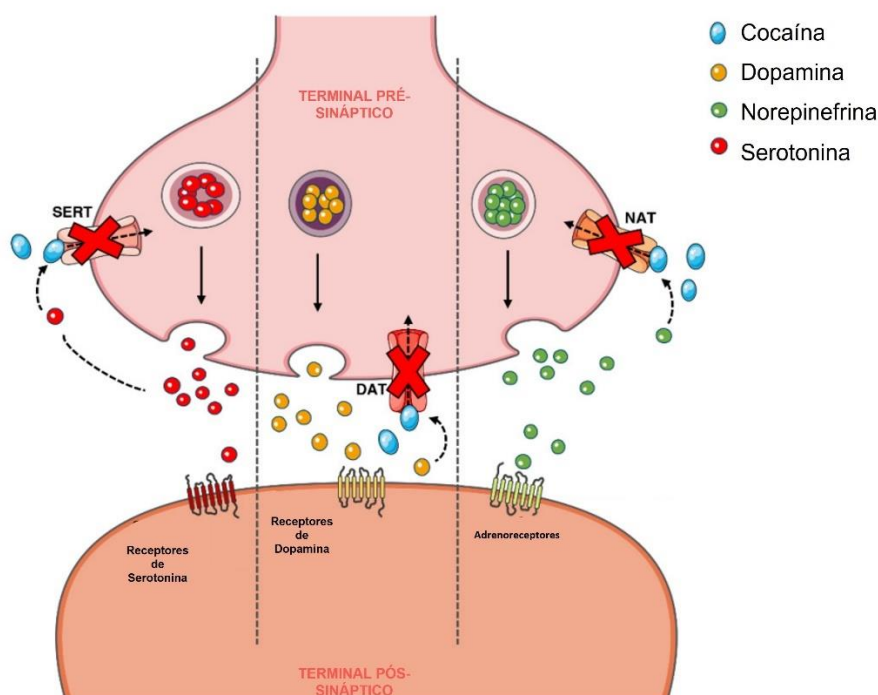
Dentre as diferentes substâncias psicoativas ilícitas disponíveis a cocaína assume um papel de destaque sendo uma das substâncias mais utilizadas na América Latina, atrás apenas da *cannabis* (UNODC, 2021). É considerada um composto estimulante, pertencente à classe dos alcaloides e originária da planta *Erythroxylon coca*. Na América do Sul, as folhas de coca são utilizadas para fins culturais e religiosos. No final do século 19, a cocaína foi isolada da planta e adicionada a formulações de produtos, aplicada na medicina, entre outras práticas. A cocaína teve seu uso proscrito no Brasil e em outros países após a descoberta de seu potencial efeito de indução a dependência e correlata tolerância aos usuários (GOLDSTEIN *et al.*, 2009; NIDA, 2020)

Segundo a UNODC (UNODC, do inglês: *United Nations Office on Drugs and Crimes*), em 2019, cerca de 20 milhões de pessoas utilizaram cocaína, contabilizando 0,4% da população adulta mundial (UNODC, 2021). Enquanto isso, estima-se que 4% da população brasileira já entrou em contato com essa substância em alguma de suas apresentações (cloridrato de cocaína, crack e similares) ao menos uma vez durante a vida. Isso representa, aproximadamente, 6

milhões de brasileiros, conforme o III Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (III LENAD) (INPAD, 2017). A *Erythroxylon coca* é cultivada principalmente na América do Sul, sendo a Colômbia responsável pela produção de 70% de toda a cocaína que é comercializada globalmente. O Brasil é um dos países que mais apreende cocaína em seu território, representando 7% das apreensões globais. Na rota do tráfico, o Brasil ocupa um papel fundamental na distribuição da droga para outros continentes, em especial a Europa e África. Isso se dá em função da localização geográfica estratégica do país, vizinho dos maiores produtores de coca (UNODC, 2020; UNODC, 2021).

Os efeitos estimulantes provocados pela cocaína são consequência de sua atuação no sistema nervoso central. O principal mecanismo de ação consiste na inibição dos transportadores de catecolaminas, responsáveis pela recaptação de dopamina, norepinefrina e serotonina da fenda sináptica (**Figura 1**). Estas catecolaminas controlam funções psíquicas como o humor, percepção/alerta e prazer. Assim, o aumento da disponibilidade destes neurotransmissores na fenda sináptica potencializa seus efeitos no organismo. Além disso, a cocaína também bloqueia os canais de sódio (Na^+) e potássio (K^+) nas células, induzindo respostas cardiovasculares anormais (BACHI *et al*, 2017; ROQUE BRAVO *et al.*, 2022).

Figura 1 - Mecanismo de ação da cocaína, atuando na inibição pré-sináptica dos transportadores de noradrenalina (NAT), dopamina (DAT) e serotonina (SERT).

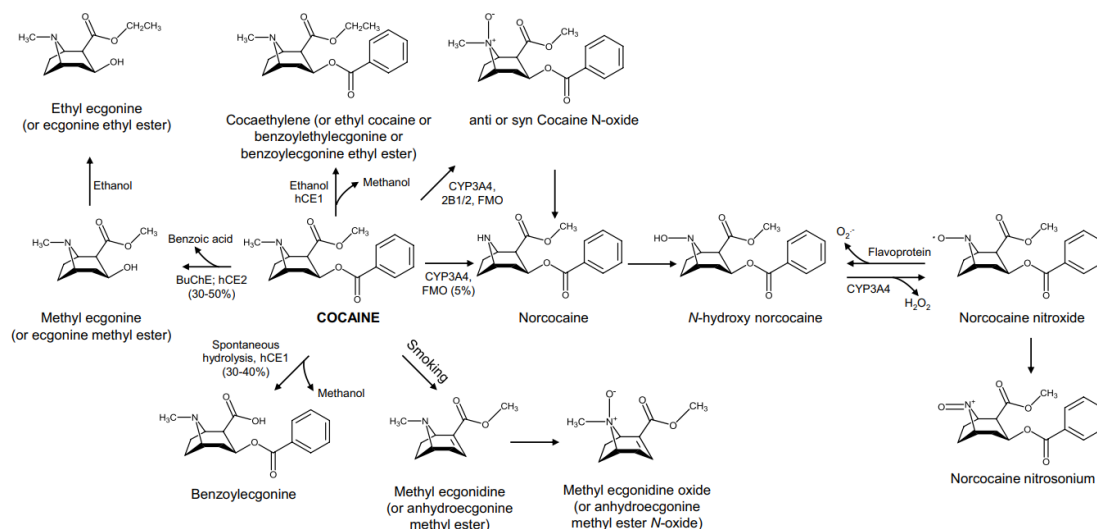


Fonte: Adaptado de BRAVO *et al*, 2022.

A cocaína possui diferentes formas de apresentação, as mais frequentes são o crack que é consumido por via pulmonar e o cloridrato de cocaína, que usualmente é administrado pelas vias intranasal e intravenosa (NIDA, 2020). Após a administração pelas vias pulmonar ou intravenosa são observados efeitos em um período de 1 - 5 min com o pico de resposta cardiovascular entre 8 - 12 min podendo perdurar por até 30 min. Os efeitos decorrentes da administração intranasal ocorrem mais lentamente, entre 15 - 30 min após a administração e o pico de concentração plasmática é alcançado entre 20 - 60 min. Em contrapartida, os efeitos estimulantes ocorrem de forma prolongada (CHASIN; SILVA; CARVALHO, 2008; ISENSCHMID, 2020).

A biotransformação da cocaína ocorre majoritariamente no fígado por meio dos processos de hidrólise, entre outros mecanismos, como a ação enzimática da Citocromo P-450 (**Figura 2**). A molécula de cocaína (COC), possui em sua estrutura dois ésteres suscetíveis a serem hidrolisados, formando produtos inativos. O éster ligado a alquila é hidrolisado por esterases hepáticas ou espontaneamente, formando benzoilecgonina (BE). Já o éster ligado ao fenil será hidrolisado à éster metil ecgonina (EME) através das colinesterases presentes no fígado e no plasma. Ambos são biotransformados à ecgonina (EC), que pode ser hidrolisada espontaneamente. Ainda, a COC e a BE podem sofrer outros processos de hidrólise, gerando produtos em menores concentrações como meta-, para- e hidroxí- cocaína e -BE. A biotransformação da cocaína por meio da Citocromo P-450 gera um produto de biotransformação ativo (tóxico), denominado norcocaína (NCOC). A NCOC é considerada um anestésico local mais potente que a cocaína. Outro produto de biotransformação ativo que pode ser gerado é o cocaetileno (CE), quando há coadministração de álcool e cocaína. Por fim, quando há administração via pulmonar, ocorre a formação de produto tóxico a metilecgonidina (AEME) gerada no processo de pirólise do crack (BORTOLOTTI *et al.*, 2012; OLIVEIRA E DINIS-OLIVEIRA, 2018; ISENSCHMID, 2020).

FIGURA 2 - Representação toxicocinética do mecanismo de biotransformação da cocaína.



Fonte: Adaptado de OLIVEIRA E DINIS-OLIVEIRA, 2018.

Nota: CYP: citocromo P450; FMO: monoxigenase flavina dependente; hCE carboxylesterases; BuChE: butirilcolinesterases.

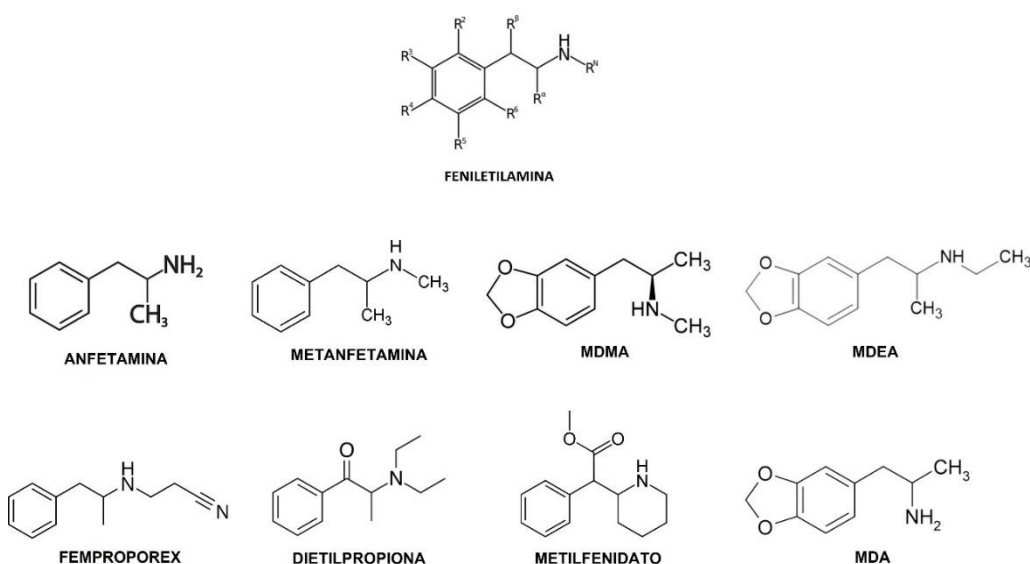
Além da cocaína, as anfetaminas compõem uma classe de substâncias estimulantes muito popular. Os estimulantes tipo anfetaminas (ATS, do inglês: *Amphetamine tipe stimulants*), são substâncias psicotrópicas sintéticas análogas à molécula de anfetamina, que por sua vez é derivada da molécula feniletilamina. A anfetamina foi sintetizada pela primeira vez no início do século XX, durante o mesmo período, a efedrina e a pseudoefedrina também foram isoladas da planta *Ephedra sinica*. O potencial farmacológico destas substâncias começou a ser explorado pela indústria farmacêutica e, inicialmente, as substâncias eram utilizadas como descongestionante nasal e no tratamento da asma. Efeitos adversos como redução de sono e fadiga, sensação de euforia e bem-estar logo foram notados. Então, novos análogos da anfetamina surgiram (metanfetamina, por exemplo) e passaram a ser prescritos para o tratamento da depressão, obesidade e para melhorar o desempenho cognitivo. Entretanto, as propriedades estimulantes tornaram atrativo o uso abusivo da substância, inclusive entre soldados durante a Segunda Guerra Mundial. Após o período de guerra, medidas para controlar a fabricação e consumo dos compostos foram estabelecidas, mas a fabricação de compostos derivados da anfetamina em laboratórios clandestinos tornou-se uma realidade que perdura até a atualidade (RASMUSSEN, 2011; RASMUSSEN, 2015).

A UNODC estima que em 2019, aproximadamente 27 milhões de pessoas ao redor do mundo fizeram uso de anfetamínicos, o equivalente a 0,5% da população global (UNODC,

2021). Na América Latina, o Brasil lidera o uso de anfetamínicos, 1,4% da população relatou ter feito uso não médico (sem prescrição médica) de medicamentos à base de anfetamínicos pelo menos uma vez na vida. Ainda, mais de um milhão de pessoas relataram a utilização de ecstasy, revelando uma prevalência de 0,7% da população brasileira (III LENUD, 2018).

Entre as principais substâncias pertencentes à classe dos anfetamínicos estão a própria anfetamina, efedrina, pseudoefedrina, femproporex, dietilpropiona, metilfenidato, metanfetamina, 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) e 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA) (**Figura 3**). As anfetaminas possuem diferentes padrões de uso. Sibutramina e metilfenidato possuem uso no contexto terapêutico, são utilizadas no tratamento depressão, obesidade, TDAH (transtorno de déficit de atenção e hiperatividade) e narcolepsia. Outras anfetaminas como femproporex e dietilpropiona estão relacionadas ao uso não-médico, principalmente em função das propriedades anorexígenas. Além disso, casos de dopagem com anfetamínicos também já foram reportados, principalmente em competições que exigem resistência. Por fim, o uso de metanfetamina, MDMA, MDA e derivados estão intimamente relacionados ao abuso para fins de socialização, principalmente em festas (HOLT; EROKOTOU-MULLIGAN; SÖNKSEN, 2009; THEVIS *et al.*, 2010; MOREIRA, 2017; EMCDDA, 2018; CRUZ *et al.*, 2018; STEINBUCHEL; GREENHILL, 2020).

Figura 3 - Estrutura química de substâncias pertencentes à classe dos estimulantes tipo anfetaminas (ATS)



Fonte: Autoria própria.

Um aspecto particularmente impactante no Brasil, é a utilização de substâncias estimulantes no trânsito, em especial por caminhoneiros profissionais. As jornadas de trabalho exaustivas e os curtos prazos estipulados para a conclusão das viagens estão fortemente associados com o aumento da utilização de anfetamínicos e cocaína, popularmente conhecidos como “rebite”. Um estudo realizado por Oliveira e colaboradores, em 2015, revelou que quase um terço dos caminhoneiros participantes (29%) admitiram que dirigiam sob a influência de anfetamínicos (YONAMINE *et al.*, 2013; DE OLIVEIRA *et al.*, 2015; BOMBANA *et al.*, 2017; LEYTON *et al.*, 2019).

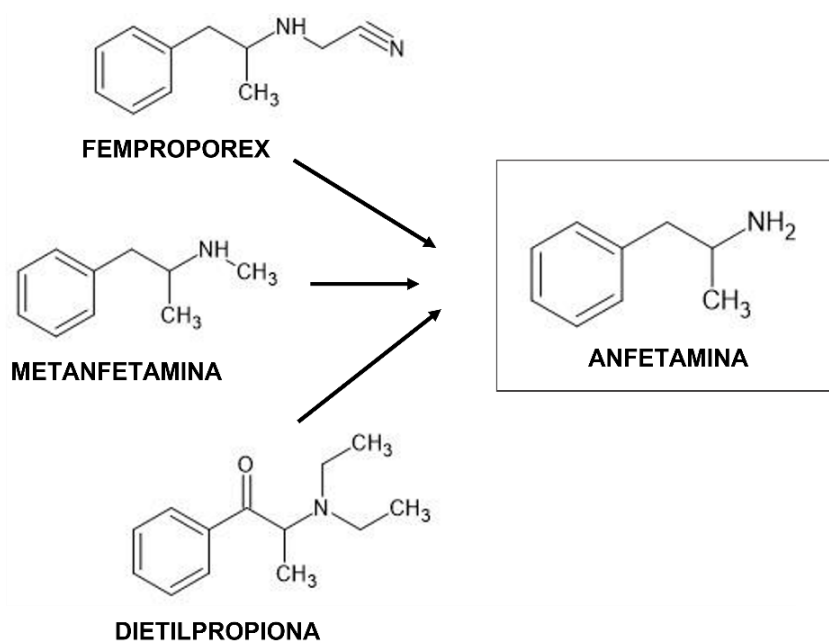
Os efeitos psicoestimulantes das anfetaminas são decorrentes de sua ação sob a neurotransmissão de monoaminas, principalmente, norepinefrina, dopamina e serotonina. Alguns mecanismos de ação são amplamente aceitos e bem estabelecidos, o primeiro deles é a inibição da recaptação das monoaminas através do bloqueio dos transportadores. As anfetaminas também são inibidores da MAO (monoamina oxidase), enzima responsável pela degradação de norepinefrina e serotonina. A afinidade de cada substância pelos transportadores de monoaminas é variável, modulando os efeitos provocados por cada substância (LUETHI; LIECHTI, 2020; JAYANTHI; DAIWILE; CADET, 2021). Os efeitos alucinógenos relacionados ao uso de MDMA, por exemplo, está intimamente relacionado com sua maior afinidade por transportadores de serotonina (TORRE, 2004; MOREIRA, 2017; GREGORIO *et al.*, 2021; COSTA; GO, 2022). Entre os efeitos característicos mais comuns das anfetaminas estão euforia, irritabilidade, insônia, taquicardia, redução da motilidade intestinal e elevação da temperatura corporal. Os efeitos a longo prazo e com relação à dependência são tópicos ainda bastante discutidos entre os especialistas. Entretanto, estudos realizados em primatas não-humanos demonstraram que a administração de anfetamínicos repetidas vezes ou a longo prazo produz modificações nas concentrações de norepinefrina, dopamina e serotonina (CARVALHO *et al.*, 2012; KEVIL *et al.*, 2019; LUETHI; LIECHTI, 2020; JAYANTHI; DAIWILE; CADET, 2021).

As anfetaminas são caracterizadas como compostos básicos, de baixo peso molecular e lipossolúveis. Possuem diferentes formas de apresentação, comprimidos, cristais e em pó. Geralmente, são administradas por via oral, por possuírem rápida absorção gastrointestinal. Entretanto, o uso por via nasal, endovenosa e pulmonar também pode ocorrer. Suas propriedades físico-químicas facilitam a ultrapassagem das barreiras biológicas, como a

barreira hematoencefálica e placentária (CRUICKSHANK; DYER, 2009; CARVALHO *et al.*, 2012).

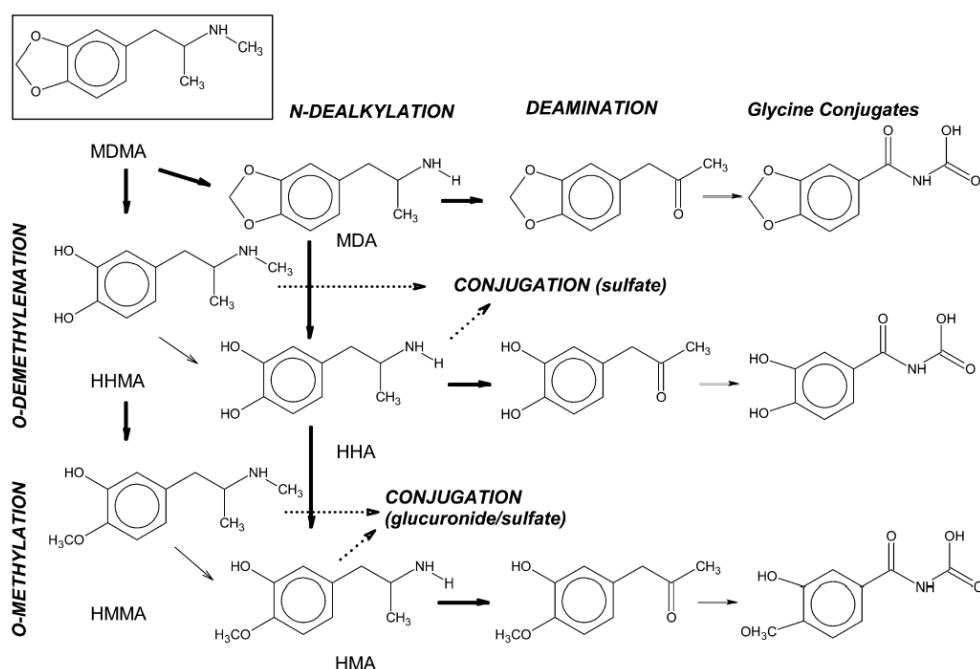
Um dos processos toxicocinéticos mais importantes a serem considerados em análises toxicológicas é a biotransformação. Este processo biológico ocorre principalmente no fígado e as principais vias de biotransformação envolvidas são a hidroxilação aromática, beta-hidroxilação na cadeia lateral, desaminação oxidativa, N-desalquilação, N-oxidação e conjugação com o átomo de nitrogênio. Sendo assim, é importante ressaltar a biotransformação de várias substâncias como a metanfetamina, a anfepramona e o femproporex geram como produto de biotransformação a própria anfetamina (**Figura 4**) (KRAEMER; MAURER, 2002). Já a administração de MDMA, resulta em produtos ativos como o MDA, HMMA (hidroximetoximetanfetamina) e a HMA (hidroximetoxianfetamina) (**Figura 5**). A biotransformação do MDMA ocorre principalmente em duas vias: (1) N-dealquilação, desaminação e oxidação pela CYP2D6 (entre outras CYPs) e (2) O-demetilação pela ação da O-metiltransferase (COMT). Também acabam sendo formados produtos conjugados com ácido glicurônico, sulfato e glicina. A excreção ocorre majoritariamente por via urinária e é dependente do pH, a alcalinização urinária reduz a eliminação das anfetaminas em função do fenômeno de reabsorção (TORRE, 2004; CARVALHO *et al.*, 2012).

Figura 4 – Representação da biotransformação de metanfetamina, femproporex e dietilpropiona, gerando anfetamina.



Fonte: Adaptado de KRAEMER; MAURER, 2002.

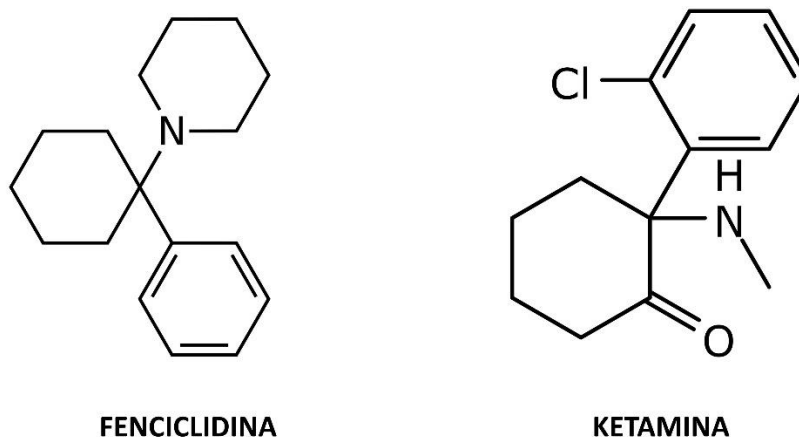
Figura 5 – Representação dos produtos formados em função da biotransformação do MDMA.



Fonte: Adaptado de TORRE, 2004.

A fenciclidina (PCP, do inglês: *phencyclidine*), conhecida popularmente como “pó de anjo” foi sintetizada pela primeira vez, com o objetivo de ser utilizada com agente anestésico. Entretanto, durante os experimentos clínicos foram observados efeitos colaterais que incluíam alucinações, potencial de dependência, entre outros. Subsequentemente a partir da PCP, nos anos 1960, surgiu a cetamina no intuito de desenvolver um novo agente anestésico (COPELAND; DILLON, 2005). Porém, efeitos adversos semelhantes aos da PCP foram relatados pelos pacientes, entre eles a sensação de transcendência corporal e alucinações. Isso porque, tanto a cetamina quanto a fenciclidina são consideradas substâncias dissociativas, atuam simultaneamente em diferentes áreas cerebrais (**Figura 6**). O principal mecanismo de ação atribuído a estes compostos é o antagonismo não-competitivo dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA). Entretanto, evidências apontam a interação da substância com receptores de opioides, nicotínicos e muscarínicos, receptores de dopamina, entre outros (LODGE; MERCIER, 2015; LIU *et al.*, 2016; SCHWENK *et al.*, 2021).

Figura 6 - Estruturas químicas das substâncias fenciclidina e cetamina.



Fonte: Autoria própria.

Os efeitos agudos provocados por essas substâncias incluem experiência extracorpórea, percepções alteradas, sensação de tempo prolongado e alucinações. Em função disso, tornaram-se drogas de abuso em potencial, utilizada em contextos recreativos como festas *rave* e uso não-médico (BOKOR; ANDERSON, 2014; LIU *et al.*, 2016). As sínteses de substâncias derivadas da PCP não foram interrompidas após o surgimento da cetamina, dando origem a outras substâncias dissociativas consideradas Nova Substância Psicoativa (NPS, do inglês: *New Psychoactive Substances*) da classe das substâncias tipo fenciclidina. De acordo com a UNODC, foi a classe de NPS mais apreendida mundialmente em 2019. Estima-se que 0,2% da população brasileira já tenha feito uso de cetamina ao menos uma vez durante a vida (III LENUD, 2018; UNODC, 2021;). Além disso, Cunha e colaboradores realizaram um estudo avaliando a prevalência de drogas ilícitas em festas e festivais de música eletrônica no Brasil, dentre as amostras positivas para alguma NPS, 75% das amostras foram positivas para cetamina (DA CUNHA *et al.*, 2021)

Cetamina e PCP podem ser administradas de várias formas diferentes. Considerando a utilização para fins recreacionais, geralmente são administradas por via intranasal ou fumada juntamente com tabaco, maconha ou outras matrizes de origem vegetal (BOKOR; ANDERSON, 2014). A biodisponibilidade da cetamina varia de acordo com a forma de administração, quando utilizada via intranasal a biodisponibilidade pode chegar a 50%. Apresenta baixa afinidade por proteínas plasmáticas e um amplo volume de distribuição (3- 5 L/kg). Em função da alta lipofilicidade é capaz de ultrapassar a barreira hematoencefálica rapidamente. A biotransformação da cetamina ocorre majoritariamente no fígado, onde ocorre

principalmente a atuação de enzimas da CYP450 que através de N-demetilação formam o produto ativo norcetamina. Além da norcetamina outros produtos de biotransformação também são formados, incluindo os conjugados. Na urina são excretados em torno de 2% como cetamina inalterada, 2% como norcetamina, 16% como dihidroxinorcetamina e 80% como conjugados com o ácido glucurônico (Dinis-Oliveira, 2017). Já a biotransformação da PCP ocorre de forma bastante heterogênea, ocorrendo principalmente no fígado através de reações enzimáticas por enzimas da família CYP450. Os principais produtos formados reportados são: cis-1-(1-fenil-4-hidroxi- ciclohexil)piperidina (c-PPC), trans-1-(1-fenil-4-hidroxi- ciclohexil)piperidina (t-PPC) e 1-(1-fenciclohexil)-4-hidroxipiperidina (PCHP) (MAURER; SAUER; THEOBALD, 2006; MEYER; MAURER, 2011)

1.2 ANÁLISES TOXICOLÓGICAS: FLUIDO ORAL

Uma das etapas críticas para o sucesso em análises toxicológicas é a escolha da matriz biológica utilizada para a determinação dos analitos. Com a evolução das metodologias de coleta e preparo de amostras, bem como das instrumentações analíticas, muitas matrizes biológicas puderam ser exploradas. Além das matrizes convencionais como sangue e urina, uma das matrizes alternativas mais estudadas em toxicologia foi o fluido oral. Para alcançar o êxito nas análises e obter resultados capazes de suprirem o objetivo, as características da amostra escolhida devem ser consideradas. Somente desta forma, é possível interpretar corretamente as informações provenientes da análise. Cada matriz apresenta particularidades, possuem finalidades diversas de acordo com sua constituição, procedimentos de coleta, metodologia de análise, acessibilidade, distribuição dos produtos de biotransformação e janela de detecção (DRUMMER, 2006).

A saliva é uma secreção produzida por um conjunto de glândulas salivares presentes na cavidade oral. É constituída por aproximadamente 99% de água, contendo eletrólitos, proteínas enzimáticas, glicoproteínas mucosas, polipeptídios e oligopeptídios, glicose e produtos metabólicos (ELMONGY; ABDEL-REHIM, 2016). Um adulto saudável normalmente produz 500 – 1.500 mL de saliva por dia, aproximadamente 0,5 mL/min. Entretanto, muitos fatores fisiológicos e patológicos podem influenciar na quantidade de saliva produzida, como a estimulação do paladar, condições psicológicas e hormonais, idade, higiene oral, exercícios físicos e o uso de drogas (CHIAPPIN *et al.*, 2007). Com relação as modulações provenientes

do sistema nervoso central, a estimulação parassimpática eleva o fluxo de água, tornando a saliva menos viscosa e diluindo os componentes. Já a estimulação simpática, aumenta a produção de muco, elevando a viscosidade da saliva secretada (BELLAGAMBI *et al.*, 2020). Contudo, o fluido oral é composto pela saliva secretada na cavidade oral acrescido de células epiteliais, bactérias, resíduos alimentares, entre outros compostos presentes na cavidade oral (CAMPOS *et al.*, 2022).

Nos últimos anos, o fluido oral vem sendo muito utilizado na monitorização terapêutica e para a detecção do uso recente de drogas, nos contextos ocupacionais e de direção sob a influência de drogas. Os mecanismos mais comuns de transferência das drogas do sangue para a saliva são a difusão passiva e a ultrafiltração. Isso porque, substâncias de baixo peso molecular sofrem difusão passiva ou ultrafiltração do sangue para a saliva, entretanto a passagem através das membranas celulares é restrita a drogas ionizadas ou ligadas a proteínas. Drogas em sua forma inalterada são encontradas em concentrações mais altas nesta matriz, em função da lipofilicidade que permite a passagem pelas membranas celulares mais facilmente (FLANAGAN, 2004; CAMPOS *et al.*, 2022). A **Tabela 1** apresenta características físico-químicas importantes de algumas drogas de abuso. Entretanto, algumas substâncias, como a cocaína, estão presentes em fluido oral tanto na forma inalterada como seus produtos de biotransformação.

Tabela 1 - Características físico-químicas das drogas de abuso abordadas neste trabalho.

Drogas de Abuso	Massa Molecular	pKa	logP
Éster metil ecgonina (EME)	199.25	9.04	0.6
Cocaína (COC)	303.35	8.61	2.3
Benzoilecgonina (BE)	289.33	3.15 9.54	-0.3
Hidroxicoína (COC-OH)	319.40	9.09	1.9
Cocaetileno (CE)	317.40	8.77	2.7
Anfetamina (AMP)	135.10	10.01	1.85
3,4-metilenedioxiamfetamina (MDA)	179.09	10.01	1.43
Metanfetamina (MET)	149.12	10.21	2.24
3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA)	193.11	10.14	1.86
3,4-metilenodioxietilamfetamina (MDEA)	207.12	10.22	2.22
Femproporex (FEMP)	188.13	7.88	2.01
Fenciclidina (PCP)	243.19	8.29	4.69
Cetamina (KET)	237.09	7.16	3.35

Fonte: DRUGBANK, 2018; PUBCHEM, 2021.

Estudos farmacocinéticos mostram que além da cocaína, seus principais produtos de biotransformação (benzoilecgonina e éster metil ecgonina) também podem ser detectados em fluido oral. Além disso, outros produtos da cocaína também já foram detectados em fluido oral, como o AEME e o cocaetileno, em menores concentrações (CONE; OYLER; DARWIN, 1997; BORTOLOTTI *et al.*, 2012; ELLEFSEN *et al.*, 2016). Scheidweiler *et al.* (2010), demonstrou através de um estudo farmacocinético que a cocaína apareceu em fluido oral pela primeira vez entre 0,08 – 0,32 h (4,8 – 19,2 min) depois da administração da droga. Cocaína, benzoilecgonina e EME permaneceram detectáveis (considerando o *cutoff* recomendado de 8 ng/mL) durante 0,08 – 9,8 h, 0,5 – 32,0 h e 0,4-28,0 h, respectivamente, demonstrando que BE e EME tendem a prolongar a possibilidade de terminação do uso de cocaína (SCHEIDWEILER *et al.*, 2010). Outro estudo realizado por Barnes *et al.*, avaliou a janela de detecção do MDMA em fluido oral. Além do próprio MDMA, MDA, HMA e HMMA também foram monitorados, apenas MDMA e MDA foram detectados em fluido oral. Considerando a mesma dose administrada,

MDMA apresentou tempo de meia vida de 7,4 h, enquanto MDA esteve presente em concentrações menores com tempo de meia vida de 8,1 h (BARNES *et al.*, 2011).

Estudos demonstram que existe uma correlação entre as concentrações de drogas encontradas no fluido oral e as concentrações plasmáticas, indicando a possibilidade de realização de análises quantitativas (WILLE *et al.*, 2009; LANGE *et al.*, 2014; BUSARDÒ *et al.*, 2018). Sendo assim, o fluido oral tem se mostrado uma matriz alternativa ao uso de sangue, indicado para determinação do uso recente de substâncias. A janela de detecção das substâncias nesta matriz é considerada curta, ou seja, os analitos permanecem detectáveis por um curto período após o uso. Considerando baixas concentrações (à nível de nanogramas por mililitro), drogas de abuso podem ser detectadas em sangue por 1 ou 2 dias, em fluido oral por 5 - 48 h. Enquanto em urina, após a administração aguda podem ser detectadas entre 1,5 - 4 dias (VERSTRAETE, 2004).

Um dos fatores mais importantes na determinação da concentração das substâncias na saliva é o pH salivar em relação ao pH da substância, funcionando como uma armadilha iônica. O pH salivar, geralmente, é levemente acidificado (pH 5,5). Em função disso, drogas com características básicas apresentarão uma porção maior de droga ionizada, consequentemente há um aumento da concentração de drogas básicas no fluido oral, o contrário o corre com compostos ácidos. Substâncias com valores de pKa maiores que 8,5 ou menor que 5,5, dificilmente serão ionizadas em fluido oral e acabam sofrendo uma influência menor às variações do pH salivar, estas substâncias tendem a apresentar uma correlação saliva/plasma melhor. Por esta razão observa-se resultados bastante expressivos na concentração de opioides, cocaína e anfetaminas neste tipo de amostra. Enquanto, drogas predominantemente ácidas, como o THC (maconha) e benzodiazepínicos, apresentam menores concentrações em fluido oral quando comparadas com as concentrações sanguíneas (DRUMMER, 2006).

Fluido oral é uma das matrizes mais promissoras para avaliação de uso recente de drogas *on-site* e em tempo real, através de testes de *screening*. A coleta de fluido oral pode ser realizada com ou sem estimulação externa (ácido cítrico) por expectoração em um tubo ou com o auxílio de dispositivos comerciais de coleta, onde o fluido oral é absorvido por um *swab* que posteriormente é adicionado a um diluente responsável pela extração dos analitos do *swab*. A coleta pode ser realizada de forma simples, segura e não invasiva, sem a necessidade de um profissional para realizá-la. Além disso, a coleta assistida pode ser realizada sem

constrangimentos e em qualquer lugar, reduzindo a possibilidade de adulteração da amostra (FLANAGAN *et al.*, 2020; PASCUAL-CARO *et al.*, 2022; CAMPOS *et al.*, 2022).

Apesar das várias vantagens, o fluido oral apresenta algumas limitações que devem ser consideradas. A interpretação dos resultados deve ser realizada com cautela, considerando a possibilidade de contaminações provenientes da cavidade oral nos casos em que a substância é fumada, administrada por via intranasal ou oral. Além disso, as substâncias são encontradas em concentrações mais baixas quando comparadas com sangue e plasma, por exemplo. Adicionalmente, a disponibilidade de amostra pode ser escassa (1 mL) e ainda está sujeita às variações na quantidade de saliva produzida, em função das modulações multifatoriais. Nesse sentido, metodologias que utilizem pouco volume de amostra e ainda assim demonstram sensibilidade adequada tornam-se uma alternativa atrativa (LILLSUNDE, 2008; GALLARDO; BARROSO; QUEIROZ, 2009; CONE; HUESTIS, 2007; DESROSIERS; HUESTIS, 2019).

Aplicações em análises forenses, controle de dopagem (ANIZAN; HUESTIS, 2014), testagem de condutores suspeitos de casos direção sob a influência de drogas (DUID do inglês, *Driving Under the Influence of Drugs*) (SCHULZE *et al.*, 2012; VEITENHEIMER; WAGNER, 2017), no ambiente de trabalho (MOORE, 2012; SAMHSA, 2019) e monitoramento terapêutico (CAPIAU; ALFFENAAR; STOVE, 2016; TEY; SEE, 2020) são algumas das aplicações mais frequentemente reportadas. Entretanto, a maioria destas análises requer testes confirmatórios realizados por metodologias mais robustas, específicas e de alta sensibilidade, como por exemplo cromatografia associada à espectrometria de massas (MAURER, 2005).

1.3 DRIED ORAL FLUID SPOT

As análises toxicológicas, em geral, requerem instrumentos altamente sensíveis capazes de detectarem baixas concentrações dos analitos. Em função disso, as técnicas mais utilizadas para determinação de drogas de abuso em amostras biológicas, incluindo fluido oral, são a cromatografia líquida (LC, do inglês: *liquid chromatography*) ou cromatografia gasosa (GC, do inglês: *gas chromatography*), geralmente associadas à espectrometria de massas (MS, do inglês: *mass spectrometry*) (DESROSIERS; HUESTIS, 2019)(PASCUAL-CARO *et al.*, 2022).

Cromatografia é uma técnica de separação, que possibilita a análise de substâncias presentes em misturas complexas, como em alimentos e amostras biológicas. As amostras são injetadas no sistema analítico onde encontram a fase móvel (constituída por solventes ou um

gás de arraste) que é bombeada por pressão. A fase móvel e a amostra passam pela coluna cromatográfica e é através da interação dos analitos com a fase móvel e fase estacionária que ocorre a separação. Por fim, as substâncias alcançam o detector, que gera um sinal proporcional à concentração, produzindo um cromatograma (HARRIS, 2012).

Já a técnica MS é utilizada há muito tempo para estudar as massas de átomos, moléculas e fragmentos de moléculas. As moléculas são ionizadas em seu estado gasoso ou dessorvidas a partir de fases condensadas. Então, os íons são acelerados por um campo elétrico e separados de acordo com a razão entre suas massas e suas cargas elétricas (m/z). Diferentes tipos de espectrômetros de massa podem ser utilizados, como por exemplo, o triploquadrupolo que é um espectrômetro em *tandem* (MS/MS, do inglês: *mass spectrometry tandem*), técnica que apresenta ainda mais sensibilidade e é amplamente aplicada na toxicologia (HARRIS, 2012; WATSON; OSSELTON; WIDDOP, 2011).

Pascual-Caro e colaboradores, publicaram uma revisão da literatura sobre as metodologias analíticas desenvolvidas entre 2018 e 2021 para determinação de drogas de abuso em fluido oral. Eles observaram que todos os métodos encontrados que utilizavam GC, eram associados a MS ou a MS/MS. Além disso, todas as metodologias publicadas utilizavam técnicas de pré-tratamento de amostra, como SPME (do inglês: *Solid Phase Microextraction*), extração magnética, MEPS (do inglês: *Microextraction by Packet Sorbent*) e DOFS (do inglês: *Dried Oral Fluid Spot*). Apesar da ampla utilização de CG, a técnica mais utilizada foi LC, em especial LC-MS/MS (PASCUAL-CARO *et al.*, 2022).

Uma das vantagens do LC-MS quando comparada ao GC-MS é o aumento da sensibilidade utilizando pequenos volumes de amostra, além de não precisar da etapa de derivatização dos analitos (MAURER, 2005). Entre as técnicas de LC-MS, a espectrometria em *tandem* oferece sensibilidade e seletividade superiores à apenas um quadrupolo. Essa ferramenta pode operar em modo MRM (MRM, do inglês: *multiple reaction monitoring mode*), que permite a detecção de baixas concentrações dos analitos em matrizes biológicas complexas, reduzindo o pré-tratamento de amostras e tempo de análise. Uma limitação do LC-MS/MS, principalmente no modo ionização por *eletrospray* (ESI, do inglês: *Eletrospray Ionization*) é a suscetibilidade ao fenômeno do efeito matriz, preparo de amostras mais robusto pode ser necessário (GALLARDO; BARROSO; QUEIROZ, 2009).

Sensibilidade é um ponto crítico para a realização de análise de drogas de abuso em fluido oral. Isso porque, como discutido anteriormente, as substâncias encontram-se em concentrações na faixa de ng/mL. Os valores de cutoff para cocaína e benzoilecgonina em fluido oral estabelecidos pela agência governamental americana *Substance Abuse and Mental Health Services Administration* (SAMHSA) é de 8 ng/mL, para testes confirmatórios. Para anfetaminas, o cutoff estabelecidos é de 15 ng/mL. Enquanto para fenciclidina, o *cutoff* é de 2 ng/mL (SAMHSA, 2019).

Para a análise de amostras complexas é necessária uma etapa de pré-tratamento da amostra, seja uma simples diluição ou técnicas mais robustas como as microextrações. A complexidade do preparo da amostra depende de vários fatores, como as características do analito e da amostra e do método analítico a ser utilizado. Geralmente, a utilização de técnicas cromatográficas, e em especial de MS requerem preparo de amostras com etapas eficientes de *clean-up* e concentração dos analitos (STIMPFL, 2011).

Contudo, a utilização de técnicas de preparo de amostra é uma prática frequente nas análises de drogas em fluido oral. O *Dried oral fluid spot* (DOFS) é uma técnica simples e de baixo custo, que consiste na aplicação (direta ou indireta) de um pequeno volume de amostra de fluido oral na superfície de um papel filtro. Após a desidratação do papel, os analitos são extraídos utilizando solventes, o extrato pode ser concentrado ou não por evaporação e geralmente é analisado por LC-MS/MS ou GC-MS/MS. O DOFS pode ser utilizado como técnica de microamostragem, possibilitando a coleta simplificada de amostra, diretamente no papel. Adicionalmente, o DOF é reconhecido pela capacidade de aumentar o tempo de estabilidade das substâncias, que podem ser armazenadas inclusive à temperatura ambiente (ZIMMER *et al.*, 2013; JACKES *et al.*, 2019; TEY; SEE, 2020).

Almeida *et al.*, 2022, encontraram que em fluido oral, BE apresentou perda de 13,5% após 136 dias de armazenamento quando armazenado em DOFS à temperatura ambiente, COC e EC apresentaram até menos de 20% em 7 dias de armazenamento. EME teve um tempo de estabilidade menor, apenas 3 dias (ALMEIDA *et al.*, 2022). Outro estudo demonstrou que AMP, KET e BE apresentaram perdas mínimas quando armazenados em DOFS à 6°C por 35 dias (GORZIZA *et al.*, 2020). Em estudos realizados em sangue, durante 6 meses a estabilidade de AMP, MET, MDA e MDMA foram armazenados em DBS (do inglês: *dried blood spot*) e apresentaram perdas inferiores a 20% (SAUSSEREAU *et al.*, 2012; SIMÕES; CASTA; DIAS, 2018). Existem poucos estudos explorando o *dried oral fluid spot* em amostras de fluido oral,

mesmo que essa técnica seja considerada uma ótima alternativa para analisar o uso recente de substâncias em diferentes contextos (PASCUAL-CARO *et al.*, 2022).

A **Tabela 2** apresenta uma revisão da literatura, contemplando trabalhos que objetivaram desenvolver metodologias analíticas para detecção de drogas de abuso em fluido oral. O volume de amostra utilizado variou entre 50 – 500 µL de fluido oral. Dentre os artigos selecionados, o limite de quantificação (LOQ) ou o menor limite de quantificação (LLOQ) dos métodos variaram entre 0,05 - 40 ng/mL, considerando os analitos estudados neste trabalho. Ainda, considerando todos os instrumentos analíticos utilizados, o menor tempo de análise foi de 3 min e o mais longo foi de 17 minutos. De acordo com os dados encontrados, as técnicas mais frequentes de preparo de amostras são extração líquido-líquido (LLE, do inglês: *liquid-liquid extection*), extração em fase sólida (SPE, do inglês: *solid phase extraction*), precipitação de proteínas e diluição, que vai ao encontro de outras revisões científicas publicadas na literatura sobre o tema (REMANE; WISSENBAACH; PETERS, 2016; DESROSIERS; HUESTIS, 2019; PASCUAL-CARO *et al.*, 2022). Entretanto, cada vez mais, microextrações e metodologias que utilizam pouco volume de amostras têm sido exploradas no intuito de aumentar a sensibilidade das análises (DARYANAVARD *et al.*, 2021)(ESTEVE-TURRILLAS; ARMENTA; GUARDIA, 2020). Além das técnicas tradicionais de preparo de amostras, foram encontrados estudos que usaram DLLME (do inglês: *dispersive liquid-liquid microextraction*), incubação, MEPS e DOFS.

Tabela 2 – Revisão da literatura: metodologias desenvolvidas para análises quantitativas de drogas de abuso, estimulantes e alucinógenos, em fluido oral.

Analitos	Volume de Amostra	Preparo de Amostra	Instrumentação	Tempo de Corrida	LOQ/LLOQ	Referência
Cocaína Benzoilecgonina Cocaetileno Hidroxycocaína EME Anfetamina Femproporex Metanfetamina MDA MDMA MDEA Cetamina PCP	100 uL	DOFS	LC-MS/MS	8 min	1 ng/mL 5 ng/mL para MDA, Anfetamina e Femproporex	Este estudo
Cocaína Benzoilecgonina Cocaetileno Anfetamina Metanfetamina MDA MDEA MDMA Cetamina Outras drogas de abuso	200 µL	Diluição e injeção	LC-MS/MS	12 min	0.5 ng/mL para COC e BE 1 ng/mL para anfetaminas, CE, e cetamina	BASSOTTI et al., 2020
Benzoilecgonina Metanfetamina Cetamina Anfetamina Mitraginina	50 uL	DOFS	LC-MS/MS	10 min	0.2 ng/mL	GORZIZA et al., 2020
Cocaína Benzoilecgonina Cocaetileno Outras drogas de abuso	300uL aproximadamente	Incubação	LC-MS/MS	13 min	8 ng/mL	DESHARNAIS et al., 2020

Analitos	Volume de Amostra	Preparo de Amostra	Instrumentação	Tempo de Corrida	LOQ/LLOQ	Referência
Cocaína Benzoilecgonina Outras drogas de abuso	500 uL	US-DLLME	UPLC-MS/MS	3 min	0.5 ng/mL para COC e BE	FERNANDÉZ <i>et al.</i> , 2019
Cocaína Benzoilecgonina Anfetamina Metanfetamina MDMA Cetamina Outras drogas de abuso	500 uL	Diluição e Injeção	UHPLC-MS/MS	10 min	0.5 – 2.2 ng/mL	MALACA <i>et al.</i> , 2019
Cocaína Benzoilecgonina Cocaetileno Anfetamina MDMA	50 uL	DOFS	LC-MS	-	40 ng/mL	JACQUES <i>et al.</i> , 2019
Cocaína Benzoilecgonina Cocaetileno AEME AEC	100 uL	Diluição e Injeção	LC-MS	-	4.25 ng/mL	FIorentin <i>et al.</i> , 2017
Cocaína Benzoilecgonina EME AEME Outras drogas de abuso	250 uL	Precipitação de Proteínas	LC-MS/MS	16 min	0.5 – 1 ng/mL	CONCHEIRO <i>et al.</i> , 2010
Cocaína Benzoilecgonina Cocaetileno Outras drogas de abuso	300 uL	MEPS	UPLC-MS/MS	-	0.5 – 1 ng/mL	Ares <i>et al.</i> , 2017
Cocaína Benzoilecgonina Anfetamina MDMA	200 uL	SPE	UPLC-MS/MS	8.50 min	5 ng/mL	DI FAZIO <i>et al.</i> , 2018

Analitos	Volume de Amostra	Preparo de Amostra	Instrumentação	Tempo de Corrida	LOQ/LLOQ	Referência
Ecgonina EME EEE p-hidroxibenzoilecgonina m- hidroxibenzoilecgonina Benzoilecgonina Hidroxicoína Norcoína Cocaína Norcoetilen Coetilen E opioides	200uL	Precipitação de Proteínas	LC-APCI-MS/MS	13 min	1 ng/mL	DAMS et al., 2007
Cocaína Benzoilecgonina Morfina 6-AM Anfetamina Metanfetamina MDA MDMA MDEA MBDB	100 uL	SPE	LC-MS	17 min	10 ng/mL	CRUZ et al., 2007
Anfetamina Metanfetamina MDA MDMA MDEA Cetamina E NPS	500 uL	LLE	LC-MS/MS	13.5 min	0.1 – 1 ng/mL	Da Cunha et al., 2020
Cocaína Anfetamina Metanfetamina MDA MDMA Cetamina Outras drogas de abuso	500 uL	Precipitação de Proteínas	UHPLC-MS/MS	9.0 min	0.59 – 7.78 ng/mL	DI CORCIA et al., 2013

Analitos	Volume de Amostra	Preparo de Amostra	Instrumentação	Tempo de Corrida	LOQ/LLOQ	Referência
Cocaína Benzoilecgonina Cocaetileno EME Anfetamina Metanfetamina MDA MDMA Cetamina Outras drogas de abuso	200 uL	LLE	LC-MS/MS	5.5 min	1 ng/mL	DI RAGO et al., 2016
Cocaína Benzoilecgonina Anfetamina Metanfetamina MDMA MDA MDEA PCP Outras drogas de abuso	200 uL	SPE	LC-MS/MS	12 min	0.8 – 5 ng/mL	FRITCH et al., 2009
Anfetamina Metanfetamina MDA MDMA MDEA	50 uL	DLLME	LC-MS/MS	6.5 min	20 ng/mL	KAHL et al., 2021
Anfetamina Metanfetamina MDMA MDEA MDA E catinonas sintéticas	500 uL	LLE	GC-MS	15 min	2.5 – 10 ng/mL	MOHAMED et al., 2016
Cocaína Anfetamina Metanfetamina MDMA Outras drogas de abuso	200 uL	LLE/96-well plate	UHPLC-MS/MS	7.1 min	0.1 – 0.7 ng/mL	VALEN et al., 2017

Analitos	Volume de Amostra	Preparo de Amostra	Instrumentação	Tempo de Corrida	LOQ/LLOQ	Referência
Cocaína Benzoilecgonina Anfetamina Metanfetamina MDMA MDA PCP Outros opioides	500 uL	LLE para anfetaminas e PCP SPE para COC, BE, e opioides	LC-MS/MS	-	10 ng/mL para anfetaminas 2ng/mL para COC, BE e PCP	KALA et al., 2008
Cocaína EME Anfetamina Metanfetamina MDMA MDEA MDA PCP Outras drogas de abuso	1000 uL	LLE	GC-MS	9.73 min	5 – 25 ng/mL	LANGEL et al., 2011
Cocaína Benzoilecgonina Anfetamina Metanfetamina MDMA MDEA MDA Cetamina Outras drogas de abuso	500 uL	SPE	UPLC-MS/MS	10 min	0.05 – 0.5 ng/mL	MERCIER et al., 2022
Anfetamina Metanfetamina Fentermina MDA MDMA MDEA	200 uL	LLE	GC-MS/MS	-	0.26 – 2.4 ng/mL	WOŹNIAK et al., 2018

Analitos	Volume de Amostra	Preparo de Amostra	Instrumentação	Tempo de Corrida	LOQ/LLOQ	Referência
Cocaína Benzoilecgonina EME Anfetamina Metanfetamina MDMA MDEA MDA Cetamina PCP Outras drogas de abuso	120 µL	MEPS	LC-MS/MS	12.5 min	0.6 – 4 ng/mL	MONTESANO et al., 2015
Cocaína Benzoilecgonina Anfetamina Metanfetamina MDA MDEA MDMA PCP Outras drogas de abuso	150 µL	Precipitação de Proteínas	UPLC-MS/MS	5 min	1.0 – 1.4 ng/mL	ZHENG; SPARVE; BERGSTRÖM, 2018

Nota: COC, cocaína; BE, Benzoilecgonina; CE, Cocaetileno; EME, éster metil ecgonina; EEE, éster etil ecgonina; AEME, éster metil anhidroecgonina; AEC, anhidroecgonina; MDMA, 3,4-metilenodioximetanfetamina; MDA, 3,4-metilenodioxianfetamina; MDEA, 3,4-metilenodioxietilanfetamina; BMDb, Metilbenzodioxililbutanamina; PCP, Fenciclidina; 6-AM, acetilmorfina; NPS, new psychoactive substances; DOFS, dried oral fluid spot, LLE, liquid-liquid extraction; SPE, solid phase extraction; MEPS, microextraction by packet sorbent; DLLME, dispersive liquid-liquid microextraction;; US-DLLME, ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction; GC-MS/MS, gas chromatography-mass spectrometry tandem; LC-APCI-MS/MS, liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry.

A relevância da determinação de drogas de abuso em amostras de fluido oral é inerente. E com isso, surge a necessidade de desenvolver e aprimorar técnicas capazes de serem aplicadas nesse contexto, suprimindo os desafios encontrados. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método utilizando *dried oral fluid spot* para a determinação de cocaína, benzoylecgonina, éster metil ecgonina (EME), cocaetileno, hidroxicoaína, anfetamina, metanfetamina, 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA), 3,4-metilenodioxietilanfetamina (MDEA), femproporex, cetamina e fenciclidina em fluido oral por LC-MS/MS.

2. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo teve como objetivo desenvolver e validar uma nova abordagem analítica para a determinação de cocaína, benzoilecgonina, éster metil ecgonina (EME), cocaetileno, hidroxicoína, anfetamina, metanfetamina, 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA), 3,4-metilenodioxietilamfetamina (MDEA), femproporex, cetamina e fenciclidina em fluido oral utilizando *dried oral fluid spot* associado à placa de 24-poços e LC-MS/MS.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Otimizar o método para determinação de drogas de abuso utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS);
- Otimizar parâmetros críticos à técnica *Dried Oral Fluid Spot* (DOFS);
- Validar a metodologia, utilizando os parâmetros otimizados, DOFS para análise de cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, hidroxicoína, EME, anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA, femproporex, fenciclidina e cetamina;
- Analisar amostras reais de fluido oral, doadas pelo Hospital de Clínicas de Porto Alegre, provenientes de dependentes químicos.

3. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA E, et al. Stability of Cocaine, Opiates, and Metabolites in Dried Saliva Spots. **Molecules**. V. 27, p. 641, janeiro, 2022.
- ANIZAN S, HUESTIS MA. The potential role of oral fluid in antidoping testing. **Clinical Chemistry**. V. 60, p. 307-22, março, 2014.
- ARES, A M et al. A fast bioanalytical method based on microextraction by packed sorbent and UPLC – MS / MS for determining new psychoactive substances in oral fluid. **Talanta**. V. 174, p. 454–461, junho, 2017.
- BACHI, K et al. Vascular disease in cocaine addiction. **Atherosclerosis**. V. 262, p.154-162, 2017.
- BARNES, Allan et al. MDMA and Metabolite Disposition in Expecterated Oral Fluid Following Controlled Oral MDMA Administration. **Ther Drug Monit.**, v. 33, p. 602 – 608, 2011.
- BASSOTTI, Elisa et al. A new LC-MS / MS confirmation method for the determination of 17 drugs of abuse in oral fluid and its application to real samples. **Forensic Science International**. V. 312, 2020.
- BELLAGAMBI, Francesca G et al. Saliva sampling: Methods and devices. An overview. **Trends in Analytical Chemistry**. V. 124, dezembro, 2020.
- BOKOR, Gyula; ANDERSON, Peter D. Ketamine : An Update on Its Abuse. **Journal of Pharmacy Practice**. V. 27, n. 6, p. 582–586, 2014.
- BOMBANA, H. S. et al. Prevalence of drugs in oral fluid from truck drivers in Brazilian highways. **Forensic Science International**. V. 273, p. 140–143, fevereiro, 2017.
- BORTOLOTTI, F. et al. Toxicokinetics of Cocaine and Metabolites: The Forensic Toxicological Approach. **Current Medicinal Chemistry**. V. 19, n. 33, p. 5658–5663, 2012.
- BUSARDÒ, Francesco et al. Correlation between Blood and Oral Fluid Psychoactive Drug Concentrations and Cognitive Impairment in Driving under the Influence of Drugs. **Current Neuropharmacology**, v. 16, p.84- 96, 2018.
- CAMPOS, Eduardo et al. Alternative matrices in forensic toxicology: a critical review. **Forensic Toxicology**, v. 40, p. 1- 18, 2022.
- CAPIAU, Sara; ALFFENAAR, Jan Willem; STOVE, Christophe P. Alternative Sampling Strategies for Therapeutic Drug Monitoring. In: Clinical challenges in therapeutic drug monitoring: special populations, physiological conditions, and pharmacogenomics. Elsevier Inc., p. 279–336, 201
- CARVALHO, Márcia et al. Toxicity of amphetamines: an update. **Arch Toxicology**, v. 86, p. 1167–1231, 2012.

- CHASIN, A. A. da M.; SILVA, E. S. da; CARVALHO, V. M. Estimulantes do Sistema Nervoso Central. **Fundamentos de Toxicologia**. April, p. 355–374, 2008.
- CHIAPPIN, Silvia et al. Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. **Clinica Chimica Acta**. V. 383, n. 1–2, p. 30–40, 2007.
- CONCHEIRO, Marta et al. High-throughput simultaneous analysis of buprenorphine, methadone, cocaine, opiates, nicotine, and metabolites in oral fluid by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. V. 398, n. 2, p. 915–924, 2010.
- CONE, Edward et al. Cocaine Disposition in Saliva Following Intravenous, Intranasal, and Smoked Administration. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 21, 1997.
- CONE, Edward J; HUESTIS, Marilyn A. Interpretation of Oral Fluid Tests for Drugs of Abuse. **New York Academy of Sciences**. V. 103, p. 51–103, 2007.
- COPELAND, Jan; DILLON, Paul. The health and psycho-social consequences of ketamine use. **International Journal of Drug Policy**. V. 16, n. 2, p. 122–131, 2005.
- CRUICKSHANK, Christopher C; DYER, Kyle R. A review of the clinical pharmacology of methamphetamine. **Addiction**. v. 2, p. 1085–1099, 2009.
- CRUZ, Angelines et al. Confirmation by LC – MS of drugs in oral fluid obtained from roadside testing. [s. l.], v. 170, p. 156–162, 2007.
- CRUZ, Fábio et al. Anfetamina e derivados. In: DA MARTINIS, Bruno Spinosa D.; DORTA, Daniel J.; COSTA, José Luiz. **Toxicologia forense**. Editora Blucher, 2018.
- DA CUNHA, Kelly Francisco et al. Prevalence of new psychoactive substances (NPS) in Brazil based on oral fluid analysis of samples collected at electronic music festivals and parties. **Drug and Alcohol Dependence**. V. 227, agosto, 2021.
- DA CUNHA, Kelly Francisco et al. Screening of 104 new psychoactive substances (NPS) and other drugs of abuse in oral fluid by LC–MS–MS. **Journal of Analytical Toxicology**. V. 44, n. 7, p. 697–707, 2020.
- DAMS, Riet et al. Oral fluid as an alternative matrix to monitor opiate and cocaine use in substance-abuse treatment patients. **Drug and Alcohol Dependence**. v. 87, p. 258–267, 2007.
- DARYANAVARD, Seyed Mosayeb et al. Recent applications of microextraction sample preparation techniques in biological samples analysis. **Biomedical Chromatography**. p. 1–31, fevereiro, 2021.
- DESHARNAIS, Brigitte et al. A threshold LC – MS / MS method for 92 analytes in oral fluid collected with the Quantisal device. **Forensic Science International**. V. 317, setembro, 2020.

DESROSIERS, Nathalie A.; HUESTIS, Marilyn A. Oral Fluid Drug Testing: Analytical Approaches, Issues and Interpretation of Results. **Journal of Analytical Toxicology**, [s. l.], v. 43, n. 6, p. 415–443, 2019.

DI CORCIA, D. et al. Determination of pharmaceutical and illicit drugs in oral fluid by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, [s. l.], v. 927, p. 133–141, 2013.

DI FAZIO, Vincent *et al.* Driving under the influence of cocaine: Quantitative determination of basic drugs in oral fluid obtained during roadside controls and a controlled study with cocaine users. **Drug Testing and Analysis**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 1285–1296, 2018.

DI RAGO, Matthew et al. Ultra-rapid targeted analysis of 40 drugs of abuse in oral fluid by LC-MS/MS using carbon-13 isotopes of methamphetamine and MDMA to reduce detector saturation. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 408, p. 3737-3749, 2016.

DINIS-OLIVEIRA, Ricardo. Metabolism and metabolomics of ketamine: a toxicological approach. **Forensic Sciences Research**, v. 2, p. 2-10, 2017.

DRUMMER, Olaf H. Drug testing in oral fluid. **The Clinical biochemist. Reviews**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 147–159, 2006.

ELLEFSSEN, Kayla N et al. Oral fluid cocaine and benzoylecgonine concentrations following controlled intravenous cocaine administration. **Forensic Science International**, [s. l.], v. 260, p. 95–101, 2016.

ELMONGY, Hatem; ABDEL-REHIM, Mohamed. Trends in Analytical Chemistry Saliva as an alternative specimen to plasma for drug bioanalysis : A review. **Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 83, p. 70–79, 2016.

ESTEVE-TURRILLAS, Francesc A; ARMENTA, Sergio; GUARDIA, Miguel De. Sample preparation strategies for the determination of psychoactive substances in biological fluids. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1633, p. 461615, 2020.

FERNÁNDEZ, P et al. Simultaneous determination of 20 drugs of abuse in oral fluid using ultrasound-assisted dispersive liquid – liquid microextraction. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. V. 411, p. 193–203, 2019.

FIORENTIN, Taís Regina et al. Simultaneous determination of cocaine/crack and its metabolites in oral fluid, urine and plasma by liquid chromatography-mass spectrometry and its application in drug users. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, [s. l.], v. 86, n. April, p. 60–66, 2017.

FIORENTIN, Taís Regina et al. Simultaneous determination of cocaine/crack and its metabolites in oral fluid, urine and plasma by liquid chromatography-mass spectrometry and its application in drug users. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, [s. l.], v. 86, n. April, p. 60–66, 2017.

FLANAGAN, Robert J. Developing an analytical toxicology service: Principles and guidance. **Toxicological Reviews**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 251–263, 2004.

FLANAGAN, Robert J. et al. Sample Collection, Transport, and Storage. In: FLANAGAN, Robert J. et al. (org.). **Fundamentals of Analytical Toxicology**. 2aed. [S. l.: s. n.], 2020. p. 23–48.

FRITCH, Dean et al. Identification and Quantitation of Amphetamines, Cocaine, Opiates, and Phencyclidine in Oral Fluid by Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Analytical Toxicology**. V. 33, n. December, p. 9–11, 2009.

GALLARDO, E; BARROSO, M; QUEIROZ, J. A. Current technologies and considerations for drug bioanalysis in oral fluid. **Bioanalysis**. V. 3, p. 637-667, 2009.

GOLDSTEIN, Rachel A et al. Cocaine : History , Social Implications , and Toxicity — A Review. **Seminars in Diagnostic Pathology**. V. 55, n. 1, p. 10-17, 2009.

GORZIZA R, et al. Extraction of dried oral fluid spots (DOFS) for the identification of drugs of abuse using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS / MS). **Forensic Chemistry**, v. 19, 2020.

GREGORIO, Danilo et al. Hallucinogens in Mental Health: Preclinical and Clinical Studies on LSD, Psilocybin, MDMA, and Ketamine. **The Journal of Neuroscience**, v. 41, p. 891-900, 2021.

HARRIS, Daniel. **Análise Química Quantitativa**. Editora: Grupo Editorial Nacional. 2012.

Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). **GBD Results**. Seattle, WA: IHME, University of Washington, 2020.

Instituto Nacional De Ciência e Tecnologia Para Políticas Públicas de Álcool e Outras Drogas. Inpad. **III Levantamento Nacional sobre o uso de drogas pela população brasileira (III LNUD)**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ. 2017.

ISENSCHMID D. S. Cocaine. In: Levine Barry S.; Kerrigan Sarah. **Principles of Forensic Toxicology**. 5. Ed. Springer. 2020. P. 371 – 387.

JACQUES ALB, et al. Dried matrix spots: an evolving trend in the toxicological field. **Forensic Science, Medicine and Pathology**, v. 18, p. 86-102, 2022.

JAYANTHI, Subramaniam; DAIWILE, Atul P; CADET, Jean Lud. Neurotoxicity of methamphetamine : Main effects and mechanisms. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 344, n. March, p. 113795, 2021.

KAHL, Júlia Martinelli Magalhães et al. Quantification of amphetamine and derivatives in oral fluid by dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography—tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 196, p. 3–9, 2021.

KALA, Subbarao et al. Validation of Analysis os Amphetamines, Opiates, Phencyclidine, Cocaine, and Benzoylecgonie in Oral Fluids by Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 32, 2008.

KEVIL, Christopher et al. Methamphetamine Use and Cardiovascular Disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 39, p. 1739 – 1746, 2019.

KIM, S et al. **PubChem** in 2021: new data content and improved web interfaces. *Nucleic Acids Res.*, 49(D1), D1388–D1395, 2020.

KRAEMER, Thomas; MAURER, Hans H. Toxicokinetics of Amphetamines: Metabolism and Toxicokinetic Data of Designer Drugs, Amphetamine, Methamphetamine, and Their N-Alkyl Derivatives. **Therapeutic Drug Monitoring**. V. 24, p. 277–289, 2002.

LANGEL, Kaarina et al. A validated method for the detection and quantitation of 50 drugs of abuse and medicinal drugs in oral fluid by gas chromatography – mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, [s. l.], v. 879, n. 13–14, p. 859–870, 2011.

LANGEL, Kaarina et al. Comparison of drug concentrations between whole blood and oral fluid. **Drug Testing and Analysis**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. 461–471, 2014.

LAURA, Ana; JACQUES, Bemvenuti; AL, Jacques E T. Development and Validation of a Method Using Dried Oral Fluid Spot to Determine Drugs of Abuse. **Journal of Forensic Sciences**. V. 64, n. 6, p. 1906–1912, 2019.

LILLSUNDE, Pirjo. Analytical Techniques for Drug Detection in Oral Fluid. **Therapeutic Drug Monitoring**. V. 30, n. 2, p. 181–187, 2008.

LIU, Yu et al. Ketamine abuse potential and use disorder. **Brain Research Bulletin**. V. 126, p. 68-73, 2016.

LODGE, D e MARCIER, MS. Ketamine and phencyclidine: the good, the bad and the unexpected. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, p. 4254-4276, 2015.

LUETHI, Dino e LIECHTI, Matthias. Designer drugs: mechanism of action and adverse effects. **Archives of Toxicology**, v. 94, p. 1085-1133, 2020.

MALACA, Sara et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Dilute and shoot ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC – MS / MS) analysis of psychoactive drugs in oral fluid. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 170, p. 63–67, 2019

MAURER, Hans H. Advances in analytical toxicology: The current role of liquid chromatography-mass spectrometry in drug quantification in blood and oral fluid. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 381, n. 1, p. 110–118, 2005.

MAURER, Hans H; SAUER, Christoph; THEOBALD, Denis S. Toxicokinetics of Drugs of Abuse: Current Knowledge of the Isoenzymes Involved in the Human Metabolism and Codeine. **Therapeutic Drug Monitoring**. V. 28, n. 3, p. 447–453, 2006.

MERCIER, Benoit et al. Online SPE UPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of 33 psychoactive drugs from swab-collected human oral fluid samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 414, p. 4203-4215, 2022.

MEYER, Markus R; MAURER, Hans H. Absorption, distribution, metabolism and excretion pharmacogenomics of drugs of abuse Review. **Pharmacogenomics**. V. 12, p. 215–233, 2011.

MOHAMED, Khaled M et al. Article A GC – MS Method for Detection and Quantification of Cathine, Cathinone, Methcathinone and Ephedrine in Oral Fluid. **Journal of Chromatographic Science**. V. 54, n. 8, p. 1271–1276, 2016.

MONTESANO, Camilla et al. Determination of illicit drugs and metabolites in oral fluid by microextraction on packed sorbent coupled with lc-ms/ms. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 407, n. 13, p. 3647–3658, 2015.

MOORE, Christine. Oral fluid for workplace drug testing: Laboratory implementation. **Drug Testing and Analysis**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 89–93, 2012.

NATONIEWSKA, K., 2018. TECHNICAL REPORT - Monitoring drug use in recreational settings across Europe: conceptual, **European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction**.

NIDA. What is Cocaine?. **National Institute on Drug Abuse website**. Disponível em: <https://nida.nih.gov/publications/research-reports/cocaine/what-cocaine>. Acesso em 15 de julho, 2022.

OLIVEIRA, N. G., & DINIS-OLIVEIRA, R. J. Drugs of abuse from a different toxicological perspective: an updated review of cocaine genotoxicity. **Archives of Toxicology**, 2018.

PASCUAL-CARO, Sergi et al. Trends in Analytical Chemistry Recent chromatographic and electrophoretic based methods for determining drugs of abuse in urine and oral fluid : A review from 2018 to June 2021. **Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 156, p. 116705, 2022.

RASMUSSEN, Nicolas. Amphetamine-Type Stimulants : The Early History of Their Medical and Nonmedical Uses. 1. ed. [S. l.]: **Elsevier Inc.**, [s. d.].

RASMUSSEN, Nicolas. Medical Science and the Military : The Allies ' Use of Amphetamine during World War II. [s. l.], v. 2, p. 205–233, 2011.

REMANE, Daniela; WISSENBAACH, Dirk K; PETERS, Frank T. Recent advances of liquid chromatography – (tandem mass spectrometry in clinical and forensic toxicology — An update. **Clinical Biochemistry**, [s. l.], v. 49, n. 13–14, p. 1051–1071, 2016.

ROQUE BRAVO, Rita et al. Cocaine: An Updated Overview on Chemistry, Detection, Biokinetics, and Pharmacotoxicological Aspects including Abuse Pattern. [S. l.: s. n.], 2022.

SAUSSEREAU E, et al. On-line liquid chromatography / tandem mass spectrometry

simultaneous determination of opiates , cocaine and amphetamines in dried blood spots. **Journal of Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.**, v. 15, p. 1–7, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.11.035>

SCHEIDWEILER, Karl et al. Pharmacokinetics of Cocaine and Metabolites in Human Oral Fluid and Correlation with Plasma Concentrations following Controlled Administration. **Ther Drug Monit.**, v. 32, p. 628 – 637, 2010.

SCHULZE, H et al. Driving Under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines in Europe—findings from the DRUID project. [S. l.: s. n.], 2012.

SCHWENK, Eric et al. Ketamine in the Past, Present, and Future: Mechanisms, Metabolites, and Toxicity. **Current Pain and Headache Reports**, p. 25-57, 2021.

SIMÕES, SS; CASTA A; DIAS MJ. Dried blood spots combined to an UPLC – MS / MS method for the simultaneous determination of drugs of abuse in forensic toxicology. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 634–644, 2018.

STEINBUCHER, Petra; GREENHILL, Laurence. Stimulants: Definition, Pharmacology, Indications, Side Effects, and Treatment Strategies. In: **NEUROPSYCHOPHARMACOTHERAPY**. [S. l.: s. n.], 2020. p. 1–29.

STIMPFL, T. Extraction. In: MOFFAT, Anthony; OSSELTON, David; WIDDOP, Brian. **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons**. Editora: Pharmaceutical Press, 4ª edição, 2011.

TEY, Hui Yin; SEE, Hong Heng. A review of recent advances in microsampling techniques of biological fluids for therapeutic drug monitoring. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], p. 461731, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461731>.

THOMAIDIS, Nikolaos et al. Reflection of Socioeconomic Changes in Wastewater: Licit and Illicit Drug Use Patterns. **Environmental Science & Technology**, v. 50, p. 10065–10072, 2016.

TORRE, Rafael De. Human Pharmacology of MDMA Pharmacokinetics , Metabolism , and Disposition. **Therapeutic Drug Monitoring**. V. 26, n. 2, p. 137–144, 2004.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. UNODC. **World Drug Report 2021**. Viena: United Nations Publications, 2021.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. UNODC. **World Drug Report 2020**. Viena: United Nations Publications, 2020.

US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES et al. Mandatory guidelines for federal workplace drug testing programs-oral/fluid. **Federal Register**, v. 84, n. 207, p. 57554-57600, 2019.

VALEN, Anja et al. Determination of 21 drugs in oral fluid using fully automated supported liquid extraction and UHPLC-MS/MS. **Drug Testing and Analysis**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 808–823, 2017.

VEITENHEIMER, Allison M; WAGNER, Jarrad R. Evaluation of oral fluid as a specimen for DUI. **Journal of Analytical Toxicology**, [s. l.], v. 41, n. 6, p. 517–522, 2017.

VERSTRAETE, Alain G. Detection Times of Drugs of Abuse in Blood, Urine, and Oral Fluid. **Therapeutic Drug Monitoring**. V. 26, n. 2, p. 200–205, 2004.

WATSOM, D. Mass Spectrometry. In: MOFFAT, Anthony; OSSELTON, David; WIDDOP, Brian. **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons**. Editora: Pharmaceutical Press, 4ª edição, 2011.

WILLE, Sarah et al. Relationship Between Oral Fluid and Blood Concentrations of Drugs of Abuse in Drivers Suspected of Driving Under the Influence of Drugs. **Ther Drug Monit.**, v. 31, p. 511–519, 2009.

WILLE, Sarah M.R. et al. Trends in drug testing in oral fluid and hair as alternative matrices. **Bioanalysis**. V. 6, 2014.

WISHART, DS et al. **DrugBank 5.0**: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res.* 2017 Nov 8. doi: 10.1093/nar/gkx1037.

WOŹNIAK, Mateusz Kacper et al. Application of gas chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of amphetamine-type stimulants in blood and urine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 148, p. 58–64, 2018.

YONAMINE, Mauricio et al. Detecting Alcohol and Illicit Drugs in Oral Fluid Samples Collected from Truck Drivers in the State of São Paulo, Brazil. **Traffic Injury Prevention**. V. 14, n. 2, p. 127–131, 2013.

ZHENG, Yufang; SPARVE, Erik; BERGSTRÖM, Mats. A simple validated multi-method for detecting drugs in oral fluid by Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS). **Drug Test. Anal.**, v. 10, p. 1001-1008, 2018.

ZIMMER, Jennifer S.D. et al. Recent advances in the bioanalytical applications of dried matrix spotting for the analysis of drugs and their metabolites. **Bioanalysis**. V. 5, 2013.

4. MANUSCRITO

O manuscrito “**An analytical approach for the determination of drugs of abuse in oral fluid using dried oral fluid spot assisted by 24-well plate and LC–MS/MS**”, que conta com a parte experimental desenvolvida nesta dissertação, foi submetido para publicação na revista *Forensic Toxicology* (ISSN 0915-9606; fator de impacto 4,096, 2022; qualis A2) e está apresentado a seguir. As normas de publicação da revista mencionada estão disponíveis no Anexo II.

An analytical approach for the determination of drugs of abuse in oral fluid using dried oral fluid spot assisted by 24-well plate and LC–MS/MS

Gabriela Ramos Borges^{1,2}, Bruno Pereira dos Santos^{1,2,3}, Giovanna Cristiano de Gouveia^{1,2}, Carolina Silveira Dalanhol^{1,2,3}, Juliana Scherer², Sarah Eller¹, Tiago Franco de Oliveira^{1*}

¹ Graduate Program in Health Sciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil

² Center for Drug and Alcohol Research and Collaborating Center on Alcohol and Drugs, Porto Alegre, RS, 90035-903, Brazil

³ Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 90010-150, Brazil

*Corresponding Author (T. F. Oliveira)

E-mail address: oliveira@ufcspa.edu.br

Abstract

Purpose In this work was develop and validate a new bioanalytical method using dried oral fluid spot (DOFS) for the determination of cocaine, benzoylecgonine, ecgonine methyl ester, cocaethylene, hydroxycocaine, amphetamine, methamphetamine, MDMA, MDA, MDEA, fenproporex, phencyclidine, and ketamine in oral fluid by liquid chromatography – tandem mass spectrometry.

Methods Samples were collected by expectoration process and diluted 1:1 in ultrapure water. The extraction parameters of dried oral fluid spot (DOFS) were optimized by multivariate and univariate experiments. Then, 100 µL of samples were pipetted on the filter paper, dried for 60 min, and extracted with 250 µL of a mixture of acetonitrile and methanol (1:3). The complete extraction process was performed in 24-well plate. The method was validated following the recommendations of ANSI/ASB Standard 036 and after validation, 86 real samples of oral fluid were analyzed.

Results The calibration curves were constructed in a range of 1 or 5 to 100 ng/mL and the coefficients of determination (r^2) were higher than 0.99 for all analytes. The limits obtained ranged from 1 to 5 ng/mL; Within-run precision were from 3.05 to 13.01%; Between-run precision were from 1.97 to 8.13%; Bias ranged between -19.7 and 9.6%; Ionization suppression/enhancement study were -16.20 to 16.60%. From a total of analyzed samples, 86% were considered positive.

Conclusions This study demonstrated that the proposed method was successfully validated, confirming a new bioanalytical alternative for the analysis of drugs of abuse in oral fluid by dried oral fluid spot.

Keywords Oral fluid, Stimulant substances, New psychoactive substances, Dried oral fluid spot, LC–MS/MS.

Introduction

Drug use is directly associated with mental health disorders, hepatitis-related liver cancer and cirrhosis, overdose, and premature death [1]. Stimulant substances like cocaine and amphetamines are considered the most used drugs of abuse due to their effects such as euphoria, reduced sleep and fatigue, and increased sociability [2,3]. In the other hand, other substances such as phencyclidine (PCP) and its derivatives also represent a considerable impact on the global scenario [4,5]. A recent study shown that ketamine was one of the “designer drugs” most frequently used during electronic music festivals and parties [6].

Generally, blood and urine are the most used matrices in toxicological analyses. However, in recent years, the oral fluid has been considered one of the most promising matrices for the evaluation of recent drug use [7-9]. Analysis, such as forensic, doping control [10], testing in suspected cases of driving under the influence of drugs (DUID) [11-13], in the workplace [14] and therapeutic monitoring [15] are some of the most frequently reported applications of oral fluid samples. It consists of the fluid collected from the oral cavity and is composed of water, proteins, epithelial cells, bacteria, food residues and traces of drugs from the secreted saliva [16]. Oral fluid collection can be easily and safely performed, besides that, is considerate non-invasively and without pain promotion or embarrassment to the patient, representing important advantages compared to conventional matrices [17,18]. Furthermore, several studies demonstrate a correlation between drug concentrations in oral fluid and plasma samples [19,20]. Nevertheless, the results interpretation must be performed with carefulness, due to the possibility of contamination from the oral cavity in cases where the substance is smoked, administered intranasally or orally [21,22]. Moreover, the sample volume available for collection is

reduced (approximately 1 mL) and the substances concentrations in oral fluid are usually lower than in blood and urine, which requires sensitive analytical techniques [17, 22,23,].

Conventional techniques such as simple dilution, protein precipitation, solid phase extraction (SPE), and liquid-liquid extraction (LLE) are the most employed in oral fluid samples [22,23]. In this context, the reduced sample volume and the low concentrations of analytes promote some techniques very attractive. The dried spot technique is included in this scenario, once presents several advantages such as increased stability, the use of small amounts of sample (50-250 µL) and organic solvents, and the low cost of the procedure [24,25,26]. Almeida *et al.* [27] demonstrated that cocaine and cocaethylene remained stable (< 20% of loss) for 7 days at room temperature, while benzoylecgonine has been at least 136 days of stability [27]. Despite being a viable option for the determination of drugs of abuse in oral fluid, few studies explore this application of the dried oral fluid spot (DOFS).

Considering the wide possibility of application of oral fluid in toxicological analyses, this study aimed to develop and validate a new analytical approach for the determination of cocaine, benzoylecgonine, ecgonine methyl ester (EME), cocaethylene, hydroxycocaine, amphetamine, methamphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), 3,4-methylenedioxyamphetamin (MDA), 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDEA), fenproporex, ketamine and phencyclidine (PCP) in oral fluid using DOFS assisted by 24-well plate and liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC–MS/MS).

Materials and methods

Standards, reagents, and materials

Benzoylecgonine, cocaine, cocaethylene, EME, ketamine, MDA, methamphetamine, MDEA, and PCP (1 mg/mL) certified reference materials were obtained from LGC Standards (Manchester, HH, USA). Amphetamine, fenproporex hydrochloride, hydroxycocaine, and MDMA (1 mg/mL) were purchased from Cerilliant Corporation (Round Rock, TX, USA). The internal standards (IS) amphetamine-*d*₅, benzoylecgonine-*d*₃, cocaine-*d*₃, 3,4-methylenedioxymethamphetamine-*d*₅, ketamine-*d*₄, and phencyclidine-*d*₅ (1 mg/mL) were obtained from Cerilliant Corporation (Round Rock, TX, USA). All reference standards were > 99% purity. LC–MS grade solvents, methanol, and acetonitrile were purchased from Merck (Darmstadt, Germany) while 98% purity formic acid was obtained from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Water was purified using a Milli-Q system (Millipore, Billerica, MA, USA). The 24-well plates purchased from Kasvi (Paraná, Brazil). Quantitative filter paper 12.5 cm in diameter and 85 g in weight were obtained from Unifil (Paraná, Brazil).

Stock solution preparation

The stock solution was prepared in acetonitrile at a concentration of 10 µg/mL. The working solutions were prepared directly in oral fluid by diluting stock standard solutions at concentrations of 50 ng/mL and 1000 ng/mL. To minimize the matrix effect, further dilutions were performed in blank oral fluid. The IS were added to the extractor solution to a final concentration of 50 ng/mL in each well. All solutions were stored at -20 °C.

Oral fluid samples

Drug-free oral fluid samples were provided by laboratory staff and were used during all validation experiments. Samples from all donors were mixed in a single tube. The pool was maintained in the refrigerator at approximately 6 °C.

Authentic oral fluid samples were provided by the *Centro de Pesquisa em Álcool e Drogas* at *Hospital de Clínicas de Porto Alegre*. The samples were collected in hospital emergencies at different care centers. Biological samples were collected from only patients with suspected of cocaine intoxication and/or relapsed drug addict. These samples were collected by spitting and were subsequently stored at -80 °C until analysis. The protocol of study has been previously approved by the ethics committee of the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* (Ethics Protocol Approval; NCAAE 31044714100005327).

Experimental Dried Oral Fluid Spot/24-well plate procedure

The drug-free oral fluid pool was centrifuged for 5 min at 10,000 rpm. The supernatant was collected and diluted 1:1 ratio in ultrapure water. Afterward, the oral fluid was fortified with the analytes. All necessary dilutions were performed directly in the blank oral fluid to minimize possible variations resulting from the matrix effect.

The 24-well plates were in house developed. Therefore, four layers of filter paper, measuring 16 mm in diameter, were cut uniformly (with the aid of a circular cutter), and carefully placed at the bottom of each well.

The extraction procedure was optimized, and the best conditions were followed. Briefly, 100 µL of the sample was pipetted into each well. For the sample drying step, the plate was left at room temperature for 60 min. The solvent that showed the best efficiency in the extraction of analytes was a mixture containing acetonitrile and methanol (3:1, v/v).

Into each well, were pipetted 250 μ L of this mixture. The plates were shaken on an orbital shaker for 10 min at 100 rpm. After that, the total volume of the extract was pipetted into vials and 2 μ L were injected into the LC–MS/MS system.

Instrumental conditions

The analyses were performed in a Nexera-I LC-2040C Plus system coupled to an LCMS-8045 triple quadrupole mass spectrometer (Shimadzu, Japan). The chromatographic separation was achieved with a 100 x 2.1 mm i.d., 1.9 mm, Shim-pack GISS C₁₈ column (Shimadzu, Japan) eluted with a flow rate of 0.4 mL/min and 40 °C, with a gradient of 0.1% formic acid in water (A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (B) as follows: 0-2.5 min, 5-100% of B; 2.5-3.0 min, was kept 100% of B; 3.1-8.0 min, 100-5% of B. The electrospray parameters were set in the positive ion mode as follows: capillary voltage, 1500 V; desolvation line temperature, 250 °C; heating block temperature, 400 °C; drying gas flow, 10 L/min; and nebulizing gas flow, 3 L/min. Collision-induced dissociation was obtained with 230 kPa argon pressure. The analysis was performed in multiple reaction monitoring (MRM) mode. The optimized MRM transitions for all analytes are listed in Table 1. One quantifier transition and one qualifier transition were selected for each compound. For data evaluation, LabSolutions[®] software (Shimadzu, Japan) was used for the data treatment.

Optimization of the methodology proposed

In the optimization experiments, blank oral fluid samples were spiked with 50 ng/mL of each analyte. The optimization of the extraction solvent type was investigated by simplex-

centroid design, and the following solvents were tested (1) ultrapure water, (2) methanol, and (3) acetonitrile was studied.

A complete factorial design 2^{3-0} was applied to assess the influence of some variables on the proposed extraction method. Three variables were evaluated in two levels, and 8 experiments were performed. The variables included extraction time (5 and 15 min), shake speed (50 and 200 rpm), and extraction solvent volume (150 and 300 μL). The multivariate analysis was processed using the software Statistica 8.0 (Statsoft, Tulsa, OK, USA).

The influence of drying time was evaluated in triplicate by univariate optimization. Blank samples from the same source were extracted and dried under four different conditions: (1) after 10 min; (2) after 60 min; and (3) overnight drying (12h). The results were compared considering the chromatographic area obtained.

Method validation

The method described was fully validated following the Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology (ANSI/ASB 036) guideline [28]. The parameters evaluated were the lower limit of quantitation (LLOQ), linearity, carryover, precision, accuracy, ionization suppression/enhancement, interference studies, and dilution integrity. The LLOQ evaluated by analyzing nine replicates from three different blank matrix sources. The replicates were injected in decreasing concentrations until the coefficient of variation (CV) was below 20%. Linearity was investigated through the construction of calibration curves in five replicates at concentrations of 1, 5, 10, 25, 50, 75, and 100 ng/mL, for EME, cocaine, benzoylecgonine, hydroxycocaine, cocaethylene, methamphetamine, MDMA, MDEA, PCP, and ketamine. For amphetamine, MDA, and

fenproporex the calibration curves concentrations were 5, 10, 25, 50, 75, and 100 ng/mL. The determination coefficients (r^2) were calculated based in the calibration curves tested for heteroscedasticity previously. Carryover was evaluated by the injection of three blank samples immediately after the highest point of the calibration curves. For the precision and accuracy study, quality control (QC) samples were prepared at three levels: 3 ng/mL (low QC) for EME, COC, BE, CE, COC-OH, MET, MDMA, MDEA, PCP, and KET; 15 ng/mL (low QC) for AMP, MDA, and fenproporex; 40 ng/mL (medium QC) and 80 ng/mL (QC) for all analytes. Three replicates of each QC in five different runs were analyzed. Within-run and between-run precision were calculated using one-way analysis of variance (ANOVA). Two sets of experiments were performed for the ionization suppression/enhancement study. In the first set, two solutions of the analytical standards diluted in the mobile phase at QC concentrations (low and high) were injected six times. In the second set, duplicates of 10 blank matrices were fortified post-extraction also at low and high QC concentrations. Endogenous selectivity was evaluated using 10 blank matrices from different sources to verify the presence of interferents in the oral fluid. Exogenous selectivity was assessed by the addition of the following substances caffeine, codeine, carbamazepine, Δ^9 -tetrahydrocannabinol, morphine, nortriptyline, amitriptyline, venlafaxine, fluoxetine, sertraline, imipramine, levomepromazine, chlorpromazine, promethazine, haloperidol, diazepam, bromazepam, and alprazolam in 200 ng/mL. The study of dilution integrity was performed by the fortification of blank samples with a concentration of 150 ng/mL and 300 ng/mL concentration and dilution in a 1:2 and 1:10 ratio, respectively, with ultrapure water.

Results and discussion

Optimization of sample preparation conditions

A critical point in the development of efficient analytical techniques is the application of multivariate analyzes to evaluate the optimized parameters [29]. One of the most critical parameters in the sample pretreatment is the extracting solvent. The optimization of the extraction solvent choose was investigated by simplex-centroid design. The triangular surface, presented in Fig 1 was generated from the geometric means of the chromatographic areas of all analytes in each of the experiments. According to Fig 1, the region with the highest response is characterized by the biggest intensity of the red color, which corresponds to an equal of the three solvents evaluated. A mixture of methanol and acetonitrile (1:3, v/v) was considered the best efficient response to extract cocaine and its metabolites. The statistical model (special cubic) explains the results with a determination coefficient (R) of 0.8871.

Other parameters involved in the DOFS-24-well plate procedure were tested to determine if they were directly influencing the efficiency of the process. A complete factorial design 2^{3-0} was used to evaluate the influence of some variables on the proposed extraction method. Three variables were considered: extraction time (5 and 15 min), shake speed (50 and 200 rpm), and extraction solvent volume (150 and 300 μ L). The response applied to generate the Pareto chart was based on the geometric mean of the chromatographic peak areas of the analytes in each experiment, as shown in Fig 2. According to the ANOVA the determination coefficient obtained was 0.93046, which demonstrates that the mathematical model applied was appropriate. The Pareto chart shows the variables extraction time and solvent volume with a significant influence on the efficiency of the process. The use of smaller volumes of solvent showed better response. On the other hand, the longer extraction time (15 min) showed a better

analytical response. Therefore, the conditions used were defined to achieve the best analytical response and at the same time keep the proposed technique helpful.

Finally, the influence of DOFS drying time was univariately evaluated. Three different conditions were studied: (1) after 10 min; (2) after 60 min; and (3) overnight drying (12 h). The geometric mean of all analytes was used to determine the best condition., the result can be seen in Fig 3. According to the data obtained, the highest analytical response for all analytes was achieved with DOFS dried for 60 min, probably due to the increasing the incorporation of the matrix interferences in the paper. Therefore, the presence of interferents in the final extract was reduced, improving the efficiency of the extractive process. Jacques *et al.* [30] developed a DOFS method that uses sample and solvent volumes similar to the present study, the total drying time of the paper was evaluated through the weight difference. They found that the filter paper mass began to stabilize between 70 and 90 min, which complements the result of the optimization performed [30].

Method validation

The LLOQ values for COC, EME, BE, CE, and COC-OH, MET, MDMA, MDEA, PCP, and KET were 1 ng/mL. The substances AMP, MDA, and fenproporex presented LLOQ of 5 ng/mL. According to international guidelines, presented in Table 2, the LLOQ obtained is at least 8 times lower than the cutoff values established for COC and BE in oral fluid for confirmatory tests. Moreover, amphetamines showed LLOQ at least three times lower than the recommended cutoff. Cutoff values for ketamine and PCP in oral fluid are still under discussion for most institutions, however, SAMHSA guidelines set a cutoff of 2 ng/mL for PCP [11,31,32]. Considering the studies describe in the literature,

the limits (LOQ/LLOQ) presented ranged from 0.05 ng/mL to 40 ng/mL. Some research that presented a limit ≤ 1 ng/mL used a considered amount of sample or included an additional step such as the sample concentration by drying with nitrogen stream [33-38].

Regarding linearity, the calibration curves were considered linear for all analytes, with a variation between 0.9975 and 0.9997, the chromatograms obtained for each of the analytes can be seen in figure 4. The F-test was applied for analysis of variances to verify the heteroscedasticity phenomenon. In the concentration range of the calibration curve for all analytes (1 or 5 - 100 ng/mL), the heteroscedasticity was present. Weighted least squares linear regression was applied and the corresponding weighting factors are described in Table 3. No analytical signal of carryover was detected.

The interference studies consisted of the evaluation of endogenous and exogenous substances and the internal standards. No significantly analytical signal interfered with the retention times of the analytes. The ionization suppression/enhancement study was evaluated at two levels (low and high). The results of the ionization suppression/enhancement study can be found in Table 4. The low QC results ranged from -16.26% (MDEA) to 11.18% (COC). The high QC results ranged from -6.91% (MDA) to 16.60% (COC). The signal variations presented were possibly caused by the matrix effect. According to Matuszewski *et al.* [39] if the sensitivity of the method was considered satisfactory, the matrix effect does not represent a significantly negative influence [39]. Assuming that, the matrix effect promotes the same response to the calibration curves and samples, the concentration of the substance should not be affected. In addition, all substances showed suppression/enhancement of less than 25%, following the guideline recommendations.

The precision data (within and between-run) were performed in three different QC concentrations and calculated using one-way ANOVA with run as a grouping variable to

adequately account and combine for within and between-run effects. The precision results were expressed as relative standard deviation (RSD). The within-run precision ranged from 3.05% (medium CE QC) to 13.01% (low MDEA QC). The between-run precision ranged from 1.97% (medium COC-OH QC) to 8.34% (low MDMA QC). Thus, all analytes obtained RSD below 20%, as recommended by the guideline [28].

The bias (%) was estimated by the equation (grand mean of calculated concentration – nominal concentration)/nominal concentration x 100. The results for this parameter presented a variation between -19.1 (high PCP control) and 9.6% (medium EME control). According to guideline recommendations, the percentage of acceptable bias is $\pm 20\%$ [28]. The precision and accuracy data are described in Table 4 for all analytes.

Analysis of real samples

After full validation, 86 authentic oral fluid samples were analyzed for EME, cocaine, benzoylecgonine, hydroxycocaine, cocaethylene, amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, MDEA, fenproporex, phencyclidine, and ketamine. Of the total samples, 74 (86.04%) were positive for at least one of the substances.

Cocaine and BE were the analytes most frequently detected. Cocaine was detected in 74 samples (86.04%) with a median concentration of 53.6 ng/mL (range 1.4-1,258.0 ng/mL). Benzoylecgonine was detected in 51 samples (59.30%) with a median concentration of 14.0 ng/mL (range 1.3-167.0 ng/mL). EME was detected in 36 samples (41.8%) with a median concentration of 28.3 ng/mL (range 5.0-339.0 ng/mL). Cocaethylene was detected in 5 samples (5.8%) with a median concentration of 7.6 ng/mL (range 2.1-15.0 ng/mL). Hydroxycocaine was not detected. Cocaine and BE were

detected concomitantly in 68.9% of positive samples. In all EME positive samples, COC and BE were also detected. A total of 27% of positive samples were positive for COC only. Moreover, all positives for CE (n=5) were also positive for COC, BE, and EME simultaneously. The other analytes validated in this study were not found in any sample at concentrations higher than LLOQ.

Samples were collected from cocaine/crack users attended by health treatment centers. So, the time between the last drug administration and the collection of biological material was not controlled, which may explain the variations presented by the samples. In this work, it was not possible to establish a clear kinetic correlation between cocaine and its metabolites, but this is a topic that can be explored in future studies. However, the results obtained for cocaine follow the trend described in previous studies [40,41], with a predominance of COC followed by BE and EME, usually in lower concentrations.

Comparison with previously reported studies

Table 5 shows a compilation of studies in oral fluid that analyze at least one of the analytes studied in this work. According to the data analysis, most of the sample preparation methodologies used included simple dilution, protein precipitation, LLE or SPE. However, in recent years, the application of microextraction and more robust sample preparation techniques have been explored. Besides to the conventional sample preparation techniques, some studies used dispersive liquid-liquid microextraction, incubation, microextraction by packet sorbent, and DOFS [30,35,36,42-45]. Considering the stability study, Almeida *et al.* [27] demonstrated that BE presented a loss of 13.5% after 136 days of storage and stains at room temperature, COC and EC presented up to less than 20% in 7 days of storage. EME had a shorter stability time, only 3 days [27].

Another study demonstrated that AMP, KET, and BE showed minimal samples when stored in dried oral fluid patches at 6 °C for 35 days [35]. In studies carried out in blood, for 6 months the stability of AMP, MET, MDA, and MDMA were analyzed by dried blood spots and showed losses of less than 20% [46,47].

One of the challenges of analyzing drugs of abuse in oral fluid is the low concentrations present in oral fluid samples [22]. Also due to the low cutoff values in oral fluid, LC–MS/MS is the most used instrumentation, because it is more sensitive. Even in that context, the sample volumes used in the studies ranged from 50–500 µL, considering only LC–MS/MS techniques. The use of low amounts of sample is considered an important advantage because the average volume of oral fluid collected is 1 mL [17,23]. Most studies that used 100 µL or less of oral fluid contained a sample concentration step before injection, often evaporating the sample using nitrogen. Despite being a widely used technique, it adds cost and time to the extraction process, which may represent a disadvantage. The developed method makes it possible to obtain an LLOQ of 1 ng/mL or 5 ng/mL, using 100 µL of sample and without the analytes concentration step. Moreover, the use of a 24-well plate optimized the analysis time, allowing the extraction of 24 samples simultaneously, demonstrating the practical applicability in laboratory routines.

Conclusions

In this study, we developed a simple, low-cost, and sensitive technique for the analysis of drugs of abuse in oral fluid. DOFS was developed, optimized, fully validated, and applied to real samples of oral fluid demonstrating its applicability. Furthermore, the 24-well plate used during the extraction process reduced the analysis time considering that it is possible

to extract several samples simultaneously. Our results confirm the applicability of this methodology in different contexts of toxicological analysis in oral fluid.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the financial support from Coordination of Improvement of Personal Higher Education, Brazil [CAPES - Finance Code 001] and to *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* for provide the samples.

Declarations

Conflict of Interest

The authors declare that there are no financial interests or personal relationships that could configure conflict of interest in the publication of this work.

Ethical approval

This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

1. United Nations Office on Drugs and Crime (2021) Global Overview: Drug demand and drug supply. https://www.unodc.org/res/wdr2021/fiel/WDR21_Booklet_2.pdf. Accessed 20 Jul 2022
2. Luethi D and Liechti ME (2020) Designer drugs: mechanism of action and adverse effects. *Arch Toxicol* 94:1085-1133. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02693-7>
3. Roque Bravo R, Faria AC, Brito-Da-costa AM, et al (2022) Cocaine: An Updated Overview on Chemistry, Detection, Biokinetics, and Pharmacotoxicological Aspects including Abuse Pattern. *Toxins* 14:1-25. <https://doi.org/10.3390/toxins14040278>
4. Bokor G, Anderson PD (2014) Ketamine : An Update on Its Abuse. 27:582-586. <https://doi.org/10.1177/0897190014525754>
5. Schwenk ES, Pradhan B, Nalamasu R, Stolle L, Wainer IW, Cirullo M, Olson A, Pergolizzi JV, Torjman MC, Viscusi ER. (2021) Ketamine in the Past, Present, and Future: Mechanisms, Metabolites, and Toxicity. *Curr Pain Headache Rep* 57:1-10. <https://doi.org/10.1007/s11916-021-00977-w>
6. Cunha KF, Oliveira KD, Cardoso MS, et al (2021) Prevalence of new psychoactive substances (NPS) in Brazil based on oral fluid analysis of samples collected at electronic music festivals and parties. *Drug Alcohol Depend* 227:108962. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2021.108962>
7. Maurer HH (2005) Advances in analytical toxicology: the current role of liquid chromatography-mass spectrometry in drug quantification in blood and oral fluid. *Anal Bioanal Chem*. 381: 110-118. <https://doi.org/10.1007/s00216-004-2774-z>
8. Drummer OH (2006) Drug testing in oral fluid. *Clin Biochem Rev* 27:147-59.
9. Bosker WM, Huestis MA (2009) Oral fluid testing for drugs of abuse. *Clin Chem* 55:1910-1931. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.108670>
10. Anizan S, Huestis MA (2014) The potential role of oral fluid in antidoping testing. *Clin Chem* 60:307-22. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.209676>.
11. Schulze H, Schumacher M, Urmeew R, et al (2012) Driving Under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines in Europe-findings from the DRUID project. https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/743/TDXA12006ENN_402402.pdf. Accessed 18 Jul 2022

12. Veitenheimer AM, Wagner JR (2017) Evaluation of oral fluid as a specimen for DUI. *J Anal Toxicol* 41:517-522. <https://doi.org/10.1093/jat/bkx036>
13. Bombana SH, Gjerde H, Filonzi M, et al (2020) Prevalence of drugs in oral fluid from truck drivers in Brazilian highways. *Forensic Sci Int* 273:140-143. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.02.023>
14. Moore C (2012) Oral fluid for workplace drug testing: Laboratory implementation. *Drug Test Anal* 4:89-93. <https://doi.org/10.1002/dta.322>
15. Tey HY, See HH (2020) A review of recent advances in microsampling techniques of biological fluids for therapeutic drug monitoring. *J Chromatogr A* 461731. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461731>
16. Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, De Palo EF (2007) Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clin Chim Acta* 383:30-40. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.04.011>
17. de Campos EG, da Costa BRB, dos Santos FS et al. (2022) Alternative matrices in forensic toxicology: a critical review. *Forensic Toxicol* 40:1-18. <https://doi.org/10.1007/s11419-021-00596-5>
18. Lillsunde P (2008) Analytical Techniques for Drug Detection in Oral Fluid. *Ther Drug Monit* 30:181-187. <https://doi.org/10.1097/FTD.0b013e3181685088>
19. Langel K, Gjerde H, Favretto D, et al (2014) Comparison of drug concentrations between whole blood and oral fluid. *Drug Test Anal* 6:461-471. <https://doi.org/10.1002/dta.1532>
20. Elmongy H, Abdel-rehim M (2016) Saliva as an alternative specimen to plasma for drug bioanalysis: A review. *Trends Anal Chem* 83:70-79. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.07.010>
21. Cone EJ, Huestis MA (2007) Interpretation of Oral Fluid Tests for Drugs of Abuse. 103:51-103. <https://doi.org/10.1196/annals.1384.037>
22. Desrosiers NA, Huestis MA (2019) Oral Fluid Drug Testing: Analytical Approaches, Issues and Interpretation of Results. *J Anal Toxicol* 43:415-443. <https://doi.org/10.1093/jat/bkz048>
23. Pascual-caro S, Borrull F, Calull M, Aguilar C (2022) Recent chromatographic and electrophoretic based methods for determining drugs of abuse in urine and oral fluid: A review from 2018 to June 2021. *Trends Anal Chem* 156:116705. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116705>

24. Jacques ALB, Santos MK, Gorziza RP, Limberger RP (2022) Dried matrix spots: an evolving trend in the toxicological field. *Forensic Sci Med* 18:86-102. <https://doi.org/10.1007/s12024-021-00434-5>
25. Zimmer JSD, Christianson CD, Johnson CJL, Needham SR (2013) Recent advances in the bioanalytical applications of dried matrix spotting for the analysis of drugs and their metabolites. *Bioanalysis* 5:2581-2588. <https://doi.org/10.4155/bio.13.214>
26. Stove CP, Ingels ASME, de Kesel PMM, Lambert WE (2012) Dried blood spots in toxicology: from the cradle to the grave? *Crit Rev Toxicol* 42:230-243. <https://doi.org/10.3109/10408444.2011.650790>
27. Almeida E, Soares S, Gonçalves J, Rosado T, Fernández N, Rodilla JM, Passarinha LA, Barroso M, Gallardo E (2022) Stability of Cocaine, Opiates, and Metabolites in Dried Saliva Spots. *Molecules* 27:641. <https://doi.org/10.3390/molecules27030641>
28. Springs C (2019) ANSI/ASB Standard 036, First Edition Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. https://www.aafs.org/sites/default/files/media/documents/036_Std_e1.pff. Accessed 18 Jul 2022
29. Ferreira SLC, Lemos VA, Carvalho VS De, et al (2018) Multivariate optimization techniques in analytical chemistry - an overview. *Microchemical Journal* 140:176-182. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.04.002>
30. Jacques ALB, et al. (2019) Development and Validation of a Method Using Dried Oral Fluid Spot to Determine Drugs of Abuse. *J Forensic Sci* 64:1906-1912. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.14112>
31. US Department of Health and Human Services. (2019). Mandatory guidelines for federal workplace drug testing programs-oral/fluid. Federal Register, 84(207), 57554-57600.
32. European Workplace Drug Testing Society (2015) European Guidelines for Workplace Drug Testing in Oral Fluid. <https://www.ewdts.org/data/uploads/documents/ewdts-oral-fluid-2015-05-29-v02.pdf>. Accessed 18 Jul 2022
33. Malaca S, Paolo F, Gottardi M, et al (2019) Dilute and shoot ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS) analysis of psychoactive drugs in oral fluid. *J Pharm Biomed Anal* 170:63-67. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.02.039>

34. Bassotti E, Maria G, Urso AD, et al (2020) A new LC–MS/MS confirmation method for the determination of 17 drugs of abuse in oral fluid and its application to real samples. *Forensic Sci Int* 312:110330 <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110330>
35. Gorziza R, Cox J, Pereira R, Arroyo-mora LE (2020) Extraction of dried oral fluid spots (DOFS) for the identification of drugs of abuse using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC–MS/MS). *Forensic Chem* 19:100254. <https://doi.org/10.1016/j.forc.2020.100254>
36. Ares AM, Fernández P, Regenjo M, et al (2017) A fast bioanalytical method based on microextraction by packed sorbent and UPLC–MS/MS for determining new psychoactive substances in oral fluid. *Talanta* 174:454-461. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.06.022>
37. Concheiro M, Gray TR, Shakleya DM, Huestis MA (2010) High-throughput simultaneous analysis of buprenorphine, methadone, cocaine, opiates, nicotine, and metabolites in oral fluid by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 398:915-24. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3903-5>
38. Dams R, Choo RE, Lambert WE, et al (2007) Oral fluid as an alternative matrix to monitor opiate and cocaine use in substance-abuse treatment patients. *Drug Alcohol Depend* 87:258-267. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2006.08.020>
39. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM (2003) Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC–MS/MS. *Analytical Chem* 75:3019-3030. <https://doi.org/10.1021/ac020361s>
40. Ellefsen KN, Concheiro M, Pirard S, et al (2016) Oral fluid cocaine and benzoylecgonine concentrations following controlled intravenous cocaine administration. *Forensic Sci Int* 260:95-101. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.01.013>
41. Scheidweiler KB, Kolbrich Spargo EA, Kelly TL, et al (2010) Pharmacokinetics of cocaine and metabolites in human oral fluid and correlation with plasma concentrations after controlled administration. *Ther Drug Monit* 32:628-637. <https://doi.org/10.1097/FTD.0b013e3181f2b729>
42. Desharnais B, Lajoie M, Laquerre J, et al (2020) A threshold LC–MS/MS method for 92 analytes in oral fluid collected with the Quantisal 1 device. *Forensic Sci In* 317:110506. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110506>

43. Fernández P, Regenjo M, Ares A, et al (2019) Simultaneous determination of 20 drugs of abuse in oral fluid using ultrasound-assisted dispersive liquid – liquid microextraction. *Anal Bioanal Chem* 411:193-203. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1428-5>
44. Martinelli J, Kahl M, Francisco K, et al (2021) Quantification of amphetamine and derivatives in oral fluid by dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 196:3-9. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.113928>
45. Montesano C, Simeoni MC, Curini R, Sergi M, Lo Sterzo C, Compagnone D (2015) Determination of illicit drugs and metabolites in oral fluid by microextraction on packed sorbent coupled with LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem.* 407:3647-3658. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8583-8>
46. Sausseureau E, Lacroix C, Gaulier JM, Goulle JP (2012) On-line liquid chromatography/tandem mass spectrometry simultaneous determination of opiates, cocaine and amphetamines in dried blood spots. *J. Chromatogr B: Anal Technol Biomed Life Sci* 886:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.11.035>
47. Simões SS, Casta A, Dias MJ (2018) Dried blood spots combined to an UPLC–MS/MS method for the simultaneous determination of drugs of abuse in forensic toxicology. *J Pharm Biomed Anal* 147:634-644. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.02.046>
48. Mercier B, Scala-Bertola J, Pape E, Kolodziej A, Gibaja V, Bisch M, Jouzeau JY, Gambier N (2022) Online SPE UPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of 33 psychoactive drugs from swab-collected human oral fluid samples. *Anal Bioanal Chem* 414:4203-4215. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04073-9>
49. Di Rago M, Chu M, Rodda LN, Jenkins E, Kotsos A, Gerostamoulos D (2016) Ultra-rapid targeted analysis of 40 drugs of abuse in oral fluid by LC-MS/MS using carbon-13 isotopes of methamphetamine and MDMA to reduce detector saturation. *Anal Bioanal Chem* 408:3737-49. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9458-3>
50. Di Trana A, Berardinelli D, Tini A, Zaami S (2022) The targeted analysis of New Psychoactive Substances in oral fluid through chromatographic-spectrometric methods: review of recent findings. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.*26:750-754. https://doi.org/10.26355/eurrev_202202_27982

51. Mohamed KM, Al-hazmi AH, Alasiri AM, Ali ME (2016) A GC–MS Method for Detection and Quantification of Cathine, Cathinone, Methcathinone and Ephedrine in Oral Fluid. *J Chromatogr Sci* 54:1271-1276. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw082>
52. Valen A, Leere ÅM, Strand DH, et al Determination of 21 drugs in oral fluid using fully automated supported liquid extraction and UHPLC-MS/MS. *Drug Test Anal* 9:808-823. <https://doi.org/10.1002/dta.2045>
53. Da Cunha KF, Oliveira KD, Huestis MA, Costa JL (2020) Screening of 104 new psychoactive substances (NPS) and other drugs of abuse in oral fluid by LC–MS-MS. *J Anal Toxicol* 44:697-707. <https://doi.org/10.1093/jat/bkaa089>

FIGURE LEGENDS

Fig. 1 Optimization of extraction solvent: triangular surface resulting from the simplex-centroid design.

Fig. 2 Pareto chart obtained from the complete factorial design 2^{3-0} for speed shake, solvent volume, and extraction time optimization.

Fig. 3 Optimization of drying time, the response was evaluated by the geometric mean of the chromatographic areas of all analytes under each of the conditions.

Fig. 4 Extracted ion, considering the quantify transition, obtained from the oral fluid samples spiked with ecgonine methyl ester (EME), cocaine (COC), benzoylecgonine (BE), cocaethylene (CE), hydroxycocaine (COC-OH), amphetamine (AMP), methamphetamine (MET), 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDEA), fenproporex (FENP), phencyclidine (PCP), and ketamine (KET) in the concentration of 10 ng/mL.

Fig. 1

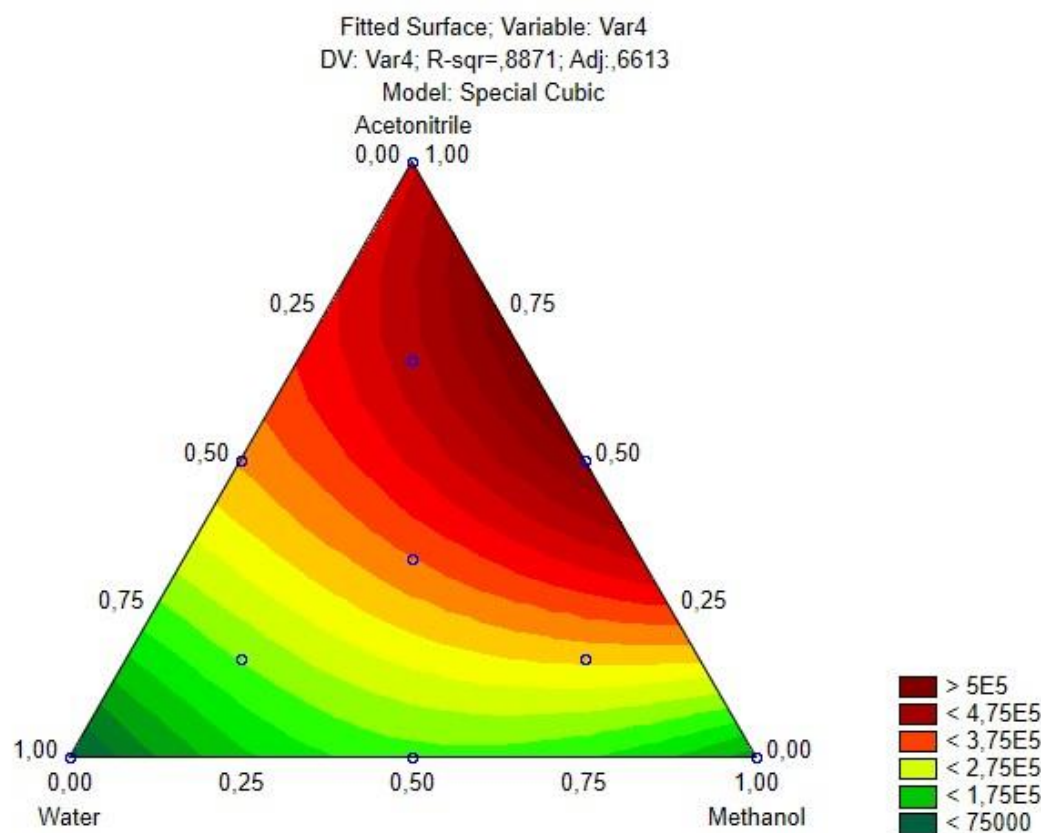


Fig. 2

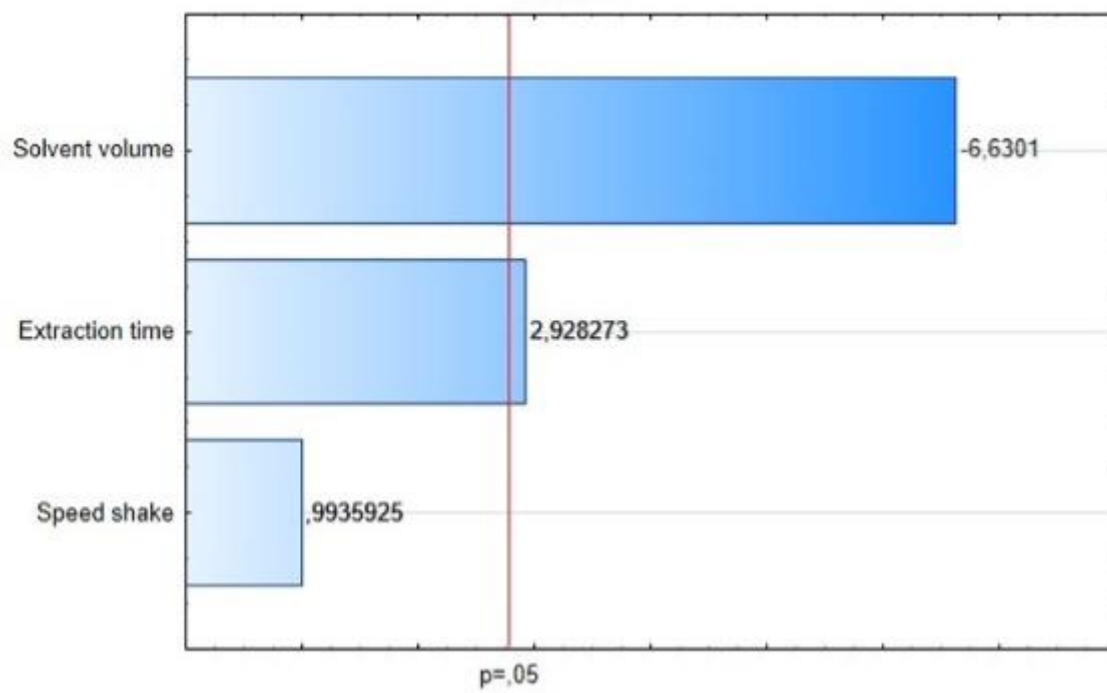


Fig. 3

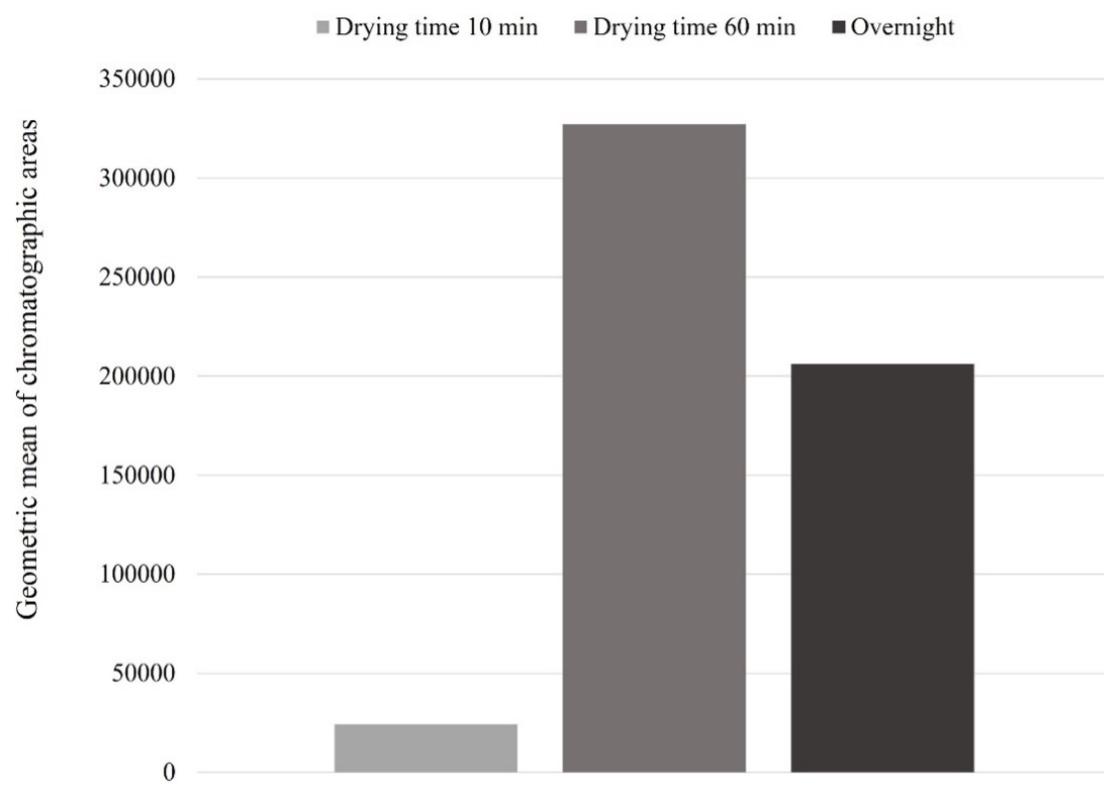
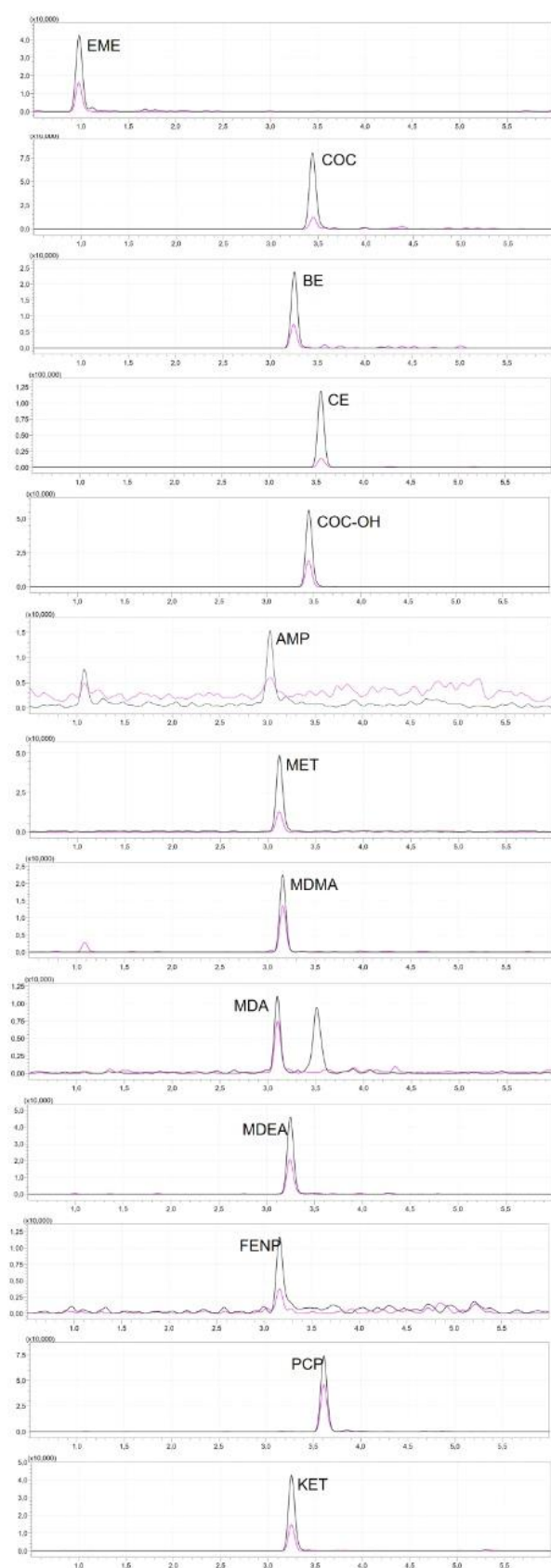


Fig. 4



Tables

Table 1 Mass spectrometry conditions and retention time

Analyte	Internal Standard	Retention time (min)	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>) ^a	Collision energy (eV)
Amphetamine	Amphetamine- <i>d</i> ₅	3,03	136.0	<u>91.1</u>	-15
				65.1	-39
Benzoylecgonine	Benzoylecgonine- <i>d</i> ₃	2.61	290.0	<u>168.2</u>	-21
				105.2	-31
Cocaethylene	Cocaine- <i>d</i> ₃	2.92	318.1	<u>196.2</u>	-20
				82.2	-35
Cocaine	Cocaine- <i>d</i> ₃	2.80	304.0	<u>182.1</u>	-20
				105.1	-33
EME	Cocaine- <i>d</i> ₃	0.73	200.0	<u>182.1</u>	-20
				82.2	-26
Fenproporex	Amphetamine- <i>d</i> ₅	3.15	189.0	119.0	-15
				<u>91.0</u>	-30
Hydroxycocaine	Cocaine- <i>d</i> ₃	2.82	320.3	<u>200.2</u>	-20
				182.1	-30
MDA	MDMA- <i>d</i> ₅	3,09	180.0	<u>163.0</u>	-13
				105.1	-23
MDEA	MDMA- <i>d</i> ₅	3.26	208.05	<u>163.1</u>	-15
				135.2	-22
MDMA	MDMA- <i>d</i> ₅	3.16	194.0	<u>163.1</u>	-23
				133.1	-16
Methamphetamine	MDMA- <i>d</i> ₅	3.16	150.0	<u>91.1</u>	-20
				119.2	-15
Ketamine	Ketamine- <i>d</i> ₄	3.24	238.0	<u>125.0</u>	-25
				207.0	-15
PCP	PCP- <i>d</i> ₅	3.61	244.1	<u>86.1</u>	-15
				159.1	-15

Amphetamine- <i>d</i> ₅	-	3.03	141.0	<u>93.1</u>	-20
				124.2	-15
Benzoylcegonine- <i>d</i> ₃	-	2.61	293.1	<u>171.2</u>	-20
				105.1	-31
Cocaine- <i>d</i> ₃	-	2.81	307.1	<u>185.2</u>	-20
				85.2	-30
Ketamine- <i>d</i> ₄	-	3.24	242.0	<u>129.0</u>	-25
				211.0	-15
MDMA- <i>d</i> ₅	-	3.16	199.0	<u>165.1</u>	-10
				135.1	-22
PCP- <i>d</i> ₅	-	3.61	249.0	<u>96.1</u>	-30
				164.1	-15

MDA 3,4-methylenedioxyamphetamine, *MDEA* 3,4-methylenedioxyethylamphetamine, *MDMA* 3,4-methylenedioxymethamphetamine, *EME* ecgonine methyl ester, *PCP* phencyclidine

^a Quantifying transition is highlighted in bold and underlined

Table 2 Comparison of achieved LLOQ with cutoff values for confirmatory tests in oral fluid, considering international guidelines

Drug	EWDTS Guidelines (ng/mL)	SAMHSA Guidelines (ng/mL)	DRUID Recommendations (ng/mL)	LLOQ (ng/mL)
Amphetamine	15	15	25	5
Benzoylecgonine	8	8	10	1
Cocaine	8	8	10	1
MDA	15	15	25	5
MDEA	-	15	25	1
MDMA	15	15	25	1
Methamphetamine	15	15	25	1
PCP	-	2	-	1

DRUID, Driving Under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines, *EWDTS* European Workplace Drug Testing Society, *LLOQ* lower limit of quantitation, *MDA* 3,4-methylenedioxyamphetamine, *MDEA* 3,4-methylenedioxyethylamphetamine, *MDMA* 3,4-methylenedioxymethamphetamine, *SAMHSA* Substance Abuse and Mental Health Services Administration, *PCP* phencyclidine

Table 3 Linear equation, weighting factor, linear range, determination coefficient, and lower limit of quantification for all analytes

Analyte	Linear equation	Weighting factor	Linear range (ng/mL)	r^2 ^a	LLOQ (n=9)	
					Concentration (ng/mL)	CV%
EME	$y = 0.0014x + 0.0020$	1	1 - 100	0.9997	1	11.2
Cocaine	$y = 0.0040x + 0.0031$	$1/x^2$	1 - 100	0.9981	1	5.9
Benzoylecgonine	$y = 0.0142x + 0.0074$	$1/x^2$	1 - 100	0.9984	1	8.7
Hydroxycocaine	$y = 0.0036x + 0.0005$	$1/x^2$	1 - 100	0.9988	1	8.8
Cocaethylene	$y = 0.0069x + 0.0017$	$1/x^2$	1 - 100	0.9985	1	4.4
Amphetamine	$y = 0.0218x + 0.0115$	$1/y^2$	5 - 100	0.9983	5	9.5
Methamphetamine	$y = 0.0335x - 0.0019$	$1/y^2$	1 - 100	0.9989	1	9.4
MDA	$y = 0.0061x - 0.0011$	$1/x^2$	5 - 100	0.9996	5	8.0
MDMA	$y = 0.0162x - 0.0003$	$1/x^2$	1 - 100	0.9988	1	16.6
MDEA	$y = 0.0310x + 0.0011$	$1/y$	1 - 100	0.9985	1	9.8
Fenproporex	$y = 0.0223x + 0.0037$	$1/x^{1/2}$	5 - 100	0.9997	5	5.5
PCP	$y = 0.0195x + 0.0008$	$1/y^2$	1 - 100	0.9992	1	9.9
Ketamine	$y = 0.0201x - 0.0014$	$1/y^2$	1 - 100	0.9975	1	12.8

MDA 3,4-methylenedioxyamphetamine, *MDEA* 3,4-methylenedioxyethylamphetamine, *MDMA* 3,4-methylenedioxymethamphetamine, *EME* ecgonine methyl ester, *PCP* phencyclidine

^a Coefficient of determination (r^2)

Table 4 Results of validation parameters: within-run and between-run precision, bias, and ionization suppression/enhancement of each quality control (QC)

Analyte	Within-run Precision (RSD%, n=15)			Between-run Precision (RSD%, n=15)			Bias (%, n=15)			Average ionization suppression/enhance (%, n=20)	
	Low QC	Medium QC	High QC	Low QC	Medium QC	High QC	Low QC	Medium QC	High QC	Low QC	High QC
EME	12.04	10.20	10.19	6.41	5.69	5.68	-2.4	9.6	8.4	-8.68	-5.58
Cocaine	7.21	3.85	7.05	3.46	3.75	4.52	-2.9	4.6	4.3	11.18	16.60
Benzoyllecgonine	7.04	5.46	8.16	4.25	3.83	4.05	-9.1	-0.2	-0.6	10.15	4.59
Hydroxycocaine	8.83	3.21	3.90	6.06	1.97	2.80	-4.6	0.1	-3.5	3.41	3.35
Cocaethylene	6.35	3.05	5.12	3.99	2.20	2.65	4.4	4.3	4.9	3.39	-4.64
Amphetamine	6.82	4.53	7.34	4.77	3.28	5.07	-3.0	-8.2	-16.6	-1.27	0.74
Methamphetamine	5.72	7.72	7.12	4.46	4.35	4.74	1.2	-4.1	-16.4	-7.54	10.96
MDA	6.03	6.42	7.36	5.26	4.66	4.53	4.3	4.6	-12.1	-4.51	-6.91
MDMA	11.45	8.38	7.51	8.34	4.73	7.00	-5.9	-8.5	-15.8	-14.79	-3.20
MDEA	13.01	6.99	8.95	6.23	3.55	4.91	-12.1	-16.2	-16.0	-16.26	2.78
Fenproporex	6.69	8.20	6.34	6.51	4.50	4.90	-7.1	-5.2	-14.1	7.08	10.95
PCP	8.44	6.48	4.39	5.01	3.12	2.16	-11.9	-14.0	-19.1	-0.85	3.47
Ketamine	11.24	9.08	4.35	8.13	4.70	4.59	-5.2	-10.3	-19.7	-7.55	5.43

MDA 3,4-methylenedioxyamphetamine, *MDEA* 3,4-methylenedioxyethylamphetamine, *MDMA* 3,4-methylenedioxymethamphetamine,

EME ecgonine methyl ester, *PCP* phencyclidine, *QC* quality control, *RSD* relative standard deviation

Table 5 Review of methodologies developed for the quantitative analysis of stimulant drugs and hallucinogens in oral fluid samples

Analytes	Sample volume	Sample Preparation	Instrument	Run time	LOQ/ LLOQ	Reference
Cocaine Benzoylecgonine Cocaethylene Hydroxycocaine EME Amphetamine Fenproporex Methamphetamine MDA MDMA MDEA Ketamine PCP	100 µL	DOFS	LC–MS/MS	8 min	1 ng/mL 5 ng/mL for MDA, Amphetamine, and Fenproporex	This study
Cocaine Benzoylecgonine Amphetamine Methamphetamine MDMA Ketamine Other drugs of abuse	500 µL	Dilute and Shoot	UHPLC–MS/MS	10 min	0.5 - 2.2 ng/mL for COC, BE, amphetamines, and ketamine	[33]
Amphetamine Methamphetamine MDA MDMA MDEA Ketamine and NPS	500 µL	LLE	LC–MS/MS	13.5 min	0.1 - 1 ng/mL	[53]

Analytes	Sample volume	Sample Preparation	Instrument	Run time	LOQ/ LLOQ	Reference
Cocaine Benzoylecgonine Amphetamine Methamphetamine MDMA MDEA MDA Ketamine Other drugs of abuse	500 µL	SPE	UPLC–MS/MS	10 min	0.05 - 0.5 ng/mL	[48]
Cocaine Benzoylecgonine Cocaethylene Amphetamine MDMA	50 µL	DOFS	LC–MS	-	40 ng/mL	[30]
Cocaine Benzoylecgonine Cocaethylene Amphetamine Methamphetamine MDA MDEA MDMA Ketamine Other 8 drugs of abuse	200 µL	Dilute and shoot	LC–MS/MS	12 min	0.5 ng/mL for COC and BE 1 ng/mL for Amphetamines, CE, and ketamine	[34]
Benzoylecgonine Methamphetamine Ketamine Amphetamine Mitragynine	50 µL	DOFS	LC–MS/MS	10 min	0.2 ng/mL	[35]

Analytes	Sample volume	Sample Preparation	Instrument	Run time	LOQ/ LLOQ	Reference
Cocaine Benzoylecgonine Cocaethylene Other 18 drugs of abuse	300 µL	MEPS	UPLC–MS/MS	-	0.5 – 1 ng/mL	[36]
Cocaine Benzoylecgonine EME AEME Other 12 drugs of abuse	250 µL	Protein precipitation	LC–MS/MS	16 min	0.5 - 1 ng/mL	[37]
Ecgonine EME EEE p-hydroxybenzoylecgonina m- hydroxybenzoylecgonine Benzoylecgonine Hydroxycocaine Norcocaine Cocaine Norcocaethylene Cocaethylene and opiates	200 µL	Protein precipitation	LC–APCI-MS/MS	13 min	1 ng/mL	[38]
Cocaine Benzoylecgonine Cocaethylene Other 94 drugs of abuse	300 µL approximately	Incubation	LC–MS/MS	13 min	8 ng/mL	[42]
Cocaine Benzoylecgonine Other 18 drugs of abuse	500 µL	US-DLLME	UPLC–MS/MS	3 min	0.5 ng/mL for COC and BE	[43]

Analytes	Sample volume	Sample Preparation	Instrument	Run time	LOQ/ LLOQ	Reference
Cocaine Benzoylecgonine Cocaethylene EME Amphetamine Methamphetamine MDA MDMA Ketamine Other drugs	200 µL	LLE	LC–MS/MS	5.5 min	1 ng/mL	[49]
Cocaine Benzoylecgonine Cocaethylene Amphetamine Methamphetamine MDMA MDA MDEA Ketamine Other drugs of abuse	100 µL	Dilute and shoot	HPLC–MS/MS	10 min	0.07 - 0.8 ng/mL	[50]
Amphetamine Methamphetamine MDA MDMA MDEA	50 µL	DLLME	LC–MS/MS	6.5 min	20 ng/mL	[44]
Amphetamine Methamphetamine MDMA MDEA MDA and synthetics cathinones	500 µL	LLE	GC–MS	15 min	2.5 - 10 ng/mL	[51]

Analytes	Sample volume	Sample Preparation	Instrument	Run time	LOQ/ LLOQ	Reference
Cocaine Benzoylecgonine EME Amphetamine Methamphetamine MDMA MDEA MDA Ketamine PCP Other drugs of abuse	120 µL	MEPS	LC–MS/MS	12.5 min	0.6 - 4 ng/mL	[45]
Cocaine Amphetamine Methamphetamine MDMA Others DOA	200 µL	LLE/96-well plate	UHPLC–MS/MS	7.1 min	0.1 - 0.7 ng/mL	[52]

6-AM acetylmorphine, AEC anhydroecgonine, AEME anhydroecgonine methyl ester, COC cocaine, BE benzoylecgonine, CE cocaethylene, DLLME dispersive liquid-liquid microextraction, DOFS dried oral fluid spot, EEE ecgonine ethyl ester, EME ecgonine methyl ester, GC-MS/MS gas chromatography-mass spectrometry, LC-APCI-MS/MS liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry, LLE liquid-liquid extraction, LOQ limit of quantitation, LLOQ lower limit of quantitation, MDA 3,4-methylenedioxyamphetamine, MDB methylbenzodioxolylbutanamine, MDEA 3,4-methylenedioxyethylamphetamine, MDMA 3,4-methylenedioxymethamphetamine, MEPS microextraction by packet sorbent, NPS new psychoactive substances, PCP phencyclidine, QC quality control, RSD relative standard deviation, SPE solid phase extraction, US-DLLME ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi possível aprimorar a técnica de *dried oral fluid spot* (DOFS) para determinação de cocaína, benzoilecgonina, éster metil ecgonina, cocaetileno, hidroxicoína, anfetamina, metanfetamina, MDMA, MDA, MDEA, femproporex, fenciclidina e cetamina em fluido oral utilizando LC-MS/MS. Apesar de ser uma técnica amplamente explorada na extração de outras matrizes, como por exemplo sangue, a aplicação em fluido oral representa uma inovação analítica que corrobora com o desenvolvimento e futuras aplicações da técnica em análises toxicológicas. As principais vantagens desta metodologia foram o pequeno volume de amostra utilizado (100 µL), pequenos volumes de solvente (250 µL), requer poucos insumos tornando o custo baixo e os valores de LLOQ obtidos para todos os analitos ficaram, consideravelmente, abaixo dos cutoffs estabelecidos internacionalmente para fluido oral. Além disso, a utilização de uma placa de 24-poços possibilitou a otimização do processo de preparo de amostras, tornando mais rápido e simples a extração de várias amostras simultaneamente.

A metodologia foi satisfatoriamente validada seguindo todos os parâmetros recomendados pelo guia ANSI/ASB Standard 036. Após a validação, foram analisadas 86 amostras reais de fluido oral coletadas de pacientes dependentes químicos que buscaram auxílio em centros de saúde selecionados pelo Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Demonstrando assim, a aplicabilidade da metodologia desenvolvida.

Adicionalmente, este trabalho oferece contribuições às áreas de toxicologia forense e analítica, apresentando aplicabilidade na área de análises toxicológicas em fluido oral. O DOFS pode ser explorado em uma série de outras substâncias, entre elas medicamentos e novas substâncias psicoativas, demonstrando ser uma alternativa para as análises em caso de DUID, testagem anti-doping e testes no ambiente de trabalho, por exemplo.

6. ANEXOS

6.1 ANEXO I – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE - HCPA / UFRGS 
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA
Título da Pesquisa: Análise de sistemas de testagem móvel para a detecção de cocaínicos em fluidos biológicos
Pesquisador: Flávio Pechansky
Área Temática:
Versão: 4
CAAE: 31044714.1.0000.5327
Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO INSTITUTO DE PESQUISAS ECONÔMICAS FIPE
DADOS DO PARECER
Número do Parecer: 1.094.438
Data da Relatoria: 03/06/2015
Apresentação do Projeto:
Trata-se de emenda (Emenda 1) ao projeto original, com a seguinte justificativa: O presente projeto necessitou de alterações, pois passou de um estudo de conclusão de curso de graduação para um estudo de doutorado. Assim, alterações metodológicas estão sendo solicitadas para uma melhora na qualidade do estudo, levando em consideração o maior tempo de execução do projeto e as melhores condições de análise metodológica proporcionadas em um estudo de doutorado. Emenda adicionada em 04/05/2015 com resposta às pendências em 25/05/2015.
Objetivo da Pesquisa:
Objetivo Geral: Estabelecer os indicativos de seletividade, especificidade, precisão, sensibilidade e robustez de dispositivos móveis para a detecção de cocaínicos, utilizando como padrão ouro a análise das matrizes biológicas pela técnica de cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de massas (CG/EM) e/ou cromatografia em fase líquida acoplada a detector de massas (LC/EM).
Objetivos Específicos: Avaliar a seletividade e a sensibilidade de dispositivos móveis para o monitoramento do uso de cocaína/crack em amostras de fluido oral de pacientes em tratamento para a dependência química através da análise confirmatória por CG/EM e/ou LC/EM; Comparar os resultados provenientes de uma mesma amostra em diferentes dispositivos disponíveis no mercado brasileiro; Comparar os resultados obtidos pelas análises confirmatórias por CG/EM e/ou
Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F CEP: 90.035-903 Bairro: Bom Fim Município: PORTO ALEGRE UF: RS Telefone: (51)359-7640 Fax: (51)359-7640 E-mail: cephcpa@hcpa.ufrgs.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE - HCPA /
UFRGS



Continuação do Parecer: 1.094.438

LC/EM para sangue com os resultados dos testes de triagem por fluido oral; Avaliar a reatividade cruzada para a detecção de cocaínicos com possíveis interferentes em dispositivos móveis de detecção de cocaínicos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com os autores:

Riscos: A doação do fluido oral consiste em torno de 0,6mL de saliva, que é coletada através do pincelamento do dispositivo de coleta no interior da cavidade oral durante aproximadamente 40 segundos, o que pode levar a algum desconforto ao participante. A doação da urina consiste em torno de 5mL de urina, que será coletada pelo participante da pesquisa em banheiros dos locais de realização do estudo. As chances de contaminação por microrganismos durante esses processos são relativamente baixas, visto que os dispositivos de coleta são estéreis e descartáveis. A coleta de sangue será realizada por um profissional capacitado, sendo coletado cerca de 5mL de sangue. Além do possível desconforto dessa coleta, poderá haver a formação local de uma pequena área roxa (hematoma local). Todos os equipamentos utilizados para a coleta são estéreis e descartáveis e, por isso, as chances de contaminação são mínimas, mas existentes.

Benefícios: Caso for verificado bons parâmetros de acurácia e efetividade dos dispositivos para a cocaína, eles poderão passar a ser utilizados pelos serviços do hospital e das emergências, em locais de trabalho e em fiscalização de trânsito.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O fluido oral e a urina serão coletados em dispositivos coletores específicos para o sistema de testagem rápida dos dispositivos a ser utilizados (DDS2 – Alere, Twist Screen Test Device – Abon e Triage® TOX Drug Screen – Alere), sendo a coleta realizada de acordo com as instruções dos fabricantes. Através da leitura dos dispositivos, serão registradas as informações referentes à análise para cocaínicos. Um ou mais dispositivos serão testados simultaneamente, dependendo da disponibilidade, voluntariedade e aceite do sujeito de pesquisa. Para a análise dos indicadores de precisão, utilizaremos como padrão ouro a análise de fluido oral e de sangue através da técnica de CG/EM e/ou LC/EM.

Como padrão ouro, será utilizada a análise de fluido oral pela técnica de CG/EM e/ou LC/EM, que está sendo padronizada pelo LABTOXICO - Laboratório de Toxicologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Aproximadamente 1mL de fluido oral será coletado e armazenado nos tubos de coleta específicos para a análise de substâncias psicoativas (Quantisal® Alere), e, após a coleta, estes serão imediatamente transportados ao laboratório e mantidos em freezer -80°C até o momento da análise.

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)359-7640 **Fax:** (51)359-7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.ufrgs.br

Página 02 de 05

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE - HCPA /
UFRGS



Continuação do Parecer: 1.004.438

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta nova versão do TCLE.

Recomendações:

Foi verificado que o Patrocinador Principal cadastrado na Plataforma Brasil "FUNDAÇÃO INSTITUTO DE PESQUISAS ECONÔMICAS FIPE" não corresponde ao FIPE/HCPA, quando da submissão de uma nova emenda sugerimos aos pesquisadores readequar o cadastro.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

1) Foi realizada atualização do TCLE, contudo, ainda são necessárias as seguintes alterações:

COMENTÁRIO DO CEP:

a) Padronizar a fonte do TCLE, pois apresenta várias diferentes, dificultando a leitura.

RESPOSTA DO PESQUISADOR:

A fonte do termo foi padronizada.

PENDÊNCIA ATENDIDA.

COMENTÁRIO DO CEP:

b) Corrigir erros de digitação.

RESPOSTA DO PESQUISADOR:

Os erros de digitação foram corrigidos.

PENDÊNCIA ATENDIDA.

COMENTÁRIO DO CEP:

c) Esclarecer em linguagem leiga o objetivo do estudo, pois "seletividade e sensibilidade" são termos de difícil entendimento para os possíveis participantes.

RESPOSTA DO PESQUISADOR:

O objetivo do estudo foi reescrito em linguagem leiga, visando o melhor entendimento pelos participantes.

PENDÊNCIA ATENDIDA.

COMENTÁRIO DO CEP:

d) Incluir uma frase esclarecendo que os participantes não terão custos nem receberão pagamento pela participação.

RESPOSTA DO PESQUISADOR:

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim CEP: 90.035-903
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)359-7640 Fax: (51)359-7640 E-mail: cephcpa@hcpa.ufrgs.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE - HCPA /
UFRGS



Continuação do Parecer: 1.094.438

Foi incluída no TCLE uma sentença comunicando que os participantes não terão custos com a participação no estudo e nem receberão pagamentos por isso.

PENDÊNCIA ATENDIDA.

COMENTÁRIO DO CEP:

e) Informar que o termo será assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

RESPOSTA DO PESQUISADOR:

Incluímos uma frase comunicando a necessidade da assinatura de duas vias do termo, sendo uma para o participante e uma para o pesquisador.

PENDÊNCIA ATENDIDA.

COMENTÁRIO DO CEP:

f) Sugerimos retirar a frase FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PACIENTES, pois o termo de consentimento é um documento único.

RESPOSTA DO PESQUISADOR:

A sentença FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PACIENTES foi removida.

PENDÊNCIA ATENDIDA.

COMENTÁRIO DO CEP:

g) Não são necessários todos aqueles itens da declaração. Basta uma frase informando que compreendeu as informações e concorda em participar do estudo.

RESPOSTA DO PESQUISADOR:

Os itens no final da declaração foram substituídos por uma frase que onde os participantes informam a compreensão das informações do termo e concordam com a participação no estudo.

PENDÊNCIA ATENDIDA.

COMENTÁRIO DO CEP:

h) Sugerimos esclarecer nas opções sobre o uso do teste de urina, no final do termo, que se trata do teste rápido, evitando confusão com a coleta de urina da pesquisa.

RESPOSTA DO PESQUISADOR:

Incluímos o esclarecimento de que o resultado do teste de urina diz respeito ao teste rápido realizado pelas equipes de assistência.

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim CEP: 90.035-903
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)359-7640 Fax: (51)359-7640 E-mail: cephcpa@hcpa.ufrgs.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE - HCPA /
UFRGS



Continuação do Parecer: 1.094.438

PENDÊNCIA ATENDIDA.

A emenda não apresenta pendências e está em condições de aprovação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Emenda adicionada em 25/05/2015 aprovada, inclui mudanças na metodologia e nova versão do TCLE.

PORTO ALEGRE, 05 de Junho de 2015

Assinado por:
José Roberto Goldim
(Coordenador)

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (513)359-7640 **Fax:** (513)359-7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.ufrgs.br

Página 05 de 05

6.2 ANEXO II – NORMAS PARA SUBMISSÃO DE TRABALHOS NA REVISTA CIENTÍFICA *FORENSIC TOXICOLOGY*

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide a structured abstract of up to 250 words which should be divided into the following sections:

- Purpose (stating the main purposes and research question)
- Methods
- Results
- Conclusions

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text

- Text of the paper divided into following sections, if appropriate: Introduction; Materials and methods; Results; Discussion; Conclusions; Acknowledgements; Conflict of Interest; References; tables; figure legends
- In this journal, the format "Results and discussion" is not acceptable; separate "Results" and "Discussion" sections are mandatory in Forensic Toxicology. However, the "Results" section is allowed to include short comments just below results obtained. The "Discussion" section should describe the study from broader points of view, such as discussions about the novelty of the main content, citing preceding papers on similar subjects, and perspectives of the study described in the manuscript.
- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables. Footnotes to the text are numbered consecutively;

those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols. Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

References

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

References should be numbered in the order in which they appear in the text and should be listed in numerical order. References, with correct punctuation, should be styled as follows:

*Journal papers: name(s) and initial(s) of all authors; year; full title; journal title abbreviated in accordance with international practice; volume number; first and last page numbers

Example:

Hattori H, Arinobu T, Iwai M, Masuda K, Suzuki O, Seno H (2005) Analysis of butyrophenones in whole blood specimens by LC/MS/MS using a new polymer column. *Jpn J Forensic Toxicol* 23:13–17

If available, the DOI of the cited literature should be added at the end of the reference in question.

*Single contributions in a book: name(s) and initial(s) of all authors; year; title of article; editor(s); title of book; edition; volume number; publisher; place of publication; page numbers

Example:

Rifkind BM, Tamir I, Heiss G (1978) Preliminary high_density lipoprotein findings. In: Gotto AM, Miller F, Oliver MF (eds) *High_density lipoprotein and atherosclerosis*. Elsevier, Amsterdam, pp 109–119

*Book: name and initial(s) of all authors; year; title; publisher; place of publication

Example:

Suzuki O, Watanabe K (2005) *Drugs and poisons in humans: a handbook of practical analysis*. Springer, Berlin Heidelberg New York

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ArtWork

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions into your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in the text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article/chapter and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

- In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that
- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1.

Electronic Supplementary Material

Electronic supplementary material will be published in the online version only.

It may consist of

- Information that cannot be printed: animations, video clips, sound recordings
- Information that is more convenient in electronic form: sequences, spectral data, etc.

- Large original data, e.g. additional tables, illustrations, etc.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized formats such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

After Acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer’s web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice. Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs. You will also receive a separate e-mail for ordering offprints and printing of figures in color.

Open Choice Publication

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer

Open Choice article receives all the benefits of a regular "subscription-based" article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. Springer Open Choice [<http://springer.com/openchoice>]

- Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Japanese Association of Forensic Toxicology and Springer (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

- Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

- Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

- Proofreading

Authors are informed by e-mail that a temporary URL has been created from which they can obtain their proofs. Proofreading is the responsibility of the author. Authors should make their proof corrections (formal corrections only) on a printout of the pdf file supplied, checking to see that the text is complete and that all figures and tables are included. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, and changes in title and authorship, are not allowed without the approval of the responsible editor. In such a case please contact the editorial office before returning the proofs to the publisher. After online publication, corrections can be made only in exceptional cases and in the form of an erratum, which will be hyperlinked to the paper.

- Online First

Papers will be published online about one week after receipt of the corrected proofs. Papers published online can already be cited by their DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

Open Choice

Open Choice allows you to publish open access in more than 1850 Springer Nature journals, making your research more visible and accessible immediately on publication.

Article processing charges (APCs) vary by journal – view the full list

Benefits:

Increased researcher engagement: Open Choice enables access by anyone with an internet connection, immediately on publication.

Higher visibility and impact: In Springer hybrid journals, OA articles are accessed 4 times more often on average, and cited 1.7 more times on average*.

Easy compliance with funder and institutional mandates: Many funders require open access publishing, and some take compliance into account when assessing future grant applications.

It is easy to find funding to support open access – please see our funding and support pages for more information.

*) Within the first three years of publication. Springer Nature hybrid journal OA impact analysis, 2018.

Open Choice

Funding and Support pages

Copyright and license term – CC BY

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

6.3 ANEXO III – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO NA REVISTA CIENTÍFICA *FORENSIC TOXICOLOGY*

Forensic Toxicology

An analytical approach for the determination of drugs of abuse in oral fluid using dried oral fluid spot assisted by 24-well plate and LC-MS/MS

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	FOTO-D-22-00073	
Full Title:	An analytical approach for the determination of drugs of abuse in oral fluid using dried oral fluid spot assisted by 24-well plate and LC-MS/MS	
Article Type:	Original Article	
Funding Information:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - Finance Code 001)	Miss Gabriela Borges Ramos
Abstract:	Purpose In this work was develop and validate a new bioanalytical method using dried oral fluid spot (DOFS) for the determination of cocaine, benzoylecgonine, ecgonine methyl ester, cocaethylene, hydroxycocaine, amphetamine, methamphetamine, MDMA, MDA, MDEA, fenproporex, phencyclidine, and ketamine in oral fluid by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. Methods Samples were collected by expectoration process and diluted 1:1 in ultrapure water. The extraction parameters of dried oral fluid spot (DOFS) were optimized by multivariate and univariate experiments. Then, 100 µL of samples were pipetted on the filter paper, dried for 60 min, and extracted with 250 µL of a mixture of acetonitrile and methanol (1:3). The complete extraction process was performed in 24-well plate. The method was validated following the recommendations of ANSI/ASB Standard 036 and after validation, 86 real samples of oral fluid were analyzed. Results The calibration curves were constructed in a range of 1 or 5 to 100 ng/mL and the coefficients of determination (r^2) were higher than 0.99 for all analytes. The limits obtained ranged from 1 to 5 ng/mL; Within-run precision were from 3.05 to 13.01%; Between-run precision were from 1.97 to 8.13%; Bias ranged between -19.7 and 9.6%; Ionization suppression/enhancement study were -16.20 to 16.60%. From a total of analyzed samples, 86% were considered positive. Conclusions This study demonstrated that the proposed method was successfully validated, confirming a new bioanalytical alternative for the analysis of drugs of abuse in oral fluid by dried oral fluid spot.	
Corresponding Author:	Tiago Franco de Oliveira UFCSPA Porto Alegre, Rio Grande do Sul BRAZIL	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	UFCSPA	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Gabriela Borges Ramos	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Gabriela Borges Ramos Bruno Pereira dos Santos Giovanna Cristiano de Gouveia Carolina Silveira Dalanhol Juliana Scherer Sarah Eller	

Powered by Editorial Manager® and Prodxion Manager® from Aries Systems Corporation

	Tiago Franco de Oliveira
Order of Authors Secondary Information:	
Author Comments:	Prof. Osamu Suzuki, Chief Editor, Forensic Toxicology Dear Prof. Suzuki, Accompanying this cover letter is a copy of a manuscript titled: "An analytical approach for the determination of drugs of abuse in oral fluid using dried oral fluid spot assisted by 24-well plate and LC-MS/MS" that we would like to have considered for publication in Forensic Toxicology. We describe in this work a method based using using dried oral fluid spot and ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry technique for the determination of cocaine, benzoylecgonine, ecgonine methyl ester, cocaethylene, hydroxycocaine, amphetamine, methamphetamine, MDMA, MDA, MDEA, fenproporex, phencyclidine, and ketamine. The developed methodology was able to achieve its goals of optimizing, validating, and analyzing of samples from patients with suspected of cocaine intoxication and/or relapsed drug addict. Furthermore, this study results confirms a new bioanalytical alternative for the analysis of drugs of abuse in oral fluid by dried oral fluid spot. As a wide-reaching journal publishing original research of applied modern analytical science, we believe that Forensic Toxicology represents the perfect platform to share our results with the international research community. Additionally, our findings could be applied in the forensic toxicology right away, they are likely to be of great interest to the vision scientists, researchers, and clinicians, who read your journal. It is expected that findings within this study will be of wide interest to Forensic Toxicology audience. This manuscript has been read and approved by all co-authors and has not been submitted to any other journal for consideration. Sincerely, Prof. Tiago Franco de Oliveira

[Click here to view linked References](#)

**An analytical approach for the determination of drugs of abuse in oral fluid using
dried oral fluid spot assisted by 24-well plate and LC-MS/MS**

Gabriela Ramos Borges^{1,2}, Bruno Pereira dos Santos^{1,2,3}, Giovanna Cristiano de
Gouveia^{1,2}, Carolina Silveira Dalanhol^{1,2,3}, Juliana Scherer², Sarah Eller¹, Tiago Franco
de Oliveira^{1*}

¹ Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, RS, 90050-170,
Brazil

² Center for Drug and Alcohol Research and Collaborating Center on Alcohol and Drugs,
Porto Alegre, RS, 90035-903, Brazil

³ Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 90010-150, Brazil

*Corresponding Author (T. F. Oliveira)

E-mail address: oliveira@ufcspa.edu.br