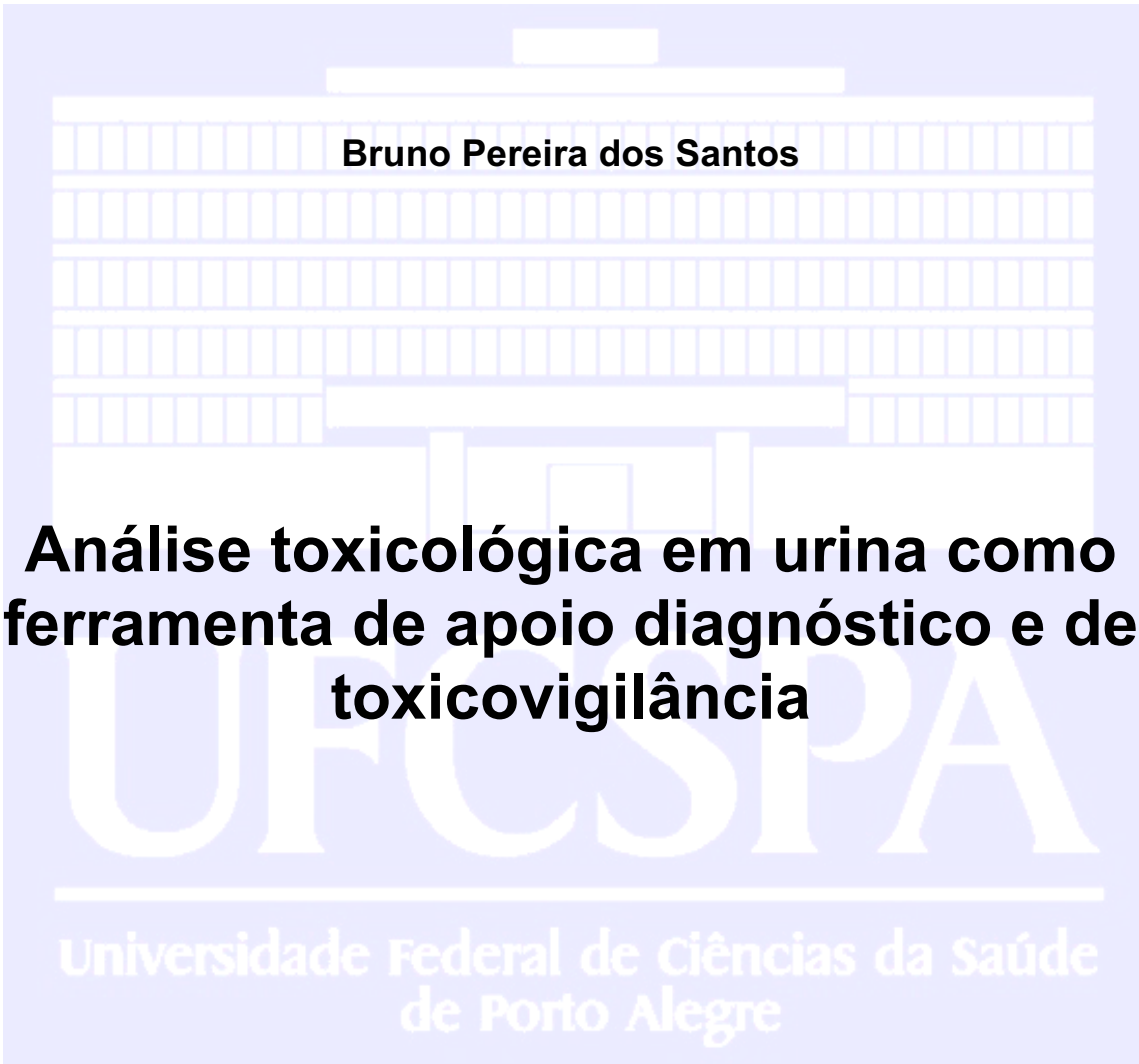


**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE**



Bruno Pereira dos Santos

**Análise toxicológica em urina como
ferramenta de apoio diagnóstico e de
toxicovigilância**

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

**Porto Alegre
2026**

Bruno Pereira dos Santos

Análise toxicológica em urina como ferramenta de apoio diagnóstico e de toxicovigilância

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

Orientador: Prof. Dr. Tiago Franco de Oliveira

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Sarah Eller

**Porto Alegre
2026**

Catálogo na Publicação

Pereira dos Santos, Bruno

Análise toxicológica em urina como ferramenta de apoio diagnóstico e de toxicovigilância / Bruno Pereira dos Santos. -- 2026.

116 p. : 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2026.

Orientador(a): Tiago Franco de Oliveira ;
coorientador(a): Sarah Eller.

1. urina. 2. LC-MS/MS. 3. análise multianalito. 4. intoxicação. 5. toxicovigilância. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).

Bruno Pereira dos Santos

Análise toxicológica em urina como ferramenta de apoio diagnóstico e de toxicovigilância

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

Data: 10 de julho de 2026

Parecer: APROVADO

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Eliane Dallegrave

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Prof. Dr. Rafael Lanaro

Universidade Estadual de Campinas

Dr^a. Sabrina Nunes do Nascimento

Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

Meu primeiro agradecimento é dedicado à minha família, especialmente aos meus pais, Marcia e Edison, pelo amor incondicional, apoio constante e incentivo durante toda a minha jornada acadêmica.

Agradeço ao meu amor, Vítor, por caminhar ao meu lado nos momentos felizes e desafiadores, sempre me apoiando e incentivando em todas as minhas aventuras.

Expresso meu agradecimento à UFCSPA e ao PPG-CS por oferecerem a infraestrutura indispensável ao desenvolvimento deste trabalho.

Sou grato ao Professor Tiago, meu orientador, e à Professora Sarah, minha coorientadora, por todos os ensinamentos compartilhados ao longo dos anos de pós-graduação, bem como pelo apoio, incentivo a novos desafios, disponibilidade e amizade.

Agradeço ao CIT-RS, ao IGP-RS e ao SVO-AHVN pela colaboração, por meio da disponibilização de amostras e dados essenciais para o desenvolvimento deste estudo.

Agradeço a todos os colegas do grupo de Espectrometria de Massas da UFCSPA, em especial à Letícia e à Patrícia, pela amizade, parceria no laboratório, momentos de descontração e valiosas trocas ao longo dessa trajetória.

Agradeço a todos os familiares e amigos que de alguma forma contribuíram nesta jornada.

Por fim, agradeço à CAPES pela bolsa de estudos concedida e à FAPERGS pelo auxílio financeiro, os quais foram essenciais para o desenvolvimento deste estudo.

RESUMO

A análise toxicológica em urina desempenha papel relevante na toxicologia clínica e forense, contribuindo para o apoio ao diagnóstico de intoxicações, monitoramento de exposições e ações de toxicovigilância. No entanto, a crescente complexidade do cenário toxicológico, marcada pela exposição simultânea a fármacos, drogas de abuso tradicionais e novas substâncias psicoativas, exige métodos analíticos sensíveis, específicos e de amplo escopo. Esta tese teve como objetivo investigar a aplicabilidade da análise toxicológica em urina como ferramenta de apoio diagnóstico e toxicovigilância, com foco no desenvolvimento e aplicação de métodos multianalito baseados em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS). Inicialmente, foi desenvolvido e validado um método analítico para a análise simultânea de 95 medicamentos e drogas de abuso em urina por LC-MS/MS. Em seguida, o escopo analítico foi ampliado com um novo método para a detecção de novas substâncias psicoativas, incluindo catinonas sintéticas, canabinoides sintéticos e alucinógenos. Os métodos desenvolvidos e validados foram aplicados em amostras de casos clínicos e forenses provenientes de instituições públicas do estado do Rio Grande do Sul. Por fim, um dos métodos foi empregado em amostras de casos pediátricos suspeitos de intoxicação atendidos pelo Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul, evidenciando exposição a substâncias ilícitas, especialmente por meio da detecção de marcadores relacionados à cocaína e à cannabis. Esses achados evidenciam a relevância da análise toxicológica em urina para o apoio ao diagnóstico laboratorial, caracterização de populações vulneráveis e geração de dados epidemiológicos, reforçando a análise urinária como ferramenta estratégica para o aprimoramento da toxicologia clínica, forense e da toxicovigilância.

Palavras-chave: urina; LC-MS/MS; análise multianalito; intoxicação; toxicovigilância.

Objetivos de Desenvolvimento Sustentável: ODS 3 – Saúde e Bem-Estar.

ABSTRACT

Urine toxicological analysis plays a relevant role in clinical and forensic toxicology by contributing to the diagnosis and assessment of intoxication cases, exposure monitoring, and toxicovigilance activities. However, the increasing complexity of the toxicological scenario, characterized by simultaneous exposure to therapeutic drugs, traditional drugs of abuse, and new psychoactive substances, requires sensitive, specific, and broad-scope analytical methods. This thesis aimed to investigate the applicability of urine toxicological analysis as a tool for diagnosis support and toxicovigilance, focusing on the development and application of multi-analyte methods based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Initially, an analytical method was developed for the simultaneous analysis of 95 therapeutic drugs and drugs of abuse in urine using LC-MS/MS. Subsequently, the analytical scope was expanded through a new method for the detection of new psychoactive substances, including synthetic cathinones, synthetic cannabinoids, and hallucinogens. The developed and validated methods were applied to samples from clinical and forensic cases obtained from public institutions in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Finally, one of the methods was applied to samples from pediatric cases with suspected intoxication attended by the Toxicological Information Center of Rio Grande do Sul, showing exposure to illicit substances, particularly through the detection of markers related to cocaine and cannabis. These findings highlight the relevance of toxicological analysis for laboratory-based diagnostic assessment, the characterization of vulnerable populations, and the generation of epidemiological data, reinforcing its strategic role in improving clinical toxicology, forensic toxicology, and toxicovigilance.

Keywords: urine; LC-MS/MS; multianalyte analysis; intoxication; toxicovigilance.

Sustainable Development Goals: SDG 3 – Good Health and Well-being.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Janela de detecção por tipo de matriz biológica.....	23
---	----

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Principais matrizes biológicas em toxicologia.....	22
Tabela 1. Janela de detecção aproximada de drogas de abuso e medicamentos em urina.....	24
Tabela 2. Concentrações de <i>cutoff</i> de triagem em urina estabelecidas pela EWDTS.....	27
Tabela 3. Concentrações de <i>cutoff</i> de confirmação em urina estabelecidas pela EWDTS.....	27
Quadro 2. Tipos de hidrólise e respectivos exemplos de protocolos e aplicações....	34
Quadro 3. Revisão de métodos multianalito aplicados à urina: painéis analíticos, preparo de amostra e instrumentação utilizada.....	48

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

CIT-RS	Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva, do inglês “ <i>dispersive liquid-liquid microextraction</i> ”
dSPE	Extração em fase sólida dispersiva, do inglês “ <i>dispersive solid phase extraction</i> ”
EDDP	2-etilideno-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina
ELISA	Ensaio imunoenzimático, do inglês “ <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> ”
EMIT	Imunoensaio enzimático multiplicado, do inglês “ <i>enzyme multiplied immunoassay technique</i> ”
EWDTs	<i>European Workplace Drug Testing Society</i>
GAC	Química analítica verde, do inglês “ <i>Green analytical chemistry</i> ”
GAT	Toxicologia analítica verde, do inglês “ <i>Green analytical toxicology</i> ”
GC	Cromatografia gasosa, do inglês “ <i>gas chromatography</i> ”
GC-MS/MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em tandem do inglês “ <i>gas chromatography-tandem mass spectrometry</i> ”
HLB	Balanço hidrofílico-lipofílico, do inglês “ <i>hydrophilic-lipophilic balance</i> ”
HRMS	Espectrometria de massas de alta resolução, do inglês “ <i>high resolution mass spectrometry</i> ”
ISRS	Inibidores seletivos da recaptação de serotonina
LPME	Microextração em fase líquida, do inglês “ <i>liquid phase microextraction</i> ”
LC	Cromatografia líquida, do inglês “ <i>liquid chromatography</i> ”
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem, do inglês “ <i>liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i> ”
LLE	Extração líquido-líquido, do inglês “ <i>liquid-liquid extraction</i> ”

LSD	Dietilamida do ácido lisérgico
MDA	3,4-metilenodioxianfetamina
MDMA	3,4-metilenodioximetanfetamina
MEPS	Microextração por sorbente empacotado, do inglês <i>"microextraction by packed sorbent"</i>
MRM	Monitoramento de reações múltiplas, do inglês <i>"multiple reaction monitoring"</i>
MS	Espectrometria de massas, do inglês <i>"mass spectrometry"</i>
NAPQI	N-acetil-p-benzoquinona imina
NSP	Novas substâncias psicoativas
PCP	Fenciclidina
pKa	Logaritmo negativo da constante de dissociação ácida
pH	Potencial hidrogeniônico
SBSE	Extração sortiva em barra de agitação, do inglês <i>"stir bar sorptive extraction"</i>
SIM	Sistema de Informações sobre Mortalidade
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SPE	Extração em fase sólida, do inglês <i>"solid phase extraction"</i>
SPME	Microextração em fase sólida, do inglês <i>"solid phase microextraction"</i>
THC	Δ^9 -tetrahydrocanabinol
THC-COOH	11-nor-9-carboxi- Δ^9 -tetrahydrocanabinol

SUMÁRIO

1.	REFERENCIAL TEÓRICO	13
1.1.	Intoxicações: aspectos clínicos e forense	13
1.1.1	Substâncias de relevância toxicológica	16
1.2.	Urina como matriz biológica em toxicologia	21
1.3.	Análise toxicológica em urina: preparo de amostra e técnicas analíticas	31
1.3.1	Preparo de amostra	31
1.3.1.1	Hidrólise de compostos conjugados	32
1.3.1.2	<i>Dilute-and-shoot</i>	34
1.3.1.3	Extração líquido-líquido (LLE)	35
1.3.1.4	Extração em fase sólida (SPE)	37
1.3.1.5	Microextrações	39
1.3.2	Técnicas de triagem	42
1.3.3	Técnicas instrumentais	44
1.4	Aplicações da análise toxicológica em urina	52
2.	JUSTIFICATIVA	55
3.	OBJETIVOS	57
3.1.	Objetivo geral	57
3.2.	Objetivos específicos	57
4.	ARTIGOS	58
4.1	Artigo I	58
4.2	Artigo II	77
4.3	Artigo III	91
5.	CONCLUSÕES	92
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
	ANEXOS	112
	ANEXO I – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	112

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1. Intoxicações: aspectos clínicos e forense

As exposições a substâncias tóxicas ou potencialmente tóxicas, assim como os casos de intoxicação a elas associados, têm apresentado aumento nas notificações nos últimos anos no Brasil e no mundo. Os casos de intoxicação exógena notificados ao Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) apresentaram aumento expressivo na última década no Brasil. Em 2015, foram registrados 99.238 casos notificados (48,5 casos/100.000 habitantes), número que aumentou para 142.885 casos em 2020 (67,5/100.000 habitantes). Em 2025, as notificações mais que dobraram em relação a 2020, alcançando 296.557 casos (139,5/100.000 habitantes). Esses dados evidenciam uma tendência crescente no número absoluto e na taxa de notificação de intoxicações exógenas, configurando essas ocorrências como um problema persistente e crescente de saúde pública (SINAN, 2026).

Entre os agentes tóxicos envolvidos, os medicamentos representaram o principal grupo responsável pelas intoxicações registradas no SINAN no ano de 2025, correspondendo a aproximadamente 55,6% de todas as notificações. Em seguida, destacaram-se as drogas de abuso, com 39.162 casos (13,2%), evidenciando a importante contribuição dessas substâncias para o número de intoxicações no país. Outros grupos com número relevante de notificações incluíram substâncias ignoradas/em branco (6,4%), produtos de uso domiciliar (5,0%) e alimentos e bebidas (4,6%). Esse perfil demonstra o predomínio de intoxicações relacionadas a substâncias amplamente acessíveis à população, especialmente medicamentos, sem desconsiderar a participação expressiva das substâncias psicoativas de uso não médico (SINAN, 2026).

No Brasil, o atendimento especializado às intoxicações é realizado pelos Centros de Informação e Assistência Toxicológica (CIATs), que desempenham papel fundamental no suporte à tomada de decisão clínica, na orientação terapêutica e na vigilância epidemiológica das intoxicações e exposições a agentes tóxicos. Os registros da maioria desses centros são consolidados na plataforma DATATOX, que reúne informações provenientes de diversos CIATs distribuídos pelo país, constituindo uma importante fonte de dados para o

monitoramento do perfil das intoxicações no Brasil. Os dados mais recentes do DATATOX evidenciam um aumento contínuo do número de atendimentos realizados pelos CIATs. Em 2023, foram registrados aproximadamente 150 mil casos, número que aumentou para 163 mil em 2024 e atingiu cerca de 195 mil casos em 2025. Entre esses registros, as intoxicações por medicamentos representaram a principal categoria, totalizando aproximadamente 50,6 mil casos em 2023, 55,5 mil em 2024 e 67,5 mil em 2025. As ocorrências relacionadas ao uso de drogas de abuso também apresentaram crescimento no período, passando de 5,5 mil casos em 2023 para 5,8 mil em 2024 e 8,2 mil casos em 2025 (ABRACIT, 2026).

Os registros do Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul (CIT-RS) também refletem a magnitude das exposições tóxicas no cenário regional. Em 2024, foi observado o maior número de atendimentos por exposição humana da série histórica do CIT-RS, com 38,2 mil casos, superando os picos anteriores de 31,5 mil atendimentos em 2023 e 26,4 mil em 2019. Dentre as classes de substâncias mais comuns estão os antidepressivos (15,8%), benzodiazepínicos (15,1%), analgésicos/antipiréticos (7,9%), antipsicóticos/neurolépticos (7,4%), anticonvulsivantes (4,4%) e drogas de abuso (4,1%) (CIT-RS, 2025).

Embora o número de óbitos seja substancialmente menor que o de casos notificados ao SINAN, a mortalidade associada às intoxicações evidencia o potencial de gravidade dessas exposições. Em 2024, foram registrados 1.014 óbitos por envenenamento ou intoxicação por substâncias nocivas no Brasil como causa básica do óbito, segundo o Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM, 2026).

Neste contexto, as intoxicações também apresentam importante relevância médico-legal e forense. A exposição a agentes tóxicos pode estar relacionada a circunstâncias como acidentes, suicídio, homicídio, uso abusivo de substâncias psicoativas, direção sob influência de drogas, entre outras situações de interesse clínico, epidemiológico e pericial. Nesses contextos, a investigação toxicológica assume papel fundamental não apenas para o apoio ao diagnóstico e ao manejo clínico, mas também para o esclarecimento das circunstâncias da exposição, a avaliação do nexo causal e produção de evidências periciais (BIRK *et al.*, 2025; RODDA *et al.*, 2025).

Do ponto de vista clínico, uma intoxicação aguda pode ser definida como um conjunto de sinais e sintomas decorrentes da exposição a uma substância exógena em quantidade suficiente para produzir efeitos deletérios ao organismo (EATON; GILBERT, 2012). As manifestações clínicas são altamente variáveis e dependem de fatores relacionados ao agente tóxico, como dose, via de exposição, propriedades físico-químicas e toxicocinéticas, bem como de fatores individuais, incluindo idade, comorbidades, tolerância e uso concomitante de outras substâncias. Dessa forma, intoxicações podem variar desde quadros leves e autolimitados até quadros graves e potencialmente fatais (OLSON; VOHRA, 2018).

Apesar da diversidade de agentes tóxicos acessíveis à população, diversas intoxicações manifestam-se por padrões clínicos relativamente característicos, denominados toxíndromes ou síndromes tóxicas. O reconhecimento dessas síndromes, baseado em sinais vitais, alterações neurológicas e achados autonômicos, pode fornecer pistas importantes sobre a classe de substância envolvida, especialmente quando a história de exposição é desconhecida ou limitada (HOLSTEGE; BOREK, 2012). Entretanto, apresentações atípicas, exposição polissubstância e comorbidades frequentemente dificultam essa abordagem exclusivamente clínica. Um estudo prévio identificou a presença de dois ou mais medicamentos ou drogas ilícitas em cerca de 45% das amostras de plasma de casos suspeitos de intoxicações atendidos pelo CIT-RS (DOS SANTOS *et al.*, 2022). No cenário forense, diversos estudos têm demonstrado a detecção concomitante de múltiplas substâncias em uma mesma amostra biológica (FERRARI JÚNIOR; CALDAS, 2022; ORFANIDIS *et al.*, 2022; RODDA *et al.*, 2025). Assim, em intoxicações graves, a identificação acurada do agente tóxico, quando disponível em tempo oportuno, pode ter implicações diretas no manejo, na estratificação de risco e no prognóstico clínico (HOFFMAN; ALOUMI; CAO, 2026).

Diante do exposto, a toxicologia analítica desempenha papel central no suporte ao diagnóstico clínico e à investigação forense. A identificação e quantificação de agentes tóxicos em matrizes biológicas podem confirmar exposições, auxiliar na avaliação da gravidade, orientar condutas terapêuticas, elucidar causa da morte e contribuir para a interpretação pericial. Contudo, a interpretação dos resultados toxicológicos depende de diversos fatores,

incluindo o tempo entre a exposição e a coleta, a matriz biológica analisada, parâmetros cinéticos da substância e a metodologia analítica empregada. Apesar de sua relevância, os exames toxicológicos nem sempre estão disponíveis em serviços de urgência e emergência. Além das limitações relacionadas ao tempo de resposta, muitos métodos de triagem apresentam painel analítico limitado, baixa especificidade ou sensibilidade insuficiente para determinados analitos, o que pode dificultar a interpretação clínica e atrasar intervenções terapêuticas (FREDERICK; BISSELL, 2012; UGES, 2011).

1.1.1. Substâncias de relevância toxicológica

Entre as substâncias mais frequentemente envolvidas em intoxicações no cenário clínico e forense, destacam-se os medicamentos e as drogas de abuso, em razão de sua ampla disponibilidade, elevado potencial de exposição e capacidade de produzir efeitos tóxicos significativos no organismo (BEUHLER *et al.*, 2025; SINAN, 2026). Esses agentes estão associados tanto a exposições acidentais quanto intencionais, incluindo tentativas de suicídio, acidentes individuais, automedicação e uso abusivo (CIT-RS, 2025).

Os medicamentos constituem o principal grupo de substâncias envolvidas em intoxicações no Brasil, sendo particularmente relevantes aqueles com ação sobre o sistema nervoso central (SNC) (SINAN, 2026). Entre as principais classes de psicofármacos, destacam-se antidepressivos, benzodiazepínicos, anticonvulsivantes e antipsicóticos (CIT-RS, 2025). A ampla prescrição desses medicamentos, aliada ao uso prolongado, à acessibilidade e ao armazenamento domiciliar frequente, contribui para o elevado número de casos de exposição tóxica envolvendo estes medicamentos (COWANS *et al.*, 2023).

Os antidepressivos representam uma classe heterogênea que inclui fármacos com diferentes mecanismos de ação e indicações de uso, como antidepressivos tricíclicos, inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), inibidores da monoaminoxidase e inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina. Em superdosagens, os efeitos tóxicos podem variar conforme a classe envolvida (THANACOODY, 2020). Enquanto os ISRS tendem a apresentar perfil de toxicidade relativamente mais brando, os antidepressivos tricíclicos estão associados a intoxicações potencialmente graves, incluindo

depressão do SNC, convulsões e cardiotoxicidade. Adicionalmente, a exposição a antidepressivos com ação serotoninérgica pode desencadear síndrome serotoninérgica, caracterizada por alterações neuromusculares, autonômicas e do estado mental (BENOWITZ, 2018a; BENOWITZ, 2018b).

Os benzodiazepínicos também estão entre os agentes mais frequentemente detectados em casos de intoxicação. Entre os benzodiazepínicos mais utilizados destacam-se clonazepam, diazepam, alprazolam e midazolam, que diferem principalmente quanto à duração de ação. Seu efeito tóxico decorre principalmente da modulação alostérica positiva dos receptores GABA-A, com potencialização da neurotransmissão inibitória mediada pelo ácido gama-aminobutírico, resultando em depressão do SNC. Dentre as principais manifestações clínicas estão sedação, ataxia, disartria e depressão do nível de consciência (TSUTAOKA, 2018). Embora intoxicações isoladas por benzodiazepínicos frequentemente apresentem baixa letalidade, o risco de depressão respiratória e complicações graves aumenta substancialmente quando há uso concomitante de outros depressores do SNC, como álcool, opioides ou outros sedativos. O flumazenil pode reverter os efeitos dos benzodiazepínicos em situações selecionadas, mas seu uso deve ser cauteloso, especialmente em pacientes com uso crônico, risco de convulsões ou exposição simultânea a múltiplas substâncias. Esse aspecto torna a exposição polissubstância particularmente relevante na prática toxicológica (ZAMANI; HASSANIAN-MOGHADDAM; ZAMANI, 2022).

Os antipsicóticos ou neurolépticos também possuem importante relevância clínico e forense. Esses fármacos podem ser divididos em típicos (ex.: clorpromazina e haloperidol) e atípicos (ex.: risperidona e quetiapina) e podem produzir toxicidade neurológica, cardiovascular e autonômica a depender do fármaco. Entre as manifestações observadas destacam-se sedação, hipotensão, prolongamento do intervalo QT, arritmias, sintomas extrapiramidais e, em casos mais graves, síndrome neuroléptica maligna (ISBISTER; BALIT; KILHAM, 2005; MINNS; CLARK, 2012; THANACOODY, 2020). A diversidade estrutural entre antipsicóticos típicos e atípicos também contribui para diferenças significativas no perfil toxicológico, uma vez que os antipsicóticos típicos, em geral, apresentam maior antagonismo dopaminérgico D2, enquanto muitos antipsicóticos atípicos combinam antagonismo dopaminérgico com ação

serotoninérgica, embora o perfil farmacológico varie consideravelmente entre as moléculas (CORRELL, 2012).

Os anticonvulsivantes também constituem uma classe de grande relevância toxicológica, especialmente em decorrência de seu uso crônico no manejo de epilepsia, transtornos de humor, dor neuropática e outras condições neurológicas e psiquiátricas (GÜNAYDIN *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2023). Em casos de overdose, esses fármacos podem produzir manifestações predominantemente neurológicas, como sonolência, ataxia, nistagmo, disartria, confusão mental e rebaixamento do nível de consciência (GRAY, 2024). Entretanto, o perfil toxicológico varia consideravelmente entre as diferentes moléculas. Fármacos como carbamazepina e fenitoína podem estar associados à toxicidade cardiovascular, incluindo alterações de condução e arritmias cardíacas, enquanto ácido valproico pode causar hiperamonemia, acidose metabólica e hepatotoxicidade (WANG *et al.*, 2023; WONG *et al.*, 2023). Além disso, o estreito índice terapêutico de alguns anticonvulsivantes e as frequentes interações medicamentosas tornam essa classe particularmente relevante no contexto da monitorização terapêutica e da investigação toxicológica (GRAY, 2024).

Além dos medicamentos sujeitos ao controle das autoridades sanitárias, fármacos de venda livre também representam causa importante de intoxicação, especialmente em exposições acidentais pediátricas e em casos de automedicação. O paracetamol ou acetaminofeno destaca-se entre os medicamentos isentos de prescrição com maior relevância toxicológica em nível global. Em estudos prévios, com análise de amostras de pacientes intoxicados nos estados do Rio Grande do Sul e de São Paulo, esse fármaco figurou entre as três substâncias mais comumente detectadas (DOS SANTOS *et al.*, 2023; FRANCO DE OLIVEIRA *et al.*, 2019). Em doses terapêuticas, o paracetamol apresenta bom perfil de segurança. Entretanto, em superdose, sua biotransformação leva à formação excessiva de N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI), produto reativo capaz de induzir lesão hepatocelular grave e insuficiência hepática aguda. Apesar da gravidade da intoxicação em casos de ingestas massivas, o paracetamol possui um antídoto específico, a N-acetilcisteína, que atua principalmente como precursora da síntese de glutathione

e contribui para a neutralização de metabólitos reativos e a redução do estresse oxidativo (CHIDIAC *et al.*, 2023; DART *et al.*, 2023).

Além dos medicamentos, as drogas de abuso também apresentam papel central na toxicologia clínica e forense. Essas substâncias estão frequentemente associadas a intoxicações agudas, eventos traumáticos, acidentes e mortes relacionadas ao uso recreativo ou compulsivo (BOMBANA *et al.*, 2022; CASTALDELLI-MAIA *et al.*, 2023; SINAN, 2026). Entre as drogas de abuso mais relevantes no cenário brasileiro destacam-se cocaína, canabinoides e psicoestimulantes do tipo anfetamínico, além das novas substâncias psicoativas (NSP).

A cocaína permanece como uma das drogas ilícitas mais frequentemente associadas a intoxicações graves. Birk e colaboradores detectaram cocaína ou seus metabólitos em aproximadamente 18% das amostras de sangue *post-mortem* oriundas de casos forenses no Rio Grande do Sul (BIRK *et al.*, 2025). De maneira semelhante, Campelo e Caldas relataram a identificação da substância e de compostos relacionados em cerca de 22% de mais de 1.800 amostras de urina analisadas no Distrito Federal (CAMPELO; CALDAS, 2010). A toxicodinâmica da cocaína envolve principalmente o bloqueio da recaptação de catecolaminas, como dopamina e noradrenalina, resultando em intensa estimulação simpática. Clinicamente, a intoxicação por cocaína pode manifestar-se com agitação psicomotora, taquicardia, hipertensão, hipertermia, convulsões, isquemia miocárdica e arritmias potencialmente fatais (JORGE DINIZ-OLIVEIRA *et al.*, 2012). Além disso, o consumo concomitante com álcool pode levar à formação de cocaetileno, produto este associado ao aumento da cardiotoxicidade (ZUCOLOTO *et al.*, 2021).

Os canabinoides, como o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), são compostos presentes em produtos derivados da *Cannabis spp.* (família das Cannabaceae) e estão entre as substâncias psicoativas mais consumidas no mundo (PEACOCK *et al.*, 2018). No Brasil, a maconha, nome popular da droga, é a droga de abuso ilícita mais consumida pela população (BASTOS *et al.*, 2017). Embora muitas exposições resultem em quadros leves, intoxicações agudas podem causar ansiedade intensa, alterações perceptivas, comprometimento cognitivo, taquicardia e, em casos específicos, quadros psicóticos agudos (NOBLE; HEDBERG; HENDRICKSON, 2019). A crescente disponibilidade de

produtos com altas concentrações de THC tem contribuído para o surgimento de quadros mais graves e imprevisíveis (SALAS-WRIGHT *et al.*, 2019). No contexto forense, seu consumo também apresenta relevância em investigações relacionadas a colisões de trânsito, alterações psicomotoras e comprometimento da capacidade de julgamento (JOHNSON; MISKELLY; RINDELAUB, 2022).

As anfetaminas e substâncias correlatas, como metanfetamina e 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), apresentam propriedades estimulantes e empatogênicas que favorecem seu uso recreativo. Em intoxicações agudas, esses compostos podem produzir agitação, hiperatividade, hipertermia, rabdomiólise, distúrbios hidroeletrólíticos e alterações cardiovasculares importantes. A gravidade clínica frequentemente depende da dose, assim como do uso concomitante com outras substâncias, sejam lícitas ou ilícitas (GREENE; KERR; BRAITBERG, 2008; ROXBURGH; LAPPIN, 2020)

Por fim, nos últimos anos, as NSP emergiram como desafio importante para a toxicologia. Essas substâncias incluem compostos sintéticos desenvolvidos para mimetizar os efeitos de drogas ilícitas tradicionais e burlar a legislação de controle de substâncias (SANTOS *et al.*, 2024). A rápida introdução de novas moléculas no mercado ilícito, frequentemente com escassa caracterização toxicológica, dificulta tanto o exame clínico quanto sua detecção laboratorial por métodos convencionais (GIORGETTI *et al.*, 2025; KROTULSKI *et al.*, 2025). Dentre as principais classes de NSP com relevância no Brasil estão as catinonas sintéticas (ex.: eutilona, N-etilpentilona), as fenetilaminas sintéticas (ex.: derivados NBOMe e NBOH) e os agonistas sintéticos de receptores canabinoides (ex.: ADB-BUTINACA, MDMB-4en-PINACA) (DOS SANTOS *et al.*, 2023).

Nesse cenário, a elevada diversidade estrutural e farmacológica das substâncias envolvidas em intoxicações, associada à frequente exposição simultânea a múltiplos agentes, impõe desafios significativos à toxicologia analítica. Métodos amplos capazes de detectar diversos compostos em diferentes classes terapêuticas e recreativas tornam-se essenciais para o suporte ao diagnóstico clínico, monitoramento toxicológico e investigação forense (MAURER, 2005).

1.2. Urina como matriz biológica em toxicologia

A interpretação de resultados em toxicologia clínica e forense depende não apenas da sensibilidade e seletividade dos métodos analíticos empregados, mas também da escolha adequada da matriz biológica analisada. Diferentes matrizes podem fornecer informações complementares sobre a exposição a agentes tóxicos, incluindo janela de detecção, padrão temporal de exposição, possibilidade de correlação com o quadro clínico e relevância clínico-forense. Entre as principais matrizes utilizadas, destacam-se sangue, urina, fluido oral e cabelo, cada uma com vantagens e limitações específicas (ALLEN 2011; UGES, 2011). O **Quadro 1** apresenta as principais matrizes biológicas empregadas em toxicologia, incluindo as vantagens, limitações e desafios ao seu uso na rotina analítica.

A urina apresenta diversas vantagens que justificam sua ampla utilização em análises toxicológicas. Entre elas, destaca-se a possibilidade de obtenção de volumes relativamente elevados de amostra, geralmente superiores a 20 mL, permitindo a realização de múltiplas análises e eventuais repetições. Além disso, muitos fármacos, drogas de abuso e seus produtos de biotransformação são excretados em concentrações superiores às observadas em outras matrizes biológicas, favorecendo a detectabilidade e ampliando a janela de detecção (ver **Figura 1**). Outro aspecto relevante é a ampla disponibilidade de testes rápidos comerciais para triagem, os quais podem fornecer resultados preliminares em curto intervalo de tempo (FLANAGAN *et al.*, 2020). Embora a coleta de urina seja geralmente não invasiva, em situações específicas, como em pacientes críticos ou atendidos em serviços de emergência, pode ser necessária a realização de sondagem vesical para obtenção da amostra (UGES, 2011).

Apesar de suas vantagens, o uso da urina também apresenta limitações que devem ser consideradas durante a interpretação dos resultados. A amostra está sujeita à adulteração, substituição ou diluição intencional, exigindo procedimentos para verificação de sua integridade. Adicionalmente, o estado de hidratação do indivíduo pode influenciar significativamente a concentração dos analitos. Por fim, para determinadas substâncias, a investigação dos produtos de biotransformação é indispensável, uma vez que o composto original pode

estar presente em baixas concentrações ou já ter sido extensivamente biotransformado no momento da coleta (FLANAGAN *et al.*, 2020).

Quadro 1. Principais matrizes biológicas em toxicologia.

Matriz	Vantagens	Limitações e desafios
Sangue (incluindo sangue total, plasma e soro)	Pode ser correlacionado com a clínica do paciente ou com o estado <i>antemortem</i> . Ideal para estudos cinéticos. A quantificação tende a ser relevante no contexto clínico-forense. Valores de referências bem estabelecidos.	Necessidade de profissional treinado para coleta. Pequena janela de detecção. Usualmente, os analitos estão em baixas concentrações. Maior suscetibilidade à instabilidade frente às outras matrizes.
Urina	Disponibilidade de grandes volumes de amostra (usualmente > 20 mL). Altas concentrações dos analitos comparados às outras matrizes biológicas. Testes rápidos comerciais estão disponíveis no mercado.	Possibilidade de adulteração. O status hídrico influencia na concentração ou diluição da amostra. Pode ser necessária a pesquisa de produtos de biotransformação.
Fluido oral	A presença do analito no fluido oral geralmente é associada à presença no sangue. Coleta não invasiva.	As concentrações no fluido oral podem não ser correlacionáveis com as concentrações no sangue. Necessidade de dispositivos para a realização da coleta. Baixo volume amostral (em torno de 1 mL).
Cabelo	Larga janela de detecção. Permite verificar exposições crônicas e padrões de uso temporais. Boa estabilidade.	Não útil em casos agudos de intoxicações. Concentrações baixas (ordem de pg/mg de cabelo). Cor e tratamentos cosméticos podem influenciar a incorporação das substâncias na matriz.

Fonte: Adaptado de FLANAGAN *et al.*, 2020.

Figura 1. Janela de detecção por tipo de matriz biológica.

Matriz	Tempo					
Sangue						
Urina						
Fluido oral						
Cabelo						
	Minutos	Horas	Dias	Semanas	Meses	Anos

Fonte: Adaptado de HADLAND; LEVY, 2016.

Usualmente, a janela de detecção de xenobióticos na urina varia de horas a 2 ou 3 dias. A janela de detecção urinária é influenciada, em grande parte, pela toxicocinética do xenobiótico e pela formação de produtos de biotransformação excretados por via renal. Outros fatores, como características físico-químicas da substância, dose e frequência de uso e fatores intrínsecos do indivíduo irão influenciar o tempo em que a substância será detectada na urina (VERSTRAETE, 2004). A **Tabela 1** apresenta a janela de detecção das substâncias mais comumente pesquisadas em exames toxicológicos de urina. De modo geral, substâncias hidrossolúveis e seus produtos conjugados tendem a ser eliminados com maior facilidade pela urina, prolongando sua detectabilidade mesmo após a redução ou desaparecimento das concentrações plasmáticas (MAURER; SAUER; THEOBALD, 2006). Em usuários crônicos, especialmente no caso de compostos lipofílicos, como os canabinoides, a detecção pode se estender por dias ou até semanas em razão do acúmulo tecidual (como tecido adiposo) e da liberação gradual para a circulação. Entretanto, a interpretação dos resultados urinários requer cautela, uma vez que a presença de um analito na urina confirma exposição prévia, mas nem sempre reflete exposição aguda, comprometimento clínico ou momento exato do consumo (ODELL *et al.*, 2015). Além disso, fatores como taxa de filtração glomerular, pH urinário, estado de hidratação e possíveis adulterações da

amostra podem impactar significativamente a concentração detectada e, consequentemente, a interpretação toxicológica.

Tabela 1. Janela de detecção aproximada de drogas de abuso e medicamentos em urina.

Analitos	Janela de detecção
Anfetamina	2 a 4 dias
Barbitúricos	Até 7 dias
Benzodiazepínicos	Até 7 dias
Cocaína (considerando benzoilecgonina como marcador)	1 a 3 dias
Fenciclidina (PCP)	5 a 6 dias
LSD (dietilamida do ácido lisérgico)	1 a 4 dias
Maconha (considerando THC-COOH como marcador)	1 a 30 dias
3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA)	Até 2 dias
Metanfetamina	2 a 4 dias
Opiáceos/opioides	2 a 5 dias

Fonte: Adaptado de HADLAND; LEVY, 2016; VERSTRAETE, 2004.

A função renal influencia diretamente a interpretação de resultados toxicológicos em urina, uma vez que alterações na filtração glomerular, secreção e reabsorção tubular podem modificar a excreção de xenobióticos e seus produtos de biotransformação (FLANAGAN *et al.*, 2020). Em indivíduos com comprometimento renal, a depuração renal de determinadas substâncias pode estar reduzida, alterando tanto a concentração urinária quanto a janela de detecção. Dessa forma, a avaliação da função renal deve ser considerada na interpretação de resultados toxicológicos, especialmente em pacientes com disfunção renal. Adicionalmente, alterações no pH urinário, sejam fisiológicas ou induzidas terapeuticamente, podem modificar a excreção renal de xenobióticos ao alterar seu grau de ionização e reabsorção tubular, influenciando, consequentemente, sua concentração urinária e detectabilidade. Cita-se como exemplo a alcalinização da urina com bicarbonato para aumento da eliminação de ácidos fracos com baixo volume de distribuição, como ácido salicílico e fenobarbital (OLSON; VOHRA, 2018).

Como destacado anteriormente, os xenobióticos estarão presentes na urina majoritariamente na sua forma hidrossolúvel, como produtos de biotransformação. As substâncias podem ser biotransformadas por reações de Fase I, como reações de oxidação, redução e hidrólise, ou Fase II, como conjugação com grupos polares, como o ácido glucurônico e o sulfato (MAURER;

SAUER; THEOBALD, 2006). Conhecer estes aspectos é essencial na análise toxicológica de urina, visto que algumas vezes somente os produtos de biotransformação podem estar presentes na amostra ou, ainda, podem estar em concentrações maiores que os compostos inalterados. Ademais, etapas adicionais como hidrólise podem ser necessárias pela liberação de analitos conjugados (FLANAGAN *et al.*, 2020). No contexto das NSP, a escassez de dados sobre produtos de biotransformação, associada à indisponibilidade de padrões analíticos e à ausência desses alvos em métodos de rotina, representa um importante desafio para a análise toxicológica em urina, podendo contribuir para subdetecção e consequente subnotificação da real prevalência de exposição a essas substâncias emergentes (WELTER-LUEDEKE; MAURER, 2016).

Apesar do mérito do uso da urina no contexto clínico-forense, algumas considerações devem ser levadas em conta. Idealmente, a coleta de amostra de urina deve ser sempre assistida, de forma que o coletador possa atestar a fonte da amostra e que não houve adulteração. Informações como local, data e hora da coleta, coletador e outras informações relevantes devem ser registradas na cadeia de custódia da amostra (EWDTS, 2022). A coleta de urina pode ser realizada por diferentes métodos, incluindo amostras aleatórias, primeira urina da manhã, amostras coletadas ao final do turno de trabalho ou urina de 24 horas, conforme o objetivo clínico ou analítico. Em toxicologia, a amostra aleatória de jato médio é a mais utilizada devido à praticidade, enquanto amostras de horários específicos podem ser úteis em estudos metabólicos ou de monitoramento ocupacional. Idealmente, coleta-se entre 20 e 50 mL de amostra. Além disso, a utilização de preservantes, como ácidos, e o armazenamento sob refrigeração ou congelamento são estratégias importantes para minimizar o crescimento microbiano, a degradação de analitos e alterações químicas da amostra (FLANAGAN *et al.*, 2020).

Em contextos periciais e de monitoramento do uso de substâncias, tentativas deliberadas de adulteração incluem substituição da amostra, adição de diluentes ou introdução de agentes químicos capazes de degradar analitos ou interferir em imunoensaios (FRANKE *et al.*, 2024; WISSENBAACH; STEUER, 2023). Estratégias podem ser implementadas para atestar a veracidade/validação da amostra, como análise de cor, aspecto e odor, além de

parâmetros quantitativos como densidade, pH e temperatura logo após a coleta. A densidade indica quão diluída ou concentrada está uma amostra, seja esta diluição externa (ex.: adição de água ou outro diluente) ou diluição por mecanismos internos (ex.: elevada ingestão de água ou uso de diuréticos) (JOUBERT; LYNCH; CARTER, 2026). Além da densidade, a dosagem da creatinina urinária é útil para verificar a diluição da amostra e pode ser usada para normalizar os resultados (ex.: ng/mg de creatinina). Essa abordagem baseia-se no fato de que a excreção de creatinina apresenta relativa estabilidade ao longo do dia, permitindo minimizar o efeito da diluição urinária sobre a concentração dos analitos e proporcionando uma estimativa mais representativa da excreção da substância. Entretanto, a excreção de creatinina pode ser influenciada por fatores como idade, sexo, massa muscular, dieta e função renal, devendo a interpretação dos resultados corrigidos considerar essas variáveis (BARR *et al.*, 2004). A normalização pela creatinina é particularmente útil em estudos comparativos e em monitoramento longitudinal, pois reduz a variabilidade causada pelo estado de hidratação. Concentrações urinárias de creatinina entre 0,05 e 0,20 mg/mL são sugestivas de urina diluída por hiper-hidratação, enquanto concentrações inferiores a 0,05 mg/mL são consideradas inconsistentes com urina humana e podem indicar adulteração ou substituição da amostra (JOUBERT; LYNCH; CARTER, 2026). Na análise toxicológica, a diluição da urina, seja intencional ou não, representa uma importante limitação, uma vez que reduz a concentração dos analitos, podendo resultar em achados não detectáveis ou inferiores aos valores de corte estabelecidos.

Em determinados cenários, o estabelecimento de valores de corte (do inglês “*cutoff*”) é fundamental para a interpretação adequada dos resultados, uma vez que define a concentração mínima de um analito ou um produto de biotransformação necessária para que uma amostra seja considerada positiva. A proposição desses valores busca equilibrar sensibilidade analítica e especificidade diagnóstica, minimizando tanto resultados falso-positivos, decorrentes de exposições passivas, contaminações ou interferências analíticas, quanto falso-negativos associados a concentrações muito baixas (BIEDERMANN *et al.*, 2018; LUZZI *et al.*, 2004). Os valores de *cutoff* podem variar conforme o objetivo da análise, como monitoramento terapêutico, toxicologia ocupacional, contextos forenses ou programas de monitoramento do

uso de drogas, e devem considerar fatores como a janela de detecção da substância, a matriz analisada e a metodologia empregada. Guias como o “*European guidelines for workplace drug testing in urine*” elaborado pela *European Workplace Drug Testing Society* (EWDTS) é um exemplo de referência para a testagem de drogas em urina no ambiente de trabalho (EWDTS, 2022). A **Tabela 2** apresenta valores de *cutoff* em urina para metodologias de triagem, como imunoensaios, enquanto a **Tabela 3** apresenta valores de *cutoff* em urina para metodologias de confirmação.

Tabela 2. Concentrações de *cutoff* de triagem em urina estabelecidas pela EWDTS.

Analitos	Concentração (ng/mL)
Anfetaminas (grupo)	500
Barbitúricos (grupo)	200
Benzodiazepínicos (grupo)	200
Buprenorfina	5
Cetamina	100
Drogas-Z (ex.: zolpidem, zopiclona)	200
EDDP (ou metadona)	100 (300)
Fentanil	1
Gabapentina	2000
LSD ou produtos de biotransformação	1
Opiáceos (total)	300
Opioides	300
PCP	25
Pregabalina	500
Produtos de biotransformação da cocaína	150
Produtos de biotransformação do THC/maconha	50
Propoxifeno ou produtos de biotransformação	300
Tramadol	200

Fonte: Adaptado de EWDTS, 2022.

Tabela 3. Concentrações de *cutoff* de confirmação em urina estabelecidas pela EWDTS.

Analitos	Concentração (ng/mL)
Anfetaminas	
Anfetamina (d+l)	200
Metanfetamina	200
3,4-metilenodioxianfetamina (MDA)	200
3,4- metilenodioximetanfetamina (MDMA)	200
Outras anfetaminas	200
Benzodiazepínicos ou produtos de biotransformação	
Alprazolam	100
Bromazepam	100

Tabela 3. Concentrações de *cutoff* de confirmação em urina estabelecidas pela EWDTS.

continuação

Analitos	Concentração (ng/mL)
Clonazepam	100
Diazepam	100
Fenazepam	100
Flunitrazepam	100
Flurazepam	100
Lorazepam	100
Lormetazepam	100
Midazolam	100
Nitrazepam	100
Nordiazepam	100
Oxazepam	100
Temazepam	100
Cocaína	
Benzoilecgonina	100
Drogas-Z	
Zaleplon	100
Zolpidem	100
Zopiclona	100
Maconha/Cannabis	
11-nor-9-carboxi- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC-COOH)	15
Metadona	
Metadona (d+l)	250
2-etilideno-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina (EDDP)	75
Opiáceos	
6-acetilmorfina	10
Codeína	300
Diidrocodeína	300
Morfina	300
Opioides	
Hidrocodona	100
Hidromorfona	100
Oxicodona	100
Oximorfona	100
Outras substâncias	
Barbitúricos (grupo)	150
Buprenorfina ou norbuprenorfina	2
Cetamina ou norcetamina	75
Fentanil	1
Gabapentina	1000
Pregabalina	250
LSD ou produto de biotransformação	1
PCP	25
Propoxifeno ou produtos de biotransformação	300
Tramadol	100

Fonte: Adaptado de EWDTS, 2022.

O valor de *cutoff* influencia diretamente a interpretação toxicológica, uma vez que *cutoffs* mais altos reduzem falsos-positivos, mas podem aumentar falsos-negativos, enquanto *cutoffs* mais baixos aumentam a sensibilidade analítica. Nesse contexto, Lecompte *et al.* (2012) demonstraram que uma possível redução do *cutoff* confirmatório urinário de THC-COOH de 15 para 5 ng/mL aumentou em 25,2% o número de resultados confirmados, além de elevar o valor preditivo positivo da triagem de 63,9% para 80,0% (LECOMPTE *et al.*, 2012). Corroborando esse achado, West *et al.* (2011), em um estudo de coorte retrospectivo com análise de 223 mil amostras de urina, demonstraram que a redução dos valores de *cutoff* aumenta significativamente a taxa de positividade em testes urinários. No estudo, a diminuição do *cutoff* de benzoilecgonina de 100 para 25 ng/mL aumentou em aproximadamente 39% o número de resultados positivos, enquanto para metanfetamina a redução de 250 para 50 ng/mL elevou a positividade em cerca de 28%. Na testagem de THC-COOH, a redução de 50 para 15 ng/mL resultou em aumento de 35%. Esses achados reforçam que *cutoffs* mais baixos aumentam a sensibilidade diagnóstica e favorecem a ampliação da janela de detecção. Apesar disso, os valores de *cutoff* são empregados para estabelecer limites de decisão analítica, auxiliando a distinguir exposições significativas de concentrações residuais ou oriundas de exposição passiva, além de definir janelas de detecção compatíveis com a finalidade da análise (WEST *et al.*, 2011).

Diferentemente dos programas de monitoramento de drogas de abuso, nos quais são adotados valores de *cutoff* para otimizar a especificidade dos testes de triagem, a toxicologia clínica prioriza métodos analíticos com elevada sensibilidade e seletividade, capazes de detectar um amplo espectro de xenobióticos. Nessa abordagem, os resultados laboratoriais devem ser interpretados em conjunto com os dados clínicos e circunstanciais do paciente, não existindo valores universais de *cutoff* para caracterização de intoxicação. A utilização de técnicas baseadas em espectrometria de massas amplia essa capacidade diagnóstica ao permitir triagem multianalito com alta sensibilidade, reduzindo a dependência de imunoensaios baseados em valores de corte (LUCH, 2010).

Aspectos pré-analíticos relacionados ao armazenamento e à estabilidade das amostras de urina também devem ser considerados na análise toxicológica,

uma vez que podem impactar diretamente a integridade dos analitos e a confiabilidade dos resultados. Fatores como o tempo decorrido entre a coleta e a análise, temperatura de armazenamento, exposição à luz e ciclos de congelamento e descongelamento podem favorecer a degradação dos analitos, hidrólise ou biotransformação residual de determinadas substâncias. Além disso, a proliferação microbiana em amostras inadequadamente armazenadas pode alterar parâmetros físico-químicos, como pH, e comprometer a estabilidade de xenobióticos e de seus produtos (ALDUBAYYAN *et al.*, 2021; HOFFMANN-LÜCKE *et al.*, 2025; VAN DE MERBEL *et al.*, 2014). Dessa forma, o armazenamento sob condições controladas, como refrigeração ou congelamento quando necessário, é fundamental para minimizar alterações pré-analíticas e assegurar maior confiabilidade na interpretação analítica (ALDUBAYYAN *et al.*, 2021; GLICKSBERG; KERRIGAN, 2018; NISBET *et al.*, 2023).

Hoffmann-Lücke *et al.* (2025), em revisão sistemática sobre a estabilidade de drogas de abuso em urina, demonstraram que a maioria dos analitos apresenta estabilidade satisfatória quando as amostras são armazenadas sob refrigeração ou congelamento. Em contrapartida, o armazenamento em temperatura ambiente, assim como variações de pH e contaminação bacteriana, pode comprometer a estabilidade de substâncias mais suscetíveis à degradação, como canabinoides, cocaína e alguns opioides (HOFFMANN-LÜCKE *et al.*, 2025). De forma semelhante, Nisbet *et al.* (2023) destacaram que a estabilidade de analitos em urina é altamente dependente das condições de armazenamento. Os autores observaram que, por exemplo, o THC-COOH permaneceu estável por até 52 semanas sob congelamento (-20 °C), enquanto degradação significativa foi observada após 1 semana em temperatura ambiente e após 4 semanas sob refrigeração (NISBET; DIEMMA; SCOTT, 2023). No cenário das novas substâncias psicoativas, os dados de estabilidade na urina ainda são escassos, mas a maior labilidade de muitos desses compostos sugere que condições inadequadas de armazenamento podem comprometer significativamente sua detecção. Esse aspecto torna-se ainda mais crítico ao se considerar que diversas NSP já se encontram presentes em baixas concentrações na urina, de modo que pequenas perdas por degradação podem resultar em concentrações abaixo dos limites de detecção (ALDUBAYYAN *et*

al., 2021; BOCCUZZI *et al.*, 2026; GLICKSBERG; KERRIGAN, 2018; NISBET *et al.*, 2023).

1.3. Análise toxicológica em urina: preparo de amostra e técnicas analíticas

1.3.1 Preparo de amostra

O preparo de amostra constitui uma etapa fundamental na análise toxicológica, desempenhando papel decisivo na qualidade e na confiabilidade dos resultados analíticos. De forma geral, essa etapa compreende o conjunto de procedimentos realizados entre a obtenção da amostra biológica e sua introdução no sistema analítico, com o objetivo de tornar a amostra compatível com a técnica empregada, reduzir interferentes da matriz e favorecer a detecção dos analitos de interesse. Em toxicologia, o preparo de amostra é particularmente relevante devido à complexidade das matrizes biológicas, que contêm sais, compostos endógenos, proteínas residuais, produtos de biotransformação e outros componentes capazes de interferir na detecção e na quantificação dos compostos de interesse (JONES *et al.*, 2022).

A principal finalidade do preparo de amostra é isolar, concentrar e/ou purificar os analitos, minimizando a presença de interferentes provenientes da matriz. Esse processo contribui para a redução do efeito matriz, melhora a seletividade e a sensibilidade do método, favorece recuperações adequadas e reprodutíveis dos compostos-alvo e auxilia na preservação da integridade dos sistemas instrumentais, especialmente em técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas. Além disso, a escolha do tipo de preparo deve considerar fatores como as propriedades físico-químicas dos analitos, a natureza da matriz biológica, a técnica analítica empregada e os requisitos de desempenho do método, incluindo sensibilidade, robustez e produtividade (COUCHMAN; MORGAN, 2011). Entre as principais estratégias empregadas no preparo de amostras de urina, destacam-se a técnica de *dilute-and-shoot*, a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE), que serão abordadas a seguir. Adicionalmente, ressalta-se a etapa de hidrólise,

particularmente relevante na análise toxicológica em urina, devido à presença de analitos conjugados e produtos de biotransformação.

1.3.1.1. Hidrólise de compostos conjugados

A hidrólise de compostos conjugados é uma etapa frequentemente necessária na análise toxicológica em urina, especialmente quando os analitos são excretados predominantemente como produtos de biotransformação conjugados com grupos polares, oriundos de reações de Fase II. Os principais produtos gerados são derivados conjugados com ácido glucurônico ou sulfato. A hidrólise exerce influência importante na etapa de extração, uma vez que compostos conjugados apresentam maior polaridade e hidrossolubilidade, o que pode dificultar sua recuperação em técnicas extrativas baseadas em partição para solventes orgânicos ou interação com sorventes menos polares. A conversão dos produtos conjugados para a forma livre reduz sua polaridade e, em muitos casos, aumenta sua afinidade por solventes orgânicos ou sorventes hidrofóbicos, favorecendo a eficiência da extração e a detectabilidade dos analítico (FLANAGAN *et al.*, 2020; UGES, 2011).

O processo de hidrólise pode ser dividido em três métodos: hidrólise ácida, hidrólise básica ou alcalina e hidrólise enzimática. As hidrólises ácidas e básicas promovem a quebra de ligações conjugadas por meio da exposição da amostra a condições extremas de pH, geralmente associadas ao aquecimento. Embora essas abordagens apresentem como vantagens o menor tempo de processamento e o baixo custo, podem resultar em degradação de analitos termolábeis, formação de artefatos e menor seletividade. Um exemplo é a utilização de hidrólise ácida na análise de benzodiazepínicos que, embora seja capaz de promover a desconjugação desses compostos, pode também induzir abertura do anel diazepínico e formação de derivados benzofenônicos, reduzindo a especificidade do método quando diferentes benzodiazepínicos originam produtos comuns de degradação. De forma semelhante, a hidrólise ácida do 6-monoacetilmorfina-glucuronídeo, importante marcador do consumo de heroína, pode provocar reações de desacetilação, resultando na formação de morfina e comprometendo a identificação inequívoca do composto original (JOHNSON-DAVIS, 2018).

Em contraste, a hidrólise enzimática tem sido amplamente empregada devido à sua maior especificidade e às condições reacionais mais brandas. Essa abordagem utiliza enzimas, principalmente β -glucuronidase, para clivar conjugados glucuronidados, e arilsulfatase, para clivar conjugados sulfatados, preservando melhor a integridade dos analitos e reduzindo artefatos secundários. Apesar de frequentemente demandar maior tempo de incubação e custos mais elevados, a hidrólise enzimática é geralmente preferida na análise toxicológica em urina quando o objetivo é liberar analitos conjugados preservando, tanto quanto possível, a estrutura dos compostos livres (FLANAGAN *et al.*, 2020; SKOV *et al.*, 2023).

A eficiência da hidrólise enzimática depende de diversos fatores, incluindo a origem da enzima, sua atividade específica, os parâmetros de incubação (tempo, temperatura e pH) e a natureza dos conjugados presentes na amostra. Diferentes preparações de β -glucuronidase apresentam especificidades distintas, sendo as enzimas derivadas de *Helix pomatia* amplamente utilizadas por associarem atividade da β -glucuronidase e da arilsulfatase, possibilitando a hidrólise tanto de conjugados glucuronídeos quanto de conjugados sulfatos. Em contrapartida, enzimas provenientes de *Escherichia coli* apresentam elevada atividade β -glucuronidase, porém não possuem atividade de sulfatase, tornando-se mais adequadas para analitos excretados predominantemente como glucuronídeos. Além disso, a eficiência da hidrólise pode variar entre diferentes classes de compostos e até mesmo entre amostras, em razão da presença de substâncias capazes de interferir na atividade enzimática. Dessa forma, a seleção da enzima e a otimização das condições de hidrólise devem considerar o perfil dos analitos de interesse, sendo etapas fundamentais para maximizar a recuperação dos compostos e garantir a sensibilidade e a confiabilidade dos métodos analíticos (DWIVEDI *et al.*, 2018; TAYLOR *et al.*, 2017).

O **Quadro 2** apresenta exemplos de protocolos e aplicações dos diferentes tipos de hidrólise. Por fim, a escolha do método de hidrólise deve considerar fatores como a natureza do analito e de seus conjugados, a estabilidade química dos compostos, o tempo de processamento, a compatibilidade com a técnica analítica empregada e o impacto potencial sobre a recuperação e a integridade dos analitos.

Quadro 2. Tipos de hidrólise e respectivos exemplos de protocolos e aplicações.

Hidrólise	Exemplo de aplicação	Protocolo	Referência
Ácida	Compostos fenólicos, como alguns pesticidas e disruptores endócrinos	Amostra: 500 µL Ácido: 125 µL de HCl 12 mol/L Condições: 90 °C por 60 min	LU <i>et al.</i> , 2015
Básica/alcalina	THC-COOH	Amostra: 2 mL Base: 100 µL de NaOH 10% (v/v) Condições: 60 °C por 20 min	DE OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2021
Enzimática	Benzodiazepínicos	Amostra: 2 mL Enzima: 25 µL de β-glucuronidase de <i>Helix pomatia</i> (100 U/µL) + 100 µL de tampão de acetato de sódio 2 mol/L (pH 4,5) Condições: 55 °C por 90 min	DE BAIRROS <i>et al.</i> , 2015

1.3.1.2. *Dilute-and-shoot*

Entre as principais técnicas de preparo de amostra de urina, uma das mais simples e amplamente utilizadas é a diluição seguida de injeção direta, conhecida como *dilute-and-shoot*. Essa abordagem baseia-se na diluição da amostra com solvente, fase móvel ou solução tampão compatível com o método analítico, seguida de sua injeção no sistema instrumental. Usualmente, empregam-se água, soluções tampão e solventes orgânicos, como metanol, acetonitrila ou etanol, isoladamente ou em mistura, conforme as características dos analitos e da separação cromatográfica. Além da diluição, procedimentos como adição de padrão interno, agitação, centrifugação e/ou filtração podem ser empregados para homogeneizar a amostra, remover partículas em suspensão e reduzir a introdução de material particulado no sistema analítico (DEVENTER *et al.*, 2014; TAMAMA, 2023). Trata-se de uma estratégia simples, de baixo custo, rápida e compatível com rotinas de alto rendimento, com possibilidade de automação parcial ou total do preparo em plataformas integradas ao sistema analítico (SIDE, 2018).

Entre as principais vantagens dessa técnica destaca-se a possibilidade de análise de uma ampla variedade de compostos em um mesmo preparo, uma vez

que, diferentemente de métodos extrativos convencionais, não depende diretamente de condições específicas de pH para a recuperação dos analitos. Tal atributo é favorável no contexto clínico-forense para o desenvolvimento de métodos analíticos voltados à análise toxicológica sistemática, permitindo análise direcionada ou não de substâncias com diferentes características físico-químicas (JONES *et al.*, 2022; TAMAMA, 2023). CAO, KALETA e WANG (2015) analisaram amostras de urina para 78 substâncias em uma única análise usando um protocolo de *dilute-and-shoot* e LC-MS/MS. No painel de analitos, os autores incluíram antidepressivos, benzodiazepínicos, analgésicos, anfetaminas, dentre outros. Os limites de quantificação variaram de 0,3 a 62,5 ng/mL (CAO; KALETA; WANG, 2015). No mesmo sentido, o método desenvolvido por LEE (2013) permitiu a triagem simultânea de 177 substâncias, incluindo drogas de abuso, fármacos e seus produtos de biotransformação, abrangendo classes como opioides, benzodiazepínicos, estimulantes, antidepressivos e analgésicos. O método usando *dilute-and-shoot* e análise por LC-MS/MS apresentou alta sensibilidade, com limites de detecção inferiores a 62 ng/mL, chegando a 6 ng/mL para alguns analitos (LEE, 2013).

Em contrapartida, por tratar-se de uma técnica de diluição sem concentração da amostra, é indicada para analitos que estejam presentes em concentrações consideráveis na amostra ou que tenham boa detectabilidade. Por tal razão, usualmente o preparo de amostra usando *dilute-and-shoot* é associado a técnicas instrumentais de alta sensibilidade, como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (COUCHMAN; MORGAN, 2011). Além disso, usualmente o *dilute-and-shoot* é aplicável a amostras com baixo conteúdo proteico como urina, visto que os solventes de diluição nem sempre terão capacidade desproteinizante (TAMAMA, 2023). Por fim, frente a outros preparos extrativos, a técnica *dilute-and-shoot* tem capacidade de limpeza da amostra (*clean-up*) inferior e o efeito da matriz no sinal analítico pode ser um limitante de sensibilidade.

1.3.1.3. Extração líquido-líquido (LLE)

A extração líquido-líquido (LLE, do inglês *liquid-liquid extraction*) é uma das técnicas de preparo de amostras mais utilizadas em toxicologia. Seu

princípio baseia-se na distribuição do analito entre duas fases líquidas imiscíveis, geralmente uma fase aquosa, correspondente à amostra biológica, e uma fase orgânica, composta por um solvente extrator. A migração do analito da amostra para a fase orgânica depende principalmente de suas propriedades físico-químicas, como polaridade, lipofilicidade e grau de ionização, descritas por parâmetros como pK_a , $\log P$ e, sobretudo, $\log D$ no pH de extração. O extrato obtido pode ser injetado diretamente no sistema analítico, desde que apresente compatibilidade com a técnica empregada, ou submetido à evaporação para promover a concentração dos analitos (KARAKKA KAL; SUBHAHAR; KARATT, 2026).

A eficiência da LLE é fortemente influenciada pelo pH da amostra, pois este determina o estado de ionização dos compostos ácidos e básicos. Em geral, moléculas em sua forma não ionizada apresentam maior afinidade pela fase orgânica, favorecendo sua extração. Enquanto isso, moléculas protonadas (carregadas positivamente) ou desprotonadas (carregadas negativamente) terão maior afinidade pela fase aquosa, no caso, a amostra. Por tal motivo, o ajuste do pH é essencial para maximizar a recuperação dos analitos de interesse (COUCHMAN; MORGAN, 2011). Uma das principais limitações da LLE é a análise de substâncias anfóteras, isto é, moléculas que apresentem dois ou mais sítios ionizáveis com pK_a distintos (ácidos e básicos). Como resultado, a molécula tende a ficar ionizada, qualquer que seja o pH do meio. Um exemplo clássico é a benzoilecgonina, principal produto de biotransformação da cocaína, que pode ser caracterizada como uma molécula anfótera, tendo baixa recuperação em métodos usando LLE. Nesse contexto, Maria e colaboradores (2026) observaram recuperação de apenas 11% para a benzoilecgonina, em contraste com aproximadamente 69% para a cocaína, quando empregando LLE com 2-propanol e acetato de etila e posterior análise por LC-MS/MS, evidenciando a maior dificuldade de extração do produto em sistemas de partição líquido-líquido (MARIA; NENG; BERG, 2026).

Além do pH, o tipo de solvente orgânico empregado também exerce papel importante no desempenho da extração, sendo comumente empregados solventes como acetato de etila, clorofórmio, diclorometano, éter etílico e hexano, isoladamente ou em misturas. A escolha do solvente depende da classe de compostos a serem extraídos. Idealmente, utilizam-se solventes com valores

de logP semelhantes aos dos analitos, buscando maior afinidade e, consequentemente, melhor recuperação (FLANAGAN *et al.*, 2020). Misturas de diferentes solventes também podem ser empregadas com o objetivo de ampliar o espectro de compostos analisados. Para a definição da composição ideal da fase extratora, podem ser utilizadas estratégias baseadas em planejamento experimental multivariado, permitindo a identificação das condições que maximizam a eficiência de extração (BIGÃO *et al.*, 2024; COUCHMAN; MORGAN, 2011).

Entre as principais vantagens da LLE destacam-se sua relativa simplicidade operacional, baixo custo e boa capacidade de concentração dos analitos, tornando-a amplamente aplicável em análises toxicológicas clínicas e forenses. Entretanto, a técnica também apresenta limitações, como maior consumo de solventes orgânicos, possibilidade de formação de emulsões e menor eficiência para compostos altamente polares (WILLE; LAMBERT, 2007). Além disso, o uso da LLE pode tornar mais desafiador o desenvolvimento de métodos multianalito para substâncias com diferentes características físico-químicas, embora essa limitação possa ser contornada por meio da adequada otimização das condições de extração. Nesse contexto, um estudo de 2021 exemplifica a aplicação da LLE como etapa de preparo de amostras em um método multianalito voltado à triagem de drogas clássicas e novas substâncias psicoativas em urina, permitindo a extração simultânea de diferentes classes de compostos antes da análise por GC-MS e LC-HRMS. Essa abordagem possibilitou a identificação de cerca de 80 substâncias em pacientes em tratamento da dor, evidenciando a utilidade da LLE em estratégias multianalito aplicadas à triagem toxicológica em urina (MARCHEI *et al.*, 2021).

Ademais, embora preparos mais modernos tenham sido desenvolvidos, a extração líquido-líquido permanece como uma abordagem robusta, eficiente e relevante no preparo de amostras para análise toxicológica.

1.3.1.4. Extração em fase sólida (SPE)

A extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid-phase extraction*) é uma técnica de preparo de amostras amplamente utilizada em toxicologia, especialmente quando se busca maior seletividade, concentração dos analitos e

remoção de interferentes da matriz biológica. Seu princípio baseia-se na retenção seletiva dos analitos em uma fase estacionária sólida (sorvente), seguida da remoção de compostos interferentes e posterior eluição dos analitos com um solvente apropriado. De forma geral, o processo de SPE envolve quatro etapas principais: condicionamento do sorvente, aplicação da amostra, lavagem para remoção de interferentes fracamente retidos e eluição dos analitos (BUSZEWSKI; SZULTKA, 2012).

O mecanismo de retenção na SPE depende das interações estabelecidas entre os analitos, a matriz e o sorvente, podendo envolver interações hidrofóbicas, polares, iônicas ou mistas. Em sorventes de fase reversa, como C18 e C8, predominam interações hidrofóbicas, sendo estes amplamente empregados para compostos apolares ou moderadamente polares. Já sorventes de fase normal, como a sílica, favorecem a retenção de compostos polares por interações dipolo-dipolo e por ligações de hidrogênio. Além disso, cartuchos de troca iônica (catiônica ou aniônica) são úteis para analitos ionizáveis, enquanto sorventes de fase mista combinam múltiplos mecanismos de retenção, o que permite maior seletividade em métodos multianalito (BADAWY *et al.*, 2022). Mais recentemente, sorventes poliméricos como os de balanço hidrofílico-lipofílico (HLB, do inglês *hydrophilic-lipophilic balance*) têm ganhado destaque por combinarem interações hidrofóbicas e hidrofílicas, oferecendo ampla aplicabilidade para analitos com diferentes polaridades (LOREDO *et al.*, 2025). Adicionalmente, materiais à base de zircônia vêm sendo empregados para aplicações específicas, especialmente na remoção seletiva de interferentes da matriz, como fosfolipídios, contribuindo para a redução do efeito matriz e para a melhora do desempenho analítico em métodos usando espectrometria de massas (PUCCI *et al.*, 2009).

A SPE pode ser realizada em diferentes formatos, incluindo cartuchos, discos, placas de 96 poços e ponteiros para sistemas automatizados, o que amplia sua aplicabilidade e capacidade de automação. Entre suas principais vantagens destacam-se a elevada capacidade de *clean-up*, a redução do efeito matriz, o menor consumo de solventes orgânicos em comparação à extração líquido-líquido e a alta concentração dos analitos (COUCHMAN; MORGAN, 2011). Seu elevado potencial de remoção de interferentes da matriz torna a SPE especialmente adequada para métodos baseados em análises *untargeted* ou

full-scan, envolvendo, por exemplo, a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) e a espectrometria de massas de alta resolução (HRMS), uma vez que a redução do ruído de fundo e do efeito matriz contribui para a melhora da qualidade espectral e facilita a detecção e identificação de analitos (MUSATADI *et al.*, 2023).

Apesar de suas vantagens, a SPE também apresenta limitações. O desenvolvimento do método pode ser mais complexo, exigindo otimização criteriosa do sorvente, das soluções de lavagem e dos solventes de eluição. Além disso, cartuchos especializados podem elevar os custos analíticos, especialmente em análises em larga escala. Outro desafio está no desenvolvimento de métodos multianalito envolvendo compostos com propriedades físico-químicas muito distintas, uma vez que a seleção de condições que favoreçam simultaneamente a retenção e eluição eficientes de todos os analitos pode ser complexa. Ainda assim, a SPE permanece como uma das principais estratégias de preparo de amostras de urina em toxicologia devido ao seu equilíbrio entre seletividade, robustez e desempenho analítico (BADAWY *et al.*, 2022).

1.3.1.5. Microextrações

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de métodos de preparo de amostras em toxicologia analítica tem sido fortemente influenciado pelos princípios da Química Analítica Verde (GAC, do inglês *Green Analytical Chemistry*), uma vertente da química analítica voltada à redução do impacto ambiental das análises laboratoriais (BIRK *et al.*, 2023). Esse objetivo é buscado por meio da redução do consumo de reagentes tóxicos, da geração de resíduos, do gasto energético e da exposição ocupacional a solventes e substâncias perigosas. Em toxicologia, esses princípios foram adaptados ao conceito de Toxicologia Analítica Verde (GAT, do inglês *Green Analytical Toxicology*), que incorpora, além da sustentabilidade, as particularidades das análises toxicológicas, como a necessidade de elevada sensibilidade, seletividade, robustez e capacidade de análise multianalito em matrizes biológicas complexas. Nesse contexto, o desenvolvimento de técnicas miniaturizadas de preparo de amostra surge como uma estratégia para reduzir volumes de amostra e de

solventes orgânicos, favorecer a capacidade de automação e aumentar a segurança ocupacional do analista, desde que o desempenho analítico seja preservado por adequada otimização do método (BARROSO et al., 2012; MEIRELLES et al., 2022).

Embora técnicas convencionais, como LLE e SPE, permaneçam amplamente utilizadas, essas abordagens frequentemente demandam consumo significativo de solventes orgânicos e maior tempo para o preparo de amostra. Além disso, na toxicologia clínica e forense, a crescente necessidade de detectar analitos em concentrações-traço, frequentemente em amostras de volume limitado, impõe novos desafios analíticos. Assim, novas técnicas de microextração têm destaque por combinarem etapas de extração, limpeza e pré-concentração em procedimentos mais rápidos, miniaturizados e potencialmente automatizáveis (HE; CONCHEIRO-GUISAN, 2020).

De modo geral, as técnicas de microextração podem ser classificadas em microextrações baseadas em fase sólida e em fase líquida, de acordo com a natureza da fase extratora. Entre as abordagens em fase sólida destacam-se a microextração em fase sólida (SPME), a extração em fase sólida dispersiva (dSPE), a microextração por sorvente empacotado (MEPS) e a extração sortiva em barra de agitação (SBSE). Já entre as abordagens em fase líquida, as mais empregadas incluem a microextração em fase líquida (LPME) e a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME). Essas técnicas têm sido amplamente aplicadas em toxicologia clínica e forense devido à capacidade de combinar extração e pré-concentração com menor consumo de solventes e maior rapidez analítica. Nas técnicas baseadas em fase sólida, os analitos são extraídos principalmente por mecanismos de sorção, adsorção ou interação com o sorvente, enquanto, nas técnicas baseadas em fase líquida, a extração ocorre predominantemente por partição entre a amostra e a fase extratora. Em ambos os casos, a eficiência depende das propriedades físico-químicas dos analitos, da composição da matriz, do pH, da força iônica, do tempo de extração e das características da fase extratora (BARROSO et al., 2012; BIRK et al., 2023; HE; CONCHEIRO-GUISAN, 2020).

Na SPME, os analitos particionam da matriz para um revestimento sorvente imobilizado em uma fibra ou dispositivo equivalente, por imersão direta ou em modo *headspace*, até o equilíbrio ou um estado próximo a ele. Após a

sorção dos analitos na fibra, a dessorção pode ser feita diretamente no injetor, no caso de cromatografia gasosa, ou em solvente apropriado para posterior análise por cromatografia líquida. A SPME em modo *headspace* é particularmente útil para compostos voláteis ou semivoláteis, além de favorecer a automação e reduzir a introdução de componentes não voláteis da matriz no sistema analítico. No entanto, sua aplicação depende da volatilidade e da estabilidade térmica dos analitos, podendo exigir otimização de temperatura, tempo de extração, pH e força iônica (LESZCZYŃSKA *et al.*, 2024). A SBSE opera sob um princípio semelhante, porém utiliza uma barra magnética revestida com sorvente que permanece em contato com a amostra sob agitação. Geralmente, barras de SBSE possuem um volume de fase extratora significativamente maior que o da SPME, o que pode aumentar a capacidade de retenção e favorecer a sensibilidade analítica, especialmente para analitos com elevada afinidade pelo revestimento (NAZYROPOULOU; SAMANIDOU, 2015).

Já na dSPE, o sorvente é disperso diretamente na amostra, promovendo maior área de contato e rápida interação com os analitos ou interferentes, sendo posteriormente separado por centrifugação, filtração ou magnetismo para que, assim, seja feita a dessorção ou a recuperação da fração de interesse. Por sua vez, a MEPS representa uma miniaturização da SPE convencional, na qual pequenas quantidades de sorvente são empacotadas em seringas, cartuchos ou dispositivos miniaturizados. A amostra é aspirada e dispensada repetidamente através da fase sólida, permitindo retenção dos analitos, remoção de interferentes e posterior eluição em pequenos volumes de solvente, o que pode favorecer a injeção direta no sistema analítico. (BIRK *et al.*, 2023).

Na LPME, os analitos migram da amostra para pequenos volumes de solvente orgânico ou para uma fase aceitadora confinada, frequentemente em membranas ocas porosas (do inglês *hollow fiber*), de acordo com sua afinidade relativa entre as fases (DE BAIRROS *et al.*, 2015). Na DLLME, uma mistura de solvente extrator e solvente dispersor é rapidamente introduzida na amostra aquosa, formando uma dispersão de microgotículas que aumenta drasticamente a área interfacial entre as fases, acelera a transferência de massa e favorece a extração eficiente em curto tempo (JAIN; SINGH, 2016). Embora eficiente e baseada no uso de baixos volumes de solvente, a DLLME exige seleção criteriosa dos solventes extrator e dispersor, além de controle das condições de

dispersão, separação de fases e compatibilidade com a técnica instrumental subsequente.

De modo geral, a escolha entre microextrações em fase sólida ou líquida depende das propriedades físico-químicas dos analitos, da complexidade da matriz a ser analisada, dos limites de detecção e quantificação requeridos, da necessidade de pré-concentração, da compatibilidade com a técnica instrumental subsequente e do potencial de automação do preparo. No contexto da análise toxicológica em urina, as microextrações têm sido amplamente aplicadas na determinação de substâncias de interesse toxicológico, como drogas de abuso tradicionais, novas substâncias psicoativas, antidepressivos, benzodiazepínicos, opioides e medicamentos isentos de prescrição (BIRK *et al.*, 2023; NOURANI *et al.*, 2022).

1.3.2. Técnicas de triagem

No cenário clínico e forense, os testes de triagem, *screening* ou testes rápidos constituem, muitas vezes, a etapa inicial da investigação laboratorial para detecção de xenobióticos e produtos relacionados na urina. Seu principal objetivo é fornecer uma avaliação rápida e presuntiva sobre a possível presença de substâncias de interesse, auxiliando na tomada de decisão inicial e na seleção de amostras que requerem investigação confirmatória. Em geral, as metodologias de triagem tendem a priorizar elevada sensibilidade, buscando minimizar resultados falso-negativos e garantir que amostras com suspeita de presença do analito ou de uma classe de substâncias sejam identificadas para análises confirmatórias subsequentes (SMITH, 2020).

Entre as principais técnicas de triagem destacam-se os imunoensaios, incluindo métodos como imunocromatografia de fluxo lateral, ensaio imunoenzimático (ELISA, do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*), imunoensaio enzimático multiplicado (EMIT, do inglês *enzyme multiplied immunoassay technique*) e imunofluorescência. Esses métodos baseiam-se na interação entre antígenos e anticorpos, permitindo a detecção de classes de compostos com relativa simplicidade operacional. Como vantagens, os testes de triagem apresentam rapidez analítica, custo relativamente baixo por amostra, facilidade de automação e capacidade de processamento em larga escala,

características que os tornam particularmente úteis em laboratórios com alta demanda (MELANSON *et al.*, 2012). Além disso, muitos testes rápidos podem ser realizados com preparo mínimo de amostra e com infraestrutura laboratorial reduzida, favorecendo seu uso em ambientes descentralizados ou próximos ao local de atendimento (dispositivos *point-of-care*) (KRASOWSKI *et al.*, 2019).

Apesar de sua utilidade, os testes de triagem possuem limitações importantes que devem ser consideradas na interpretação dos resultados. Por serem métodos essencialmente presuntivos, geralmente não fornecem identificação inequívoca do analito. A ocorrência de reatividade cruzada com compostos estruturalmente semelhantes ou não relacionados estruturalmente pode levar a resultados falso-positivos, enquanto variações na sensibilidade analítica ou concentrações abaixo do *cutoff* podem resultar em falso-negativos (BRAHM *et al.*, 2010). A ocorrência de resultados falsos-positivos em imunoensaios é amplamente documentada na literatura. Uma revisão de 61 estudos demonstrou que diversos fármacos e seus produtos podem apresentar reatividade cruzada, gerando interferências em diferentes classes de drogas, como anfetaminas, benzodiazepínicos, cocaína, canabinoides, opiáceos, opioides e PCP (SAITMAN *et al.*, 2026). Diante disso, resultados positivos obtidos em testes de triagem frequentemente requerem confirmação por técnicas instrumentais mais seletivas e específicas, como cromatografia gasosa ou líquida acoplada à espectrometria de massas.

Outra limitação importante dos testes comerciais de triagem é a cobertura limitada do painel de substâncias contempladas, que, em geral, abrange drogas de abuso e fármacos tradicionais, como cocaína, canabinoides, anfetaminas, benzodiazepínicos e opiáceos (KRASOWSKI *et al.*, 2019). Painéis analíticos restritos podem resultar em triagens urinárias com resultado não reagente ou não detectado, mesmo na presença de quadro de intoxicação clinicamente relevante, comprometendo a exclusão diagnóstica quando utilizados de forma isolada. Esse cenário foi demonstrado por Yamamoto *et al.* (2026), que observaram detecção de fármacos no sangue em 99,4% de 501 pacientes com suspeita de intoxicação aguda e triagem em urina não reagente, sendo que 86,3% correspondiam a substâncias não contempladas no teste de triagem, evidenciando que resultados negativos não excluem exposição a xenobióticos nem a possibilidade de intoxicação aguda (YAMAMOTO *et al.*, 2026).

A disponibilidade de testes rápidos voltados para as NSP permanece reduzida, principalmente devido à grande variabilidade estrutural desses compostos, ao surgimento contínuo de novos análogos e à rápida mudança nos padrões de consumo e comercialização no mercado ilícito. Além disso, muitas NSP possuem alta potência farmacológica e podem estar presentes em concentrações baixas, o que representa um desafio adicional para o desenvolvimento de imunoensaios sensíveis e suficientemente abrangentes (KROTULSKI *et al.* 2025). Por fim, os testes de triagem devem ser compreendidos como ferramentas de rastreamento úteis e frequentemente essenciais para orientar a investigação toxicológica inicial, mas não como métodos definitivos para confirmação analítica.

1.3.3. Técnicas instrumentais

As técnicas instrumentais desempenham papel central na toxicologia analítica, especialmente em contextos que demandam elevada seletividade, sensibilidade e confiabilidade na detecção e/ou quantificação de agentes tóxicos em matrizes biológicas. Diferentemente dos testes de triagem, que fornecem resultados presuntivos e apresentam cobertura analítica limitada, métodos instrumentais podem fornecer identificação confirmatória e quantificação dos analitos, desde que sejam empregados métodos validados e critérios adequados de identificação. Na análise toxicológica em urina, essas técnicas são particularmente relevantes devido à complexidade da matriz e à ampla diversidade de substâncias potencialmente presentes, incluindo fármacos, drogas de abuso, produtos de biotransformação e, mais recentemente, novas substâncias psicoativas. Nesse contexto, as técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas consolidaram-se como abordagens centrais para confirmação, triagem ampliada e quantificação em laboratórios clínicos e forenses (FLANAGAN *et al.*, 2020; GAŁĘZOWSKA *et al.*, 2017; MAURER, 2010).

Entre as técnicas mais empregadas, destacam-se a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e sua versão *tandem* (GC-MS/MS), amplamente utilizadas para análise de compostos voláteis, semivoláteis e termicamente estáveis (KYLE, 2017). Dada a ampla consolidação histórica em laboratórios analíticos, tais plataformas muitas vezes são

consideradas padrão-ouro para confirmação de diversas classes de substâncias. Na GC-MS, a identificação é frequentemente baseada na combinação entre tempo de retenção e espectros de massas, com comparação a bibliotecas espectrais, enquanto a GC-MS/MS agrega maior seletividade por meio do monitoramento de transições específicas de íons. Essa configuração reduz ruído proveniente de compostos interferentes e melhora a detecção de analitos em baixas concentrações. Apesar de sua relevância, a necessidade de derivatização para compostos com grupamentos polares, de baixa volatilidade ou termolábeis pode representar uma limitação operacional da GC em aplicações toxicológicas mais amplas (SNEDDON; MASURAM; RICHERT, 2007).

Por sua vez, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) expandiu significativamente as capacidades analíticas da toxicologia, sobretudo para compostos polares, termolábeis ou de maior massa molecular. Técnicas como LC-MS/MS tornaram-se amplamente utilizadas na rotina laboratorial devido à alta sensibilidade, seletividade e compatibilidade com preparos de amostra relativamente simples, favorecendo o desenvolvimento de protocolos analíticos mais rápidos e aplicáveis a painéis multianalito (COUCHMAN; MORGAN, 2011; PETERS; WISSENBACH, 2023). Além disso, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (LC-HRMS) representa um avanço importante ao permitir medições de massa exata com elevado poder discriminatório, possibilitando análises direcionadas, suspeitas e não direcionadas (*targeted*, *suspect* e *untargeted screening*). Abordagens não direcionadas (*untargeted*) são valiosas no contexto de análise toxicológica sistemática, em especial em casos sem suspeita definida, assim como na detecção de NSP e em estudos toxicocinéticos. Entretanto, quando padrões analíticos não estão prontamente disponíveis, os achados por LC-HRMS devem ser interpretados segundo níveis de confiança e critérios de identificação, podendo não equivaler à confirmação definitiva do composto (MAURER *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2012). Em contraste com a LC-HRMS, a LC-MS/MS é empregada predominantemente em análises direcionadas (*target*), direcionadas à detecção e quantificação de um conjunto previamente definido de analitos (COUCHMAN; MORGAN, 2011).

Um ponto central no contexto atual da toxicologia analítica é o desenvolvimento de métodos multianalito, que possibilitam a detecção simultânea de dezenas a centenas de substâncias em uma única corrida analítica. Essa abordagem é especialmente importante em amostras de urina, onde a exposição a múltiplas substâncias é frequente, seja em contextos clínicos, forenses ou de monitoramento terapêutico. Métodos multianalito aumentam a eficiência laboratorial, reduzem tempo de análise e consumo de reagentes, além de permitirem uma visão mais abrangente do perfil toxicológico do indivíduo (MAURER, 2005). No contexto clínico, isso contribui para uma identificação mais rápida e abrangente de exposições polissubstâncias, auxiliando na tomada de decisão terapêutica e no manejo de intoxicações com quadros clínicos complexos (DOS SANTOS *et al.*, 2023). Em investigações forenses e *post-mortem*, a abordagem multianalito é particularmente relevante por permitir a reconstrução mais completa das circunstâncias de exposição a substâncias, incluindo polifarmácia, uso recreativo de múltiplas drogas de abuso e possíveis interações tóxicas, fornecendo subsídios mais robustos para a interpretação pericial e a determinação de causa ou contribuição toxicológica para o desfecho observado (LEE *et al.*, 2013). O **Quadro 3** apresenta uma revisão de métodos multianalito em urina, assim como painel analítico contemplado, preparo de amostra e instrumentação.

O desenvolvimento de métodos multianalito exige um equilíbrio entre abrangência e desempenho analítico, uma vez que a inclusão de muitos compostos pode impactar parâmetros como sensibilidade, efeito matriz e robustez do método (PETERS *et al.*, 2017). Um dos principais desafios é a diversidade físico-química dos analitos. Em um mesmo método podem coexistir compostos com ampla variação de polaridade, pKa, estabilidade térmica, massa molecular e comportamento cromatográfico. Isso dificulta a obtenção de condições únicas de preparo de amostra, separação e detecção que sejam simultaneamente adequadas para todos os compostos, muitas vezes afetando a sensibilidade ou resolução para parte do painel (RYGAARD *et al.*, 2023). Outro ponto crítico é a eficiência da separação cromatográfica. Em métodos multianalito, especialmente em LC-MS/MS, há risco de coeluição de compostos, o que pode gerar interferências e, conseqüentemente, ganho ou supressão de sinal na fonte de ionização (COUCHMAN; MORGAN, 2011). Em GC-MS, embora

a separação seja frequentemente mais eficiente para compostos voláteis, a necessidade de derivatização de múltiplos analitos também pode introduzir variabilidade adicional e reações incompletas para alguns componentes do painel. Apesar disso, a GC-MS permanece como uma técnica adequada para a análise toxicológica multiclasse (FERREIRA et al., 2023).

A otimização da detecção por espectrometria de massas também se torna mais complexa. Em sistemas MS/MS, a seleção de transições de MRM para dezenas ou centenas de analitos pode reduzir o tempo de aquisição por transição (*dwell time*), impactando a sensibilidade e a qualidade do sinal. Além disso, em métodos multianalito de grande abrangência, o desafio não se limita ao número de transições monitoradas, mas também à necessidade de equilibrar sensibilidade e seletividade, especialmente na presença de compostos isobáricos ou isoméricos com coeluição cromatográfica. Nesses casos, a escolha da transição mais intensa nem sempre é a mais adequada, sendo frequentemente necessário priorizar fragmentos menos abundantes, porém mais específicos, para minimizar interferências e evitar erros de identificação ou quantificação (CHEN et al., 2022). Já em LC-HRMS, embora haja maior flexibilidade na aquisição de dados, o volume e a complexidade das informações exigem estratégias avançadas de processamento e critérios rigorosos de identificação para evitar falsos positivos. Ademais, estratégias modernas têm se baseado na otimização de condições cromatográficas, na segmentação temporal de métodos MRM, na seleção criteriosa de transições, no uso de padrões internos, quando disponíveis, e em bibliotecas espectrais e bancos de dados de alta resolução (GONÇALVES et al., 2022; WU et al., 2012). Dessa forma, as técnicas instrumentais não apenas sustentam a confirmação e a quantificação de substâncias de interesse toxicológico, mas também viabilizam a tendência atual de análises mais amplas, rápidas e integradas em toxicologia analítica.

Quadro 3. Revisão de métodos multianalito aplicados à urina: painéis analíticos, preparo de amostra e instrumentação utilizada.

Tipo de preparo/extração	Número de analitos	Painel de analitos	Hidrólise	Volume de amostra (µL)	Instrumento	Tempo de corrida cromatográfica (min)	Referência
<i>Dilute-and-shoot</i>	78	Opiáceos, opioides, benzodiazepínicos e barbitúricos	NP (análise direta de conjugados glucuronídeos na urina)	100	LC-MS/MS	11,1 (modo positivo) e 4,5 (modo negativo)	CA; KALETA; WANG, 2015
<i>Dilute-and-shoot</i>	74	Anfetaminas, catinonas sintéticas e fenetilaminas sintéticas	NP	20	LC-MS/MS	10,5	FAN <i>et al.</i> , 2021
<i>Dilute-and-shoot</i>	127	Canabinoides, anfetaminas, cocaína, benzodiazepínicos, opioides, anticonvulsivantes, anti-histamínicos, relaxantes musculares, barbitúricos	NP	150	LC-MS/MS	8	FARLEY <i>et al.</i> , 2022
<i>Dilute-and-shoot</i>	19	Antipsicóticos	NP	25	LC-MS/MS	3,7	FENG <i>et al.</i> , 2020
<i>Dilute-and-shoot</i>	40	Analgésicos, benzodiazepínicos, antidepressivos, anticonvulsivantes, drogas de abuso e pesticidas	Enzimática (β-glucuronidase; 60 min a 55 °C)	100	LC-MS/MS	6 (modo positivo) e 4 (modo negativo)	FRANCO DE OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2019
<i>Dilute-and-shoot</i>	8	Opiáceos e anti-histamínicos	NP (análise direta de conjugados glucuronídeos na urina)	20	LC-MS/MS	28	YEN <i>et al.</i> , 2020

Quadro 3. Revisão de métodos multianalito aplicados à urina: painéis analíticos, preparo de amostra e instrumentação utilizada.

Tipo de preparo/extração	Número de analitos	Painel de analitos	Hidrólise	Volume de amostra (µL)	Instrumento	Tempo de corrida cromatográfica (min)	Referência
<i>Dilute-and-shoot</i>	14	Catinonas sintéticas e fenetilaminas sintéticas	NP	10	LC-MS/MS	10	OLESTI <i>et al.</i> , 2020
DLLME	9	Benzodiazepínicos e opioides	NP	5000	LC-MS/MS	24	CLIVILLE-CABRE <i>et al.</i> , 2020
Extração líquido-sólido suportada	94	Canabinoides sintéticos, catinonas sintéticas e outras NSP	Enzimática (β -glucuronidase de <i>Haliotis rufescens</i> ; 1 h a 60 °C)	500	LC-HRMS	18	GOH <i>et al.</i> , 2023
LLE	6	Catinonas sintéticas, opioides e canabinoides sintéticos	NP	500	GC-MS	14,5	ALEXANDRIDOU <i>et al.</i> , 2023
LLE	80	Anticonvulsivantes, antidepressivos, antipsicóticos, anfetaminas, benzodiazepínicos, cocaína, canabinoides, opioides clássicos e sintéticos, canabinoides sintéticos e catinonas sintéticas	NP	500	GC-MS e LC-HRMS	32 (GC-MS) e 15 (LC-HRMS)	MARCHEI <i>et al.</i> , 2021

Quadro 3. Revisão de métodos multianalito aplicados à urina: painéis analíticos, preparo de amostra e instrumentação utilizada.

Tipo de preparo/extração	Número de analitos	Painel de analitos	Hidrólise	Volume de amostra (µL)	Instrumento	Tempo de corrida cromatográfica (min)	Referência
LLE	54	Canabinoides, buprenorfina, anfetaminas, benzodiazepínicos, antidepressivos e antipsicóticos	Enzimática (Glusulase II assistida por micro-ondas (350 W) por 5 min; Alternativa: 3 h a 60 °C)	200	GC-MS e GC-MS/MS	10 min (GC-MS) e 5 min (GC-MS/MS)	VERSACE <i>et al.</i> , 2012
LLE	+1500	Drogas de abuso, medicamentos, pesticidas e produtos relacionados	Ácida (15 min)	10000	GC-MS	15	MAURER; PFLEGER; WEBER, 2017
LPME	11	Benzodiazepínicos	Enzimática (β-glucuronidase de <i>Helix pomatia</i> ; 90 min a 55 °C)	2000	GC-MS	11,33	
QuEChERS modificado	79	Anticonvulsivantes, benzodiazepínicos, anfetaminas, opioides, cocaína, canabinoides, catinonas sintéticas, fenetilaminas sintéticas, canabinoides sintéticos e outros	NP	500	LC-MS/MS	14,1	FERRARI JÚNIOR; CALDAS, 2022
SPE	9	Benzodiazepínicos e opioides	NP	10000	LC-MS/MS	24	CLIVILLE-CABRE <i>et al.</i> , 2020

Quadro 3. Revisão de métodos multianalito aplicados à urina: painéis analíticos, preparo de amostra e instrumentação utilizada.

Tipo de preparo/extração	Número de analitos	Painel de analitos	Hidrólise	Volume de amostra (µL)	Instrumento	Tempo de corrida cromatográfica (min)	Referência
SPE	42	Anfetaminas, benzodiazepínicos, cocaína, canabinoides, opioides, anestésicos, anticonvulsivantes e outros	Enzimática (β-glucuronidase; 2 h a 65 °C)	500	LC-MS/MS	11	CHIUMINATTO <i>et al.</i> , 2010
SPE	12	Opiáceos, cocaína, anfetaminas, metadona, EDDP e LSD	Enzimática (β-glucuronidase; 16 h a 40 °C)	500	LC-MS/MS	18	CONCHEIRO <i>et al.</i> , 2007
SPE	25	Antipsicóticos	NP	1000	LC-MS/MS	10	KIM <i>et al.</i> , 2020
SPE	40	Cocaína, anfetaminas, opioides, benzodiazepínicos e NSP (catinonas sintéticas)	NP	5000	LC-MS/MS	34	PASCUAL-CARO <i>et al.</i> , 2023
SPE	43	Benzodiazepínicos e drogas-Z	Enzimática (β-glucuronidase recombinante IMCSzyme; 30 min a 55 °C)	500	LC-MS/MS	24	SOFALVI <i>et al.</i> , 2020

Abreviações: DLLME, microextração líquido-líquido dispersiva; LLE, extração líquido-líquido; LPME, microextração em fase líquida; LSD, dietilamida do ácido lisérgico; NP, não performada; NSP, novas substâncias psicoativas; SPE, extração em fase sólida;

1.4. Aplicações da análise toxicológica de urina

A análise toxicológica em urina possui ampla aplicabilidade em diferentes contextos, sendo uma das matrizes mais utilizadas devido às vantagens já citadas anteriormente. No contexto clínico, essa matriz contribui para o apoio ao diagnóstico de intoxicações agudas e para a identificação de exposições recentes a medicamentos, drogas de abuso e outros agentes tóxicos, especialmente quando interpretada em conjunto com dados clínicos, histórico de exposição e outros exames laboratoriais. Quando disponível em tempo compatível com a tomada de decisão, a análise toxicológica pode auxiliar a condução terapêutica em serviços de emergência e unidades de terapia intensiva, favorecendo intervenções mais direcionadas e a estratificação de risco do paciente intoxicado. Em um cenário ambulatorial, a análise toxicológica de urina pode ser utilizada para monitorar a adesão terapêutica, identificar o uso de substâncias, subsidiando a tomada de decisão clínica (HOFFMANN; ALOUMI; CAO, 2026).

No âmbito forense, a análise toxicológica em urina é amplamente empregada na investigação de casos envolvendo suspeita de uso de substâncias psicoativas, especialmente em contextos criminais, acidentes e situações de violência. Embora não seja a matriz mais adequada para estimar concentração sanguínea ou correlação direta com efeito toxicológico, sua utilidade reside na confirmação da exposição prévia a determinadas substâncias, complementando achados de outras matrizes como sangue e tecidos. Dessa forma, contribui para a reconstrução de cenários toxicológicos e para a elucidação de circunstâncias associadas a eventos investigados (DYER; SALEHIAN, 2020; RODDA *et al.*, 2025).

Em investigações *post-mortem*, a urina também pode fornecer informações relevantes sobre exposições anteriores ao óbito, auxiliando na elucidação da causa da morte ou, mais frequentemente, da contribuição toxicológica para o desfecho. Em conjunto com outras matrizes biológicas, como sangue periférico, humor vítreo e tecidos, os achados na urina ajudam a compor um panorama mais abrangente da exposição a substâncias, especialmente em casos envolvendo múltiplos agentes e em situações complexas ou inicialmente indefinidas (AKHGARI; SARDARI-IRAVANI; GHADIPASHA, 2021; CEELEN *et*

al., 2011). Já em investigações *in vivo*, como tentativas de homicídio e exposições envolvendo drogas facilitadoras de crime, a urina é amplamente utilizada e, por vezes, preferível, dada a sua maior janela de detecção (RODDA *et al.*, 2025; SKOV *et al.*, 2023). Em razão dessa vantagem, a urina consolidou-se como a matriz biológica de escolha para o controle antidopagem no esporte, permitindo verificar a exposição prévia a substâncias proibidas pela Agência Mundial Antidopagem, como drogas de abuso, hormônios e agentes mascarantes (DEVENTER *et al.*, 2014).

Além dos contextos forense e de emergência, a análise toxicológica em urina é amplamente aplicada no monitoramento do uso de substâncias em diferentes cenários, como programas de reabilitação, no monitoramento terapêutico da adesão medicamentosa e no controle do uso de substâncias em populações específicas (COTTEN, 2012; DYER; SALEHIAN, 2020; KIM *et al.*, 2025; TENORE, 2010). Adicionalmente, no ambiente ocupacional, a análise de urina é útil no monitoramento da exposição a substâncias químicas em geral, como produtos químicos industriais e medicamentos perigosos, como citotóxicos (PORTILHA-CUNHA *et al.*, 2025). No Brasil, o uso da urina para testagem ocupacional é regido pela Norma Regulamentadora nº 07 (BRASIL, 2022).

Por fim, o exame toxicológico em urina desempenha papel importante em estudos epidemiológicos e de saúde pública, permitindo o monitoramento do consumo de drogas de abuso em populações específicas e a avaliação de tendências de exposição a substâncias emergentes, como as NSP (HAYASHI *et al.*, 2018). Esses dados são fundamentais para fomentar a toxicovigilância, subsidiando políticas públicas, estratégias de prevenção e intervenções direcionadas, especialmente diante da constante emergência de NPS e padrões de consumo. Dessa forma, a análise toxicológica em urina se consolida como uma ferramenta versátil e estratégica, com impacto significativo em diferentes áreas da saúde e da justiça (BARTHWELL, 2016; WHITLEY *et al.*, 2022).

Em conjunto, essas aplicações evidenciam que a análise toxicológica em urina não se trata da simples identificação de substâncias, constituindo uma ferramenta essencial para o cuidado em saúde, a investigação forense e a vigilância em saúde pública. Sua ampla janela de detecção, coleta relativamente fácil, elevada disponibilidade e capacidade de detectar simultaneamente diferentes classes de compostos tornam a urina uma matriz estratégica para

apoiar o diagnóstico, orientar condutas clínicas, monitorar exposições e gerar informações relevantes para a toxicovigilância. Nesse contexto, o desenvolvimento de métodos analíticos cada vez mais abrangentes, sensíveis e rápidos representa um passo fundamental para ampliar a utilidade da análise toxicológica em urina e atender às demandas crescentes dos serviços de saúde e da toxicologia.

2. JUSTIFICATIVA

A análise toxicológica desempenha papel fundamental nos contextos clínico e forense, especialmente na identificação de substâncias envolvidas em intoxicações agudas, exposições não intencionais e investigações *post mortem*. No cenário clínico, a identificação do agente tóxico pode contribuir diretamente para o diagnóstico e para a definição da conduta terapêutica, favorecendo intervenções mais rápidas e precisas (HOFFMAN; ALOUMI; CAO, 2026). No âmbito forense, os achados toxicológicos auxiliam na elucidação da causa *mortis*, na investigação de exposições intencionais, no controle de dopagem e na caracterização de circunstâncias associadas ao uso de substâncias psicoativas (BIRK *et al.*, 2025; RODDA *et al.*, 2025). Entretanto, a crescente complexidade do perfil de exposições, frequentemente envolvendo múltiplos agentes tóxicos com características físico-químicas distintas, impõe importantes desafios analíticos (MAURER, 2005).

Nesse contexto, a urina destaca-se como uma das principais matrizes biológicas utilizadas em toxicologia, em razão de sua coleta pouco invasiva na maioria dos casos, ampla disponibilidade, presença de analitos e produtos de biotransformação em concentrações frequentemente elevadas e janela de detecção geralmente mais ampla que a observada em matrizes como sangue ou fluido oral para diversos xenobióticos (FLANAGAN *et al.*, 2020). Essas características tornam a análise toxicológica em urina particularmente relevante não apenas para o apoio ao diagnóstico laboratorial, mas também para ações de toxicovigilância, permitindo a identificação de padrões de consumo e perfis de exposição (BARTHWELL, 2016; WHITLEY *et al.*, 2022).

Tal abordagem é especialmente importante frente ao aumento da exposição a medicamentos, drogas de abuso tradicionais e novas substâncias psicoativas, cuja circulação dinâmica dificulta o monitoramento por métodos convencionais de triagem (DOS SANTOS *et al.*, 2023; KROTULSKI *et al.* 2025). Além disso, a exposição simultânea a múltiplas substâncias, a presença de produtos de biotransformação urinários como principais marcadores analíticos e a limitação dos painéis comerciais reforçam a necessidade de métodos capazes de ampliar a cobertura toxicológica sem comprometer sensibilidade, seletividade e confiabilidade.

Dessa forma, tornam-se necessários o desenvolvimento e a implementação de métodos analíticos amplos e confiáveis para análise toxicológica em urina, capazes de detectar simultaneamente múltiplas classes de substâncias. Além de fortalecer o apoio ao diagnóstico laboratorial em emergências e em investigações forenses, métodos analíticos robustos fornecem dados essenciais para vigilância epidemiológica, subsidiando estratégias de prevenção e políticas públicas em saúde e segurança. Em vista disso, o aprimoramento da análise toxicológica em urina representa uma necessidade científica, assistencial e pericial relevante diante dos desafios

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a aplicabilidade da análise toxicológica em urina como ferramenta de apoio diagnóstico, à investigação clínica e forense e à toxicovigilância, por meio do desenvolvimento, validação e aplicação de métodos analíticos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem em casos clínicos e forenses com suspeita de exposição a fármacos, drogas de abuso e novas substâncias psicoativas.

3.2. Objetivos específicos

- Desenvolver, otimizar e validar um método multianalito em urina utilizando LC-MS/MS e preparo de amostra por *dilute-and-shoot* para a análise simultânea de medicamentos, drogas de abuso e produtos relacionados relevantes em contextos clínicos e forenses;
- Desenvolver, otimizar e validar um método analítico por LC-MS/MS para a determinação de alucinógenos, catinonas sintéticas e canabinoides sintéticos em urina;
- Aplicar os métodos desenvolvidos em amostras provenientes de casos clínicos e forenses atendidos pelo Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul (CIT-RS), Serviço de Verificação de Óbitos da Associação Hospitalar Vila Nova (SVO-AHVN) e Instituto Geral de Perícias do Rio Grande do Sul (IGP-RS);
- Caracterizar o perfil epidemiológico e toxicológico da exposição infantil a drogas ilícitas no Estado do Rio Grande do Sul por meio da análise de amostras de urina de casos suspeitos de intoxicação atendidos pelo CIT-RS;

4. ARTIGOS

4.1. Artigo I

O artigo “***A validated dilute-and-shoot LC–MS-MS urine screening for the analysis of 95 illicit drugs and medicines: Insights from clinical and forensic Brazilian cases***”, publicado no periódico *Journal of Analytical Toxicology* (ISSN 1945-2403, fator de impacto 2.6, 2024), é apresentado a seguir. O método descrito no artigo é baseado em preparo simplificado de amostra (*dilute-and-shoot*) onde, aliado à LC-MS/MS, é capaz de detectar simultaneamente 95 analitos, incluindo medicamentos, drogas de abuso e produtos relacionados. O método demonstrou alta sensibilidade e aplicabilidade, em que 839 amostras obtidas de casos clínicos e post-mortem foram analisadas, evidenciando seu potencial como ferramenta diagnóstica em toxicologia clínica e forense. O artigo pode ser acessado na íntegra em: <https://doi.org/10.1093/jat/bkae005>

A validated dilute-and-shoot LC–MS–MS urine screening for the analysis of 95 illicit drugs and medicines: Insights from clinical and forensic Brazilian cases

Bruno Pereira Dos Santos^{1,2,*}, Letícia Birk¹, Patrícia Schwarz¹, Viviane Cristina Sebben³, Ângela Malysz Sgaravatti^{1,4}, Giovanna Cristiano de Gouveia¹, Adriana Ubirajara Silva Petry^{5,6}, Francisco Paz de Menezes⁶, Alessandro Pinto Gonzaga⁶, Paula Flores Schlickmann⁶, Marcelo Dutra Arbo², Tiago Franco de Oliveira¹, Sarah Eller¹

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

²Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90010-150, Brazil

³Toxicological Information Center of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90610-000, Brazil

⁴General Institute of Expertise of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90230-010, Brazil

⁵Graduate Program in Pathology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil

⁶Division of Postmortem Inspection, Associação Hospitalar Vila Nova, Porto Alegre, RS 91750-040, Brazil

*Corresponding author: Graduate Program in Health Sciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil.
Email: brunods@ufcspa.edu.br

Abstract

Urine toxicological analysis is a relevant tool in both clinical and forensic scenarios, enabling the diagnosis of acute poisonings, elucidation of deaths, verification of substance use in the workplace and identification of drug-facilitated crimes. For these analyses, the dilute-and-shoot technique associated with liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC–MS–MS) is a promising alternative since it has demonstrated satisfactory results and broad applicability. This study developed and validated a comprehensive LC–MS–MS screening method to analyze 95 illicit drugs and medicines in urine samples and application to clinical and forensic Brazilian cases. The dilute-and-shoot protocol was defined through multivariate optimization studies and was set using 100 μ L of sample and 300 μ L of solvent. The total chromatographic run time was 7.5 min. The method was validated following the recommendations of the ANSI/ASB Standard 036 Guideline. The lower limits of quantification varied from 20 to 100 ng/mL. Within-run and between-run precision coefficient of variations% were <20%, and bias was within $\pm$ 20%. Only 4 of the 95 analytes presented significant ionization suppression or enhancement (>25%). As proof of applicability, 839 urine samples from *in vivo* and postmortem cases were analyzed. In total, 90.9% of the analyzed samples were positive for at least one substance, and 78 of the 95 analytes were detected. The most prevalent substances were lidocaine (40.2%), acetaminophen (38.0%) and benzoylcegonine (31.5%). The developed method proved to be an efficient and simplified alternative for analyzing 95 therapeutic and illicit drugs in urine samples. Additionally, the results obtained from sample analysis are essential for understanding the profile of Brazilian substance use, serving as a valuable database for the promotion of health and safety public policies.

Introduction

Every year, thousands of individuals suffer from poisoning as a result of their exposure to medications and drugs of abuse (1). In Brazil, around 900,000 cases of poisoning by these two groups of substances have been reported by local health authorities in the last 10 years (2). These data are particularly concerning since they may not accurately reflect the actual number of cases due to underreporting (3, 4). One contributing factor to this situation is the inadequate and inefficient diagnosis of intoxicated patients in emergency circumstances.

In clinical contexts, identification of the toxic agents involved in an exposure provides the most appropriate choice of management and treatment for the patient, aiming at a better prognosis (5). Furthermore, the correct diagnosis of poisoning can result in significant cost savings for the healthcare system (6).

Nonetheless, in the postmortem scenario, confirmation of the presence of therapeutic and illicit drugs in biological samples is essential to elucidate the cause of death (7). In addition, it is important to highlight other relevant forensic applications of toxicological analysis, such as the verification of substance use in the workplace and the identification of drug-facilitated crimes (DFCs) (8–10).

Considering this, urine is an excellent matrix for toxicological assays. The use of urine to confirm substance exposure presents several advantages, including the availability of substantial sample volumes (usually at least 30 mL), high concentration of analytes, minimal interference from other compounds and the comprehensive detection window which can range from hours to days (11–13). However, the extended window of detection can impair results interpretation, as toxicological findings from urine may not correlate with the

clinical status of the patient or the cause of death (14, 15). Despite this, urine analysis is extremely useful to complement poisoning diagnosis.

An important aspect of the search for medicines and illicit drugs in urine samples is the toxicokinetic of these analytes (16, 17). In some cases, the respective metabolites will be in greater concentration than the substance in its unchanged form, as with cocaine (18). In addition, due to Phase II metabolic pathways, substances such as opiates, benzodiazepines and THC-COOH may be conjugated with polar groups, requiring a prior hydrolysis procedure (17, 19, 20).

Considering the discussed requirements for urine analysis, liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS–MS) is widely stated as the gold standard technique for toxicological analysis (21, 22). The use of LC–MS–MS allows high-reliability analysis and greater speed and sensitivity when compared to other techniques, such as gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). Furthermore, dozens of compounds can be analyzed in a single analysis in order to facilitate the screening of possible substances involved in a poisoning case (23). Due to these advantages, LC–MS–MS is increasingly being adopted for screening methods, besides the well-known employment in confirmatory methods (24).

A screening method must allow the analysis of several analytes; therefore, a less selective sample preparation technique must be employed. For urine analysis, several studies have demonstrated that liquid–liquid extraction (LLE), solid-phase extraction (SPE) and microextractions are suitable for the analysis of amphetamines, cocaine, cannabinoids, benzodiazepines and antidepressants (25–31). However, simultaneous analysis of substances with different chemical characteristics can be challenging using these extractions, since they often are highly selective due to pH adjustments and employment of sorbents or solvents. Furthermore, these extractions may require high volumes of sample or organic solvents, which commonly need to be dried due to incompatibility with the analytical system (22, 32, 33). Considering this, the dilute-and-shoot technique is a notable strategy for urine screening methods.

Dilute-and-shoot is an easy-to-perform sample preparation for urine samples, in which the sample is diluted with an appropriate solvent and injected into the LC–MS. The technique brings advantages such as the use of low quantities of organic solvents, in addition to not using sorbents (e.g., C18 and SCX). Therefore, the dilute-and-shoot technique generates less waste, consumes a lower time of analysis and enables the security of the operator (34). These advantages make dilute-and-shoot an environmentally friendly choice, aligning its characteristics with the concepts of green analytical chemistry (35). Several studies have already employed this sample preparation in clinical-forensic scenarios and obtained good results (36–39).

The applicability of dilute-and-shoot with LC–MS–MS in the clinical and forensic context is well established. Therefore, this study aimed to develop, optimize and validate a screening method for quantitative analysis of drugs of abuse, medications and related metabolites in urine samples using dilute-and-shoot and LC–MS–MS. Furthermore, the validated method was applied to suspected intoxication cases,

in both *in vivo* and postmortem scenarios with the intention of verifying toxicological findings from the Brazilian state population.

Materials and methods

Chemicals and reagents

Acetonitrile, methanol, isopropanol and formic acid 99% were purchased from Merck® (Darmstadt, Germany). Analytical standards and deuterated internal standards were purchased from Cerilliant® (Round Rock, TX, USA), LGC Standards® (Manchester, NH, USA) and Cayman Chemical® (Ann Arbor, MI, USA). Ammonium acetate and β -glucuronidase (Type H-1, from *Helix pomatia*) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Ultrapure water was supplied by a Milli-Q water system (Millipore, Billerica, MA, USA).

Solutions

Stock solutions were prepared in acetonitrile, in a 100 μ g/mL concentration. Afterward, working solutions were prepared at 8.34 μ g/mL, except for morphine and codeine, which were prepared at 16.68 μ g/mL. Solutions were stored at -20°C when not in use. Drug-free urine samples were fortified in the optimization and validation processes by the addition of the working solutions. These samples were obtained from the researchers and previously tested to verify negativity.

The internal standard (IS) solution was prepared in water at 500 ng/mL, containing amphetamine- d_5 , benzoylecgonine- d_3 , chlorpromazine- d_3 , cocaine- d_3 , diazepam- d_5 , DMT- d_6 , fentanyl- d_5 , fluoxetine- d_6 , haloperidol- d_4 , ketamine- d_4 , MDMA- d_5 , nortriptyline- d_3 and PCP- d_5 .

Instrumentation

All the analyses were conducted using a liquid chromatographic system coupled to a triple quadrupole mass spectrometer (LC–MS–MS), model LCMS-8045 (Shimadzu, Kyoto, Japan). The chromatographic separation was performed with a Raptor Biphenyl column (50 mm $\times$ 3.0 mm, 2.7 μ m particle size) (Restek, USA). The mobile phases employed were (i) ultra-pure water and (ii) acetonitrile, both fortified with formic acid (0.1%, v/v). The column was heated at 50°C , and the mobile phase flow rate was 0.5 mL/min. The chromatographic run has 7.5 min and was performed using a gradient as follows: 0–0.5 min, 5% of B; 0.5–2.5 min, 5–100% of B; 2.5–3.3 min, 100% of B; 3.3–3.31 min, 100–5% of B; 3.31–7.5 min, 5% of B.

The mass spectrometer was operated using electrospray ionization (ESI). The acquisition of all analytes was made in positive mode. The following settings were used for the instrumental parameters: heat block temperature, 400°C ; capillary voltage, 4.5 kV; nebulizer gas (N_2) flow, 3.0 L/min; drying gas (N_2) flow, 10 L/min; desolvation line temperature, 250°C ; and collision induced dissociation gas pressure (Ar), 230 kPa. Multiple reaction monitoring (MRM) mode was used for the analyses, with two MRM transitions for each analyte—one for quantification and other for qualification. In the cases of fluoxetine, O-desmethyltramadol and fluoxetine- d_6 , only a MRM transition was used. Table 1 shows the retention time, MRM transitions and collision energies for each compound.

Table 1. Analytes included in this study and their respective retention time (RT), transitions and internal standards

Analyte	RT (min)	Quantifier transitions ions, <i>m/z</i> (collision energy, eV)	Qualifier transitions ions, <i>m/z</i> (collision energy)	Internal standard
7-Aminoclonazepam	2.54	286.0 → 121.0 (29)	286.0 → 222.0 (25)	Diazepam-d ₅
Acetaminophen	1.28	152.0 → 110.0 (18)	152.0 → 65.0 (30)	Amphetamine-d ₅
AEME	1.13	182.1 → 122.1 (22)	182.1 → 91.2 (26)	Benzoylgonine-d ₃
Alprazolam	3.02	309.1 → 281.1 (26)	309.1 → 205.1 (40)	Diazepam-d ₅
Amitriptyline	2.89	278.2 → 91.0 (27)	278.2 → 105.0 (27)	Nortriptyline-d ₃
Amphetamine	2.05	136.0 → 91.1 (15)	136.0 → 65.1 (39)	Amphetamine-d ₅
Benzoylgonine	2.44	289.9 → 168.2 (20)	289.9 → 105.0 (35)	Benzoylgonine-d ₃
Biperiden	2.83	312.2 → 98.1 (25)	312.2 → 294.2 (17)	Ketamine-d ₄
Brompheniramine	2.63	319.0 → 274.0 (20)	319.0 → 167.0 (45)	PCP-d ₅
Bupropion	2.59	240.0 → 184.0 (13)	240.0 → 166.0 (16)	Haloperidol-d ₄
Buspirone	2.68	386.2 → 122.1 (30)	386.2 → 109.1 (49)	Haloperidol-d ₄
Captopril	2.53	218.0 → 116.1 (14)	218.0 → 75.1 (23)	Diazepam-d ₅
Carbamazepine	2.91	237.1 → 194.0 (20)	237.1 → 192.0 (25)	Chlorpromazine-d ₃
Carisoprodol	2.91	261.2 → 176.3 (9)	261.2 → 97.1 (18)	Diazepam-d ₅
Chlorpheniramine	2.59	275.1 → 230.1 (15)	275.1 → 167.1 (45)	Chlorpromazine-d ₃
Chlorpromazine	2.92	319.2 → 58.2 (30)	319.2 → 86.2 (15)	Chlorpromazine-d ₃
Chlordiazepoxide	2.62	300.0 → 283.0 (16)	300.0 → 282.0 (25)	Diazepam-d ₅
Ciprofloxacin	2.40	332.0 → 314.1 (20)	332.0 → 231.0 (36)	MDMA-d ₅
Citalopram	2.74	325.1 → 109.1 (30)	325.1 → 234.1 (31)	Haloperidol-d ₄
Clomipramine	2.95	315.0 → 86.1 (20)	315.0 → 58.1 (40)	Nortriptyline-d ₃
Clonazepam	3.02	316.1 → 270.0 (28)	316.1 → 214.0 (40)	Diazepam-d ₅
Clonidine	2.21	229.9 → 44.1 (28)	229.9 → 213.0 (26)	Amphetamine-d ₅
Cocacethylene	2.67	318.0 → 196.1 (20)	318.0 → 82.2 (35)	Cocaine-d ₃
Cocaine	2.60	304.0 → 182.1 (20)	304.0 → 82.1 (32)	Cocaine-d ₃
Codeine	2.27	300.4 → 165.0 (42)	300.4 → 215.1 (25)	Amphetamine-d ₅
Cyclobenzaprine	2.86	276.0 → 215.0 (45)	276.0 → 216.0 (26)	Nortriptyline-d ₃
Cyproheptadine	2.86	288.0 → 191.0 (31)	288.0 → 58.2 (23)	Nortriptyline-d ₃
Desipramine	2.82	267.2 → 72.0 (16)	267.2 → 44.0 (40)	Nortriptyline-d ₃
Desvenlafaxine	2.41	264.1 → 58.1 (20)	264.1 → 246.1 (13)	MDMA-d ₅
Diazepam	3.20	285.1 → 154.1 (28)	285.1 → 193.0 (29)	Diazepam-d ₅
Diclofenac	3.28	296.0 → 214.0 (37)	296.0 → 250.0 (14)	Haloperidol-d ₄
Diethylpropion	2.40	206.0 → 105.0 (30)	206.0 → 100.0 (30)	Amphetamine-d ₅
Diphenhydramine	2.74	256.2 → 165.1 (38)	256.2 → 152.0 (36)	Chlorpromazine-d ₃
DMT	2.34	189.0 → 58.0 (13)	189.0 → 144.1 (16)	DMT-d ₆
EME	0.58	200.0 → 182.1 (20)	200.0 → 82.2 (20)	Benzoylgonine-d ₃
Ephedrine	1.64	166.1 → 148.1 (15)	166.1 → 117.1 (22)	Amphetamine-d ₅
Fenproporex	2.32	189.0 → 119.0 (15)	189.0 → 91.0 (30)	Amphetamine-d ₅
Fenoterol	2.18	304.0 → 107.0 (35)	304.0 → 135.1 (20)	Ketamine-d ₄
Fentanyl	2.75	337.1 → 105.0 (37)	337.1 → 188.1 (24)	Fentanyl-d ₅
Flunitrazepam	3.13	314.0 → 268.1 (27)	314.0 → 239.2 (39)	Diazepam-d ₅
Fluoxetine	2.85	310.1 → 44.1 (15)	–	Fluoxetine-d ₆
Fluphenazine	2.90	438.1 → 171.2 (26)	438.1 → 100.1 (45)	Chlorpromazine-d ₃
Haloperidol	2.79	376.1 → 165.1 (25)	376.1 → 123.1 (42)	Haloperidol-d ₄
Hydroxycocaine	2.60	320.3 → 200.2 (20)	320.3 → 182.1 (30)	Cocaine-d ₃
Imipramine	2.85	281.2 → 86.3 (19)	281.2 → 58.1 (19)	Nortriptyline-d ₃
Ketamine	2.45	238.0 → 125.0 (25)	238.0 → 207.0 (15)	Ketamine-d ₄
Levamisole	2.35	205.0 → 178.1 (25)	205.0 → 123.1 (30)	Ketamine-d ₄
Lidocaine	2.40	235.0 → 86.1 (19)	235.0 → 58.1 (45)	Ketamine-d ₄
Loperamide	3.06	477.2 → 266.1 (25)	477.2 → 210.0 (50)	Haloperidol-d ₄
Lorazepam	2.96	321.0 → 275.0 (21)	321.0 → 303.0 (9)	Diazepam-d ₅
Maprotiline	2.86	278.2 → 250.1 (20)	278.2 → 219.1 (25)	Nortriptyline-d ₃
Mazindol	2.62	285.1 → 44.0 (25)	285.1 → 242.0 (35)	Amphetamine-d ₅
MDA	2.26	180.0 → 163.0 (25)	180.0 → 135.1 (20)	MDMA-d ₅
MDEA	2.42	208.0 → 163.1 (15)	208.0 → 135.2 (22)	MDMA-d ₅
MDMA	2.34	194.0 → 163.1 (11)	194.0 → 133.1 (21)	MDMA-d ₅
Meloxicam	3.16	352.0 → 115.1 (23)	352.0 → 140.9 (21)	Diazepam-d ₅
Meperidine	2.57	248.1 → 70.1 (35)	248.1 → 91.0 (35)	Amphetamine-d ₅
Methamphetamine	2.27	150.0 → 91.1 (20)	150.0 → 119.2 (15)	Amphetamine-d ₅
Methylphenidate	2.52	234.0 → 84.1 (20)	234.0 → 56.1 (50)	Amphetamine-d ₅
Metoclopramide	2.47	300.1 → 227.0 (20)	300.1 → 184.0 (35)	Ketamine-d ₄
Midazolam	2.74	326.1 → 291.1 (28)	326.1 → 223.0 (38)	Diazepam-d ₅
Morphine	1.20	286.1 → 165.1 (44)	286.1 → 153.1 (45)	Amphetamine-d ₅
Naphazoline	2.49	211.0 → 141.1 (33)	211.0 → 115.2 (38)	Amphetamine-d ₅
N-Ethylpentylone	2.55	250.0 → 232.1 (15)	250.0 → 174.1 (33)	MDMA-d ₅
Nitrazepam	2.97	282.0 → 236.0 (25)	282.0 → 180.1 (41)	Diazepam-d ₅
Norcyclobenzaprine	2.83	262.0 → 215.0 (45)	262.0 → 231.1 (16)	Nortriptyline-d ₃

(continued)

Table I. (Continued)

Analyte	RT (min)	Quantifier transitions ions, <i>m/z</i> (collision energy, eV)	Qualifier transitions ions, <i>m/z</i> (collision energy)	Internal standard
Norfentanyl	2.41	233.0 → 84.1 (20)	233.0 → 55.2 (39)	Fentanyl-d ₅
Norfluoxetine	2.81	296.3 → 134.1 (7)	296.3 → 30.1 (24)	Fluoxetine-d ₆
Nortriptyline	2.86	264.1 → 233.1 (15)	264.1 → 91.1 (25)	Nortriptyline-d ₃
O-Desmethyltramadol	2.31	250.1 → 58.1 (20)	–	Haloperidol-d ₄
Oxazepam	2.94	287.2 → 241.2 (28)	287.2 → 269.1 (12)	Diazepam-d ₅
Oxymetazoline	2.66	261.1 → 205.1 (25)	261.1 → 44.1 (25)	Amphetamine-d ₅
Paroxetine	2.81	330.0 → 192.2 (31)	330.0 → 70.2 (32)	Fluoxetine-d ₆
PCP	2.76	244.1 → 86.1 (15)	244.1 → 159.1 (15)	PCP-d ₅
Phenacetin	2.71	180.0 → 110.0 (22)	180.0 → 138.0 (18)	PCP-d ₅
Phenylephrine	0.65	168.0 → 150.1 (15)	168.0 → 91.1 (24)	Amphetamine-d ₅
Phenylpropanolamine	1.15	152.0 → 134.2 (15)	152.0 → 115.1 (24)	Amphetamine-d ₅
Piroxicam	3.04	331.9 → 95.1 (30)	331.9 → 78.0 (55)	Diazepam-d ₅
Procaine	2.25	237.0 → 100.1 (15)	237.0 → 164.0 (16)	Ketamine-d ₄
Promethazine	2.81	285.1 → 86.2 (16)	285.1 → 71.1 (45)	Chlorpromazine-d ₃
Propranolol	2.67	260.0 → 116.1 (20)	260.0 → 183.0 (19)	Diazepam-d ₅
Quetiapine	2.72	384.1 → 221.1 (40)	384.1 → 279.0 (26)	Haloperidol-d ₄
Risperidone	2.63	411.1 → 191.1 (30)	411.1 → 110.1 (53)	Haloperidol-d ₄
Salbutamol	1.11	240.0 → 222.1 (10)	240.0 → 148.1 (20)	Ketamine-d ₄
Sertraline	2.91	306.0 → 275.0 (15)	306.0 → 159.0 (26)	Haloperidol-d ₄
Sibutramine	2.92	280.2 → 125.0 (25)	280.2 → 139.0 (20)	Amphetamine-d ₅
Sulfadiazine	2.39	250.9 → 156.1 (16)	250.9 → 92.1 (28)	Haloperidol-d ₄
Sulfamethoxazole	2.70	253.9 → 156.1 (17)	253.9 → 92.1 (28)	Haloperidol-d ₄
Temazepam	3.11	301.0 → 255.1 (25)	301.0 → 283.1 (13)	Diazepam-d ₅
Tetracaine	2.70	265.1 → 176.1 (15)	265.1 → 72.1 (20)	Cocaine-d ₃
THC-COOH	3.40	345.2 → 327.1 (16)	345.2 → 299.1 (21)	Diazepam-d ₅
Trifluoperazine	2.96	408.0 → 113.1 (35)	408.0 → 70.1 (50)	Chlorpromazine-d ₃
Trimethoprim	2.36	291.1 → 230.1 (25)	291.1 → 261.1 (27)	Haloperidol-d ₄
Venlafaxine	2.61	278.1 → 58.1 (20)	278.1 → 260.1 (14)	Haloperidol-d ₄
Zolpidem	2.64	308.1 → 235.1 (30)	308.1 → 236.0 (35)	Haloperidol-d ₄
Amphetamine-d ₅	2.05	141.0 → 93.1 (20)	141.0 → 124.2 (15)	–
Benzoylcegonine-d ₃	2.44	293.1 → 171.2 (20)	293.1 → 77.2 (55)	–
Chlorpromazine-d ₃	2.92	322.0 → 89.3 (22)	322.0 → 61.1 (39)	–
Cocaine-d ₃	2.60	307.0 → 185.1 (20)	307.0 → 85.1 (32)	–
Diazepam-d ₅	3.20	290.2 → 227.0 (30)	290.2 → 154.0 (30)	–
DMT-d ₆	2.34	195.0 → 64.0 (15)	195.0 → 144.0 (15)	–
Fentanyl-d ₅	2.75	342.1 → 188.1 (25)	342.1 → 105.1 (50)	–
Fluoxetine-d ₆	2.85	316.2 → 44.0 (15)	–	–
Haloperidol-d ₄	2.79	380.0 → 127.2 (44)	380.0 → 169.0 (26)	–
Ketamine-d ₄	2.45	242.0 → 129.0 (30)	242.0 → 224.0 (16)	–
MDMA-d ₃	2.34	199.0 → 165.1 (10)	199.0 → 135.1 (22)	–
Nortriptyline-d ₃	2.86	267.1 → 233.0 (15)	267.1 → 105.0 (25)	–
PCP-d ₅	2.76	249.3 → 96.1 (30)	249.3 → 164.1 (15)	–

Abbreviations: AEME, anhydroecgonine methyl ester; DMT, dimethyltryptamine; EME, ecgonine methyl ester; MDA, 3,4-methylenedioxymphetamine; MDEA, 3,4-methylenedioxymphetamine; MDMA, 3,4-methylenedioxymphetamine; PCP, phencyclidine; RT, retention time; THC-COOH, 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol.

All data were extracted using the LabSolutions® software (Shimadzu, Kyoto, Japan).

Sample preparation

In a polypropylene microtube, 100 μ L of urine and 10 μ L of the internal standard solution (500 ng/mL) were added. Subsequently, 5 μ L of β -glucuronidase (100 U/ μ L) and 100 μ L of acetate buffer (0.2 M, pH 4.8) were added. The mixture was heated at 55°C for 60 min in order to promote enzymatic hydrolysis of glucuronidated molecules. Following the hydrolysis time, the sample was cooled to room temperature, and 300 μ L of a cold methanol:acetonitrile solution (3:1, v/v) were added. Afterwards, the mixture was vortexed for 15 s and centrifuged for 6 min at 9000 rpm. The supernatant was transferred to a vial, and 1.5 μ L was injected into the LC–MS–MS system.

Optimization of sample procedure

The sample preparation steps can directly influence the sensitivity of a method. Thus, optimizing the variables involved in the procedure is crucial for analytical response enhancement (40). In this study, the solvent used in the dilution was optimized by multivariate approach in order to obtain better sensitivity of the analyzed substances. A simplex-centroid design was employed, evaluating the use of acetonitrile, isopropanol and methanol. Solvents were tested purely and mixed in different proportions. In addition, sample and solvent volumes were optimized through a Doehlert design. Sample volume was evaluated in three levels (50, 75 and 100 μ L), and solvent volume in five levels (300, 450, 600, 750 and 900 μ L). The experiments were performed using blank urine samples fortified with the analytes at a 500 ng/mL concentration. For each experiment (condition), the geometric mean of the absolute area of the analytes was used to evaluate the response.

The resulting data from the optimization procedure were analyzed using the software Statistica 10.0 (Statsoft, Tulsa, OK, USA). All generated models were statistically evaluated by the ANOVA test. The best conditions were chosen based on surface graphs from the obtained data.

Bioanalytical validation

The bioanalytical validation was carried out following the ANSI/ASB Standard 036 guideline from the American Academy of Forensic Science (AAFS) (41). All the parameters evaluated in this study are described below.

- (i) Lower limit of quantification (LLOQ): the LLOQ is the lowest concentration of the analyte in the sample at which it can be reliably quantified. The LLOQ was evaluated by analyzing spiked samples with decreasing concentrations. Three urine samples from different sources were analyzed, each one prepared in triplicate. To consider the result acceptable, the coefficient of variation (CV%) between replicates should be <20%.
- (ii) Interference studies: endogenous and exogenous interference studies were performed. Initially, the endogenous interference was evaluated by analyzing 10 different urine samples without the chosen analytes. Exogenous interference was verified by the analysis of a sample fortified with other substances that may be present, such as caffeine, cannabidiol, cannabinol, chlorpropamide, lamotrigine, phenobarbital, phenytoin, prednisone, theophylline and valproic acid. Additionally, the interference of stable-isotopes internal standards was evaluated. In the first set, a drug-free urine sample was analyzed with the addition of the IS solution. The response of the analytes cannot be greater than the LLOQ. If there is an analytical response from the analytes, it may indicate contamination of the stable-isotopes internal standards with non-deuterated molecules. A spiked urine sample at 500 ng/mL was analyzed in the second set without the IS. The signal of the stable-isotopes internal standards should not be observed or, if present, should not impact quantification.
- (iii) Linearity: calibration curves were obtained by fortifying blank samples with the analytes working solution. Six different concentrations were evaluated, arranged equidistantly, from the LLOQ to the upper limit of quantification (ULOQ). The ULOQ was set at 1,000 ng/mL, except for fentanyl, which was 200 ng/mL, and codeine and morphine, which was 2,000 ng/mL. The minimum requirement for linearity is a coefficient of determination (r^2) value ≥ 0.99 . Additionally, homoscedasticity was verified using Fisher's F-test, and if heteroscedasticity was observed, the weighted least squares model was employed. The tested weights were: 1, $1/x$, $1/x^2$, $1/x^{1/2}$, $1/y$, $1/y^2$ and $1/y^{1/2}$. For each analyte, the weight with the lowest sum of residues was adopted, indicating a better fitting of the calibration curve.
- (iv) Bias and precision: spiked urine samples were analyzed to assess bias and precision of the method. Samples were prepared at three quality control (QC) levels: low, medium and high. The low QC concentration was set

at three times the LLOQ concentration. The medium QC concentration was set at 430 ng/mL, except for fentanyl (100 ng/mL), codeine and morphine (860 ng/mL). The high QC concentration was set at 860 ng/mL, except for fentanyl (180 ng/mL), codeine and morphine (1,720 ng/mL). Five runs were carried out at each QC level, each prepared in a triplicate. Bias was verified through the difference between the measured and theoretical concentration of each QC level. Bias was acceptable within a $\pm 20\%$ range. Precision was monitored from within-run CV% and between-run CV% values, which should be <20%.

- (v) Carryover: study of carryover was conducted to verify contamination due to the injection of high concentrated samples. The evaluation was conducted by analyzing three blank samples after the injection of the ULOQ level. The method is considered carryover-free if the analyte response in the blank sample is less than the LLOQ.
- (vi) Matrix effect: matrix effect evaluation was conducted according to Matuszewski et al. (2003, 42). This parameter was performed by analyzing six urine samples obtained from different individuals. Each sample was spiked with all analytes at their respective low and high QC concentrations. To assess each substance matrix effect, the analytical response of the samples was compared with a neat solution containing the analytes prepared in methanol and acetonitrile (3:1, v/v) at the same concentration. The matrix effect (ME%) can be obtained from the equation: $ME\% = (\text{peak area in matrix} / \text{peak area neat standard solution}) \times 100$. Values <100% indicate ionization suppression in the mass spectrometer, while values >100% indicate ionization enhancement. In this study, the mean ME% of the six replicates are presented. The CV% between replicates should be <20%.
- (vii) Dilution integrity: the dilution integrity aims to verify the maintenance of precision and bias when a prior dilution step is required. This frequently happens when the analyte concentration exceeds the ULOQ. This study evaluated a dilution factor of 1:20, using ultrapure water as the diluent. Urine samples were spiked with 10,000 ng/mL of all compounds, except for morphine and codeine, spiked with 20,000 ng/mL, and fentanyl, spiked with 1,000 ng/mL. After dilution with ultrapure water, samples were prepared and analyzed as usual. Acceptability criteria are the same as those adopted for precision and bias.

Proof of applicability

In order to verify applicability, 839 urine samples were submitted for analysis employing the validated method. The samples were obtained from three different institutions.

- (i) Toxicological Information Center of Rio Grande do Sul (CIT-RS): attends suspected *in vivo* cases of poisoning treated in hospitals from the Rio Grande do Sul state. In total, 675 urine samples from CIT-RS were analyzed.
- (ii) Division of Postmortem Inspection, Associação Hospitalar Vila Nova (SVO-AHVN): responsible for post-mortem investigation of death cases classified as natural

causes which occurred in Porto Alegre city, Rio Grande do Sul state. In this study, 101 urine samples from SVO-AHVN were analyzed.

- (iii) General Institute of Expertise of Rio Grande do Sul (IGP-RS): performs investigation of cases involving legal aspects that occurred in the Rio Grande do Sul state, such as postmortem elucidation of death cases classified as non-natural or violent causes and *in vivo* cases of DFCs. Sixty-three urine samples from IGP-RS were analyzed.

The use of the samples analyzed in this work was approved by the Ethical Committee for Human Studies of the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Brazil (CAAE 31992920.3.0000.5345 & CAAE 17996819.7.0000.5345).

Results and discussion

Several analytical techniques are available for toxicological screening in urine, but LC-MS-MS has shown to be a worthy strategy, offering fast and reliable results. Additionally, dilute-and-shoot is an easy-to-perform, inexpensive and not-so-selective sample preparation technique, which allows the simultaneous analysis of substances with different physico-chemical properties. In this work, a method for the determination of 95 substances, including therapeutic and illicit drugs and their related metabolites, was developed and validated. The selection of substances included in this study was based on epidemiological data from poisoning cases in Brazil. A limitation to be considered is the presence of some substances only in its unchanged form. Since urine is an excretion matrix, compounds such as 9-OH-risperidone (risperidone metabolite), zolpidem-COOH (zolpidem metabolite) and other benzodiazepine metabolites would be of great value for case elucidation. Unfortunately, these compounds were unavailable at validation time in our laboratory. The chromatographic analysis takes 7.5 min, in line with or faster than other previously published multi-analyte studies for urine analysis (27, 39, 43–45).

Optimization of sample procedure

The simplex-centroid design, used to evaluate the best dilution solvent, showed a maximum response for a mixture of methanol and acetonitrile in a 3:1 (v/v) ratio. Figure 1A shows the surface plot, where the best analytical response is indicated by the darker color region. The special cubic model was used, which presented $P < 0.05$ and a coefficient of determination (r^2) of 0.9148, showing a significant influence of the solvent on the response of the analytes. As for the Doehlert design, both sample and solvent volumes were variables that influenced the analytical response ($P < 0.001$; $r^2 = 0.9956$). The best response was obtained using the highest level of sample tested (100 μ L) and the lowest level of solvent tested (300 μ L). This proportion was expected since it would be the lowest dilution factor possible to be used among the tested levels. Figure 1B shows the surface plot, with the most intense analytical response in the darker color zone. Larger sample volumes were not tested, as one of the objectives was to employ the smallest amount of urine possible, established by the authors at 100 μ L. The performed optimization enabled the use of small volumes, supporting the application of the dilute-and-shoot technique as an eco-friendly alternative.

Bioanalytical validation

LLOQ values of the 95 analytes ranged from 20 to 100 ng/mL, as shown in Table II. These concentrations agree with other previously published studies (27, 46–49). Considering the urine cutoffs established by the Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA) and Europe Workplace Drug Testing Society for some drugs (amphetamines, benzoylecgonine, codeine, morphine and PCP), the obtained LLOQs are in agreement with the cutoffs for confirmatory testing. The only exception is THC-COOH, where the LLOQ obtained was 50 ng/mL. Therefore, this method can be considered as an initial test, which requires confirmatory testing (8, 50). Moreover, it is crucial to acknowledge that certain substances may necessitate more sensitive methods to verify exposure and eliminate the possibility of false negative results, such as in the case of fentanyl.

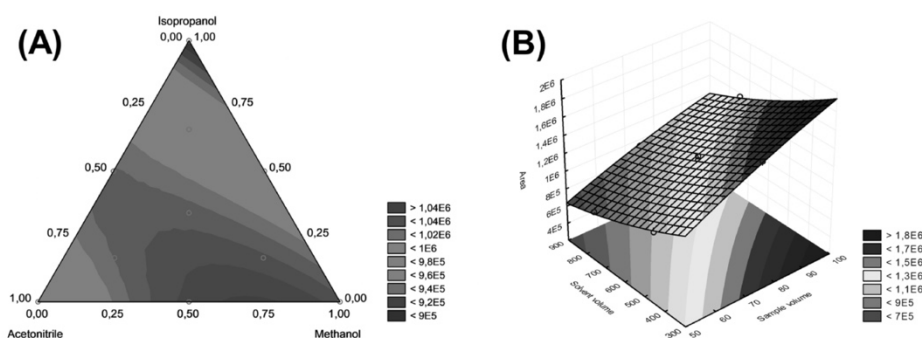


Figure 1. Surface plots obtained from multivariate experiments. Surface plot of simplex-centroid for optimization of dilution solvent (A). Surface plot of Doehlert design for optimization of sample and solvent volumes (B).

Table II. Validation data from limits of quantification, linearity, precision and bias

Analyte	LLOQ (ng/mL)	r^2	Low QC			Medium QC			High QC		
			Within-run precision (CV%)	Between-run precision (CV%)	Bias (%)	Within-run precision (CV%)	Between-run precision (CV%)	Bias (%)	Within-run precision (CV%)	Between-run precision (CV%)	Bias (%)
7-Aminoclonazepam	50	0.9986	1/x ²	10.5	10.7	12.1	12.7	6.9	7.8	11.4	0.5
Acetaminophen	50	0.9983	1/x	13.7	13.3	8.9	11.7	6.3	8.0	8.6	2.5
AEME	50	0.9957	1	11.0	11.3	6.5	8.4	1.9	10.1	10.2	5.2
Alprazolam	50	0.9926	1/x ²	14.4	14.5	15.1	14.2	8.7	11.1	10.5	-0.8
Amiripityline	20	0.9931	1/x ²	11.3	14.4	14.5	15.4	-0.4	11.0	11.4	2.5
Amphetamine	50	0.9986	1/x ²	10.4	9.6	10.4	12.9	-3.7	4.9	7.3	-0.2
Benzoylcegonine	20	0.9984	1/x ²	8.6	10.6	10.8	15.1	0.6	11.2	10.3	0.0
Biperiden	20	0.9932	1/x ²	7.9	8.9	15.1	14.4	-12.9	11.5	12.0	-7.1
Brompheniramine	20	0.9959	1/x ²	13.0	11.8	6.4	8.7	8.5	4.6	9.9	-0.6
Bupropion	20	0.9918	1/x	7.1	8.8	12.1	10.9	-16.6	9.9	9.0	-10.0
Bupropione	20	0.9994	1/x ²	10.2	12.8	6.7	9.8	5.6	8.5	8.4	0.4
Captopril	50	0.9917	1/x ²	10.7	19.0	14.7	17.0	6.4	5.8	7.9	-3.5
Carbamazepine	20	0.9983	1/x ²	14.9	15.4	9.0	12.3	5.7	10.9	10.6	7.3
Carisoprodol	50	0.9978	1/x ²	13.1	17.6	6.6	9.9	3.2	9.9	11.4	-6.1
Chlorpheniramine	20	0.9998	1/x ²	11.4	11.7	8.4	10.0	-10.0	7.2	7.1	-4.5
Chlorpromazine	20	0.9987	1/x ²	10.6	18.8	13.9	13.1	12.1	10.8	10.2	8.4
Chlordiazepoxide	50	0.9960	1/x ²	12.0	17.1	11.0	13.3	5.9	7.6	11.3	-1.1
Ciprofloxacin	50	0.9998	1/x ²	18.5	17.2	11.0	13.7	19.1	12.6	11.7	-4.8
Citalopram	20	0.9997	1/x ²	9.4	15.1	11.0	9.7	16.1	8.0	7.7	12.3
Clomipramine	20	0.9930	1/x ²	4.9	5.9	7.2	12.4	-1.3	10.2	10.0	10.7
Clonazepam	50	0.9944	1	17.1	17.2	13.1	14.3	1.0	6.4	6.4	-10.6
Clonidine	50	0.9963	1/x ²	13.0	13.2	2.8	10.4	-1.3	6.4	11.9	-4.1
Cocethylene	20	0.9990	1/x	8.5	12.0	13.4	13.9	-0.4	13.1	12.1	-3.1
Cocaine	20	0.9990	1/x ²	9.1	9.5	2.6	9.0	1.1	7.5	10.4	-1.6
Codéine	100	0.9925	1/x	10.3	18.4	10.4	17.8	16.4	11.3	13.0	-2.1
Cyclobenzaprine	20	0.9992	1/x ²	10.7	10.2	11.6	14.9	-0.8	12.0	10.9	-1.9
Cyproheptadine	20	0.9962	1/x ²	11.3	13.2	12.1	17.2	4.3	10.6	10.9	1.8
Desipramine	20	0.9994	1/x ²	7.6	8.6	12.0	15.9	-0.2	13.0	11.4	-1.3
Desvenlafaxine	20	0.9986	1/x ²	9.8	9.5	14.4	8.7	6.6	5.9	6.9	-9.3
Diazepam	50	0.9973	1/x ²	10.2	13.3	10.5	10.2	8.9	6.7	11.0	-4.8
Diclofenac	50	0.9961	1/x ²	12.5	14.1	11.4	12.6	8.4	10.3	10.0	9.4
Diethylpropion	50	0.9937	1/x	13.9	4.9	10.3	10.3	3.8	9.0	8.9	-2.6
Diphenhydramine	20	0.9985	1	7.3	9.2	13.5	13.6	-19.9	9.4	10.9	-9.5
DMT	20	0.9973	1/x ²	11.5	13.0	8.3	10.5	0.4	9.1	9.3	6.9
EME	20	0.9949	1/x ²	12.5	12.2	1.3	8.2	3.1	9.7	10.4	9.0
Ephedrine	20	0.9980	1/x ²	7.4	7.5	6.6	11.3	2.6	6.9	9.6	-2.1
Fenproporex	50	0.9990	1/x ²	12.5	14.3	12.5	14.5	5.0	9.2	8.3	-6.2
Fenoterol	20	0.9960	1/x ²	8.4	8.1	13.8	17.1	16.9	10.1	11.2	10.2
Fentanyl	50	0.9995	1/x ²	8.7	8.8	6.5	7.6	4.7	6.7	6.5	0.8
Flunitrazepam	50	0.9942	1	12.9	19.5	11.3	12.5	1.0	9.0	8.5	-7.2
Fluoxetine	20	0.9992	1/x ²	7.6	7.2	8.2	13.1	6.6	12.6	12.0	7.1

(continued)

Table II. (Continued)

Analyte	LLOQ (ng/mL)	r^2	Weighting factor	Low QC			Medium QC			High QC		
				Within-run precision (CV%)	Between-run precision (CV%)	Bias (%)	Within-run precision (CV%)	Between-run precision (CV%)	Bias (%)	Within-run precision (CV%)	Between-run precision (CV%)	Bias (%)
Fluphenazine	50	0.9948	1/x ²	8.3	9.9	-2.1	12.3	12.9	5.9	12.1	11.8	15.2
Haloperidol	20	0.9995	1/x ²	8.2	7.7	5.5	5.3	6.6	8.4	6.8	6.7	-1.8
Hydroxycocaine	20	0.9997	1/x ²	13.9	12.7	11.9	11.3	12.6	4.3	8.6	11.3	-2.0
Imipramine	20	0.9971	1/x ²	7.7	8.7	-0.3	12.3	15.0	-5.8	10.2	10.7	-0.8
Ketamine	20	0.9981	1/x ²	10.4	10.2	3.9	14.5	13.2	-0.1	14.1	13.0	-0.4
Levamisole	20	0.9986	1/x ²	6.4	6.3	3.4	11.1	12.2	-0.5	9.3	10.8	-0.8
Lidocaine	20	0.9994	1/x ²	10.2	9.7	3.7	13.2	12.8	4.7	10.8	12.8	-4.2
Loperamide	20	0.9959	1/x	5.5	7.3	6.4	8.1	9.5	12.7	7.6	9.7	7.5
Lorazepam	50	0.9925	1/x ²	11.2	10.5	-18.4	7.8	9.7	-7.3	10.7	10.5	-5.8
Maprotiline	20	0.9983	1/x ²	12.5	11.4	12.5	12.8	19.4	-1.7	8.3	8.0	3.5
Mazindol	20	0.9961	1/x ²	15.7	14.4	-1.4	12.1	13.8	-19.3	13.1	12.4	-13.4
MDA	50	0.9966	1/x	10.9	17.7	-8.1	12.3	13.8	-1.3	10.8	11.0	2.3
MDEA	20	0.9984	1/x ²	10.1	8.9	-0.7	10.1	10.9	-0.2	11.2	11.7	-12.0
MDMA	20	0.9996	1/x ²	11.4	11.9	1.0	9.4	10.6	-2.0	6.0	5.9	-1.1
Meloxicam	50	0.9969	1/x ²	6.2	8.4	0.9	13.3	12.3	14.8	5.4	8.4	8.2
Meperidine	50	0.9983	1/x ²	12.0	18.8	-12.4	11.2	13.7	-5.7	7.7	9.3	-6.1
Methamphetamine	20	0.9997	1/x ²	7.1	8.7	5.9	8.0	10.0	1.8	7.7	7.9	-5.5
Methylphenidate	20	0.9999	1/x ²	7.5	9.1	-1.1	14.2	15.1	-3.7	8.4	10.7	-6.1
Metoclopramide	20	0.9983	1/x ²	5.1	5.1	-1.2	8.4	9.9	2.1	12.6	11.8	-1.2
Midazolam	20	0.9907	1/x ²	12.1	18.2	-0.6	17.0	19.4	-12.0	11.2	11.8	-15.2
Morphine	100	0.9918	1/x ²	13.1	15.3	3.6	12.9	19.1	7.0	9.9	12.4	-3.2
Naphazoline	20	0.9937	1/x ²	9.1	10.1	5.8	9.8	18.1	-2.6	6.8	7.7	-10.6
N-Ethylpentylone	20	0.9914	1/x ²	10.9	10.1	-16.8	16.4	15.0	-14.2	6.8	8.3	-10.8
Nitrazepam	50	0.9955	1/x ²	7.9	17.1	13.3	12.4	13.7	-1.3	5.1	7.7	-5.0
Norcyclobenzaprine	20	0.9987	1/x ²	7.0	7.8	1.3	10.7	17.6	-2.7	11.9	11.1	0.1
Norfentanyl	50	0.9949	1/x ²	12.6	17.0	8.6	9.5	8.8	3.3	7.3	9.7	15.5
Norflouxetine	50	0.9980	1/x ²	14.5	17.1	-9.0	10.0	12.7	15.5	12.4	12.5	14.7
Nortriptyline	20	0.9964	1/x ²	7.9	7.9	1.2	11.0	16.5	-2.6	16.1	14.2	1.1
O-Desmethyltramadol	20	0.9981	1/x ²	8.6	9.3	1.4	7.9	8.8	18.3	8.3	11.4	9.7
Oxazepam	50	0.9945	1/x ²	10.8	15.5	-15.6	12.8	13.5	-7.9	8.4	8.8	-5.8
Oxycetazoline	50	0.9970	1/x ²	11.7	17.5	-6.1	7.3	16.3	-3.1	8.5	10.1	-9.0
Paroxetine	50	0.9984	1/x	8.4	8.3	12.4	16.0	14.5	9.4	11.5	12.7	6.0

(continued)

Table II. (Continued)

Analyte	LLOQ (ng/mL)	r^2	Weighting factor	Low QC			Medium QC			High QC		
				Within-run precision (CV%)	Between-run precision (CV%)	Bias (%)	Within-run precision (CV%)	Between-run precision (CV%)	Bias (%)	Within-run precision (CV%)	Between-run precision (CV%)	Bias (%)
PCP	20	0.9992	1/x ²	4.4	8.3	-2.6	6.5	8.0	2.3	4.7	6.2	-0.9
Phenacetin	50	0.9995	1/x ²	12.9	15.8	2.6	11.7	11.4	7.4	9.6	10.2	8.2
Phenylephrine	50	0.9962	1/x ²	13.6	16.9	12.7	10.4	11.2	10.3	6.2	10.4	-0.5
Phenylpropanolamine	50	0.9993	1/x ²	9.2	13.5	-1.9	7.7	9.8	7.2	6.2	7.7	-0.3
Piroxicam	50	0.9947	1/x ²	7.9	8.5	-9.7	17.6	18.3	-6.2	7.3	10.1	-9.7
Procaine	20	0.9979	1/x ²	9.7	9.7	0.6	8.0	8.6	3.6	10.9	11.7	0.4
Promethazine	20	0.9998	1/x ²	9.5	10.2	-1.4	13.2	12.2	-4.7	9.6	11.5	-0.9
Proparanolol	50	0.9997	1/x ²	7.1	7.8	1.8	8.7	9.1	12.3	14.4	13.7	0.5
Quetiapine	20	0.9980	1/x ²	6.4	7.7	0.0	12.0	11.2	-1.3	7.5	8.0	-1.2
Risperidone	20	0.9967	1/x ²	3.8	5.7	0.2	4.9	6.9	-3.2	6.8	7.2	-2.2
Salbutamol	20	0.9964	1/x ²	7.2	7.1	1.4	10.0	10.0	3.3	9.1	9.3	3.5
Serrtraline	50	0.9948	1	15.2	17.8	-5.6	6.6	10.5	-3.0	9.9	9.8	-0.3
Sibutramine	50	0.9960	1/x ²	9.3	12.2	0.9	10.9	14.1	-2.3	6.6	9.6	-0.1
Sulfadiazine	50	0.9994	1/x ²	12.0	14.6	17.7	11.9	11.1	19.0	7.4	12.6	-0.4
Sulfamethoxazole	50	0.9926	1/x	13.7	14.5	-14.2	10.1	10.3	-13.3	12.1	12.2	-9.5
Temazepam	50	0.9935	1/x ²	14.2	15.8	-7.4	10.8	10.8	6.1	9.9	9.8	-1.5
Tetracaine	20	0.9993	1/x ²	6.8	7.3	10.9	14.2	12.9	5.8	7.6	11.0	3.7
THC-COOH	50	0.9997	1/x ²	12.0	16.9	-1.3	11.2	18.1	3.3	7.7	10.5	10.8
Trifluoperazine	50	0.9941	1/x	7.8	8.2	-2.4	6.2	6.6	3.6	11.8	11.2	9.8
Trimethoprim	50	0.9906	1/x	13.9	18.0	-0.9	9.7	10.3	5.2	4.2	5.2	-3.9
Venlafaxine	20	0.9967	1/x ²	3.8	4.6	-5.9	7.5	9.5	-7.2	6.3	7.3	0.0
Zolpidem	20	0.9929	1/x ²	7.9	7.5	-6.7	10.5	10.9	-11.2	10.0	11.8	0.0

Abbreviations: AEME, anhydroecgonine methyl ester; CV%, coefficient of variation; DMT, dimethyltryptamine; EME, ecgonine methyl ester; LLOQ, lower limit of quantification; MDA, 3,4-methylenedioxymphetamine; MDEA, 3,4-methylenedioxymphetamine; MDMA, 3,4-methylenedioxymphetamine; PCP, phenylcyclidine; QC, quality control; r^2 , coefficient of determination; THC-COOH, 11-nor-9-carboxy- Δ^8 -tetrahydrocannabinol.

Additionally, the time between exposure to the substance and collection of the sample must be considered in the interpretation of negative or low concentration results. The CV% between replicates obtained for each analyte's LLOQ was <20%, as defined by the ANSI/ASB guideline.

No analytical response was observed from the interference studies, whether in blank samples or samples fortified with other substances. Moreover, there was no interference from stable-isotopes internal standards in the analytes signal, nor the opposite. Additionally, carryover was not observed in the analysis of blank samples after ULOQ analysis.

All 95 analytes presented good linearity in their calibration curves, with coefficients of determination >0.99. Some analytes showed heteroscedasticity, making it necessary to apply weights ($1/x$ and $1/x^2$). The obtained r^2 values, as well as the weighting factors used for each analyte, are presented in Table II.

The method proved to be precise and accurate, demonstrating satisfactory precision and bias results within the acceptable values defined by the validation guideline. Complete data, organized by analyte and QC levels, are shown in Table II. Within-run precision CVs% ranged from 3.8% (risperidone and venlafaxine low QCs) to 18.5% (ciprofloxacin low QC). Meanwhile, between-run precision CVs% ranged from 4.6% (venlafaxine low QC) to 19.4% (maprotiline and midazolam medium QCs). The bias varied from -19.9% (7-aminoclonazepam low QC and diphenhydramine medium QC) to 19.1% (ciprofloxacin medium QC), being within the limit of $\pm 20\%$. Furthermore, dilution integrity data presented within-run and between-run CV% values of up to 20% and bias within $\pm 20\%$, as recommended.

Regarding the matrix effect parameter, 4 of the 95 substances exhibited a significant matrix effect (<75% or >125%). Figure 2 shows a graph demonstrating the distribution of matrix effect by substance. Ecgonine methyl ester

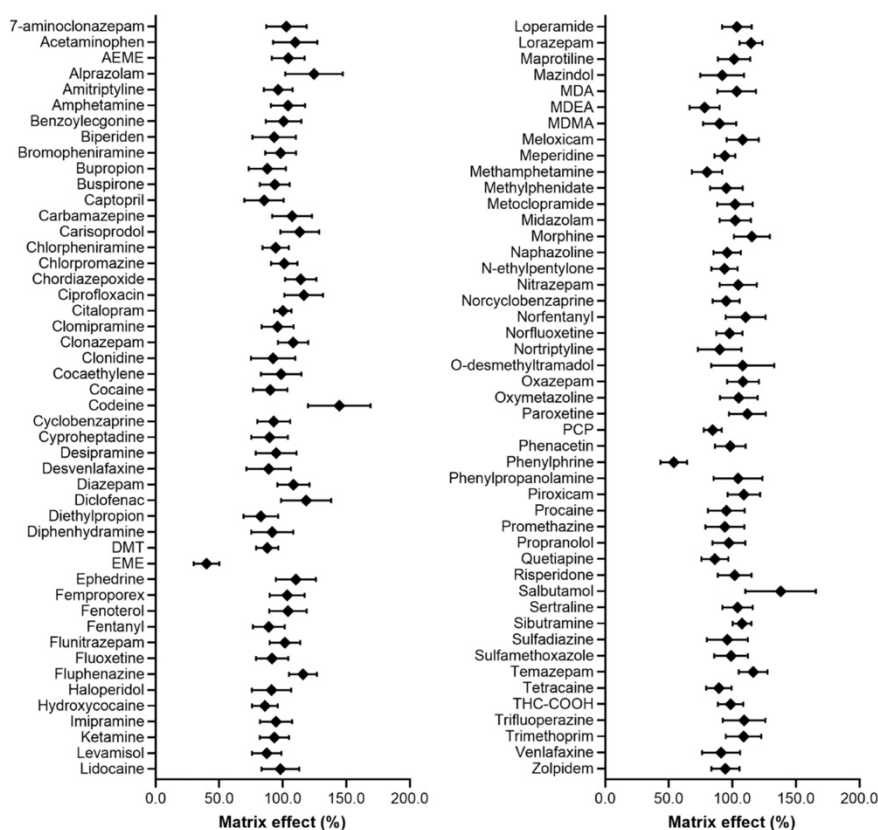


Figure 2. Matrix effect results per analyte.

(EME) and phenylephrine had considerable ionization suppression, with ME% values of 40.0% and 53.9%, respectively. In line with these data, Xiong et al. found significant signal suppression for EME in urine, with ME% values between 28.7% and 49.2% (51). Feng et al. also demonstrated an intense ionization suppression for phenylephrine in plasma samples. Despite differences in matrix constitution, the ME% varied between 46.5% and 60.4%, with a result similar to the one found in this study (52). In contrast, codeine and salbutamol showed an ionization enhancement, with a ME% of 145.8% and 138.1%, respectively. Some studies did not observe a significant matrix effect in the analysis of codeine or salbutamol in urine. However, these studies employed more selective sample preparation techniques, such as SPE (53, 54). An important point is that the CV% of the six samples analyzed did not exceed 20% for all substances. This shows that despite having signal suppression or enhancement, the matrix effect is constant, not affecting the accuracy of the method.

Application to clinical and forensic cases

The developed and validated method was successfully applied to 839 urine samples from *in vivo* and postmortem cases. In total, 90.9% of the samples analyzed were considered positive (>LLOQ) for at least one substance. Considering each institution, 97.2% of the samples from CIT-RS were positive, while 81.0% of IGP-RS samples and 55.4% of SVO-AHVN samples were positive. This difference can be explained by the type of cases each institution receives. Samples from CIT-RS, for example, are more likely to give a positive result, as only suspected cases of poisoning are attended. Furthermore, the urine sample is collected in the hospital, often after the administration of pharmaceuticals (included in this study) to manage the poisoned patient. A more detailed distribution of the number of analytes detected per sample is shown in [Supplementary Figure S1](#), in the Supplementary Material. Of the 95 analytes included in this work, 78 were detected in the analyzed samples.

An essential data to highlight is the fact that 61.9% of the samples had three or more substances. If considered a scenario where 10 or more analytes are detected in the same sample, 5.4% of the samples are included in this group. These data reinforce the importance of developing and implementing multi-analyte methodologies capable of analyzing as many significant substances as possible. Moreover, in this context, the selection of the analytes represents a crucial stage for analytical laboratories, requiring a thorough consideration of the unique substance consumption profile of each region or country.

The profiles of the most detected substances in the samples, in total and separated by institution, are presented in [Table III](#). Considering the main analyzed classes, the most prevalent were benzodiazepines (33.0%), cocaine and its metabolites (32.3%), antipsychotics (27.1%), antidepressants (23.7%), antihistamines (18.8%), opioids (8.6%), amphetamine-type stimulants (4.5%) and antimicrobials (2.5%). Lidocaine was the most detected substance, present in 40.2% of the samples. Although it can be a potentially toxic agent, whether through direct exposure or as a cocaine adulterant, the presence of lidocaine in most cases is due to its therapeutic use. A total of 326 of the 337 positive samples for lidocaine came from

CIT-RS, that is, from hospital cases. Lidocaine is widely used as a local anesthetic in medical procedures, such as endotracheal intubation. Considerable levels of lidocaine are detected in urine in only 1 h after exposure (55). However, direct contamination must be considered when collecting urine via a urogenital probe.

The second most common substance in the samples was acetaminophen, with a positivity rate of 38%. Acetaminophen was the most detected drug in the samples from SVO-AHVN and the second most detected in CIT-RS samples. In IGP-RS samples, it was also one of the main substances, only behind cocaine metabolites. These high rates can be related to the easy accessibility of acetaminophen in Brazil, in addition to the considerable hepatotoxicity associated with poisoning cases due to this substance. In another Brazilian study conducted by Franco de Oliveira et al. (2019), acetaminophen was the second most prevalent substance in samples from intoxicated patients (56). Likewise, Lee et al. (2018) found that acetaminophen was the second most detected agent in urine samples from intoxicated Korean patients when using a method for diverse medicines classes (57).

Afterward, the next most prevalent substances were cocaine metabolites, benzoylecgonine and EME, present in 31.5% and 22.6% of the samples, respectively. Overall, 32.3% of samples were positive for cocaine or one of its metabolites. This substantial percentage is an indicative of the ongoing situation in Brazil, as cocaine stands as the illicit drug of utmost toxicological and public health significance in the country (58). In comparison, Campelo & Caldas (2010) found a positivity rate of around 22% for cocaine and its metabolites in urine samples, where more than 1,800 postmortem cases in a Brazilian state were analyzed (59).

Only one positive sample for unchanged cocaine did not have the presence of another metabolite. Furthermore, with a more in-depth analysis, it was possible to verify that from all the samples with concentrations of cocaine and benzoylecgonine higher than LLOQ, only one had a benzoylecgonine concentration (54.1 ng/mL) lower than the confirmation cutoff (100 ng/mL) recommended by SAMHSA. This reinforces the idea of using benzoylecgonine as a gold standard biomarker for the verification of cocaine exposure when working with urine samples. In the context of cocaine poisoning, two other analytical aspects must be considered. The first is the inclusion of metabolites such as anhydroecgonine methyl ester (AEME, a cocaine pyrolysis product and marker of crack cocaine use) and cocaethylene (a marker of concomitant cocaine and alcohol use) in analytical methods. Of the positive samples for cocaine and its metabolites, 15.1% had the presence of cocaethylene, and 9.6% were positive for AEME. The second point is the inclusion of common cocaine-cutting agents. In this study, every sample positive for levamisole, phenacetin or tetraacaine also exhibited a positive result for cocaine.

Among the limitations of urine analysis verified in this study, the most relevant was the wide concentration ranges of substances. Of the 78 analytes detected, 62 substances had positive samples with concentrations higher than the ULOQ, requiring sample dilution. Furthermore, 34 analytes were found to present concentrations greater than 10 µg/mL (or 20 µg/mL for codeine and morphine), the maximum concentration evaluated, considering the possibility of dilution in the 1:20 factor. [Table IV](#) exhibits the concentration ranges

Table III. Most detected substances in analyzed urine samples, in overall and per institution

Overall (n = 839)			CIT-RS (n = 675)			SVO-AHVN (n = 101)			IGP-RS (n = 63)		
Substance	%		Substance	%		Substance	%		Substance	%	
Lidocaine	40.2		Lidocaine	48.3		Acetaminophen	28.7		Benzoyllecgonine	39.7	
Acetaminophen	38.0		Acetaminophen	40.6		Benzoyllecgonine	9.9		EME	33.3	
Benzoyllecgonine	31.5		Benzoyllecgonine	33.9		Diphenhydramine	8.9		Acetaminophen	25.4	
EME	22.6		EME	23.9		Diclofenac	7.9		Cocaine	19.0	
Temazepam	16.7		Temazepam	20.1		EME	7.9		Cocacethylene	15.9	
Cocaine	13.1		Oxazepam	14.5		Chlorpheniramine	5.9		Lidocaine	11.1	
Oxazepam	12.4		Haloperidol	13.6		Chlorpromazine	5.9		THC-COOH	9.5	
7-Aminoclonazepam	11.6		Cocaine	13.3		Metoclopramide	5.9		7-Aminoclonazepam	7.9	
Haloperidol	11.2		7-aminoclonazepam	13.2		Salbutamol	5.0		AEME	6.3	
Chlorpromazine	10.6		Risperidone	12.6		Oxazepam	4.0		Citalopram	6.3	
Risperidone	10.3		Ketamine	12.4		Cocaine	4.0		Diclofenac	6.3	
Ketamine	10.1		Chlorpromazine	12.1		Cyclobenzaprine	4.0		Norfluoxetine	6.3	
THC-COOH	9.8		Promethazine	11.0		Norfluoxetine	4.0		Fluoxetine	4.8	
Promethazine	9.1		THC-COOH	10.8		Temazepam	4.0		Sertraline	4.8	
Carbamazepine	8.5		Fluoxetine	10.1		Aniripryline	3.0		Alprazolam	3.2	
Fluoxetine	7.6		Amiripryline	8.6		Carbamazepine	3.0		Amiripryline	3.2	
Amiripryline	7.4		Midazolam	8.4		Carisoprodol	3.0		Carisoprodol	3.2	
Metoclopramide	6.8		Metoclopramide	7.6		Cipofloxacin	3.0		Clonazepam	3.2	
Midazolam	6.8		Nortriptyline	7.3		Fluoxetine	3.0		Ephedrine	3.2	
Nortriptyline	6.4		Norfluoxetine	6.7		Norfluoxetine	3.0		MDA	3.2	
Norfluoxetine	6.3		Diphenhydramine	5.0		Norfluoxetine	3.0		MDMA	3.2	
Diclofenac	5.2		Morphine	5.0		Norfluoxetine	3.0		Norriptyline	3.2	
Diphenhydramine	5.1		Naphazoline	5.0		O-Desmethylnadol	3.0		Phenylpropanolamine	3.2	
Cocacethylene	4.9		Chlorpheniramine	4.7		7-Aminoclonazepam	2.0		Biperiden	1.6	
Chlorpheniramine	4.6		Diclofenac	4.7		Haloperidol	2.0		Bupropion	1.6	
Naphazoline	4.2		Fentanyl	4.6		Promethazine	2.0		Chlorpheniramine	1.6	
Morphine	4.1		Cocacethylene	4.1		Proparanolol	2.0		Chlorpromazine	1.6	
Fentanyl	3.7		Citalopram	3.9		THC-COOH	2.0		Cipofloxacin	1.6	
Citalopram	3.6		Salbutamol	3.4		AEME	1.0		Cyclobenzaprine	1.6	
Salbutamol	3.6		Bupropion	3.3		Alprazolam	1.0		Desipramine	1.6	
AEME	3.1		Clonazepam	3.3		Biperiden	1.0		Imipramine	1.6	
Clonazepam	2.9		Levamisole	3.1		Brompheniramine	1.0		Ketamine	1.6	
Bupropion	2.7		Norfentanyl	3.1		Cocacethylene	1.0		Levamisole	1.6	
Levamisole	2.6		AEME	3.0		Desipramine	1.0		MDEA	1.6	
Norfentanyl	2.5		Desvenlafaxine	3.0		Diazepam	1.0		Methylphenidate	1.6	
Quetiapine	2.5		Quetiapine	2.8		Ephedrine	1.0		Naphazoline	1.6	
Sertraline	2.5		Sertraline	2.5		Imipramine	1.0		Norcylobenzaprine	1.6	
Desvenlafaxine	2.4		Carisoprodol	2.1		Lidocaine	1.0		O-Desmethylnadol	1.6	
Carisoprodol	2.3		MDA	1.9		Phenylephrine	1.0		Oxazepam	1.6	
Cyclobenzaprine	1.8		Sulfamethoxazole	1.6		Quetiapine	1.0		Quetiapine	1.6	
MDA	1.8								Risperidone	1.6	

(continued)

Table III. (Continued)

Overall (<i>n</i> = 839)		CIT-RS (<i>n</i> = 675)		SVO-AHVN (<i>n</i> = 101)		IGP-RS (<i>n</i> = 63)	
Substance	%	Substance	%	Substance	%	Substance	%
Norcyclobenzaprine	1.5	Cyclobenzaprine	1.5	Sertraline	1.0	Salbutamol	1.6
Sulfamethoxazole	1.5	Diazepam	1.5	Sulfamethoxazole	1.0	Sulfamethoxazole	1.6
Codine	1.4	Codine	1.3	Trimethoprim	1.0	Trimethoprim	1.6
Alprazolam	1.3	Norcyclobenzaprine	1.3	Zolpidem	1.0		
Diazepam	1.3	Phenylephrine	1.3				
O-Desmethylnadol	1.3	Alprazolam	1.2				
Ephedrine	1.2	Clonidine	1.2				
Phenylephrine	1.2	Lorazepam	1.2				
Trimethoprim	1.2	Trimethoprim	1.2				
Biperiden	1.1	Venlafaxine	1.2				
Clonidine	1.0	Biperiden	1.0				
Imipramine	1.0	Ephedrine	1.0				
Lorazepam	1.0	Methylphenidate	1.0				
MDMA	1.0	O-Desmethylnadol	1.0				
Methylphenidate	1.0	Paroxetine	1.0				
Venlafaxine	1.0	Amphetamine	0.9				
Brompheniramine	0.8	Brompheniramine	0.9				
Ciprofloxacin	0.8	Imipramine	0.9				
Paroxetine	0.8	Loperamide	0.9				
Propranolol	0.8	MDMA	0.9				
Zolpidem	0.8	Zolpidem	0.9				
Amphetamine	0.7	Cyproheptadine	0.7				
Desipramine	0.7	Propranolol	0.7				
Loperamide	0.7	Desipramine	0.6				
Cyproheptadine	0.6	Captopril	0.4				
Phenylpropanolamine	0.6	Ciprofloxacin	0.4				
Captopril	0.4	Oxymetazoline	0.3				
MDEA	0.2	Phenylpropanolamine	0.3				
Oxymetazoline	0.2	Bupirone	0.1				
Bupirone	0.1	Clonidine	0.1				
Clomipramine	0.1	Diethylpropion	0.1				
Diethylpropion	0.1	Fenoterol	0.1				
Fenoterol	0.1	MDEA	0.1				
Methamphetamine	0.1	Methamphetamine	0.1				
Phenacetin	0.1	Phenacetin	0.1				
Sulfadiazine	0.1	Sulfadiazine	0.1				
Tetracaine	0.1	Tetracaine	0.1				

Abbreviations: AEME, anhydroecgonine methyl ester; CIT-RS, Toxicological Information Center of Rio Grande do Sul; EME, ecgonine methyl ester; IGP-RS, General Institute of Expertise of Rio Grande do Sul; MDMA, 3,4-methylenedioxymphetamine; MDEA, 3,4-methylenedioxymphetamine; MDMA, 3,4-methylenedioxymphetamine; MDEA, 3,4-methylenedioxymphetamine; MDEA, 3,4-methylenedioxymphetamine; carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol.

Table IV. Distribution of analyte concentrations observed in samples (N = 839)

Analyte	Positive samples	Lowest concentration (ng/mL)	Highest concentration (ng/mL)
Lidocaine	337	21.5	>10,000
Acetaminophen	319	56.4	>10,000
Benzoylcegonine	264	20.0	>10,000
EME	190	21.0	>10,000
Temazepam	140	51.0	4,580
Cocaine	110	20.2	>10,000
Oxazepam	104	51.1	9,603
7-Aminoclonazepam	97	50.0	>10,000
Haloperidol	94	20.4	1,473
Chlorpromazine	89	23.2	>10,000
Risperidone	86	21.0	>10,000
Ketamine	85	20.7	>10,000
THC-COOH	82	51.3	6,840
Promethazine	76	23.7	2,620
Carbamazepine	71	25.6	>10,000
Fluoxetine	64	22.8	8,282
Amitriptyline	62	20.5	>10,000
Metoclopramide	57	21.1	4,135
Midazolam	57	20.2	>10,000
Nortriptyline	54	32.7	>10,000
Norfluoxetine	53	51.0	5,119
Diclofenac	44	56.4	>10,000
Diphenhydramine	43	20.1	>10,000
Cocathylene	41	20.3	3,276
Chlorpheniramine	39	32.4	>10,000
Naphazoline	35	20.3	4,776
Morphine	34	177	>20,000
Fentanyl	31	22.7	864
Citalopram	30	45.2	>10,000
Salbutamol	30	25.0	>10,000
AEME	26	20.0	469
Clonazepam	24	53.3	1,757
Bupropion	23	20.7	>10,000
Levamisole	22	23.5	6,506
Norfentanyl	21	52.4	809
Quetiapine	21	25.4	2,944
Sertraline	21	127	>10,000
Desvenlafaxine	20	23.8	>10,000
Carisoprodol	19	52.7	>10,000
Cyclobenzaprine	15	25.4	1,367
MDA	15	66.2	>10,000
Norcyclobenzaprine	13	23.2	1,214
Sulfamethoxazole	13	67.4	>10,000
Codeine	12	104	>20,000
Alprazolam	11	51.9	734
Diazepam	11	22.1	83.6
O-	11	31.1	6,855
Desmethyltramadol			
Ephedrine	10	485	>10,000
Phenylephrine	10	142	>10,000
Trimethoprim	10	1890	>10,000
Biperiden	9	21.1	591
Clonidine	8	20.3	484
Imipramine	8	20.3	4,347
Lorazepam	8	57.8	7,088
MDMA	8	22.5	>10,000
Methylphenidate	8	20.9	>10,000
Venlafaxine	8	29.9	5,502
Brompheniramine	7	81.7	2,397
Ciprofloxacin	7	66.0	>10,000
Paroxetine	7	131	5,035
Propranolol	7	119	>10,000
Zolpidem	7	75.4	3,414
Amphetamine	6	46.3	602

(continued)

Table IV. (Continued)

Analyte	Positive samples	Lowest concentration (ng/mL)	Highest concentration (ng/mL)
Desipramine	6	28.5	1,363
Loperamide	6	20.7	452
Cyproheptadine	5	53.5	2,173
Phenyl-propanolamine	5	62.7	1,081
Captopril	3	84.8	>10,000
MDEA	2	42.2	561
Oxymetazoline	2	47.3	266
Bupirone	1	34.0	
Clomipramine	1	113	
Diethylpropion	1	23.4	
Fenoterol	1	20.8	
Methamphetamine	1	4,957	
Phenacetin	1	913	
Sulfadiazine	1	1,385	
Tetracaine	1	47.3	

Abbreviations: AEME, anhydroecgonine methyl ester; EME, ecgonine methyl ester; MDA, 3,4-methylenedioxymethamphetamine; MDEA, 3,4-methylenedioxyethylamphetamine; MDMA 3,4-methylenedioxymethamphetamine; THC-COOH, 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol.

observed for each analyte in the analyzed samples.

Figure 3 presents chromatograms of five cases analyzed using the developed method. Case 1 refers to a 1-year-old baby male who was admitted to the hospital displaying symptoms of pallor, lethargy and reduced responsiveness. The child's guardians denied any possible exposure to toxic agents. After a few hours, there was a brief recovery, followed by a new episode of reduced sensorium and bradycardia, which led the medical team to suspect a possible intoxication. The urine analysis identified the presence of naphazoline, with a concentration of 1,397 ng/mL. Naphazoline is an imidazoline drug used as a nasal decongestant, contraindicated for children due to its narrow therapeutic window for this population. In these cases, it can lead to toxic effects, like bradycardia, hypotension and reduced sensorium (60).

In Case 2, a woman of unknown age (around 20–25 years old) was admitted to the hospital with reduced sensorium. The patient suspected something was put in her drink at a party she attended, three 3 h before seeking medical care. Toxicological analysis indicated the presence of methamphetamine (4,957 ng/mL) and amphetamine (178 ng/mL). Despite the presence of clinical manifestations characteristic of Central Nervous System depressants, no other substance was detected using the developed method. Obviously, other substances not included in this method could not be discarded, e.g., gamma-hydroxybutyric acid (GHB) and alcohol. In this case, methamphetamine may have been used as a crime-facilitating drug due to its disinhibitory action, making the victim more susceptible to violations, such as sexual assaults (61). Fiorentin & Logan (2019) verified more than 1,000 cases of drug-facilitated sexual assault, and the presence of methamphetamine and amphetamine was found in 16.5% of the analyzed blood and urine samples, being the third most prevalent substance, only behind alcohol and THC and its derivatives (62).

In the same line of DFCs, Case 3 involved a 35-year-old man who was victim of a robbery. This individual arranged

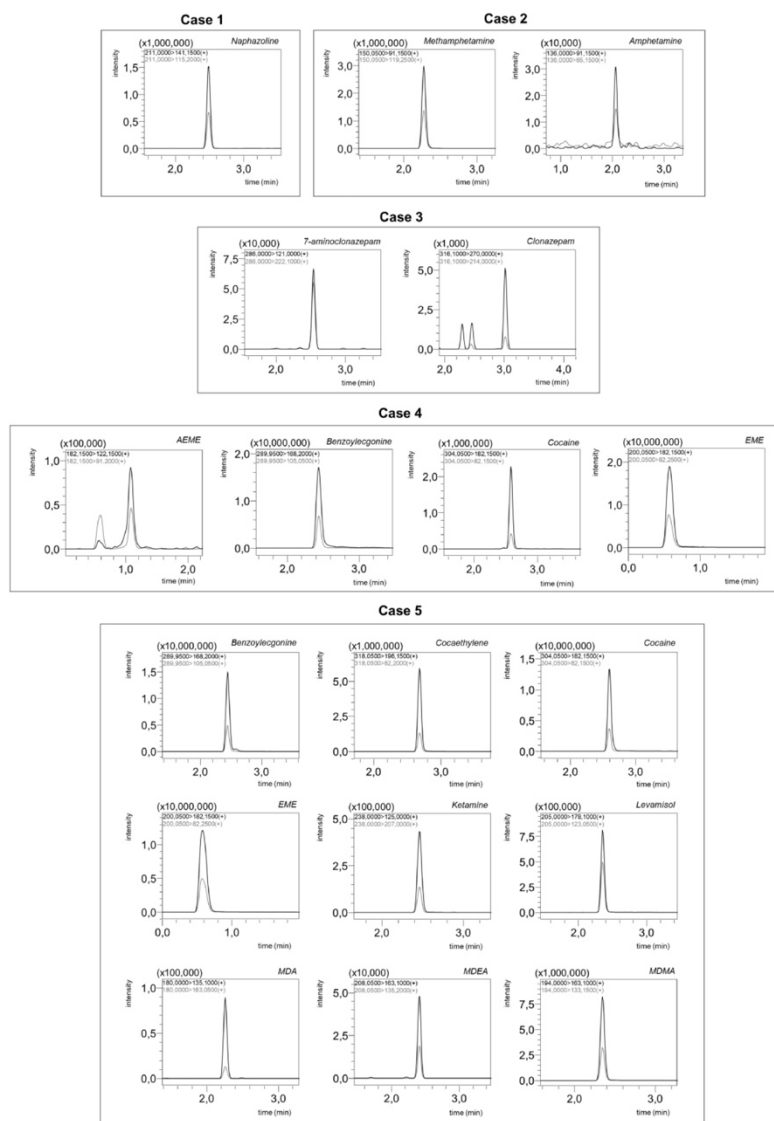


Figure 3. MRM chromatograms of five urine samples, from *in vivo* and postmortem cases, were analyzed using the developed method.

a meeting through a dating app, initially to go to a bar and return home. The next day, he reported the robbery to police authorities and the potential involvement of drug-related exposure. Urine analysis verified that there was exposure to clonazepam due to the positive result for clonazepam

(64 ng/mL) and its main metabolite 7-aminoclonazepam (1,582 ng/mL). Historically, clonazepam is one of the most frequent substances in DFC cases (63). In a prospective study carried out in France, benzodiazepines were the main group involved in DFC, with clonazepam representing 20% of cases

involving this class of substances (64). Analyzing Cases 2 and 3, an important aspect to consider in DFC cases is the need to collect urine samples as quickly as possible. Unfortunately, this does not happen in a great percentage of cases, and therefore it is essential to analyze metabolites that are capable of extending the detection window. In Case 3, sample collection was performed one day after exposure and the concentration of clonazepam was already low. The presence of 7-aminoclonazepam made it possible to confirm exposure to clonazepam. As previously stated, the inclusion of more metabolites (e.g., zolpidem-COOH, 7-aminoflunitrazepam) in the method would be valuable in these situations (65).

Case 4 is a postmortem collection of a 43-year-old man known to be a drug addict and with no other comorbidities. One day before death, he reported abdominal pain. At autopsy, a perforated gastroduodenal peptic ulcer was found, which was associated with the cause of death. Additionally, a COVID-19 test yielded a positive result, although it was not likely to be related to the cause of death. Urine analysis confirmed the history of substance use, especially for cocaine (609 ng/mL) and its metabolites benzoylecgonine (>10 µg/mL), AEME (129 ng/mL) and EME (>10 µg/mL). In this context, it was possible to confirm cocaine use by the individual, especially in the form of crack cocaine, corroborated through the presence of AEME. Studies already reported an association between the use of crack cocaine and the occurrence of gastric perforations (66).

Finally, Case 5 involved the analysis of a sample from a 35-year-old man whose body was found on a road, with multiple close-range gunshot wounds to the head. The cause of death was defined as cerebral hemorrhage. In the urine sample, different substances were detected: MDMA (3,479 ng/mL), MDA (269 ng/mL), MDEA (42 ng/mL), cocaine (4,187 ng/mL), cocaethylene (1,346 ng/mL), benzoylecgonine (>10 µg/mL), EME (>10 µg/mL), ketamine (137 ng/mL) and levamisole (430 ng/mL). In this specific case, the positive toxicological result is not directly related to death. However, it is possible to verify that the individual was exposed to numerous illicit drugs with significant psychoactive effects, which can lead to violence-related behaviors (67). When analyzing 148 deaths involving MDMA, Armenian & Rodda (2022) found that 45.3% of death cases were due to homicide, being the most prevalent circumstance (68). All the cases presented here illustrate the broad versatility of the developed method, whether in clinical or forensic scenarios, for both *in vivo* and postmortem applications.

Conclusion

This work developed a comprehensive screening LC-MS-MS method for the analysis of 95 substances, including illicit drugs and medicines, in urine samples. The dilute-and-shoot technique for urine analysis was demonstrated to be a feasible and effective alternative for implementation in analytical toxicology laboratories. The method was successfully validated, in accordance with parameters and recommendations established by the AAFS validation guideline. In total, 839 urine samples from *in vivo* and postmortem cases were analyzed, from three different institutions of a Brazilian state. A high positivity rate (>90%) was observed, mainly due to the variety and number of substances included in the method. The most detected substances were lidocaine, acetaminophen and

cocaine metabolites. The developed methodology is a valuable tool in poisoning diagnosis, as well as for substance use history evaluation, which cooperates in the elucidation of deaths and related comorbidities. Ultimately, the data obtained from the performed sample analyses are crucial to comprehend the Brazilian context and produce strong evidence for the creation and improvement of new health and safety public policies.

Supplementary data

Supplementary data is available at *Journal of Analytical Toxicology* online.

References

- Gummin, D.D., Mowry, J.B., Beuhler, M.C., Spyker, D.A., Rivers, L.J., Feldman, R., et al. (2022) 2021 annual report of the National Poison Data System® (NPDS) from America's poison centers: 39th annual report. *Clinical Toxicology*, **60**, 1381–1643.
- SINAN. 2023 *Intoxicação exógena*. Sistema de Informação de Agravos de Notificação, 2023. <http://portalsinan.saude.gov.br/intoxicacao-exogena> (Apr 7, 2023).
- Magalhães, A.E.A., Caldas, E.D. (2018) Underreporting of fatal poisonings in Brazil – a descriptive study using data from four information systems. *Forensic Science International*, **287**, 136–141.
- Moradinazar, M., Najafi, F., Baneshi, M.R., Haghdoust, A.A. (2017) Estimation of the rate and number of underreported deliberate self-poisoning attempts in western Iran in 2015. *Epidemiology and Health*, **39**, e2017023.
- Bechtel, L., Holstege, C.P. (2022) Utilizing the toxicology laboratory in the poisoned patient. *Emergency Medicine Clinics of North America*, **40**, 431–441.
- Friedman, L.S., Krajewski, A., Vannoy, E., Allegretti, A., Wahl, M. (2014) The association between U.S. Poison Center assistance and length of stay and hospital charges. *Clinical Toxicology (Philadelphia, Pa.)*, **52**, 198–206.
- Skopp, G. (2010) Postmortem toxicology. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, **6**, 314–325.
- Taskinen, S., Beck, O., Bosch, T., Brckak, M., Carmichael, D., Fucci, N., et al. (2017) European guidelines for workplace drug testing in urine. *Drug Testing and Analysis*, **9**, 853–865.
- Dinis-Oliveira, R.J., Magalhães, T. (2020) Abuse of licit and illicit psychoactive substances in the workplace: medical, toxicological, and forensic aspects. *Journal of Clinical Medicine*, **9**, 1–18.
- Dinis-Oliveira, R.J., Magalhães, T. (2013) Forensic toxicology in drug-facilitated sexual assault. *Toxicology Mechanisms & Methods*, **23**, 471–478.
- Verstraete, A.G. (2004) Detection times of drugs of abuse in blood, urine, and oral fluid. *Therapeutic Drug Monitoring*, **26**, 200–205.
- Jones, S., McGowan, C., Boyle, S., Ke, Y., Chan, C.H.M., Hwang, H. (2022) An overview of sample preparation in forensic toxicology. *WIREs Forensic Science*, **4**, e1436.
- Deventer, K., Pozo, O.J., Verstraete, A.G., Van Eenoo, P. (2014) Dilute-and-shoot-liquid chromatography-mass spectrometry for urine analysis in doping control and analytical toxicology. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, **55**, 1–13.
- Ceelen, M., Dorn, T., Buster, M., Stomp, J., Zweipfenning, P., Das, K. (2011) Post-mortem toxicological urine screening in cause of death determination. *Human and Experimental Toxicology*, **30**, 1165–1173.
- Allen, K.R. (2011) Screening for drugs of abuse: which matrix, oral fluid or urine? *Annals of Clinical Biochemistry*, **48**, 531–541.

16. Meyer, M.R., Maurer, H.H. (2011) Absorption, distribution, metabolism and excretion pharmacogenomics of drugs of abuse. *Pharmacogenomics*, **12**, 215–233.
17. Maurer, H.H., Sauer, C., Theobald, D.S. (2006) Toxicokinetics of drugs of abuse: current knowledge of the isoenzymes involved in the human metabolism of tetrahydrocannabinol, cocaine, heroin, morphine, and codeine. *Therapeutic Drug Monitoring*, **28**, 447–453.
18. Bortolotti, F., Gottardo, R., Pascali, J., Tagliaro, F. (2012) Toxicokinetics of cocaine and metabolites: the forensic toxicological approach. *Current Medicinal Chemistry*, **19**, 5658–5663.
19. Yang, G., Ge, S., Singh, R., Basu, S., Shatzer, K., Zen, M., et al. (2017) Glucuronidation: driving factors and their impact on glucuronide disposition. *Drug Metabolism Reviews*, **49**, 105–138.
20. Dinis-Oliveira, R.J. (2017) Metabolic profile of oxazepam and related benzodiazepines: clinical and forensic aspects. *Drug Metabolism Reviews*, **49**, 451–463.
21. Maurer, H.H. (2018) Mass spectrometry for research and application in therapeutic drug monitoring or clinical and forensic toxicology. *Therapeutic Drug Monitoring*, **40**, 389–393.
22. Couchman, L., Morgan, P.E. (2011) LC-MS in analytical toxicology: some practical considerations. *Biomedical Chromatography*, **25**, 100–123.
23. Van Wijk, X.M.R., Goodnough, R., Colby, J.M. (2019) Mass spectrometry in emergency toxicology: current state and future applications. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, **56**, 225–238.
24. Seger, C., Salzmann, L. (2020) After another decade: LC-MS/MS became routine in clinical diagnostics. *Clinical Biochemistry*, **82**, 2–11.
25. Aizpurua-Olaizola, O., Zarandona, I., Ortiz, L., Navarro, P., Etxebarria, N., Usobiaga, A. (2017) Simultaneous quantification of major cannabinoids and metabolites in human urine and plasma by HPLC-MS/MS and enzyme-alkaline hydrolysis. *Drug Testing and Analysis*, **9**, 626–633.
26. Montesano, C., Sergi, M., Odoardi, S., Simeoni, M.C., Compagnone, D., Curini, R. (2014) A μ -SPE procedure for the determination of cannabinoids and their metabolites in urine by LC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, **91**, 169–175.
27. Salomone, A., Gerace, E., Brizio, P., Gennaro, M.C., Vincenti, M. (2011) A fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determining benzodiazepines and analogues in urine. Validation and application to real cases of forensic interest. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, **56**, 582–591.
28. Rosado, T., Gonçalves, A., Martinho, A., Alves, G., Duarte, A.P., Domingues, F., et al. (2017) Simultaneous quantification of antidepressants and metabolites in urine and plasma samples by GC-MS for therapeutic drug monitoring. *Chromatographia*, **80**, 301–328.
29. Langman, L.J., Bjergum, M.W., Williamson, C.L., Crow, F.W. (2009) Sensitive method for detection of cocaine and associated analytes by liquid chromatography–tandem mass spectrometry in urine. *Journal of Analytical Toxicology*, **33**, 447–455.
30. Jain, R., Singh, R. (2016) Applications of dispersive liquid-liquid micro-extraction in forensic toxicology. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, **75**, 227–237.
31. Chambers, E.E., Woodcock, M.J., Wheaton, J.P., Pekol, T.M., Diehl, D.M. (2014) Systematic development of an UPLC-MS/MS method for the determination of tricyclic antidepressants in human urine. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, **88**, 660–665.
32. D'ovidio, C., Bonelli, M., Rosato, E., Tartaglia, A., Ulusoy, H.I., Samanidou, V., et al. (2022) Novel applications of microextraction techniques focused on biological and forensic analyses. *Separations*, **9**, 1–33.
33. Viette, V., Fathi, M., Rudaz, S., Hochstrasser, D., Veuthey, J.L. (2011) Current role of liquid chromatography coupled to mass spectrometry in clinical toxicology screening methods. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, **49**, 1091–1103.
34. Greer, B., Chevallier, O., Quinn, B., Botana, L.M., Elliott, C.T. (2021) Redefining dilute and shoot: the evolution of the technique and its application in the analysis of foods and biological matrices by liquid chromatography mass spectrometry. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, **141**, 116284.
35. Birk, L., Dos Santos, B.P., Schwarz, P.D.S., Eller, S., de Oliveira, T.F. (2023) Green chemistry: developments and perspectives for sample treatment in forensic methodologies. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Forensic Science*, **5**, e1497.
36. Dong, Y., Yan, K., Ma, Y., Wang, S., He, G., Deng, J., et al. (2015) A sensitive dilute-and-shoot approach for the simultaneous screening of 71 stimulants and 7 metabolites in human urine by LC-MS-MS with dynamic MRM. *Journal of Chromatographic Science*, **53**, 1528–1535.
37. Feng, S., Enders, J.R., Cummings, O.T., Strickland, E.C., McIntire, T., McIntire, G. (2020) A dilute and shoot LC-MS/MS method for antipsychotics in urine. *Journal of Analytical Toxicology*, **44**, 331–338.
38. Tudela, E., Deventer, K., Geldof, L., Van Eenoo, P. (2015) Urinary detection of conjugated and unconjugated anabolic steroids by dilute-and-shoot liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis*, **7**, 95–108.
39. Kong, T.Y., Kim, J.H., Kim, J.Y., In, M.K., Choi, K.H., Kim, H.S., et al. (2017) Rapid analysis of drugs of abuse and their metabolites in human urine using dilute and shoot liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Archives of Pharmacological Research*, **40**, 180–196.
40. Ferreira, S.L.C., Lemos, V.A., de Carvalho, V.S., da Silva, E.G.P., Queiroz, A.F.S., Felix, C.S.A., et al. (2018) Multivariate optimization techniques in analytical chemistry - an overview. *Microchemical Journal*, **140**, 176–182.
41. American Academy of Forensic Science. (2019) *Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology*. https://www.aafs.org/sites/default/files/media/documents/036_Std_e1.pdf (accessed Apr 10, 2023).
42. Matuszewski, B.K., Constanzer, M.L., Chavez-Eng, C.M. (2003) Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bio-analytical methods based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry*, **75**, 3019–3030.
43. Ferrari Júnior, E., Caldas, E.D. (2022) Determination of new psychoactive substances and other drugs in postmortem blood and urine by UHPLC-MS/MS: method validation and analysis of forensic samples. *Forensic Toxicology*, **40**, 88–101.
44. Tang, M.H.Y., Ching, C.K., Lee, C.Y.W., Lam, Y.H., Mak, T.W.L. (2014) Simultaneous detection of 93 conventional and emerging drugs of abuse and their metabolites in urine by UHPLC-MS/MS. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **969**, 272–284.
45. Montenarh, D., Hopf, M., Warth, S., Maurer, H.H., Schmidt, P., Ewald, A.H. (2015) A simple extraction and LC-MS/MS approach for the screening and identification of over 100 analytes in eight different matrices. *Drug Testing and Analysis*, **7**, 214–240.
46. Wissenbach, D.K., Meyer, M.R., Remane, D., Weber, A.A., Maurer, H.H. (2011) Development of the first metabolite-based LC-MS n urine drug screening procedure-exemplified for antidepressants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **400**, 79–88.
47. Rosado, T., Gonçalves, A., Margalho, C., Barroso, M., Gallardo, E. (2017) Rapid analysis of cocaine and metabolites in urine using microextraction in packed sorbent and GC/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **409**, 2051–2063.
48. Farley, M., Tran, H., Towler, S., Gevorkyan, J., Pearrin, S., Rodda, L.N. (2022) A single method for 127 recommended and additional DUID drugs in blood and urine by LC-MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology*, **46**, 658–669.
49. Pablo, A., Breaud, A.R., Clarke, W. (2020) Automated analysis of dried urine spot (DUS) samples for toxicology screening. *Clinical Biochemistry*, **75**, 70–77.

50. SAMHSA. (2017) *Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs*. 2017. <https://www.samhsa.gov/workplace/drug-testing-resources> (accessed April 20, 2023).
51. Xiong, L., Wang, R., Liang, C., Cao, F., Rao, Y., Wang, X., et al. (2013) Determination of ecgonine and seven other cocaine metabolites in human urine and whole blood by ultra-high-pressure liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **405**, 9805–9816.
52. Feng, S., Zhao, Q., Jiang, J., Hu, P. (2013) Determination of phenylephrine in human plasma using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **915–916**, 28–32.
53. Berg, T., Lundanes, E., Christophersen, A.S., Strand, D.H. (2009) Determination of opiates and cocaine in urine by high pH mobile phase reversed phase UPLC-MS/MS. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **877**, 421–432.
54. Bozzolino, C., Leporati, M., Gani, F., Ferrero, C., Vincenti, M. (2018) Development and validation of an UHPLC-MS/MS method for β 2-agonists quantification in human urine and application to clinical samples. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, **150**, 15–24.
55. Wunder, C., Meier, J., Reyher, C., Könitz, V., Paulke, A., Zacharowski, K., et al. (2014) Use of lidocaine in endotracheal intubation. Blood and urine concentrations in patients and deceased after unsuccessful resuscitation. *Forensic Science International*, **244**, 259–262.
56. Franco de Oliveira, S.C.W.S.E., Zucoloto, A.D., de Oliveira, C.D.R., Hernandez, E.M.M., Fruchtgarten, L.V.G., de Oliveira, T.F., et al. (2019) A fast and simple approach for the quantification of 40 illicit drugs, medicines, and pesticides in blood and urine samples by UHPLC-MS/MS. *Journal of Mass Spectrometry*, **54**, 600–611.
57. Lee, J., Park, J., Go, A., Moon, H., Kim, S., Jung, S., et al. (2018) Urine multi-drug screening with GC-MS or LC-MS-MS using SALLE-hybrid PPT/SPE. *Journal of Analytical Toxicology*, **42**, 617–624.
58. Abdalla, R.R., Madruga, C.S., Ribeiro, M., Pinsky, I., Caetano, R., Laranjeira, R. (2014) Prevalence of cocaine use in Brazil: data from the II Brazilian National Alcohol and Drugs Survey (BNADS). *Addictive Behaviors*, **39**, 297–301.
59. Campelo, E.L.C., Caldas, E.D. (2010) Postmortem data related to drug and toxic substance use in the Federal District, Brazil, from 2006 to 2008. *Forensic Science International*, **200**, 136–140.
60. Alvarez-Pitti, J., Rodríguez-Varela, A., Morales-Carpi, C., Lurbe, E., Estañ, L. (2006) Naphazoline intoxication in children. *European Journal of Pediatrics*, **165**, 815–816.
61. Jansen, K.L.R., Theron, L. (2006) Ecstasy (MDMA), methamphetamine, and date rape (drug-facilitated sexual assault): a consideration of the issues. *Journal of Psychoactive Drugs*, **38**, 1–12.
62. Fiorentin, T.R., Logan, B.K. (2019) Toxicological findings in 1000 cases of suspected drug facilitated sexual assault in the United States. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, **61**, 56–64.
63. García, M.G., Pérez-Cárceles, M.D., Osuna, E., Legaz, I. (2021) Drug-facilitated sexual assault and other crimes: a systematic review by countries: criminal social behaviors associated with drug use. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, **79**, 102151.
64. Djezzar, S., Gaulier, J.M., Gorgiard, C., Chêze, M., Alvarez, J.C., Martin, C., et al. (2023) Assessment of 19 years of a prospective national survey on drug-facilitated crimes in France. *Legal Medicine*, **65**, 102297.
65. Rossi, S.S., Vecchio, S., Odoardi, S., Anzillotti, L., Chiarotti, M., Serpelloni, G., et al. (2019) Analytical protocol for the screening of psychotropic/incapacitating drugs in alleged drug-facilitated crimes. *Forensic Chemistry*, **14**, 100168.
66. Chander, B., Aslanian, H.R. (2010) Gastric perforations associated with the use of crack cocaine. *Gastroenterology and Hepatology*, **6**, 733–735.
67. Fonseca Pego, A.M., Souza Eller, S.C., de Oliveira, F., de Oliveira, T.F., Leyton, V., Miziara, I., et al. (2018) Cocaine toxicological findings in cases of violent death in Sao Paulo city - Brazil. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, **60**, 3–8.
68. Armenian, P., Rodda, L.N. (2022) Two decades of ecstasy: shifting demographic trends in decedents using MDMA. *Journal of Analytical Toxicology*, **46**, 163–169.

4.2. Artigo II

O artigo “**A Sensitive and Comprehensive LC-MS/MS Method for the Analysis of Hallucinogens, Synthetic Cathinones, and Synthetic Cannabinoids in Urine Samples**”, publicado no periódico *Journal of Mass Spectrometry* (ISSN 1096-9888, fator de impacto 2.0, 2024), é apresentado a seguir. O estudo descreve o desenvolvimento, a otimização e a validação de um método analítico sensível por LC-MS/MS para a detecção de drogas de abuso em urina, incluindo LSD e 2-oxo-3-OH-LSD, fenetilaminas sintéticas, catinonas sintéticas e canabinoides sintéticos. O método apresentou elevada sensibilidade, com limites de detecção entre 0,1 e 1 ng/mL, e foi aplicado com sucesso em 24 amostras de casos suspeitos de intoxicação atendidos pelo CIT-RS. Um caso envolvendo o uso de 25B-NBOH e dois casos envolvendo LSD são descritos. O artigo pode ser acessado na íntegra em: <https://doi.org/10.1002/jms.5178>

RESEARCH ARTICLE OPEN ACCESS

A Sensitive and Comprehensive LC-MS/MS Method for the Analysis of Hallucinogens, Synthetic Cathinones, and Synthetic Cannabinoids in Urine Samples

Bruno Pereira dos Santos¹ | Leticia Birk¹ | Vitor Camargo Pôrto¹ | Sabrina Nunes Nascimento² | Viviane Cristina Sebben² | Sarah Eller¹ | Tiago Franco de Oliveira¹

¹Graduate Program in Health Sciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil | ²Toxicological Information Center of Rio Grande do Sul (CIT-RS), Rio Grande do Sul State Center for Health Surveillance (CEVS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Correspondence: Bruno Pereira dos Santos (brunods@ufcspa.edu.br)

Received: 30 July 2025 | **Revised:** 26 August 2025 | **Accepted:** 1 September 2025

Funding: This work was supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel.

Keywords: drug analysis | LC-MS/MS | new psychoactive substances | urine

ABSTRACT

The laboratory analysis of new psychoactive substances and related drugs is crucial for accurate clinical and forensic diagnosis of poisonings. Given this, a new LC-MS/MS method for analyzing hallucinogens, synthetic cathinones, and synthetic cannabinoids in urine was developed. Urine samples were extracted using a liquid–liquid extraction protocol optimized via a multivariate experimental design. An aliquot of 400 μ L of urine was enzymatically hydrolyzed with β -glucuronidase and extracted with 700 μ L of ethyl acetate. The resulting extracts were analyzed using LC-MS/MS, with a total chromatographic run time of 8 min. The method was validated according to the ANSI/ASB Standard 036 guideline and was applied to 24 samples from suspected poisoning cases. The lower limits of quantification ranged from 0.1 to 1 ng/mL. Within-run and between-run precision (CV) were <16%, and bias ranged from –12.8% to 19.8%. Nine of the 20 analytes investigated showed significant ionization suppression or enhancement (>25%). Only two analytes (2C-E and 2-oxo-3-OH-LSD) had a recovery rate lower than 70%. Among the 24 analyzed urine samples, one tested positive for 25B-NBOH, one for LSD, and two for 2-oxo-3-OH-LSD. The developed method enables the simultaneous quantification of 20 illicit drugs, serving as an efficient diagnostic tool for clinical and forensic laboratories.

1 | Introduction

New psychoactive substances (NPS) represent a growing public health concern due to their potentially higher toxicity compared to classic drugs of abuse, their dynamic distribution market and easy accessibility, and their frequent absence from routine drug screening methods [1, 2]. As of June 2025, a total of 1343 NPS have been reported globally [3]. The traditional definition of NPS, as established by the United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), includes all substances of abuse not listed

in the 1961 Single Convention on Narcotic Drugs or the 1971 Convention on Psychotropic Substances [1, 3].

Among the main groups of NPS are synthetic cathinones, synthetic phenethylamines, synthetic cannabinoid receptor agonists (SCRAs), and synthetic opioids [2]. These compounds, often designed to mimic the effects of controlled substances, pose significant challenges in clinical and forensic toxicology, including nonspecific clinical presentations, reliance on highly sensitive and comprehensive analytical methods, and limited

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2025 The Author(s). *Journal of Mass Spectrometry* published by John Wiley & Sons Ltd.

Journal of Mass Spectrometry, 2025; 60:e5178
<https://doi.org/10.1002/jms.5178>

1 of 13

availability of evidence-based treatment and management protocols for intoxicated patients [4, 5]. Common clinical manifestations of NPS use include cardiovascular disturbances, central nervous system and respiratory depression, hallucinations, delirium, psychosis, and anxiety [6]. The use of NPS, either alone or in combination with other NPS or additional substances, can lead to life-threatening or fatal outcomes [7].

Analytical approaches for the detection of NPS have significantly improved in recent years. A diverse range of validated methods for the determination of NPS in whole blood [8–10], plasma [11, 12], urine [13, 14], and hair [15] has been described in the literature. Typically, NPS are present in biological matrices at low concentrations. In addition, the development of comprehensive analytical methods that enable the simultaneous detection of multiple substances or classes is essential, given the large number of NPS currently available to the population. To overcome these challenges, the use of highly sensitive and selective techniques, such as liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), is recommended [16]. The implementation of LC-MS/MS-based methods in clinical and forensic laboratories is critical for strengthening NPS surveillance, improving patient management, and supporting forensic investigations [5].

Urine analysis allows a broader detection window, increasing the likelihood of obtaining a positive result. Urine is also considered a cleaner biological matrix, with fewer interferents, ample sample volumes (~20–30 mL), higher analyte concentrations, and frequent availability in clinical and forensic cases [17, 18]. An important aspect to consider in urine analysis is biotransformation, as it may be necessary to target the biotransformation products rather than unchanged substances. Furthermore, a hydrolysis step may be required for drugs that are conjugated with polar groups [17, 19–21].

Given this, this study aimed to develop and validate a quantitative LC-MS/MS method for the simultaneous analysis of 20 drugs of abuse, including hallucinogens (2C-E, 25B-NBOH, 25B-NBOMe, 25C-NBOMe, 25E-NBOH, 25I-NBOH, 25I-NBOMe, 2-oxo-3-OH-LSD, and LSD), synthetic cathinones (4-chloro-dimethylcathinone, dipentylone, ethylone, eutylone, mephedrone, methylone, N-butylpentylone, N-ethylheptedrone, and pentylone), and synthetic cannabinoids (ADB-BUTINACA and ADB-FUBINACA) in urine samples from clinical poisoning cases.

2 | Materials and Methods

2.1 | Chemicals and Reagents

LC-MS-grade acetonitrile, ethyl acetate, hexane, methyl tert-butyl ether (MTBE), and 99% formic acid were acquired from Merck (Darmstadt, Germany). Standard solutions of 25B-NBOMe, 25C-NBOMe, 25I-NBOH, 25I-NBOMe, ethylone, lysergic acid diethylamide (LSD), mephedrone, methylone, and pentylone (1 mg/mL) were purchased from Cerilliant (Round Rock, TX, USA). 25B-NBOH, 2C-E, 25E-NBOH, 4-chloro-N,N-dimethylcathinone (4-CDC), ADB-BUTINACA, ADB-FUBINACA, dipentylone, N-butylpentylone, and N-ethylpentedrone (1–5 mg total) were purchased from Cayman

Chemical (Ann Arbor, MI, USA). Standard solutions of 2-oxo-3-OH-LSD (100 µg/mL) and eutylone (1 mg/mL) were acquired from LGC Standards (Manchester, NH, USA). The internal standard (IS) solutions MDEA-*d*₆ and PCP-*d*₅ (1 mg/mL) were also purchased from LGC Standards (Manchester, NH, USA). Ammonium acetate, sodium hydroxide, and β-glucuronidase (type B-1, from bovine liver) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Ultrapure water was supplied by a Milli-Q system (Millipore, Billerica, MA, USA).

2.2 | Solutions

A working solution containing all analytes was prepared in acetonitrile at a concentration of 250 ng/mL. When not in use, the solutions were stored at –20°C. Blank urine samples were spiked with the working solution for the optimization and validation procedures. Drug-free samples were collected from the researchers and previously analyzed to confirm the absence of target analytes. Both blank and spiked urine samples were stored in a freezer (–20°C) when not in use. The IS solution, containing MDEA-*d*₆ and PCP-*d*₅, was prepared in acetonitrile at a concentration of 400 ng/mL.

2.3 | LC-MS/MS Settings

The analyses were performed using a liquid chromatographic system coupled to a triple quadrupole mass spectrometer (LC-MS/MS), model LCMS-8045 (Shimadzu, Kyoto, Japan). The chromatographic separation was achieved using a Raptor Biphenyl column (50 × 3.0 mm, 2.7 µm particle size) from Restek (Bellefonte, PA, USA). Ultrapure water (A) and acetonitrile (B), both acidified with 0.1% (v/v) formic acid, were used as mobile phases, with a flow rate of 0.5 mL/min. The column oven was set at 50°C. The elution gradient used is described as follows: 0.0–0.25 min, 5%–5% of B; 0.25–4.8 min, 15%–50% of B; 4.8–5.5 min, 50%–100% of B; 5.5–6.5 min, 100% of B; 6.5–6.6 min, 100%–5% of B; 6.6–8.0 min, 5% of B. The total chromatographic run time was 8 min.

Mass spectral data were acquired using electrospray ionization (ESI) in positive mode. The mass spectrometer settings used were as follows: heat block temperature, 400°C; capillary voltage, 1.5 kV; nebulizer gas (N₂) flow, 3.0 L/min; drying gas (N₂) flow, 10 L/min; desolvation line temperature, 250°C; and collision-induced dissociation (CID) gas pressure (Ar), 230 kPa. Analyses were performed in multiple reaction monitoring (MRM) mode. For each analyte, three MRM transitions were monitored: one for quantification and two for confirmation. MRM transitions, collision energies, and retention time for each substance are presented in Table 1. Figure 1 shows a representative chromatogram of all analytes extracted from a spiked urine sample at 12 ng/mL concentration. All data were processed using the LabSolutions software (Shimadzu, Kyoto, Japan).

2.4 | Sample Procedure

An aliquot of 400 µL of urine and 20 µL of the IS solution (400 ng/mL) were added to a polypropylene microtube. The sample was

TABLE 1 | Analytes and their respective mass spectrometry conditions, retention time, and internal standard (IS).

Analyte	MRM transitions (m/z)	Dwell time (s)	Q1 pre bias (V)	CE (eV)	Q3 pre bias (V)	Retention time (min)	IS
2C-E	210.0 → 193.1	1.0	10	14	21	2.81	PCP-d ₅
	210.0 → 178.1	1.0	14	20	17		
	210.0 → 163.0	1.0	10	29	30		
25B-NBOH	366.1 → 243.0	1.0	13	24	25	3.95	PCP-d ₅
	366.1 → 107.0	1.0	13	28	18		
	366.1 → 260.1	1.0	13	12	17		
25B-NBOMe	380.0 → 121.1	1.0	13	22	22	4.59	PCP-d ₅
	380.0 → 91.1	1.0	11	45	16		
	380.0 → 93.1	1.0	13	32	16		
25C-NBOMe	336.1 → 121.1	1.0	12	21	23	4.42	PCP-d ₅
	336.1 → 91.1	1.0	12	48	15		
	336.1 → 93.1	1.0	12	40	16		
25E-NBOH	316.0 → 193.1	1.0	21	21	18	4.25	PCP-d ₅
	316.0 → 107.1	1.0	11	31	18		
	316.0 → 178.1	1.0	21	31	17		
25I-NBOH	414.0 → 290.9	1.0	15	24	30	4.25	PCP-d ₅
	414.0 → 107.1	1.0	15	31	18		
	414.0 → 308.0	1.0	15	14	20		
25I-NBOMe	428.0 → 121.1	1.0	15	24	21	4.90	PCP-d ₅
	428.0 → 91.1	1.0	15	53	15		
	428.0 → 93.1	1.0	15	46	17		
2-Oxo-3-OH-LSD	356.0 → 237.1	1.0	24	25	23	2.11	MDEA-d ₅
	356.0 → 222.0	1.0	24	34	22		
	356.0 → 265.1	1.0	24	19	28		
4-CDC	212.0 → 139.0	1.0	19	20	21	2.28	MDEA-d ₅
	212.0 → 167.0	1.0	19	15	25		
	212.0 → 103.0	1.0	18	25	14		
ADB-BUTINACA	331.2 → 201.1	1.0	12	27	20	5.67	PCP-d ₅
	331.2 → 314.2	1.0	12	10	21		
	331.2 → 286.1	1.0	12	16	18		
ADB-FUBINACA	383.1 → 338.2	1.0	22	16	21	5.89	PCP-d ₅
	383.1 → 366.2	1.0	13	10	24		
	383.1 → 253.1	1.0	14	26	22		
Dipentylone	250.0 → 100.1	1.0	17	23	18	2.62	MDEA-d ₅
	250.0 → 205.0	1.0	16	15	21		
	250.0 → 175.1	1.0	17	20	17		

(Continues)

TABLE 1 | (Continued)

Analyte	MRM transitions (m/z)	Dwell time (s)	Q1 pre bias (V)	CE (eV)	Q3 pre bias (V)	Retention time (min)	IS
Ethylone	222.0 → 174.1	1.0	20	20	20	2.02	MDEA-d ₅
	222.0 → 204.1	1.0	16	14	20		
	222.0 → 146.1	1.0	16	29	14		
Eutylone	236.0 → 188.1	1.0	20	20	20	2.30	MDEA-d ₅
	236.0 → 218.0	1.0	20	15	20		
	236.0 → 189.1	1.0	20	25	20		
LSD	324.2 → 223.0	1.0	12	26	22	3.04	MDEA-d ₅
	324.2 → 281.1	1.0	12	19	30		
	324.2 → 207.0	1.0	21	45	20		
Mephedrone	178.0 → 160.1	1.0	20	15	20	2.10	MDEA-d ₅
	178.0 → 145.1	1.0	20	16	20		
	178.0 → 144.1	1.0	18	15	20		
Methylone	208.1 → 160.1	1.0	20	20	20	1.86	MDEA-d ₅
	208.1 → 132.1	1.0	15	22	23		
	208.1 → 190.1	1.0	15	12	17		
N-Butylpentylone	278.1 → 260.2	1.0	20	15	20	3.46	MDEA-d ₅
	278.1 → 230.1	1.0	20	20	20		
	278.1 → 188.0	1.0	20	20	20		
N-Ethylheptedrone	234.1 → 216.1	1.0	20	15	20	3.48	MDEA-d ₅
	234.1 → 91.1	1.0	20	30	20		
	234.1 → 146.1	1.0	20	20	20		
Pentylone	236.1 → 188.1	1.0	20	20	20	2.49	MDEA-d ₅
	236.1 → 218.1	1.0	20	14	20		
	236.1 → 131.1	1.0	18	40	22		
MDEA-d ₅	213.1 → 163.1	1.0	20	15	20	2.18	—
	213.1 → 105.1	1.0	20	30	20		
	213.1 → 135.1	1.0	19	23	20		
PCP-d ₅	249.3 → 96.1	1.0	20	32	20	3.61	—
	249.3 → 164.2	1.0	20	18	20		
	249.3 → 86.1	1.0	20	22	20		

Abbreviations: CE, collision energy; IS, internal standard; MRM, multiple reaction monitoring.

hydrolyzed by the addition of 10 µL of β-glucuronidase (400 U/µL) and 50 µL of acetate buffer (0.2 mol/L, pH 5.2), and the mixture was heated at 55°C for 60 min. After hydrolysis, the sample was cooled to room temperature. Then, 100 µL of NaOH solution (0.1 mol/L) and 700 µL of ethyl acetate were added. The mixture was vortexed for 10 s and centrifuged for 6 min at 9000 rpm. Subsequently, 650 µL of the organic phase was transferred to a new tube and dried under nitrogen flow at 50°C. The dried extract was reconstituted with 30 µL of ACN:water (3:1, v/v) with

0.1% (v/v) formic acid. Finally, 1 µL was injected into the LC-MS/MS.

2.5 | Optimization of Sample Extraction

Sample preparation is an essential step for obtaining bioanalytical methods with reduced matrix interferences and improved sensitivity. To achieve this, proper optimization must

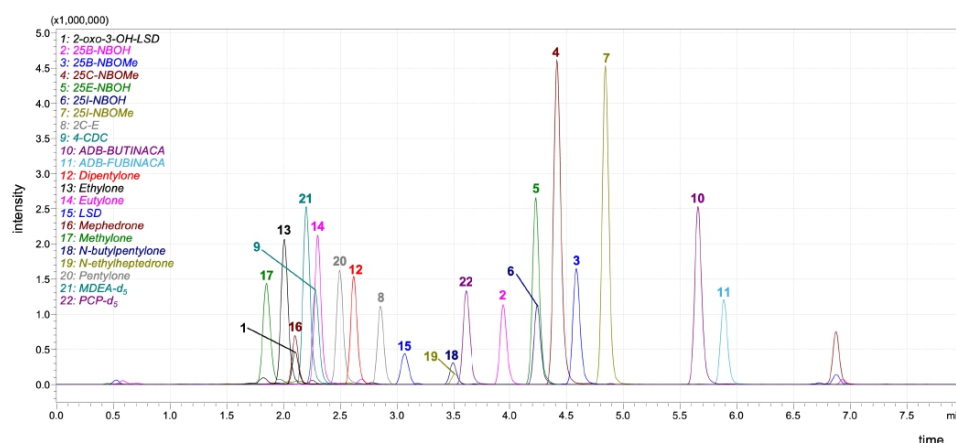


FIGURE 1 | Chromatogram of all analytes included in this study, at medium QC level (12 ng/mL).

be carried out to ensure that the best conditions for the parameters involved in the extraction process [22]. In this study, a multivariate experimental approach was employed to improve the responses of variables that can influence the extraction efficiency. Initially, a fractional factorial design with five factors (2^{5-1}) was conducted to evaluate the following variables: solvent volume, sample volume, NaOH concentration, use of salting-out, and extraction time. For each variable, two values (low and high) were defined, totaling sixteen runs. The complete experiment matrix is presented in Table S1. Subsequently, variables considered significant, when applicable, were further evaluated. A Doehlert design was employed to assess the optimal combination of solvent and sample volumes. Sample volume was optimized at five levels (100–400 μ L), whereas solvent volume was evaluated in three levels (200–800 μ L). The complete Doehlert experimental matrix is provided in Table S2. Next, the composition of the extractor solvent was investigated using three different solvents: ethyl acetate, hexane, and MTBE. Extraction was performed with both pure solvents and their mixtures, with ratios detailed in Table S3. All optimization experiments were conducted using drug-free urine samples spiked with analytes at a concentration of 15 ng/mL. In both the fractional factorial and Doehlert designs, MTBE was fixed as the extraction solvent. The geometric mean of the absolute chromatographic area of all analytes was used to assess the response of the experiments. Optimization data were analyzed using Statistica 10.0 software (Statsoft, Tulsa, OK, USA) and statistically evaluated using the analysis of variance (ANOVA).

2.6 | Bioanalytical Validation

Bioanalytical validation was performed in accordance with the Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology (ANSI/ASB Standard 036 guideline), from the American Academy of Forensic Science (AAFS), as well as other international recommendations [23, 24]. The evaluated parameters

included lower limit of quantification (LLOQ), interference studies, linearity, precision, bias, matrix effects, extraction recovery, dilution integrity, and processed sample stability.

The LLOQ was determined by analyzing fortified urine samples at decreasing concentrations (1.0, 0.5, and 0.1 ng/mL). Triplicate samples from three drug-free individuals were extracted and analyzed, totaling nine evaluations. The LLOQ was defined as the lowest concentration level that presented a coefficient of variation (CV%) below 20%.

Interference studies were conducted to assess potential false signals from different urine matrices and substances that may be present in the sample. First, endogenous interference was evaluated by analyzing 10 negative urine samples from different individuals. Second, exogenous interference was assessed by adding compounds commonly found in urine samples, including cocaine and its metabolites, amphetamine-type stimulants, cannabinoids, benzodiazepines, opioids, antidepressants, antipsychotics, and antiepileptics. Lastly, potential interference from stable isotope-labeled IS was investigated by analyzing a negative sample containing the IS solution and a fortified sample without IS addition.

To assess the linearity, calibration curves were constructed with six calibrators, ranging from the LLOQ to 25 ng/mL. The calibrators were prepared by spiking drug-free urine samples with the working solution. All curves were required to present coefficients of determination (R^2) greater than 0.99 to be considered linear. Furthermore, Fisher's F -test was used to assess the presence of heteroscedasticity. If detected, a weighted least squares model was applied using weight factors as $1/x$ and $1/x^2$. The optimal weighting scheme was selected based on the model yielding the lowest sum of residuals. After analysis of the upper limit of quantification (25 ng/mL), carryover was evaluated by injecting three blank samples. The method was considered free of carryover if the analyte signal in the blank samples was lower than the signal at the LLOQ.

To assess the precision and bias of the method, fortified urine samples were evaluated at three quality control (QC) concentrations: low (0.3 or 1.5 ng/mL), medium (12 ng/mL), and high (22 ng/mL). Each QC level was analyzed in triplicate within a single analytical run. Five runs were performed for each QC level, totaling 15 analyses per level. Precision was assessed by calculating within-run and between-run coefficients of variation (CV%) using ANOVA. According to the ANSI/ASB guideline, acceptable CV% values should be equal to or less than 20%. The same experiments were used to evaluate method bias, which was calculated as the difference between the measured and theoretical concentrations, with an acceptable range of $\pm 20\%$. Additionally, dilution integrity was evaluated using a 1:20 (v/v) dilution factor to verify precision and bias when sample dilution is required due to analyte concentrations exceeding 25 ng/mL. For this purpose, fortified samples at 300 ng/mL were diluted with ultrapure water and analyzed. Acceptance criteria for this test were $CV\% \leq 20\%$ and bias within $\pm 20\%$.

Matrix effect (ME) and extraction recovery were evaluated according to the procedure described by Matuszewski et al. [24]. For this purpose, three sets of six samples from different individuals were analyzed: Set A, neat solution; Set B, urine samples spiked before extraction; and Set C, urine samples spiked after extraction. The ME% was calculated by dividing Set C by that of Set A and multiplying by 100. The CV% of ME% across the six individual samples was required to be below 20%. Extraction recovery was calculated by dividing Set B by Set C and multiplying by 100. Both ME and extraction recovery were evaluated at low and high QC concentrations.

Processed sample stability was evaluated by analyzing six samples at time zero and again after 24 h of storage in the LC-MS/

MS autosampler maintained at 15°C. This parameter was assessed at all QC levels, and results were expressed as the percentage of the concentration at 24 h relative to the concentration at time zero.

2.7 | Application to Urine Samples From Poisoning Cases

As proof of the method's applicability, 24 urine samples from poisoning cases attended by the Toxicological Information Center of Rio Grande do Sul (CIT-RS), southern Brazil, were analyzed using the validated method. This study was approved by the Ethics Committee for Human Research at the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSA), Brazil, and by the Ethics Committee for Human Research of the School of Public Health, State Health Department of Rio Grande do Sul, Brazil (CAAE 31992920.3.0000.5345 and CAAE 31992920.3.3001.5312).

3 | Results

3.1 | Extraction Optimization

In the fractional factorial design (2^{5-1}), three variables (sample volume, solvent volume, and NaOH concentration) had a significant effect ($p < 0.05$) on the analytical response. Extraction time and the addition of NaCl were not significant, with p values of 0.6355 and 0.7171, respectively. These results can be visualized in the Pareto chart of effects (see Figure 2). All variables that crossed the red significance threshold line ($p = 0.05$) were considered statistically significant.

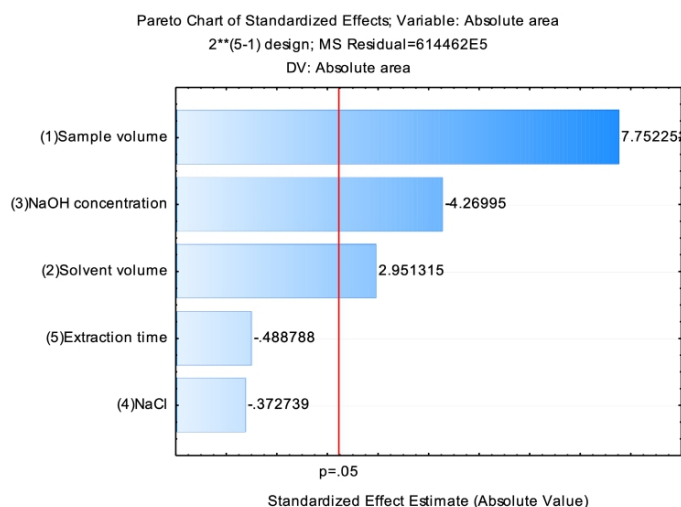


FIGURE 2 | Pareto chart of effects from the variables evaluated in the fractional factorial design (2^{5-1}). All variables that crossed the red line ($p = 0.05$) were considered statistically significant, that is, these variables are able to influence the analytical response.

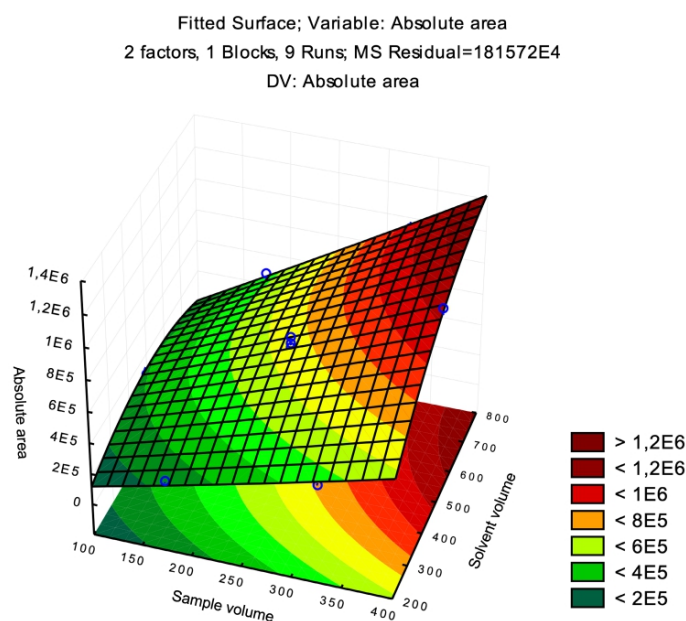


FIGURE 3 | Surface response graph from Doehlert design for the evaluation of sample and extractor solvent volumes.

The subsequent optimization focused exclusively on sample volume and solvent volume, as low NaOH concentrations had already been evaluated in the fractional factorial design. The standardized effect value for NaOH concentration indicates a trend toward better responses at the lowest tested level, corresponding to 0.1 mol/L NaOH. The Doehlert design demonstrated a more sensitive analytical response when using the highest volumes of both sample and extraction solvent. This result was expected, because the larger the sample volume, the greater the amount of analyte available to be extracted. The surface response plot is shown in Figure 3, where the red region represents the highest response (geometric mean of absolute areas). The R^2 value of the model was 0.9909. Finally, the simplex-centroid optimization indicates neat ethyl acetate as the most suitable extractor solvent, as shown in Figure 4. The obtained R^2 for the design was 0.7628.

3.2 | Bioanalytical Validation

The complete validation data is presented in Table 2. The LLOQ ranged from 0.1 to 1.0 ng/mL, with CV% values below 20% between the nine replicates. All analytes showed acceptable linearity, with R^2 values greater than 0.9918. Except for 2-oxo-3-OH-LSD, the calibration curves exhibited heteroscedasticity, requiring the application of weight factors. The weighting schemes applied were $1/x$ and $1/x^2$, both commonly used in analytical toxicology. No carryover effect was observed following the injection of the upper limit of quantification. During the interference assessment, no peaks were observed at the retention

times of the analytes or IS, either in the analyses of urine samples fortified with exogenous compounds or in the analysis of drug-free urine samples from different sources, confirming the selectivity of the method. Additionally, no interference from the stable isotope-labeled ISs was identified.

The obtained within-run and between-run precision values were below 20% for all QC concentrations, in accordance with the ANSI/ASB guideline [23]. Within-run precision CVs ranged from 4.0% to 15.8%, corresponding to the low QCs of ADB-BUTINACA and 25B-NBOMe, respectively. Between-run precision CVs ranged from 2.5% (high QCs of 25E-NBOH and mephedrone) to 9.5% (low QC of N-butylpentylone). The observed biases ranged from -12.8% to 19.8%, associated with the low QC of 2C-E and the medium QC of 25I-NBOMe, respectively. Dilution integrity results showed within-run and between-run CV% and bias values within the $\pm 20\%$ acceptance range.

The ME varied considerably among analytes, ranging from 53.7% to 277.7%. Nine substances exhibited significant ME (defined as $< 75\%$ or $> 125\%$). In the ME assessment of 4-CDC and ethylone, ion suppression was observed, whereas ion enhancement was detected for 2C-E, 25B-NBOMe, 25C-NBOMe, 25E-NBOH, 25I-NBOH, 25I-NBOMe, and LSD. Despite ME values falling outside the 75%–125% range, all CV% values between replicates were below 20%, indicating the consistency and reproducibility of these effects. Extraction recovery rates were generally high, with only two analytes exhibiting values below 70%. The analytes with low or moderate recovery—2-oxo-3-OH-LSD

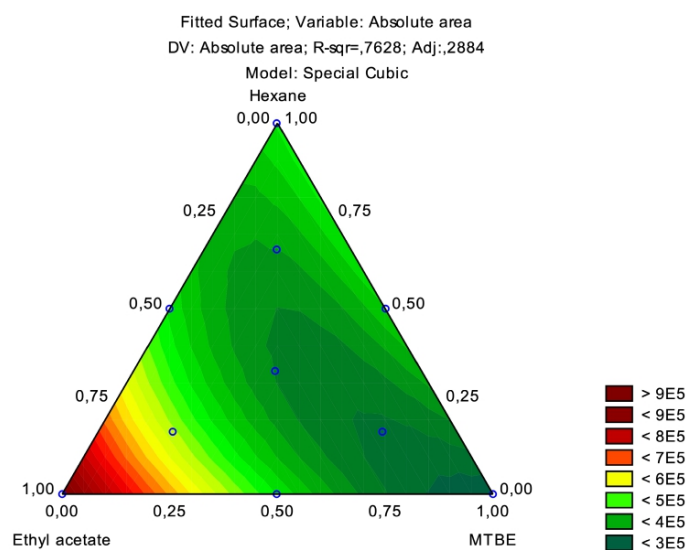


FIGURE 4 | Surface response from simplex-centroid design for the optimization of the type of extractor solvent.

(38.9%) and 2C-E (60.2%)—are more polar compared to the other compounds.

Additionally, processed sample stability over 24 h ranged from 73.2% to 126.4%. Only three analytes exhibited notable instability (outside the $\pm 25\%$ range): the medium QC of 2-oxo-3-OH-LSD and the low QC levels of N-butylpentylone and pentylone. Complete processed sample stability data are provided in Table S4.

3.3 | Analysis of Samples From Poisoning Cases

Of the 24 urine samples analyzed from suspected poisoning cases, three tested positive for at least one target compound. Case 1 was positive for LSD (73.8 ng/mL) and its metabolite, 2-oxo-3-OH-LSD (> 300 ng/mL). Case 2 was positive for 2-oxo-3-OH-LSD alone (3.8 ng/mL). Finally, Case 3 was positive for 25B-NBOH, with a concentration of 8.4 ng/mL. MRM chromatograms of the three positive cases are shown in Figure 5.

4 | Discussion

This study presented a sensitive and targeted analytical method for the detection of 20 drugs in urine, including NPS from different chemical classes. The NPS panel was defined based on the most relevant substances circulating in Brazilian territory in recent years. Historically, synthetic cathinones and synthetic phenethylamines have been the most frequently encountered NPS in Brazil, according to national drug seizure data [25]. Since the early 2020s, SCRAAs have gained increasing

prominence in the Brazilian context [26, 27]. Although LSD and its main urinary metabolite, 2-oxo-3-OH-LSD, are not classified as NPS, they were included in the method due to the common substitution of LSD with NBOMe and NBOH derivatives, particularly in blotter papers or powders [28, 29]. In the state of Rio de Janeiro, analysis of 3899 blotter papers seized between 2006 and 2019 identified 25I-NBOH as the most prevalent substance (41.3%), followed by 25I-NBOMe (16.6%) and LSD (14.2%) [30]. In another Brazilian state, Santa Catarina, blotter papers seized between 2011 and 2017 were analyzed by GC-MS, and the presence of LSD in positive samples per year ranged from 0.12% to 100% [31].

A major challenge in the simultaneous analysis of diverse compounds such as NPS is their wide chemical variability. This complexity makes it difficult to establish a single sample preparation procedure capable of efficiently extracting structurally distinct analytes while maintaining high sensitivity and precision. The use of multivariate experimental design enabled the simultaneous assessment of multiple variables and the selection of optimal extraction conditions for all target compounds included in the study. Additionally, the structural similarity between certain substances, particularly positional isomers, complicates their detection and quantification. In this study, pentylone and eutylone shared the same MRM transitions. Therefore, chromatographic separation was essential for distinguishing them. The gradient employed successfully achieved baseline separation between the two synthetic cathinones, with retention times of 2.30 min for eutylone and 2.49 min for pentylone. Despite this level of resolution, the chromatographic method remains relatively fast, being shorter than other LC-MS methods for NPS analysis reported in the literature [10, 13, 32, 33].

TABLE 2 | Results for LLOQ, linearity, precision, bias, matrix effect, and extraction recovery parameters.

Analyte	LLOQ (ng/ mL)	Linearity		Low QC			Medium QC			High QC			Matrix effect (%)	Extraction recovery (%)		
		R ²	Weighting factor	Within-	Between-	Bias	Within-	Between-	Bias	Within-	Between-					
				run precision (CV%)	run precision (CV%)		run precision (CV%)	run precision (CV%)		run precision (CV%)	run precision (CV%)					
Hallucinogens																
2C-E	0.5	0.9999	1/x	11.0	5.7	-12.8	7.0	4.3	-8.5	5.6	3.9	-11.1	147.7	60.2		
25B-NBOH	0.5	0.9999	1/x ²	7.9	4.6	2.1	5.8	4.5	1.9	6.0	3.5	-2.4	117.8	86.0		
25B-NBOMe	0.1	0.9939	1/x ²	15.8	8.7	11.4	5.7	4.1	10.4	7.7	4.6	12.9	153.0	80.8		
25C-NBOMe	0.1	0.9935	1/x ²	7.2	5.8	7.2	13.1	7.3	18.5	5.4	3.0	3.1	172.6	83.0		
25E-NBOH	0.1	0.9996	1/x ²	10.6	6.3	-6.7	5.6	3.9	7.2	5.1	2.5	2.1	178.5	89.6		
25I-NBOH	0.5	0.9981	1/x	12.0	6.8	-7.9	5.0	3.5	12.5	9.4	4.6	18.3	157.2	94.0		
25I-NBOMe	0.1	0.9999	1/x ²	9.7	5.1	4.7	9.7	5.0	19.8	8.4	4.1	16.7	164.9	83.8		
2-Oxo-3-OH-LSD	0.5	0.9995	1	7.6	4.2	-1.2	7.4	4.7	-6.7	9.3	5.3	-6.0	104.5	38.9		
LSD	0.5	0.9918	1/x	11.6	7.0	10.1	10.9	5.6	13.5	6.1	4.2	0.5	277.7	75.9		
Synthetic cannabinoids																
ADB-BUTINACA	0.5	0.9977	1/x ²	4.0	2.6	0.7	5.9	4.2	4.8	9.7	4.8	3.5	114.7	80.5		
ADB-FUBINACA	0.5	0.9962	1/x	10.6	6.1	7.6	4.4	2.6	14.5	8.2	4.5	9.2	106.8	81.5		
Synthetic cathinones																
4-CDC	0.5	0.9930	1/x	12.5	6.7	0.1	9.2	7.0	6.7	8.0	5.4	2.4	53.7	94.7		
Dipentylone	0.5	0.9999	1/x ²	15.3	7.7	-9.1	8.4	5.4	0.9	6.9	3.7	-2.2	90.7	91.6		
Ethylone	0.5	0.9995	1/x ²	6.1	4.1	3.8	7.9	4.0	6.6	4.2	3.0	2.2	72.8	75.6		
Eutylone	0.5	0.9982	1/x ²	5.5	4.1	-3.0	7.1	4.3	-0.7	4.8	2.8	-9.8	96.3	92.7		
Mephedrone	1	0.9998	1/x ²	14.1	7.9	-10.4	9.4	4.9	6.2	4.2	2.5	3.9	116.5	76.5		
Methylone	0.5	0.9998	1/x	7.2	4.4	-8.3	4.7	3.7	0.7	5.3	2.8	1.7	89.4	79.9		
N-Butylpentylone	1	0.9962	1/x ²	13.9	9.5	3.3	8.5	4.2	13.8	7.0	4.0	12.8	124.9	91.8		
N-Ethylheptedrone	1	0.9989	1/x ²	11.0	5.8	-0.7	8.5	4.5	3.9	4.9	3.8	6.8	87.9	89.5		
Pentylone	0.5	0.9998	1/x ²	8.1	5.1	-2.1	5.6	3.1	4.9	4.4	2.6	5.6	82.7	88.2		

Abbreviations: CV, coefficient of variation; LLOQ, lower limit of quantification; QC, quality control; R², coefficient of determination.

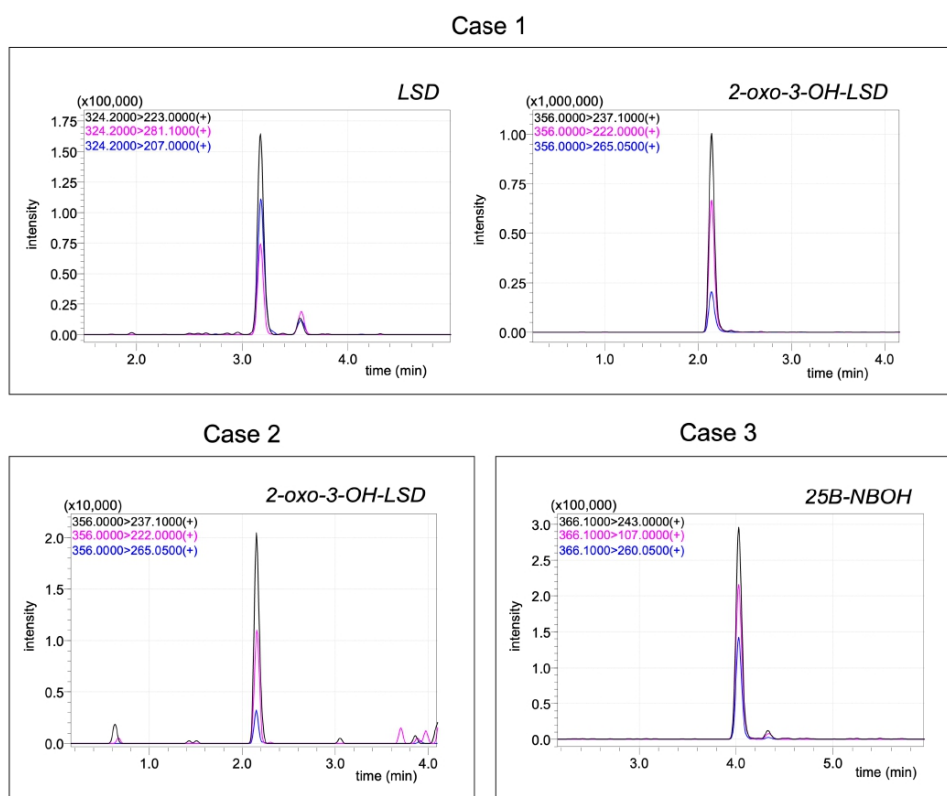


FIGURE 5 | MRM chromatogram of three urine samples with a positive result for at least one analyte.

In urine analysis, hydrolysis is a fundamental step for the cleavage of the analyte with polar groups, such as glucuronic acid. Therefore, in this study, the samples were incubated with the β -glucuronidase enzyme to obtain the analytes in their unconjugated form. Several studies indicate that some of the NPS included in this work can be excreted conjugated with glucuronic acid [34–38]. Pelletier et al. analyzed a urine sample from a poisoning case involving 25E-NBOH, and the glucuronidated metabolite was the most intense, with a relative response to the unchanged 25E-NBOH higher than 2000% [39]. Xiang et al. recommended the use of β -glucuronidase for urine analysis of NBOH and NBOME compounds to avoid false negative results [38]. Nonetheless, the absence of NPS metabolites in the current method should be acknowledged as an important limitation of this study. This is an important point to consider, as the concentration of metabolites in urine tends to be higher than that of the unchanged molecule, as can be seen in Case 1. The inclusion of metabolites helps avoid false negatives, as well as increasing the drug's detection window.

The developed method demonstrated high sensitivity, with LLOQs equal to or lower than 1 ng/mL. Some NPS, mainly SCRA and phenethylamines, require enhanced sensitivity, as

they are typically present in low concentrations in biological samples [16]. The obtained LLOQs are comparable to or inferior to the reported limits of quantification from other published methods [10, 13, 14, 32, 40–44].

The ME results indicated an intense ionization enhancement for some analytes, mainly phenethylamines. Previous studies have not reported altered ME values for these substances. Ferrari Júnior and Caldas described ME values for between 75.4% and 109.3% for LSD, NBOME, and NBOH compounds [10]. Fan et al. reported normal ME values (86% to 119%) for 4-CDC, ethylone, 25B-NBOME, 2C-E, and 25I-NBOME [13, 41]. On the other hand, Fabris et al. verified an unusual ionization enhancement for synthetic cathinones when using a dispersive liquid–liquid microextraction protocol [45]. In this study, the CV% of ME replicates was below 20%, that is, the ME, although significant, is constant. This means that the inter-individual variability of urine samples affects the ME homogeneously. In this way, it can be ensured that the blank urine employed in the validation studies modulates the analytical response similarly to the urine samples to be tested and quantified. This allows the developed method to be used in the

reliable quantification of the listed analytes. Better chromatographic separation to avoid coelution with endogenous interferents or more extensive sample preparation techniques (e.g., solid-phase extraction) could result in more suitable ME values. Additionally, the use of stable isotope-labeled IS of each analyte is recommended to minimize ME on quantification methods [24, 46, 47]. However, all these procedures demand a higher analysis time or associated cost.

In the processed sample stability assessment, instability greater than 125% was verified for three analytes (LSD, N-butylpentylone, and pentylone) in some QC levels. In this sense, the analysis of extracts after 24h may generate increased concentrations of these substances. Therefore, immediate analysis after the extraction process is recommended, at least when these analytes are suspected to be present.

Regarding the cases with positive results, Case 1 involved a male individual of unknown age who was found unconscious at an electronic music festival. Upon admission, he was in a coma, with malignant hyperthermia, hyporeflexia, mydriasis, tachycardia, and respiratory depression. A urine sample was collected and sent to the CIT-RS laboratory. Hours later, the patient died due to cardiorespiratory arrest. When screened for classic drugs and medications [17], the urine sample tested positive for MDA (> 10 µg/mL), MDEA (561 ng/mL), MDMA (> 10 µg/mL), ketamine (534 ng/mL), lidocaine (1.7 µg/mL), and diclofenac (81 ng/mL). Typically, LSD and its metabolite 2-oxo-3-OH-LSD are detected at low concentrations (below 25 ng/mL) in urine samples. However, elevated concentrations may occur following high-dose LSD use [48–50]. Moreover, markedly high urinary concentrations of LSD and 2-oxo-3-OH-LSD can be observed in cases of severe poisoning or fatal outcomes. Favretto et al. reported postmortem urine concentrations of LSD and 2-oxo-3-OH-LSD of 91.0 and 430.2 ng/mL, respectively [51], which are comparable to those found in Case 1. In this case, the concomitant presence of high urinary levels of MDA and MDMA may have exerted a cumulative effect contributing to death alongside LSD.

Case 2 involved a 35-year-old woman, reportedly a drug user in withdrawal, though a psychiatric report raised suspicions of ongoing substance use. In this case, only the main LSD metabolite, 2-oxo-3-OH-LSD, was detected. Additional urine screening revealed the presence of MDA, MDMA, 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol carboxylic acid, 7-aminoclonazepam, citalopram, oxazepam, and temazepam. A positive result exclusively for 2-oxo-3-OH-LSD without LSD detection can be explained by the longer detection window of this metabolite compared to the parent compound [48].

Case 3 involved a 17-year-old male adolescent admitted to the hospital presenting with intense agitation. The patient reported using “N-bomb,” a common street name for substances containing NBOMe derivatives. LC-MS/MS analysis for drugs and medications [17] also detected lidocaine, haloperidol, and promethazine, which were administered during hospital care. No other drugs of abuse were identified. Although the patient referred to NBOMe use, NBOH compounds currently represent the majority of circulating phenethylamines in Brazil [25, 52]. Ivory et al. described a case series involving 25B-NBOH exposure, including a patient

with severe agitation, as observed in Case 3. That report also mentioned acute kidney injury and rhabdomyolysis [28]. In Case 3, no renal damage was identified; however, elevated levels of total and indirect bilirubin and creatine phosphokinase (CK) were observed, suggesting hemolysis and muscle injury, likely related to the intense agitation presented by the patient.

5 | Conclusion

In this work, a method for the analysis of 20 drugs of abuse, including hallucinogens, synthetic cathinones, and synthetic cannabinoids, was successfully developed and validated. The established protocol is simple, efficient, and suitable for detecting NPS at low concentrations. Validation followed the ANSI/ASB Standard 036 guideline, with all assessed mandatory parameters meeting the established acceptance criteria. As proof of applicability, 24 urine samples from suspected poisoning cases were analyzed, with three yielding positive results for at least one of the target substances. The proposed method demonstrates strong potential as a diagnostic tool for NPS-related intoxications and can be readily implemented in clinical and forensic toxicology laboratories.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the financial support from Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel—Brazil (CAPES—Finance Code 001). The Article Processing Charge for the publication of this research was funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) (ROR identifier: 00x0ma614).

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

References

1. A. Shafi, A. J. Berry, H. Sumnall, D. M. Wood, and D. K. Tracy, “New Psychoactive Substances: A Review and Updates,” *Therapeutic Advances in Psychopharmacology* 10 (2020): 2045125320967197.
2. A. Y. Simão, M. Antunes, E. Cabral, et al., “An Update on the Implications of New Psychoactive Substances in Public Health,” *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19 (2022): 4869.
3. UNODC, “NPS Data Visualisations,” (2025), <https://www.unodc.org/LSS/Page/NPS/DataVisualisations>.
4. I. C. Santos, D. Maia, R. J. Dinis-Oliveira, and D. J. Barbosa, “New Psychoactive Substances: Health and Legal Challenges,” *Psychoactives* 3 (2024): 285–302.
5. J. J. Miller, M. Yazdanpanah, D. A. Colantonio, D. R. Beriault, and S. R. Delaney, “New Psychoactive Substances: A Canadian Perspective on Emerging Trends and Challenges for the Clinical Laboratory,” *Clinical Biochemistry* 133–134 (2024): 110810.
6. A. Peacock, R. Bruno, N. Gisev, et al., “New Psychoactive Substances: Challenges for Drug Surveillance, Control, and Public Health Responses,” *Lancet* 394 (2019): 1668–1684.

7. M. Kraemer, A. Boehmer, B. Madea, and A. Maas, "Death Cases Involving Certain New Psychoactive Substances: A Review of the Literature," *Forensic Science International* 298 (2019): 186–267.
8. J. Ayala and S. Kerrigan, "Comprehensive Toxicological Screening of Common Drugs of Abuse, New Psychoactive Substances and Cannabinoids in Blood Using Supported Liquid Extraction and Liquid Chromatography–Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry," *Journal of Analytical Toxicology* 47 (2023): 656–667.
9. L. Birk, B. P. Dos Santos, S. Eller, and T. F. De Oliveira, "A Novel Method for the Determination of Synthetic Cathinones and Related Substances in Postmortem Blood Samples Using Cork-Based Dispersive Solid-Phase Microextraction Prior to LC-MS/MS Analysis," *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 417, no. 17 (2025): 3845–3855.
10. E. Ferrari Júnior and E. D. Caldas, "Determination of New Psychoactive Substances and Other Drugs in Postmortem Blood and Urine by UHPLC–MS/MS: Method Validation and Analysis of Forensic Samples," *Forensic Toxicology* 40 (2022): 88–101.
11. J. Hwang, M. Han, S. An, J. H. Moon, G. Shim, and H. Chung, "Screening of New Psychoactive Substances in Human Plasma by Magnetic Solid Phase Extraction and LC-QTOF-MS," *Forensic Science International* 332 (2022): 111176.
12. A. L. Fabris, S. Pedersen-Bjergaard, E. L. Øiestad, et al., "Solvent-Free Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction for Drugs of Abuse in Plasma Samples Using LC-MS/MS," *Analytica Chimica Acta* 1301 (2024): 342387.
13. S.-Y. Fan, C.-Z. Zang, P.-H. Shih, et al., "Simultaneous LC-MS/MS Screening for Multiple Phenethylamine-Type Conventional Drugs and New Psychoactive Substances in Urine," *Forensic Science International* 325 (2021): 110884.
14. J. Czarny, J. Musiał, J. Powierska-Czarny, et al., "Determination of 465 Psychoactive Substances, Drugs and Their Metabolites in Urine by LC-MS/MS," *Analytical Methods* 16 (2024): 5426–5432.
15. R. Barone, G. Pelletti, A. Giorgetti, et al., "Validation and Application of a Method for the Quantification of 137 Drugs of Abuse and New Psychoactive Substances in Hair," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 243 (2024): 116054.
16. A. J. Krotulski, D. C. Mata, C. R. Smith, et al., "Advances in Analytical Methodologies for Detecting Novel Psychoactive Substances: A Review," *Journal of Analytical Toxicology* 49 (2025): 152–169.
17. B. P. Dos Santos, L. Birk, P. Schwarz, et al., "A Validated Dilute-and-Shoot LC–MS–MS Urine Screening for the Analysis of 95 Illicit Drugs and Medicines: Insights From Clinical and Forensic Brazilian Cases," *Journal of Analytical Toxicology* 48 (2024): 314–331.
18. K. Deventer, O. J. Pozo, A. G. Verstraete, and P. Van Eenoo, "Dilute-and-Shoot-Liquid Chromatography–Mass Spectrometry for Urine Analysis in Doping Control and Analytical Toxicology," *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 55 (2014): 1–13.
19. G. Yang, S. Ge, R. Singh, et al., "Glucuronidation: Driving Factors and Their Impact on Glucuronide Disposition," *Drug Metabolism Reviews* 49 (2017): 105–138.
20. X. Diao and M. A. Huestis, "New Synthetic Cannabinoids Metabolism and Strategies to Best Identify Optimal Marker Metabolites," *Frontiers in Chemistry* 7 (2019): 109.
21. M. Szeremeta, K. Pietrowska, A. Niemcunowicz-Janica, A. Kretowski, and M. Ciborowski, "Applications of Metabolomics in Forensic Toxicology and Forensic Medicine," *International Journal of Molecular Sciences* 22 (2021): 3010.
22. V. L. C. P. Bigão, B. R. B. Da Costa, J. J. M. Da Silva, B. S. De Martins, and D. R. Tapia-Blácido, "Use of Statistical Design of Experiments (DoE) in Forensic Analysis: A Tailored Review," *Forensic Chemistry* 37 (2024): 100554.
23. AAfS, "Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology, ANSI/ASB Standard 036," (2019).
24. B. K. Matuszewski, M. L. Constanzer, and C. M. Chavez-Eng, "Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC–MS/MS," *Analytical Chemistry* 75 (2003): 3019–3030.
25. B. P. Dos Santos, L. Birk, P. De Souza Schwarz, S. Eller, T. F. De Oliveira, and M. D. Arbo, "A Comprehensive Analysis of Legislative Strategies for New Psychoactive Substances: The Brazilian Panorama," *Psychoactives* 2 (2023): 242–255.
26. T. B. Rodrigues, M. P. Souza, L. De Melo Barbosa, et al., "Synthetic Cannabinoid Receptor Agonists Profile in Infused Papers Seized in Brazilian Prisons," *Forensic Toxicology* 40 (2022): 119–124.
27. H. S. Bombana, G. De Paula Meirelles, R. A. De Oliveira, V. Leyton, and M. Yonamine, "Synthetic Cannabinoid Receptor Agonists in Oral Fluid: Development of a Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Method With Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Detection," *Journal of Analytical Toxicology* (2025): bkaf027, <https://doi.org/10.1093/jat/bkaf027>.
28. S. T. Ivory, J.-A. Rotella, J. Schumann, and S. L. Greene, "A Cluster of 25B-NBOH Poisonings Following Exposure to Powder Sold as Lysergic Acid Diethylamide (LSD)," *Clinical Toxicology* 60 (2022): 966–969.
29. L. Birk, S. E. F. De Oliveira, G. Mafra, et al., "A Low-Voltage Paper Spray Ionization QTOF-MS Method for the Qualitative Analysis of NPS in Street Drug Blotter Samples," *Forensic Toxicology* 38 (2020): 227–231.
30. V. L. Meira, A. S. De Oliveira, L. S. A. Cohen, et al., "Chemical and Statistical Analyses of Blotter Paper Matrix Drugs Seized in the State of Rio de Janeiro," *Forensic Science International* 318 (2021): 110588.
31. B. De Souza Boff, J. Silveira Filho, K. Nonemacher, S. Driessen Schroeder, M. Dutra Arbo, and K. Z. Rezin, "New Psychoactive Substances (NPS) Prevalence Over LSD in Blotter Seized in State of Santa Catarina, Brazil: A Six-Year Retrospective Study," *Forensic Science International* 306 (2020): 110002.
32. L. Glicksberg, K. Bryand, and S. Kerrigan, "Identification and Quantification of Synthetic Cathinones in Blood and Urine Using Liquid Chromatography–Quadrupole/Time of Flight (LC-Q/TOF) Mass Spectrometry," *Journal of Chromatography B* 1035 (2016): 91–103.
33. L. Ambach, A. Hernández Redondo, S. König, V. Angerer, S. Schürch, and W. Weinmann, "Detection and Quantification of 56 New Psychoactive Substances in Whole Blood and Urine by LC–MS/MS," *Bioanalysis* 7 (2015): 1119–1136.
34. P. Kavanagh, A. Pechnikov, I. Nikolaev, G. Dowling, M. Kolosova, and A. Grigoryev, "Detection of ADB-BUTINACA Metabolites in Human Urine, Blood, Kidney and Liver," *Journal of Analytical Toxicology* 46 (2022): 641–650.
35. A. B. Godoi, N. D. J. Antunes, L. C. Rodrigues, A. F. Martins, and J. L. Costa, "In Vitro Metabolism and Metabolite Identification of Eutylone Using Rat Liver Microsomes," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 260 (2025): 116827.
36. K. N. Ellefsen, M. Concheiro, and M. A. Huestis, "Synthetic Cathinone Pharmacokinetics, Analytical Methods, and Toxicological Findings From Human Performance and Postmortem Cases," *Drug Metabolism Reviews* 48 (2016): 237–265.
37. A. T. Caspar, A. G. Helfer, J. A. Michely, et al., "Studies on the Metabolism and Toxicological Detection of the New Psychoactive Designer Drug 2-(4-Iodo-2,5-dimethoxyphenyl)-N-[(2-methoxyphenyl)methyl] ethanamine (25I-NBOMe) in Human and Rat Urine Using GC-MS, LC-MSn, and LC-HR-MS/MS," *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407 (2015): 6697–6719.

38. J. Xiang, D. Wen, W. Zhai, et al., "Metabolic Characterization of 25X-NBOH and 25X-NBOMe Phenethylamines Based on UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS in Human Liver Microsomes," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 242 (2024): 116020.
39. R. Pelletier, T. Gicquel, J. Carvelli, et al., "Severe 25E-NBOH Intoxication Associated With MDPHP Intake: A Case Report, Metabolism Study, and Literature Review," *International Journal of Legal Medicine* 138 (2024): 815–822.
40. M. Nieddu, E. Baralla, F. Sodano, and G. Boatto, "Analysis of 2,5-Dimethoxy-Amphetamines and 2,5-Dimethoxy-Phenethylamines Aiming Their Determination in Biological Matrices: A Review," *Forensic Toxicology* 41 (2023): 1–24.
41. S.-Y. Fan, C.-Z. Zang, P.-H. Shih, et al., "A LC-MS/MS Method for Determination of 73 Synthetic Cathinones and Related Metabolites in Urine," *Forensic Science International* 315 (2020): 110429.
42. C. Bouzoukas, P. Nikolaou, S. Athanaselis, A. Dona, C. Spiliopoulou, and I. Papoutsis, "Development, Validation and Applications of a GC/MS Method for the Simultaneous Determination of 9 Amphetamines and 12 NPS Analogues in Blood and Urine," *Forensic Science International* 370 (2025): 112469.
43. A. Pérez-Alcaraz, F. Borrull, M. Calull, and C. Aguilar, "Cathinones in Urine Samples: A Review of Recent Advances for Their Determination by Chromatographic and Related Techniques," *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 143 (2021): 116347.
44. L. A. Nisbet, F. M. Wylie, B. K. Logan, and K. S. Scott, "Gas Chromatography-Mass Spectrometry Method for the Quantitative Identification of 23 New Psychoactive Substances in Blood and Urine," *Journal of Analytical Toxicology* 43 (2019): 346–352.
45. A. L. Fabris, R. Lanaro, J. L. Costa, and M. Yonamine, "Development of a Dispersive Liquid–Liquid Microextraction for Synthetic Cathinones in Biological Fluids Based on Principles of Green Analytical Toxicology," *Journal of Analytical Toxicology* 47 (2023): 353–365.
46. P. Panuwet, R. E. Hunter, Jr., P. E. D'Souza, et al., "Biological Matrix Effects in Quantitative Tandem Mass Spectrometry-Based Analytical Methods: Advancing Biomonitoring," *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 46 (2016): 93–105.
47. A. V. Eeckhaut, K. Lanckmans, S. Sarre, I. Smolders, and Y. Michotte, "Validation of Bioanalytical LC–MS/MS Assays: Evaluation of Matrix Effects," *Journal of Chromatography B* 877 (2009): 2198–2207.
48. M. Jang, J. Kim, I. Han, and W. Yang, "Simultaneous Determination of LSD and 2-Oxo-3-Hydroxy LSD in Hair and Urine by LC–MS/MS and Its Application to Forensic Cases," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 115 (2015): 138–143.
49. P. C. Dolder, M. E. Liechti, and K. M. Rentsch, "Development and Validation of a Rapid Turbflow LC–MS/MS Method for the Quantification of LSD and 2-Oxo-3-Hydroxy LSD in Serum and Urine Samples of Emergency Toxicological Cases," *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407 (2015): 1577–1584.
50. R. Martin, J. Schürenkamp, A. Gasse, H. Pfeiffer, and H. Köhler, "Determination of Psilocin, Bufotenine, LSD and Its Metabolites in Serum, Plasma and Urine by SPE-LC–MS/MS," *International Journal of Legal Medicine* 127 (2013): 593–601.
51. D. Favretto, G. Frison, S. Maietti, and S. D. Ferrara, "LC-ESI-MS/MS on an Ion Trap for the Determination of LSD, iso-LSD, nor-LSD and 2-Oxo-3-Hydroxy-LSD in Blood, Urine and Vitreous Humor," *International Journal of Legal Medicine* 121 (2007): 259–265.
52. Y. Machado, J. Coelho Neto, R. A. Lordeiro, R. B. Alves, and E. Piccin, "Identification of New NBOH Drugs in Seized Blotter Papers: 25B-NBOH, 25C-NBOH, and 25E-NBOH," *Forensic Toxicology* 38 (2020): 203–215.

Supporting Information

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section. **Table S1:** Complete matrix from fractional factorial design (2^{5-1}) for screening of significant variables. **Table S2:** Complete matrix from Doehlert design for solvent and sample volume optimization. **Table S3:** Complete matrix from simplex-centroid design for extractor solvent optimization. **Table S4:** Processed sample stability results for each QC level.

4.3. Artigo III

O artigo “**Toxicology-confirmed drug exposure in Brazilian children: a case series from a Poison Center**”, publicado no periódico *Journal of Ethnicity in Substance Abuse* (ISSN 1533-2659, fator de impacto 1.2, 2024), é exposto a seguir. O estudo investigou o perfil toxicológico e epidemiológico da exposição infantil a drogas ilícitas no Rio Grande do Sul por meio da análise de amostras de urina de casos suspeitos atendidos pelo CIT-RS. Os resultados demonstraram elevada frequência de detecção de drogas, principalmente cocaína e produtos relacionados e maconha. Os achados evidenciam a análise urinária como uma ferramenta relevante para diagnóstico toxicológico e toxicovigilância em populações vulneráveis. O artigo pode ser acessado na íntegra em: <https://doi.org/10.1080/15332640.2026.2665728>. Em virtude das restrições de direitos autorais impostas pela revista, o artigo completo não pôde ser incorporado ao corpo da tese, visto que seu acesso é limitado aos assinantes do periódico.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho, os resultados obtidos demonstram que a análise toxicológica em urina constitui uma ferramenta robusta e estratégica para a toxicologia clínica e forense, com aplicações que transcendem o diagnóstico laboratorial e alcançam o campo da toxicovigilância. A urina mostrou-se uma matriz relevante no cenário toxicológico devido à sua ampla disponibilidade, coleta fácil e capacidade de concentrar produtos de biotransformação, favorecendo a detecção de substâncias em diferentes cenários de exposição. Nesse contexto, a utilização da LC-MS/MS usando diferentes preparos de amostra permitiu atender às crescentes demandas analíticas no contexto clínico-forense.

O desenvolvimento e a validação dos métodos analíticos propostos permitiram ampliar significativamente o escopo da triagem toxicológica urinária. Inicialmente, foi possível estabelecer um método multianalito capaz de detectar simultaneamente 95 medicamentos e drogas de abuso, usando um protocolo otimizado de *dilute-and-shoot*. O método apresentou sensibilidade adequada e foi aplicado com sucesso em 840 amostras de casos atendidos pelo CIT-RS, IGP-RS e SVO-AHVN. Um índice de positividade de 90,9% foi verificado e 78 dos 95 analitos foram detectados em ao menos uma amostra.

Posteriormente, a expansão do escopo para NSP, incluindo catinonas sintéticas, agonistas sintéticos de receptores canabinoides e alucinógenos, evidenciou a necessidade contínua de atualização dos painéis analíticos frente à rápida dinâmica do mercado de drogas ilícitas, em especial das NSP. O método desenvolvido com preparo por LLE foi validado e aplicado com sucesso em 24 amostras de casos clínicos atendidos pelo CIT-RS. Ao menos uma substância foi detectada em três amostras, incluindo a fenetilamina sintética 25B-NBOH. No escopo deste estudo, o caso descrito constitui o primeiro caso clínico confirmado envolvendo 25B-NBOH no estado do Rio Grande do Sul. Esses achados reforçam que métodos de escopo ampliado são essenciais para reduzir resultados não detectados em painéis convencionais e, conseqüentemente, diminuir a subnotificação da exposição a substâncias emergentes.

Adicionalmente, o terceiro estudo apresentou 286 casos pediátricos suspeitos de intoxicação, nos quais drogas ilícitas foram detectadas em 32,9%

das amostras. Cocaína e produtos relacionados (24,8%) e THC-COOH (9,4%) foram as substâncias mais prevalentes, evidenciando um cenário preocupante de exposição infantil a substâncias ilícitas. Esses dados ressaltam a importância da análise toxicológica não apenas para confirmação diagnóstica, mas também para a identificação de populações em situação de vulnerabilidade, o monitoramento de tendências de exposição e a produção de dados epidemiológicos confiáveis.

Por fim, os achados aqui apresentados reforçam que a análise toxicológica em urina, associada a métodos multianalito baseados em LC-MS/MS, representa uma ferramenta fundamental para o aprimoramento do apoio ao diagnóstico toxicológico, das investigações forenses e das ações de toxicovigilância. A incorporação de métodos sensíveis, seletivos e de amplo escopo na rotina analítica pode contribuir para respostas mais qualificadas em saúde, perícia e vigilância, especialmente diante da exposição simultânea a múltiplas substâncias e da emergência contínua de novas substâncias psicoativas.

6. REFERÊNCIAS

ABRACIT. **DATATOX – Painel de Dados**. Associação Brasileira de Centros de Informação e Assistência Toxicológica. Disponível em: <<https://painel.datatox.abracit.org.br/inicio>>, 2026. Acessado em 13 jul 2026.

AKHGARI, Maryam; SARDARI-IRAVANI, Fariba; GHADIPASHA, Masoud. Trends in poly drug use-associated deaths based on confirmed analytical toxicology results in Tehran, Iran, in 2011-2016. **Addiction & Health**, v. 13, n. 1, p. 18, 2021.

ALDUBAYYAN, Abdulaziz A. et al. Stability of synthetic cathinones in clinical and forensic toxicological analysis—where are we now?. **Drug testing and analysis**, v. 13, n. 1, p. 44-68, 2021.

ALEXANDRIDOU, Anastasia et al. GC-MS analysis of underivatized new psychoactive substances in whole blood and urine. **Journal of Chromatography B**, v. 1156, p. 122308, 2020.

ALLEN, Keith R. Screening for drugs of abuse: which matrix, oral fluid or urine?. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 48, n. 6, p. 531-541, 2011.

BADAWY, Mohamed El et al. A review of the modern principles and applications of solid-phase extraction techniques in chromatographic analysis. **Analytical Sciences**, v. 38, n. 12, p. 1457-1487, 2022.

BARR, Dana B. et al. Urinary creatinine concentrations in the US population: implications for urinary biologic monitoring measurements. **Environmental health perspectives**, v. 113, n. 2, p. 192, 2004.

BARROSO, Mário et al. Role of microextraction sampling procedures in forensic toxicology. **Bioanalysis**, v. 4, n. 14, p. 1805-1826, 2012.

BARTHWELL, Andrea G. Clinical and public health considerations in urine drug

testing to identify and treat substance use. **Substance use & misuse**, v. 51, n. 6, p. 700-710, 2016.

BASTOS, Francisco Inácio Pinkusfeld et al. **III Levantamento Nacional sobre o uso de drogas pela população brasileira**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ/ICT. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/iciict/34614>>. , 2017

BENOWITZ, Neal L. Antidepressants, general (Noncyclic). In: OLSON, KENT R (Org.). **Poisoning & Drug Overdose**. 7. ed. New York: McGraw-Hill Education, 2018a. p. 104–107.

BENOWITZ, Neal L. Antidepressants, tricyclic. In: OLSON, KENT R (Org.). **Poisoning & Drug Overdose**. 7. ed. New York: McGraw-Hill Education, 2018b. p. 107–110.

BEUHLER, Michael C. et al. 2024 Annual report of the National Poison Data System®(NPDS) from America's Poison Centers®: 42nd annual report. **Clinical Toxicology**, v. 63, n. 12, p. 1029-1280, 2025.

BIEDERMANN, Alex et al. Critical analysis of forensic cut-offs and legal thresholds: A coherent approach to inference and decision. **Forensic Science International**, v. 288, p. 72-80, 2018.

BIRK, Letícia et al. A simple method for the determination of stimulant substances in postmortem blood: development, validation, and application in nearly 1000 forensic cases. **Forensic Toxicology**, v. 43, n. 2, p. 400-409, 2025.

BIRK, Letícia et al. Green chemistry: Developments and perspectives for sample treatment in forensic methodologies. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Forensic Science**, v. 5, n. 6, p. e1497, 2023.

BOCCUZZI, Stefania et al. Evaluating the stability of synthetic cathinones in liquid urine and dried urine spots: impact of pH and storage conditions. **Archives of Toxicology**, v. 100, n. 3, p. 931-941, 2026.

BOMBANA, Henrique Silva et al. Use of alcohol and illicit drugs by trauma patients in Sao Paulo, Brazil. **Injury**, v. 53, n. 1, p. 30-36, 2022.

BRASIL. Ministério do Trabalho e Previdência. NR 7 – Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional (PCMSO). Atualizada pela Portaria MTP nº 567, de 10 de março de 2022. Brasília, DF: Ministério do Trabalho e Previdência, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/trabalho-e-emprego/pt-br/aceso-a-informacao/participacao-social/conselhos-e-orgaos-colegiados/comissao-tripartite-partitaria-permanente/normas-regulamentadora/normas-regulamentadoras-vigentes/norma-regulamentadora-no-7-nr-7>. Acesso em: 23 jun. 2026.

BUSZEWSKI, Boguslaw; SZULTKA, Malgorzata. Past, present, and future of solid phase extraction: a review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 42, n. 3, p. 198-213, 2012.

CAMPELO, Emanuele Lazzaretti Cordova; CALDAS, Eloisa Dutra. Postmortem data related to drug and toxic substance use in the Federal District, Brazil, from 2006 to 2008. **Forensic Science International**, v. 200, n. 1-3, p. 136-140, 2010.

CAO, Zheng; KALETA, Erin; WANG, Ping. Simultaneous quantitation of 78 drugs and metabolites in urine with a dilute-and-shoot LC–MS-MS assay. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 39, n. 5, p. 335-346, 2015.

CASTALDELLI-MAIA, João M. et al. Burden of disease due to amphetamines, cannabis, cocaine, and opioid use disorders in South America, 1990–2019: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet Psychiatry**, v. 10, n. 2, p. 85-97, 2023.

CEELEN, Manon et al. Post-mortem toxicological urine screening in cause of death determination. **Human & Experimental Toxicology**, v. 30, n. 9, p. 1165-1173, 2011.

CHIDIAC, Annabelle S. et al. Paracetamol (acetaminophen) overdose and hepatotoxicity: mechanism, treatment, prevention measures, and estimates of burden of disease. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 19, n. 5, p. 297-317, 2023.

CHIUMINATTO, Ugo et al. Automated online solid phase extraction ultra high performance liquid chromatography method coupled with tandem mass spectrometry for determination of forty-two therapeutic drugs and drugs of abuse in human urine. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 13, p. 5636-5645, 2010.

CIT-RS. **Relatório Anual 2024**. Porto Alegre: Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul. Disponível em: <<https://www.cit.rs.gov.br/dados-e-publicações/estatísticas/dados-publicados>>., 2025. Acessado em 13 jun 2026.

CLIVILLE-CABRE, Pol et al. A comparative study of SPE-and DLLME-based methods for the determination of opioids and benzodiazepines in urine samples using LC–MS/MS. **Microchemical Journal**, v. 208, p. 112354, 2025.

CONCHEIRO, Marta et al. Determination of illicit drugs and their metabolites in human urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry including relative ion intensity criterion. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 31, n. 9, p. 573-580, 2007.

CORRELL, C. U. From receptor pharmacology to improved outcomes: individualising the selection, dosing, and switching of antipsychotics. **European Psychiatry**, v. 25, n. S2, p. S12-S21, 2010.

COUCHMAN, Lewis; MORGAN, Phillip E. LC-MS in analytical toxicology: some practical considerations. **Biomedical Chromatography**, v. 25, n. 1-2, p. 100-123, 2011.

COTTEN, Steven W. Drug testing in the neonate. **Clinics in laboratory medicine**, v. 32, n. 3, p. 449-466, 2012.

COWANS, Claire et al. Uncovering the hidden burden of pharmaceutical poisoning in high-income and low-middle-income countries: a scoping review. **Pharmacy**, v. 11, n. 6, p. 184, 2023.

DART, Richard C. et al. Management of acetaminophen poisoning in the US and Canada: a consensus statement. **JAMA Network Open**, v. 6, n. 8, p. e2327739, 2023.

DE BAIRROS, André Valle et al. Determination of low levels of benzodiazepines and their metabolites in urine by hollow-fiber liquid-phase microextraction (LPME) and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). **Journal of Chromatography B**, v. 975, p. 24-33, 2015.

DEVENTER, Koen et al. Dilute-and-shoot-liquid chromatography-mass spectrometry for urine analysis in doping control and analytical toxicology. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 55, p. 1-13, 2014.

DOS SANTOS, Bruno Pereira et al. A comprehensive analysis of legislative strategies for new psychoactive substances: The Brazilian panorama. **Psychoactives**, v. 2, n. 3, p. 242-255, 2023.

DOS SANTOS, Bruno Pereira et al. A multi-analyte LC-MS/MS method for the determination of 57 pharmaceuticals and illicit drugs in plasma, and its application to poisoning cases. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 222, p. 115082, 2023.

DYER, Emma M.; SALEHIAN, Sormeh. How to interpret urine toxicology tests. **Archives of Disease in Childhood-Education and Practice**, v. 105, n. 2, p. 84-88, 2020.

DWIVEDI, Prabha et al. Impact of enzymatic hydrolysis on the quantification of total urinary concentrations of chemical biomarkers. **Chemosphere**, v. 199, p. 256-262, 2018.

EATON, David L.; GILBERT, Steven G. Princípios da Toxicologia. In: KLAASSEN, CURTIS D.; WATKINS III, JOHN B. (Org.). **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull**. 2. ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda., 2012. p. 5–20.

EUROPEAN WORKPLACE DRUG TESTING SOCIETY (EWDTS). **European guidelines for workplace drug testing in urine**. Version 3.0. [S.l.]: European Workplace Drug Testing Society, 2022. Disponível em: <https://ewdts.org/guidelines/>. Acesso em: 15 jun. 2026.

FAN, Shu-Yu et al. Simultaneous LC-MS/MS screening for multiple phenethylamine-type conventional drugs and new psychoactive substances in urine. **Forensic Science International**, v. 325, p. 110884, 2021.

FARLEY, Megan et al. A single method for 127 recommended and additional DUID drugs in blood and urine by LC–MS-MS. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 46, n. 6, p. 658-669, 2022.

FENG, Sheng et al. A dilute and shoot LC–MS/MS method for antipsychotics in urine. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 44, n. 4, p. 331-338, 2020.

FERRARI JÚNIOR, Ettore; CALDAS, Eloisa Dutra. Determination of new psychoactive substances and other drugs in postmortem blood and urine by UHPLC–MS/MS: Method validation and analysis of forensic samples. **Forensic Toxicology**, v. 40, n. 1, p. 88-101, 2022.

FLANAGAN, Robert J. et al. **Fundamentals of analytical toxicology: Clinical and forensic**. John Wiley & Sons, 2020.

FRANCO DE OLIVEIRA, Sarah CWSE et al. A fast and simple approach for the quantification of 40 illicit drugs, medicines, and pesticides in blood and urine samples by UHPLC-MS/MS. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 54, n. 7, p. 600-611, 2019.

FRANKE, Laura et al. Evaluation of biochemical assays and optimization of LC–MS-MS analysis for the detection of synthetic urine. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 48, n. 1, p. 37-43, 2024.

FREDERICK, Donald L.; BISSELL, Michael G. Overview of progress in clinical toxicology testing. **Clinics in laboratory medicine**, v. 32, n. 3, p. 353-359, 2012.

GAŁĘZOWSKA, Grażyna et al. Progress in analytical techniques for determination of urine components. **Separation & Purification Reviews**, v. 46, n. 4, p. 305-318, 2017.

GIORGETTI, Arianna et al. Emergency Department presentations due to new psychoactive substances (NPS) and other illicit drugs: a clinical and toxicological study on recreational drug toxicity in Italy. **International Journal of Legal Medicine**, p. 1-10, 2026.

GLICKSBERG, Lindsay; KERRIGAN, Sarah. Stability of synthetic cathinones in urine. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 42, n. 2, p. 77-87, 2018.

GOH, Evelyn Mei Ling et al. Qualitative confirmation of 94 new psychoactive substances and metabolites in urine using liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 47, n. 4, p. 366-378, 2023.

GONÇALVES, Ruben et al. Suitability of high-resolution mass spectrometry in analytical toxicology: focus on drugs of abuse. **Toxicologie Analytique et Clinique**, v. 34, n. 1, p. 29-41, 2022.

GRAY, Laurence A. Anticonvulsant toxicity. **Medicine**, v. 52, n. 6, p. 367-368, 2024.

GREENE, Shaun L.; KERR, Fergus; BRAITBERG, George. Amphetamines and related drugs of abuse. **Emergency Medicine Australasia**, v. 20, n. 5, p. 391-402, 2008.

GÜNAYDIN, Yahya Kemal et al. Antiepileptic drug poisoning: three-year experience. **Toxicology reports**, v. 2, p. 56-62, 2015.

HADLAND, Scott E.; LEVY, Sharon. Objective testing: urine and other drug tests. **Child and Adolescent Psychiatric Clinics**, v. 25, n. 3, p. 549-565, 2016.

HAYASHI, Kanna et al. Substance use patterns associated with recent exposure to fentanyl among people who inject drugs in Vancouver, Canada: a cross-sectional urine toxicology screening study. **Drug and alcohol dependence**, v. 183, p. 1-6, 2018.

HE, Yi; CONCHEIRO-GUISAN, Marta. Microextraction sample preparation techniques in forensic analytical toxicology. **Biomedical Chromatography**, v. 33, n. 1, p. e4444, 2019.

HOFFMAN, Robert J.; ALOUMI, Abdullatif; CAO, Dazhe. Laboratory testing in the poisoned patient. **Archives of Disease in Childhood**, 2026.

HOFFMANN-LÜCKE, Elke et al. Pre-analytical Stability of Drugs of Abuse in Urine for Confirmatory Testing. A Systematic Review. **Journal of Analytical Toxicology**, p. bkaf106, 2025.

HOLSTEGE, Christopher P.; BOREK, Heather A. Toxidromes. **Critical Care Clinics**, v. 28, n. 4, p. 479-498, 2012.

ISBISTER, Geoffrey K.; BALIT, Corrine R.; KILHAM, Henry A. Antipsychotic poisoning in young children: a systematic review. **Drug safety**, v. 28, n. 11, p. 1029-1044, 2005.

JAIN, Rajeev; SINGH, Ritu. Applications of dispersive liquid–liquid micro-extraction in forensic toxicology. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 75, p. 227-237, 2016.

JOHNSON, Olivia E.; MISKELLY, Gordon M.; RINDELAUB, Joel D. Testing for cannabis intoxication: current issues and latest advancements. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Forensic Science**, v. 4, n. 4, p. e1450, 2022.

JOHNSON-DAVIS, Kamisha L. Opiate & benzodiazepine confirmations: to hydrolyze or not to hydrolyze is the question. **The Journal of Applied Laboratory Medicine**, v. 2, n. 4, p. 564-572, 2018.

JONES, Sabra et al. An overview of sample preparation in forensic toxicology. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Forensic Science**, v. 4, n. 2, p. e1436, 2022.

JORGE DINIS-OLIVEIRA, Ricardo et al. Clinical and forensic signs related to cocaine abuse. **Current drug abuse reviews**, v. 5, n. 1, p. 64-83, 2012.

JOUBERT, Samantha; LYNCH, Catherine; CARTER, Andrew. Sample validity lessons learned from challenging cases and proposed biomarkers for synthetic urine detection. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 50, n. 5, p. bkag022, 2026.

KARAKKA KAL, Abdul Khader; SUBHAHAR, Michael Benedict; KARATT, Tajudheen K. Extraction Techniques in Forensic Toxicology. In: **Advanced Extraction Techniques for Drug and Toxin Detection: A Practical Guide to Sample Preparation in Forensic, Clinical, and Anti-Doping Analysis**. Cham: Springer Nature Switzerland, 2026. p. 153-232.

KIM, Seon Yeong et al. LC–MS-MS determination of 25 antipsychotic drugs and metabolites in urine for medication compliance monitoring. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 44, n. 8, p. 784-796, 2020.

KRASOWSKI, Matthew D. et al. Interpretation and utility of drug of abuse screening immunoassays: insights from laboratory drug testing proficiency surveys. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 144, n. 2, p. 177-184, 2020.

KROTULSKI, Alex J. et al. Advances in analytical methodologies for detecting novel psychoactive substances: a review. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 49, n. 3, p. 152-169, 2025.

KYLE, P. B. Toxicology: GC-MS. In: **Mass spectrometry for the clinical laboratory**. Academic Press, 2017. p. 131-163.

LECOMPTE, Yannick et al. Impact of Lowering Confirmatory Test Cutoff Value in Pre-Enlistment Urine Cannabinoids Screening: About Five Years' Experience in the French Gendarmerie. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 36, n. 8, p. 569-574, 2012.

LEE, Yong-Wha. Simultaneous screening of 177 drugs of abuse in urine using ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry in drug-intoxicated patients. **Clinical Psychopharmacology and Neuroscience**, v. 11, n. 3, p. 158, 2013.

LESZCZYŃSKA, Dagmara et al. Recent advances in the use of SPME for drug analysis in clinical, toxicological, and forensic medicine studies. **Talanta**, v. 270, p. 125613, 2024.

LOREDO, Cloé D. et al. Biomonitoring of Parabens in South Brazilian Urine Samples: A Validated SPE-LC-MS/MS Method. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 36, n. 11, p. e-20250150, 2025.

LU, Dasheng et al. Analysis of twenty phenolic compounds in human urine: hydrochloric acid hydrolysis, solid-phase extraction based on K₂CO₃-treated silica, and gas chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 14, p. 4131-4141, 2015.

LUCH, Andreas (Org.). **Molecular, Clinical and Environmental Toxicology. v. 2: Clinical Toxicology**. 1. ed. Basel – Boston – Berlin: Birkhäuser Verlag, 2010. 619 p.

LUZZI, Veronica I. et al. Analytic performance of immunoassays for drugs of abuse below established cutoff values. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 4, p. 717-722, 2004.

MARCHEI, Emilia et al. Ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry and high-sensitivity gas chromatography-mass spectrometry screening of classic drugs and new psychoactive substances and metabolites in urine of consumers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 8, p. 4000, 2021.

MARIA, Marisa H.; NENG, Nuno; BERG, Thomas. Simultaneous Determination of three Phosphatidylethanol Homologues, 12 drugs and Metabolites in Whole Blood by LC–MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, p. 117337, 2026.

MAURER, Hans H. Analytical toxicology. **Molecular, Clinical and Environmental Toxicology: Volume 2: Clinical Toxicology**, p. 317-338, 2010.

MAURER, Hans H. Multi-analyte procedures for screening for and quantification of drugs in blood, plasma, or serum by liquid chromatography-single stage or tandem mass spectrometry (LC-MS or LC-MS/MS) relevant to clinical and forensic toxicology. **Clinical biochemistry**, v. 38, n. 4, p. 310-318, 2005.

MAURER, Hans H.; SAUER, Christoph; THEOBALD, Denis S. Toxicokinetics of drugs of abuse: current knowledge of the isoenzymes involved in the human metabolism of tetrahydrocannabinol, cocaine, heroin, morphine, and codeine. **Therapeutic drug monitoring**, v. 28, n. 3, p. 447-453, 2006.

MAURER, Hans H. What is the future of (ultra) high performance liquid chromatography coupled to low and high resolution mass spectrometry for toxicological drug screening?. **Journal of chromatography A**, v. 1292, p. 19-24, 2013.

MAURER, Hans H.; PFLEGER, Karl; WEBER, Armin A. **Mass Spectral and GC Data of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and Their Metabolites**. 5. rev. and enl. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2017. 2 v.

MELANSON, Stacy EF. The utility of immunoassays for urine drug testing. **Clinics in laboratory medicine**, v. 32, n. 3, p. 429-447, 2012.

MINNS, Alicia B.; CLARK, Richard F. Toxicology and overdose of atypical antipsychotics. **The Journal of Emergency Medicine**, v. 43, n. 5, p. 906-913, 2012.

MUSATADI, Mikel et al. The role of sample preparation in suspect and non-target screening for exposome analysis using human urine. **Chemosphere**, v. 339, p. 139690, 2023.

NAZYROPOULOU, Chrysoula; SAMANIDOU, Victoria. Stir bar sorptive extraction applied to the analysis of biological fluids. **Bioanalysis**, v. 7, n. 17, p. 2241-2250, 2015.

NISBET, Lorna A.; DIEMMA, Gabrielle E.; SCOTT, Karen S. Drug stability in forensic toxicology. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Forensic Science**, v. 5, n. 4, p. e1481, 2023.

NOBLE, Matthew J.; HEDBERG, Katrina; HENDRICKSON, Robert G. Acute cannabis toxicity. **Clinical Toxicology**, v. 57, n. 8, p. 735-742, 2019.

NOURANI, Nasim et al. Microextraction techniques for sample preparation of amphetamines in urine: a comprehensive review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 54, n. 5, p. 1304-1319, 2024.

ODELL, Morris S. et al. Residual cannabis levels in blood, urine and oral fluid following heavy cannabis use. **Forensic Science International**, v. 249, p. 173-180, 2015.

OLESTI, Eulalia et al. LC-MS/MS method for the quantification of new psychoactive substances and evaluation of their urinary detection in humans for doping control analysis. **Drug testing and analysis**, v. 12, n. 6, p. 785-797, 2020.

OLSON, Kent R; VOHRA, Rais. Emergent Evaluation and Treatment. In: OLSON, KENT R (Org.). **Poisoning & Drug Overdose**. 7. ed. New York: McGraw-Hill Education, 2018. p. 1–72.

ORFANIDIS, Amvrosios et al. Development and validation of a single step GC/MS method for the determination of 41 drugs and drugs of abuse in postmortem blood. **Forensic Sciences**, v. 2, n. 3, p. 473-491, 2022.

PASCUAL-CARO, Sergi et al. Development of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of 40 drugs of abuse in human urine: application to real cases. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 47, n. 1, p. 33-42, 2023.

PEACOCK, Amy et al. Global statistics on alcohol, tobacco and illicit drug use: 2017 status report. **Addiction**, v. 113, n. 10, p. 1905-1926, 2018.

PETERS, Frank T.; WISSENBAACH, Daniela. Current state-of-the-art approaches for mass spectrometry in clinical toxicology: an overview. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 19, n. 8, p. 487-500, 2023.

PETERS, Frank T. et al. Method development in forensic toxicology. **Current Pharmaceutical Design**, v. 23, n. 36, p. 5455-5467, 2017.

PORTILHA-CUNHA, Maria Francisca et al. Development and validation of a multicomponent LLE–LC–MS/MS method for biomonitoring of hazardous medicinal products in urine of exposed workers. **Toxicology Letters**, v. 403, p. 40-49, 2025.

PUCCI, Vincenzo et al. A novel strategy for reducing phospholipids-based matrix effect in LC–ESI-MS bioanalysis by means of HybridSPE. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 50, n. 5, p. 867-871, 2009.

RODDA, Luke N. et al. Multi-class analysis of 57 drugs quantitatively in blood and qualitatively in urine by LC–MS–MS to complement comprehensive DFC, DUID, and postmortem testing. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 49, n. 1, p. 1-13, 2025.

ROXBURGH, Amanda; LAPPIN, Julia. MDMA-related deaths in Australia 2000 to 2018. **International Journal of Drug Policy**, v. 76, p. 102630, 2020.

RYGAARD, Karen et al. Overview of systematic toxicological analysis strategies and their coverage of substances in forensic toxicology. **Analytical Science Advances**, v. 4, n. 3-4, p. 96-103, 2023.

SAITMAN, Alec et al. False positive urine drug screens. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 50, n. 4, p. bkag007, 2026.

SALAS-WRIGHT, Christopher P. et al. Prevalence and correlates of cannabis poisoning diagnosis in a national emergency department sample. **Drug and alcohol dependence**, v. 204, p. 107564, 2019.

SANTOS, Inês C. et al. New psychoactive substances: health and legal challenges. **Psychoactives**, v. 3, n. 2, p. 285-302, 2024.

SIDE, Lighter. A practical guide to sample preparation for liquid chromatography-tandem mass spectrometry in clinical research and toxicology. **Spectroscopy Europe**, v. 30, n. 6, 2018.

SINAN. **Dados Epidemiológicos SINAN**. Disponível em: <<https://portalsinan.saude.gov.br/dados-epidemiologicos-SINAN>>. Acesso em: 13 jun. 2026.

SIM. **Sistema de Informações sobre Mortalidade**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/svsa/sistemas-de-informacao/sim>>. Acesso em: 14 jun. 2026.

SMITH, Michael L. Immunoassay. In: **Principles of forensic toxicology**. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 177-196.

SKOV, Kathrine et al. Exploring enzymatic hydrolysis of urine samples for investigation of drugs associated with drug-facilitated sexual assault. **Pharmaceuticals**, v. 17, n. 1, p. 13, 2023.

SNEDDON, J.; MASURAM, S.; RICHERT, J. C. Gas chromatography-mass spectrometry-basic principles, instrumentation and selected applications for detection of organic compounds. **Analytical Letters**, v. 40, n. 6, p. 1003-1012, 2007.

SOFALVI, Szabolcs et al. Development and validation of an LC–MS-MS method for the detection of 40 benzodiazepines and three Z-drugs in blood and urine by solid-phase extraction. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 44, n. 7, p. 708-717, 2020.

TAMAMA, Kenichi. Dilute and shoot approach for toxicology testing. **Frontiers in Chemistry**, v. 11, p. 1278313, 2023.

TAYLOR, Lacy L. et al. Internal hydrolysis indicator for sample specific monitoring of β -glucuronidase activity. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 41, n. 5, p. 407-411, 2017.

TENORE, Peter L. Advanced urine toxicology testing. **Journal of addictive diseases**, v. 29, n. 4, p. 436-448, 2010.

THANACOODY, Ruben. Antidepressant and antipsychotic poisoning. **Medicine**, v. 48, n. 3, p. 194-196, 2020.

TSUTAOKA, Ben. Benzodiazepines. In: OLSON, KENT R (Org.). **Poisoning & Drug Overdose**. 7. ed. New York: McGraw-Hill Education, 2018. p. 156–157.

UGES, Dra. Hospital Toxicology. In: MOFFAT, ANTHONY C; OSSELTON, M DAVID; WIDDOP, BRIAN (Org.). **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons**. 4. ed. London: Pharmaceutical Press, 2011. p. 3–58.

VAN DE MERBEL, Nico et al. Stability: recommendation for best practices and harmonization from the Global Bioanalysis Consortium Harmonization Team. **The AAPS journal**, v. 16, n. 3, p. 392-399, 2014.

VERSACE, François et al. Rapid sample pre-treatment prior to GC–MS and GC–MS/MS urinary toxicological screening. **Talanta**, v. 101, p. 299-306, 2012.

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.

WANG, Luan et al. Management of acute carbamazepine poisoning: A narrative review. **World Journal of Psychiatry**, v. 13, n. 11, p. 816, 2023.

WELTER-LUEDEKE, Jessica; MAURER, Hans H. New psychoactive substances: chemistry, pharmacology, metabolism, and detectability of amphetamine derivatives with modified ring systems. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 38, n. 1, p. 4-11, 2016.

WEST, Robert et al. Determination of illicit drug cutoff values in a pain patient population. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 17-18, p. 1589-1593, 2011.

WHITLEY, Penn et al. Analysis of urine drug test results from substance use disorder treatment practices and overdose mortality rates, 2013-2020. **JAMA Network Open**, v. 5, n. 6, p. e2215425, 2022.

WILLE, Sarah MR; LAMBERT, Willy EE. Recent developments in extraction procedures relevant to analytical toxicology. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 388, n. 7, p. 1381-1391, 2007.

WISSENBAACH, Dirk K.; STEUER, Andrea E. Advances in testing for sample manipulation in clinical and forensic toxicology-Part A: urine samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 415, n. 21, p. 5101-5115, 2023.

WONG, Yiu-Ching Jennifer et al. Valproic Acid-Associated Hyperammonemia: A Systematic Review. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 43, n.3, p. 283-294, 2023.

WU, Alan Hb et al. Role of liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry (LC-HR/MS) in clinical toxicology. **Clinical Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 733-742, 2012.

YAMAMOTO, Rie et al. Evaluation of immunochromatography-based urine drug screening and blood drug concentrations in suspected acute poisoning: insights into negative urine drug screening results. **International Journal of Emergency Medicine**, v. 19, n. 36, p. 1-8, 2026.

YEN, Yao-Te et al. A study of opiate, opiate metabolites and antihistamines in urine after consumption of cold syrups by LC-MS/MS. **Molecules**, v. 25, n. 4, p. 972, 2020.

ZAMANI, Nasim; HASSANIAN-MOGHADDAM, Hossein; ZAMANI, Naghmeh. Strategies for the treatment of acute benzodiazepine toxicity in a clinical setting: the role of antidotes. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 18, n. 6, p. 367-379, 2022.

ZUCOLOTO, Alexandre D. et al. Relationship between cocaine and cocaethylene blood concentration with the severity of clinical manifestations. **The American Journal of Emergency Medicine**, v. 50, p. 404-408, 2021.

ANEXOS

ANEXO I – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento de metodologias por espectrometria de massas para toxicologia de emergência

Pesquisador: TIAGO FRANCO DE OLIVEIRA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 31992920.3.0000.5345

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.328.757

Apresentação do Projeto:

Resumo:

Ao longo dos últimos anos, os casos de intoxicações têm aumentado no Brasil e no mundo, estando estes principalmente relacionados com exposição a fármacos e drogas de abuso. Assim, é de extrema importância que seja realizada a determinação dos toxicantes para que se proceda o melhor tratamento e manejo correto do paciente. Na toxicologia clínica, a espectrometria de massas (MS) é a metodologia de escolha para a determinação de xenobióticos em matrizes biológicas, já que a partir dela é possível gerar resultados exatos e precisos. A MS é uma técnica analítica de identificação molecular baseada na análise da relação massa carga (m/z) do composto, tendo como resultado a produção de um espectro de massas. Diante do exposto, esta proposta tem como objetivo desenvolver métodos multi-analito para a determinação de fármacos, drogas de abuso e seus produtos de biotransformação por utilizando a espectrometria de massas como técnica analítica, de forma a gerar resultados confiáveis, rápidos e exatos, podendo assim auxiliar no diagnóstico das intoxicações. Os métodos a serem desenvolvidos serão aplicados em amostras provenientes de casos atendidos pelo Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul (CIT/RS). A partir da validação analítica, será possível disponibilizar as técnicas desenvolvidas aos serviços de avaliação e controle de intoxicações do Brasil. Ademais, os resultados obtidos através das análises das amostras contribuirão como uma base de dados para o desenvolvimento de novas políticas de toxicovigilância no Rio Grande do Sul e Brasil.

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245

Bairro: Sarmiento

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

CEP: 90.050-170

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 4.328.757

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Desenvolver metodologias analíticas para diagnóstico laboratorial de intoxicações utilizando a espectrometria de massas. A partir disso, aplicar os métodos em amostras oriundas de casos atendidos pelo Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul.

Objetivo Secundário:

Desenvolver de métodos para determinação de fármacos e drogas de abuso em sangue e urina por espectrometria de massas; Desenvolver e validar métodos cromatográficos e espectrométricos; Proceder a síntese de novos preparos de amostras; Aplicar o método em amostras de sangue e urina de casos reais cedidas pelo Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul (CIT/RS).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O risco à sua saúde dos participantes voluntários da pesquisa será mínimo, uma vez que a coleta de 3 mL de sangue periférico e 10 mL de urina já foi realizada durante o atendimento do caso pelo CIT/RS, na unidade de saúde onde o paciente fora atendido para envio ao laboratório do CIT/RS. A coleta de sangue pode ter alguns efeitos indesejados, como hematomas e dor no local da picada, assim como a coleta de urina pode gerar

constrangimento ao paciente. No entanto, pelo projeto usar amostras de descarte, não será solicitada/realizada nenhuma coleta com pacientes. Além disso, um possível risco será a quebra accidental o sigilo, por meio da utilização dos dados de atendimentos. Para evitar isso, serão tomadas medidas para que essa quebra não venha a ocorrer de forma alguma, tais como identificação das amostras e casos com código numérico próprio, diferente do já existente na rotina do CIT/RS. Nenhum dos pesquisadores terá acesso ao nome dos pacientes ou quaisquer outra informação não citada no projeto. Todas informações serão guardadas em arquivos do tipo Excel ou Word com login e senha, tendo acesso a estes arquivos somente os pesquisadores integrantes deste projeto de pesquisa. Além disso, uma lista mestra com os códigos numéricos das amostras e relação com a numeração própria do CIT/RS será feita e mantida exclusivamente em guarda com a responsável e chefe de divisão do CIT/RS, MSc. Viviane Cristina Sebben.

Benefícios:

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245

Bairro: Sarmiento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

Página 02 de 05

Serão desenvolvidas metodologias analíticas para o diagnóstico de intoxicações por fármacos e drogas de abuso. Além disso, serão implementados métodos na rotina do Núcleo de Análise Laboratorial do Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul, assim como poderão ser disponibilizados por outros centros de informação e assistência toxicológica. Por fim, os resultados obtidos através das análises das amostras contribuirão como uma base de dados para o desenvolvimento de novas políticas de toxicovigilância no Rio Grande do Sul e Brasil.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa possui relevância acadêmica e a parceria UFCSPA/CIT, otimizando recursos financeiros e colaborando para formação de recursos humanos atentos às necessidades que não atender indivíduos atendidos pelo Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul (CIT/RS) realizaram o uso de pelo menos uma das substâncias (fármacos e drogas de abuso) elencadas no estudo, tendo assim oportunidade de utilização de amostras, antes descartadas, para a confirmações dos resultados da metodologia analítica instrumental em desenvolvimento nessa pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória apresentados foram revisados e encontram-se adequados. A solicitação de dispensa do TCLE foi devidamente justificada através da carta-resposta, onde foi dado todo o esclarecimento sobre as amostras, que já chegam coletadas ao CIT, não havendo possibilidade de contato com o participante; contudo há risco de quebra de sigilo e por isso a equipe adotará código numérico próprio, diferente do já existente na rotina do CIT/RS. Nenhum dos pesquisadores terá acesso ao nome dos pacientes ou quaisquer outra informação não citada no projeto. Todas informações serão guardadas em arquivos do tipo Excel ou Word com login e senha, tendo acesso a estes arquivos somente os pesquisadores integrantes deste projeto de pesquisa. Além disso, uma lista mestra com os códigos numéricos das amostras e relação com a numeração própria do CIT/RS será feita e mantida exclusivamente em guarda com a responsável e chefe de divisão do CIT/RS, MSc. Viviane Cristina Sebben. As amostras durante 3 meses são guardadas como contra-prova. Nenhuma amostra será cedida pelo CIT/RS antes deste período. Após este período, todas amostras são consideradas de descarte, mas não são necessariamente descartadas. O NAL-CIT/RS mantém parte das amostras para uso interno, como uso em controle interno de qualidade, uso em validações de metodologias analíticas, síntese de controles positivos, dentre outros, possibilitando o uso de amostras de casos de 2018 e 2019. Com a quantidade de amostras já guardadas e a média de análises de emergência realizadas por ano, espera-se atingir no mínimo o número de 400 amostras, tendo assim garantia de se alcançar

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245

Bairro: Sarmiento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE**



Continuação do Parecer: 4.328.757

esse valor.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica.

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o parecer do Relator.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1521315.pdf	15/09/2020 18:31:38		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_corrigido.pdf	15/09/2020 18:31:10	TIAGO FRANCO DE OLIVEIRA	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	15/09/2020 18:30:40	TIAGO FRANCO DE OLIVEIRA	Aceito
Outros	Carta_resposta.pdf	15/09/2020 18:30:09	TIAGO FRANCO DE OLIVEIRA	Aceito
Outros	TCUD_corrigido.pdf	15/09/2020 18:29:35	TIAGO FRANCO DE OLIVEIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Dispensa_de_TCLE_corrigido.pdf	15/09/2020 18:29:08	TIAGO FRANCO DE OLIVEIRA	Aceito
Outros	Termo_de_anuencia_Central_Analitica.pdf	13/07/2020 10:58:41	BRUNO PEREIRA DOS SANTOS	Aceito
Outros	Declaracao_de_evidente_interesse_publico_e_SUS.pdf	29/04/2020 17:24:59	BRUNO PEREIRA DOS SANTOS	Aceito
Outros	Termo_de_autorizacao_institucional.pdf	29/04/2020 17:23:31	BRUNO PEREIRA DOS SANTOS	Aceito
Outros	Termo_de_compromisso_entrega_relatorio_semestral_e_final.pdf	29/04/2020 17:22:41	BRUNO PEREIRA DOS SANTOS	Aceito
Outros	Termo_de_anuencia_do_local.pdf	29/04/2020 17:19:14	BRUNO PEREIRA DOS SANTOS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245

Bairro: Sarmiento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 4.328.757

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 08 de Outubro de 2020

Assinado por:
Fernanda Bordignon Nunes
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Sarmiento Leite ,245

Bairro: Sarmiento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

Página 05 de 05