

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

Daniela Souza Ossanes

**Determinação de substâncias psicoativas em
amostras de humor vítreo por meio de
microextração em fase sólida utilizando
folha de cortiça**

UFCSPA

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

**Porto Alegre
2023**

Daniela Souza Ossanes

Determinação de substâncias psicoativas em amostras de humor vítreo por meio de microextração em fase sólida utilizando folha de cortiça

Dissertação 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 Mestre.

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

**Porto Alegre
2023**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Marcos e Raquel, por todo o incentivo que me deram aos estudos e por todo o apoio nestes anos que passei na universidade.

Agradeço à Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pela possibilidade de realizar este mestrado, pelo acesso a seus laboratórios, pelo constante acompanhamento e pelo ensino exemplar de seu corpo docente. Também agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de pesquisa recebida.

Agradeço ao meu orientador, Professor Tiago, por toda a dedicação e paciência. Obrigada pelos conhecimentos transmitidos, pelo incentivo à pesquisa e pela oportunidade. À minha coorientadora, Professora Sarah, agradeço por todo o apoio e ensinamentos.

Agradeço imensamente ao Grupo de Pesquisa em Espectrometria de Massas da UFCSPA e aos meus colegas de pós-graduação, por todo o companheirismo e aprendizado compartilhado em laboratório e em congressos. Em especial, agradeço à Letícia, que me acompanhou neste projeto e me incentivou sempre.

Por fim, agradeço a todos os meus amigos e familiares que sempre torceram por mim.

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Há um número crescente de pessoas afetadas em todo o mundo por distúrbios de saúde mental, como depressão e ansiedade. Uma das principais linhas de tratamento, em conjunto com a psicoterapia, é o uso de medicamentos psicotrópicos, como antidepressivos e benzodiazepínicos. Além disso, o uso não prescrito dessas substâncias é um problema de saúde pública preocupante. Portanto, a análise de medicamentos psicotrópicos é obrigatória na toxicologia postmortem e para essa detecção, várias amostras biológicas podem ser empregadas, entre elas destaca-se o humor vítreo (VH), um líquido aquoso localizado no interior do globo ocular, isolado da redistribuição e contaminação bacteriana. Além disso, há uma demanda por metodologias de extração mais sustentáveis e eficientes de acordo com a química verde, e um exemplo são as técnicas de microextração em fase sólida (SPME), que usam um sorvente sólido e pequenas quantidades de solvente. Os biossorventes são substâncias de origem natural com propriedades sortivas, e têm sido utilizados com sucesso em técnicas de microextração sólida no campo da toxicologia ambiental, na análise de água, principalmente. Assim, o objetivo deste estudo foi desenvolver uma metodologia de SPME sustentável, rápida, barata e simples usando tiras de folha de cortiça como biossorvente, para detecção de antidepressivos e benzodiazepínicos em amostras de VH por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em modo tandem (LC-MS/MS). A metodologia de extração foi conduzida em placas de 96 poços e foi realizada a otimização dos parâmetros relevantes para a extração. Para a otimização do solvente, dois experimentos simplex-centroide foram planejados para extração e dessorção e para avaliar o tempo e pH, um experimento de design Doehlert foi realizado. As melhores condições para os solventes de extração e dessorção foram, respectivamente, uma mistura 1:1 de acetonitrila e etanol, e uma mistura 1:1:1 de acetonitrila, acetato de etila e éter metil terc-butilico (MTBE). Quanto aos experimentos de design Doehlert, uma melhor extração foi adquirida em 15 minutos e em pH neutro de 7. Posteriormente, o método analítico para determinação e quantificação de 17 substâncias por LC-MS/MS foi validado. Quanto à validação do método, os limites de quantificação foram de 5 ng/mL para todos os analitos e as curvas de calibração foram lineares entre 5 e 30 ng/mL. Por fim, este estudo foi capaz de desenvolver um método de microextração eficiente, barato, simples e rápido para 17 analitos em amostras de VH, usando tiras de folha de cortiça para extração e uma placa de 96 poços como recipiente. Além disso, este sistema de abordagem poderia ser possivelmente automatizado para laboratórios toxicológicos de rotina.

Palavras-chave: humor vítreo, fármacos psicoativos, espectrometria de massas, cortiça.

ABSTRACT

There is an increasing number of people affected worldwide by mental health disorders such as depression and anxiety. One of the main courses of treatment, along with psychotherapy, is the use of psychoactive medications, like antidepressants and benzodiazepines. Also, the unprescribed use of these substances is a concerning public health issue. Hence, the analysis of psychotropic medications is mandatory in postmortem toxicology and various biological samples can be used for this detection, among them the vitreous humor (VH) stands out, an aqueous liquid located inside the eyeball, isolated from redistribution and bacterial contamination. In addition to this, there is a demand for more sustainable and more efficient extraction methodologies according to green chemistry. An example is solid phase microextraction techniques (SPME), which use a solid sorbent and small solvent amounts. Biosorbents are substances of natural origin with sorptive properties, and they have been successfully used in solid-phase microextraction techniques in environmental toxicology for water analysis, mainly. Ultimately, the aim of this study was to develop a sustainable, fast, cheap, and simple SPME methodology using cork sheet stripes as a biosorbent, to extract antidepressants, benzodiazepines, and others from vitreous humor samples for posterior analysis through liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The extraction methodology was conducted in a 96-well plate and optimization of relevant parameters for extraction was performed. For solvent optimization, two simplex-centroid experiments were planned for extraction and desorption and to evaluate time and pH, a Doehlert design experiment was performed. The best conditions for extraction and desorption solvents were, respectively, a 1:1 mixture of acetonitrile and ethanol, and a 1:1:1 mixture of acetonitrile, ethyl acetate and methyl tert-butyl ether (MTBE). As for the Doehlert design experiments, a better extraction was achieved in 15 minutes and at a neutral pH of 7. Subsequently, the analytical method for determination and quantification of 17 substances by LC-MS/MS was validated. As for the method validation, the quantification limits were 5 ng/mL for all analytes and the calibration curves were linear between 5 and 30 ng/mL. Finally, this study was able to develop an efficient, cheap, simple, and fast microextraction method for 17 analytes in VH samples, using strips of cork sheet for extraction and a 96-well plate as a container. Furthermore, this approach system could possibly be automated for routine toxicology laboratories.

Keywords: vitreous humor, psychoactive drugs, mass spectrometry, cork.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química linear de antidepressivos tricíclicos.....	18
Figura 2 - Estrutura química linear de antidepressivos ISRSs.....	19
Figura 3 - Estrutura química linear de benzodiazepínicos.....	22
Figura 4 - Metodologia de extração em fase sólida utilizando folha de cortiça como biossorvente	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades químicas de substâncias psicoativas.....	24
Tabela 2 - Concentração de substâncias psicoativas em amostras de humor vítreo encontrados na literatura.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS

ADT	Antidepressivos tricíclicos
APA	Associação Americana de Psiquiatria, do inglês: <i>American Psychiatric Association</i>
BHE	Barreira hemato-encefálica
DAD	Detector de arranjo de diodos, do inglês: <i>Diode array detector</i>
DSM-5	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (5ª edição)
FID	Detector de ionização de chama, do inglês: <i>Flame ionization detector</i>
GC	Cromatografia gasosa, do inglês: <i>gas chromatography</i>
HRMS	Espectrometria de massas de alta resolução, do inglês: <i>high resolution mass spectrometry</i>
IMAO	Inibidor da monoaminoxidase
ISRS	Inibidor seletivo da recaptação de serotonina
LC	Cromatografia líquida, do inglês: <i>liquid chromatography</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
MS	Espectrometria de massas, do inglês: <i>mass spectrometry</i>
MS/MS	Espectrometria de massas em tandem
MTBE	Éter metilterc-butílico
OMS	Organização Mundial da Saúde, do inglês: <i>World Health Organization (WHO)</i>
RDSE	Extração por disco rotativo sorvente, do inglês: <i>Rotation disk sorptive extraction</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SPE	Extração em fase sólida, do inglês: <i>solid phase extraction</i>
SPME	Microextração em fase sólida, do inglês: <i>solid-phase microextraction</i>
TDAH	Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade
TEA	Transtorno do espectro autista
TEPT	Transtorno de estresse pós-traumático, do inglês: <i>Post traumatic stress disorder (PTSD)</i>
THC	Δ^9 -tetrahidrocanabinol
TOC	Transtorno obsessivo-compulsivo
TPB	Transtorno de personalidade borderline

VH Humor vítreo, do inglês: *vitreous humor*

SUMÁRIO

1 REFERENCIAL TEÓRICO	11
1.1 Distúrbios de saúde mental.....	12
1.2 Substâncias psicoativas.....	16
1.3 Análises toxicológicas postmortem	24
1.3.1 Humor vítreo.....	26
1.4 Métodos analíticos.....	28
1.4.1 Técnicas de preparo de amostra.....	29
1.4.1.1 Química verde e biossorventes	32
2 OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo Geral	35
2.2 Objetivos Específicos	35
3 REFERÊNCIAS	36
4 MANUSCRITO	42
5 CONCLUSÃO.....	62
ANEXOS	64
ANEXO A - Normas da revista.....	64
ANEXO B - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).....	93

1 REFERENCIAL TEÓRICO

O consumo de medicamentos psicoativos para o tratamento de transtornos mentais está crescendo rapidamente em todo o mundo. A depressão e os transtornos de ansiedade são um problema de saúde global e as duas categorias de medicamentos usadas principalmente para o tratamento dessas doenças são os antidepressivos e os benzodiazepínicos, respectivamente (PENNINX *et al.*, 2021; GØTZSCHE *et al.*, 2020). Essas substâncias são amplamente prescritas, tornando-se, portanto, mal utilizadas por muitas pessoas. Nesse contexto, esses fármacos podem ser usados de forma abusiva e causar dependência, sendo uma importante causa de intoxicação e desfechos negativos. Portanto, a análise toxicológica de fármacos psicotrópicos é de extrema relevância nas investigações forenses (OLFSON *et al.*, 2016; EDINOFF *et al.*, 2021).

A análise postmortem é imprescindível para ajudar a determinar a causa da morte em casos envolvendo abuso de substâncias. A principal amostra avaliada nesses casos é o sangue, devido à correlação entre a presença de uma substância e o efeito relacionado (GALERA e ROSSATO-GRANDO, 2021). No entanto, existem alguns problemas com a análise de sangue principalmente relacionados à decomposição, putrefação, redistribuição e contaminação post-mortem (CAMPOS *et al.*, 2021; MARKOWSKA *et al.*, 2017). Portanto, novas metodologias são necessárias, e a análise de matrizes alternativas é um recurso promissor para superar essas limitações. Sobre todos os tipos de amostras biológicas alternativas, o emprego do humor vítreo tem mostrado um grande potencial analítico para a análise de drogas (ISHIKAWA *et al.*, 2018; KUGELBERG *et al.*, 2007).

O humor vítreo tem constituição simples, sendo composto principalmente por água juntamente com colágeno e outras proteínas como os glicosaminoglicanos. É anatomicamente isolado dentro do globo ocular, sendo, portanto, menos sujeito a contaminação, decomposição e redistribuição pós-morte do que o sangue. O uso do humor vítreo já foi estabelecido como a amostra mais adequada e utilizada para a análise do álcool (SANTOS *et al.*, 2017). A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e a cromatografia líquida de alta pressão com detectores de arranjo de diodos já foram desenvolvidas para a análise de várias drogas de abuso no humor vítreo (NTOUPA *et al.*, 2020; METUSHI *et al.*, 2016; CARTISER *et al.*, 2011; BAZMI *et al.*, 2016; CABARCOS *et al.*, 2010). No entanto, a técnica analítica mais específica e sensível é a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS) (ARORA *et al.*, 2015; BIRK *et al.*, 2022; PELANDER *et al.*, 2010).

Junto com o uso de matrizes alternativas, a busca por técnicas sustentáveis de microextração vem crescendo rapidamente no campo da toxicologia analítica. Esses métodos geralmente se preocupam em seguir os princípios da Química Analítica Verde, buscando técnicas mais baratas, rápidas, seguras e simples (ANASTAS *et al.*, 2010). Métodos verdes são conhecidos pela redução de reagentes e pelo uso de materiais biodegradáveis que são menos tóxicos para o meio ambiente e, também, para o operador. Bons exemplos de materiais “verdes” são os biossorventes, que são substâncias de origem natural que são subprodutos da produção agrícola e podem ser reaproveitados para técnicas de preparo de amostras (LÓPEZ-LORENTE *et al.*, 2022).

Um biossorvente que vem ganhando destaque neste campo é a cortiça. A cortiça é um material biodegradável de origem vegetal normalmente utilizado em rolhas para garrafas de vinho. A folha de cortiça já foi aplicada com sucesso em métodos de extração para análises toxicológicas ambientais com detecção de diversos analitos, como parabenos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, pesticidas organoclorados, hormonas, entre outros poluentes da água (DIAS *et al.*, 2015; MANZO *et al.*, 2020; MORELLI *et al.*, 2020). Adicionalmente, a cortiça laminar tem sido utilizada como fase sortiva para a extração de hormônios na água. A eficiência das folhas de cortiça na extração por sorção por disco rotativo (RDSE) foi comparada com fases comerciais comumente usadas. Os resultados de recuperação da cortiça foram maiores ou não apresentaram diferença significativa (MANZO *et al.*, 2020). Além disso, a cortiça laminar foi também utilizada no RDSE para a determinação de 20 micropoluentes orgânicos em amostras de água (MORES *et al.*, 2017). No entanto, houve pouca exploração dessas metodologias de microextração ecoeficientes para a análise de amostras biológicas. Assim, este estudo teve como objetivo aliar a utilização de uma amostra biológica alternativa como o humor vítreo ao desenvolvimento de um método de extração sustentável baseado na utilização da cortiça como biossorvente para a análise de fármacos psicoativos em processos forenses.

1.1 Distúrbios de saúde mental

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a denominação doença ou desordem mental pode ser definida como um distúrbio clinicamente significativo na cognição, comportamento ou regulação emocional do indivíduo. Outro termo que pode ser utilizado é condições de saúde mental, sendo este mais amplo. Segundo estimativas, cerca de 1 a cada 8 pessoas no mundo, o que representam 970 milhões de indivíduos, estavam vivendo com alguma desordem mental em 2019. Desse total, estima-se que 52,4% são mulheres e que 31% sofrem

de transtornos de ansiedade e 28,9% de transtornos depressivos. Quanto à prevalência nos anos de desenvolvimento, cerca de 8% das crianças e 14% dos adolescentes vivem com algum tipo de desordem mental. Na infância, o mais comum são os transtornos de desenvolvimento idiopáticos, seguidos pelo autismo. Já na adolescência, destaca-se o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) e a ansiedade, especialmente nos indivíduos do sexo feminino. Já na vida adulta, há uma prevalência de transtornos depressivos, e, por fim, entre idosos é observada a prevalência de ansiedade (OLFSON *et al.*, 2016). Além disso, cerca de 320 milhões de pessoas sofrem com transtorno por uso de substâncias, sendo a maioria (283 milhões) relacionada ao uso de álcool e 36 milhões por uso de drogas de abuso (CLACK e WARD., 2019; MOITRA *et al.*, 2021; PENNINX *et al.*, 2021). Apesar da implementação de diversas medidas de prevenção e do desenvolvimento de novos tratamentos, o número de casos continuam em alta (CLACK e WARD, 2019).

Durante a pandemia de COVID-19 em 2020, houve um aumento significativo da prevalência de transtornos mentais (SANTOMAURO *et al.*, 2021; VINDEGAARD e BENROS, 2020). Estudos recentes investigaram os efeitos diretos do vírus SARS-CoV-2 no sistema nervoso e, principalmente, os efeitos indiretos na saúde mental tanto de profissionais da saúde quanto da população em geral. De acordo com CHEN *et al.*, 2020, profissionais da saúde apresentaram um aumento de sintomas de depressão e ansiedade, além de uma baixa qualidade de sono (XIAO *et al.*, 2020). Em relação ao público geral, viver sozinho se mostrou um fator de risco para desenvolver transtornos de depressão e ansiedade (CAO *et al.*, 2020). De acordo com SANTOMAURO *et al.*, 2021, indicadores como mobilidade humana na pandemia e taxa diária de infecção por SARS-CoV-2 influenciaram significativamente no aumento da prevalência de transtornos de depressão e de ansiedade. A estimativa calculada foi de um aumento de 27,6% de casos. Ademais, os dois subgrupos mais afetados foram a população feminina e a população abaixo dos vinte e quatro anos.

Os transtornos mentais são classificados e diagnosticados de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM) da Associação Psiquiátrica Americana (APA). Esses transtornos variam amplamente entre si quanto a causa, gravidade, sintomas e tratamento. Algumas categorias que se destacam são: transtornos do espectro autista, TDAH, esquizofrenia, transtorno bipolar, transtornos depressivos, transtornos de ansiedade, transtorno obsessivo-compulsivo, transtorno de estresse pós-traumático, transtornos alimentares, transtorno de insônia, narcolepsia, transtornos relacionados ao uso de substâncias, entre outros (CLARKE *et al.*, 2009).

O transtorno de depressão se caracteriza por uma tristeza crônica que leva a importantes alterações de humor, de sociabilidade e até mesmo de funções fisiológicas (CLACK e WARD, 2019). O transtorno da depressão pode ser classificado, de acordo com o DSM-5, em diversas categorias: transtorno disruptivo da desregulação de humor; transtorno depressivo maior, podendo este ser de episódio único ou episódio recorrente, leve a grave; transtorno depressivo persistente, também denominado distímia; transtorno disfórico pré-menstrual; transtorno depressivo induzido por substância e transtorno depressivo devido a outra condição médica. Segundo SOUZA *et al.*, 2021, a população adolescente apresentou um aumento significativo de casos de depressão no século atual. Além de ser mais intensificada e prolongada nessa fase, a depressão reflete no desenvolvimento do adolescente e pode vir a reincidir na vida adulta. A preocupação com o diagnóstico e tratamento adequados nessa fase de crescimento e de desenvolvimento é de extrema importância, com o objetivo de reduzir ao máximo os efeitos negativos no indivíduo. Entre os fármacos mais utilizados nos últimos anos para o tratamento medicamentoso da depressão em adolescentes, pode-se citar a fluoxetina, a paroxetina e a sertralina (CLACK e WARD, 2019).

Quanto à ansiedade, existem diversas condições, entre elas: transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de pânico, fobia social, entre outros. Estes diferem pela forma como se manifestam e afetam a vida do paciente. O transtorno de ansiedade generalizado se caracteriza pelo sentimento constante de ansiedade em relação a muitos aspectos, sem ter algum foco específico. No transtorno de ansiedade social ou fobia social, os sintomas de ansiedade estão relacionados a situações de convívio em sociedade. Já o transtorno de pânico se define por recorrentes ataques de pânico, que são episódios de ansiedade severa que incluem diversos sintomas físicos, como sudorese, dor no peito, taquicardia, tremores e náuseas (ROY-BYRNE, 2006). Estas desordens são caracterizadas pelo sentimento de medo, preocupação e apreensão exacerbados. Os transtornos de ansiedade são considerados, pela OMS, a nona maior causa de incapacidade relacionada à saúde (PENNINX *et al.*, 2021).

Outros transtornos, que anteriormente ao DSM-5 eram classificados como transtornos de ansiedade, são o transtorno obsessivo-compulsivo (TOC) e o transtorno de estresse pós-traumático (TEPT, ou em inglês, *post-traumatic stress disorder*, mais conhecido pela abreviação PTSD). De acordo com o DSM-5, o indivíduo com TOC apresenta obsessões, que são pensamentos, e compulsões, que são ações relativas aos pensamentos obsessivos. Alguns tipos de obsessões são mais comuns, como aqueles relacionados à limpeza e à simetria. Já o TEPT está obrigatoriamente ligado a um evento traumático específico na vida do indivíduo, podendo este ser uma experiência direta ou indireta relacionada a morte, lesão grave ou

violência sexual. Os seguintes sintomas são característicos: pensamentos intrusivos, reações dissociativas, sofrimento psicológico intenso, evitação persistente, hipervigilância, resposta de sobressalto exagerada, entre outros (APA, 2014; GOTZCHE *et al.*, 2020). Adicionalmente, estima-se que cerca de 1% da população mundial sofra de transtorno bipolar segundo dados da OMS. Nesse distúrbio, o indivíduo sofre de episódios depressivos alternados com episódios eufóricos, causando uma instabilidade emocional que afeta a sua vida no âmbito pessoal e profissional (PARIS e BLACK, 2015).

Outro transtorno mental grave é o Transtorno de Personalidade Borderline (TPB), que é caracterizado por relacionamentos instáveis, autoimagem frágil e comportamento impulsivo. Os tratamentos mais comuns incluem psicoterapia, medicamentos e grupos de apoio. Medicamentos como antidepressivos e estabilizadores de humor podem ser prescritos para ajudar a regular as mudanças de humor e estabilizar o paciente com TPB. Por fim, a esquizofrenia é um transtorno grave que afeta cerca de 1% da população mundial. Esta condição é caracterizada por sintomas como alucinações, delírios e pensamentos desorganizados, o que pode levar a uma deterioração significativa da vida diária e das relações pessoais (APA, 2014; MORENO e SOARES, 1999).

Alguns transtornos estão relacionados ao desenvolvimento desde o início da vida, sendo geralmente diagnosticados na infância e na adolescência. Entre estes, pode-se destacar os transtornos do espectro autista (TEA) e o TDAH. A categoria dos TEA apresenta uma ampla gama de distúrbios do neurodesenvolvimento, caracterizados por: dificuldade na comunicação, dificuldade na interação social, comportamentos repetitivos e interesses restritos. Alguns exemplos de classificações são o autismo clássico, o transtorno de Asperger e o transtorno global do desenvolvimento não-especificado. No Brasil, a estimativa de prevalência dos TEA é de 2% da população, segundo a Secretaria de Atenção à Saúde do Ministério da Saúde (BRASIL, 2015).

Também, o TDAH é uma condição neurobiológica caracterizada por dificuldades de atenção, hiperatividade e impulsividade. Estes sintomas podem interferir significativamente na vida diária e nas atividades escolares e profissionais. Apesar de ser um dos transtornos mais comuns entre crianças e adolescentes, também pode afetar adultos. Adultos com TDAH apresentam menor volume de massa cinzenta em áreas do cérebro relacionadas à atenção e à inibição de comportamentos impulsivos. Além disso, eles também apresentam diferenças na conectividade funcional entre essas áreas e outras regiões do cérebro (DIAS *et al.*, 2013). A prevalência do TDAH no Brasil é estimada em torno de 5% a 7% da população, de acordo com

dados da Academia Americana de Pediatria. No entanto, ainda existe uma falta de conscientização sobre o TDAH e falta acesso ao diagnóstico e aos tratamentos adequados.

Além dos sintomas deletérios de cada desordem de saúde mental, o risco de suicídio é uma grande preocupação para pessoas com esses quadros, como depressão, transtorno bipolar, esquizofrenia e transtornos de personalidade. Pacientes com algum distúrbio mental apresentam maior suscetibilidade a outros tipos de doenças e a tendências suicidas (CLARKE e CURRIE, 2009; MOITRA *et al.*, 2021). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 703.000 pessoas cometem suicídio a cada ano, o que equivale a aproximadamente 10,7 suicídios por 100.000 pessoas em todo o mundo, sendo responsável por mais mortes que a malária, AIDS ou câncer de mama. Cerca de uma em cada cem mortes no ano de 2019, estima-se que foi por suicídio. Globalmente, a taxa de suicídios entre homens é cerca de 2 vezes maior que entre as mulheres. Já no Brasil, essa taxa aumenta para mais de 3 vezes (OMS, 2021).

Para o tratamento desses distúrbios de saúde mental é indicado, além da psicoterapia, o uso de fármacos psicoativos. Para casos de sintomas depressivos, são comumente prescritas substâncias da classe dos antidepressivos, como a fluoxetina. Já no caso de sintomas de ansiedade, são indicados ansiolíticos, como o clonazepam. Essas substâncias são muito utilizadas pela população, devido à grande prevalência de distúrbios psiquiátricos, no entanto o uso proscrito desses medicamentos está aumentando ao passar dos anos. Os benzodiazepínicos são algumas das drogas mais prescritas por médicos nos Estados Unidos. De acordo com EDINOFF *et al.*, 2021, também são uma causa comum de overdose não-opioide. No Brasil, o uso de antidepressivos e benzodiazepínicos não prescritos é uma preocupação crescente. Segundo dados do Ministério da Saúde, o número de prescrições para antidepressivos aumentou mais de 50% na última década, enquanto o número de prescrições de benzodiazepínicos aumentou mais de 30%. Apesar disso, também há um número significativo de indivíduos que adquirem esses medicamentos sem receita médica, por meios ilegais, principalmente a partir da pandemia de COVID-19. Através de vendas *online* realizadas na *dark web*, o comércio e o consumo irregular de medicamentos foi facilitado. Além disso, existe o risco de se adquirirem produtos adulterados, com substâncias químicas e concentrações totalmente desconhecidas. (OLFSON *et al.*, 2016; SARANGI *et al.*, 2021).

1.2 Substâncias psicoativas

Os fármacos antidepressivos são utilizados principalmente para o tratamento de transtornos de depressão, mas também podem ser aplicados no tratamento de uma ampla variedade de distúrbios, como: transtorno obsessivo compulsivo, transtorno de ansiedade generalizado, TEPT, transtorno de pânico, agorafobia e bulimia (GØTZSCHE *et al.*, 2020; HILLHOUSE e PORTER, 2015). Os antidepressivos foram descobertos no final dos anos 50, tornando a depressão uma doença passível de tratamento. A imipramina, também conhecida pelo nome comercial *Tofranil*, foi o primeiro antidepressivo a ser aprovado pela agência federal “*Food and Drug Administration*” (FDA) em 1959, nos Estados Unidos. A sua descoberta e o sucesso no tratamento da depressão levaram ao desenvolvimento de novas classes de antidepressivos. As duas primeiras a serem utilizadas foram os antidepressivos tricíclicos e os inibidores da monoaminoxidase. Apesar da alta eficácia, a baixa especificidade faz com que essas duas classes possam gerar efeitos colaterais graves e até mesmo letais, dependendo da dosagem ingerida (HILLHOUSE *et al.*, 2015; MORENO e SOARES, 1999).

Os inibidores da monoaminoxidase (IMAOs) inibem a atividade dessa enzima, responsável por metabolizar os principais neurotransmissores do Sistema Nervoso Central (SNC) como serotonina, noradrenalina e dopamina. Como consequência, os IMAOs aumentam a concentração disponível desses neurotransmissores no SNC. A enzima monoaminoxidase possui dois subtipos: MAO-A e MAO-B. Os inibidores mais antigos se ligam a ambos os subtipos e essa ligação é irreversível. Porém, compostos mais novos possuem maior seletividade, como a moclobemida, que age apenas na MAO-A e tem efeito reversível (MORENO e SOARES, 1999).

Os antidepressivos tricíclicos (ADTs) também são conhecidos como inibidores não-seletivos de recaptação de monoaminas. Eles possuem uma estrutura química em comum, conhecida como estrutura tricíclica como pode ser observado na **Figura 1**. Esta estrutura base é composta por três anéis, geralmente sendo o anel central alicíclico e composto por sete átomos. Dessa forma, diversas modificações podem ser realizadas na estrutura base para modular eficácia e seletividade (SAMANIDOU e PAPADOYANNIS, 2014). Alguns exemplos de medicamentos desta classe são: amitriptilina, desipramina, imipramina, nortriptilina. Seu mecanismo de ação geral é o bloqueio da recaptação de monoaminas, comumente a norepinefrina e a serotonina. Além disso, esses fármacos podem bloquear diversos receptores, entre eles os receptores colinérgicos muscarínicos, histaminérgicos e beta-adrenérgicos (GOTZCHE *et al.*, 2020).

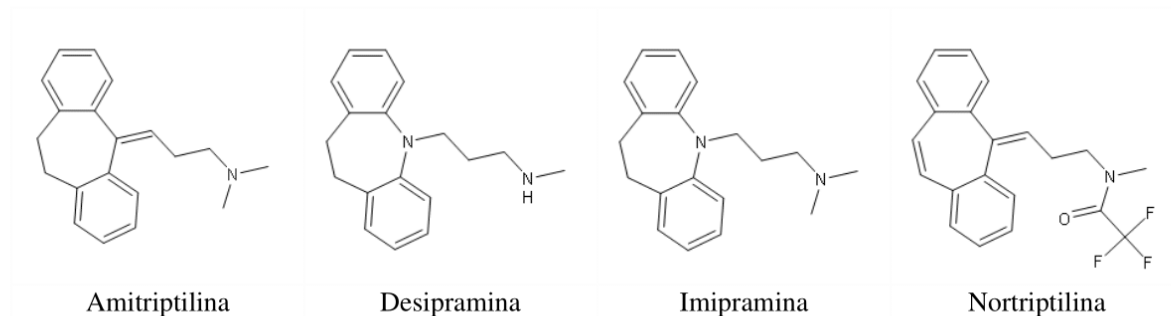
A amitriptilina é um ADT amplamente utilizado para o tratamento de depressão maior. Ela age no SNC aumentando a concentração de serotonina e de norepinefrina disponível na

fenda sináptica, através da inibição da recaptação desses neurotransmissores nos neurônios pré-sinápticos. Além de seu uso para tratamento de depressão, a amitriptilina também pode ser indicada para o tratamento de dor de cabeça por tensão, enxaqueca e de dor neuropática em adultos. Outros usos alternativos desse fármaco incluem: síndrome do intestino irritável, neuropatia diabética e insônia. Apesar de alguns estudos utilizarem a amitriptilina para o tratamento de fibromialgia, não há um consenso claro e pode haver uma superestimação dos dados (MOORE *et al.*, 2019).

Um dos produtos de biotransformação da amitriptilina é a nortriptilina, que é um produto ativo e comercializado para o tratamento psiquiátrico. Ela é utilizada principalmente para o alívio rápido de sintomas de depressão. Essa substância age bloqueando os receptores pré-sinápticos de norepinefrina, aumentando, assim, a concentração deste neurotransmissor na fenda sináptica. Ela também produz efeitos em outros receptores, como os colinérgicos. Alguns usos alternativos desse antidepressivo são: o tratamento de dor crônica, dor miofascial, neuralgia, síndrome do intestino irritável e, por fim, também é utilizado para o tratamento da dependência em nicotina.

Já a imipramina é utilizada majoritariamente para o tratamento de depressão, podendo também ser utilizada para enurese em crianças acima de 6 anos, desordens do pânico, distúrbios alimentares, manejo rápido de episódios depressivos agudos em pacientes bipolares e esquizofrênicos, entre outros. Um de seus produtos de biotransformação ativos, a desipramina, também é utilizado como medicamento. A desipramina age inibindo a recaptação de noradrenalina e de serotonina. Ela é utilizada principalmente para o tratamento de depressão, mas também pode ser aplicada no manejo de dor neuropática periférica crônica, ansiedade e TDAH.

Figura 1. Estrutura química linear de antidepressivos tricíclicos.

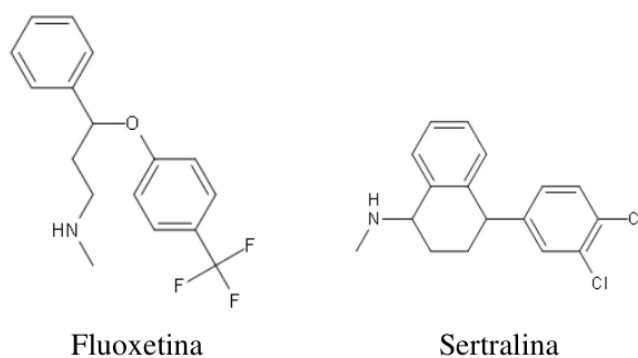


Devido a sua baixa seletividade, os ADTs podem causar diversos efeitos não desejados como: boca seca, visão turva, aumento da frequência cardíaca, tremores de mãos, sedação, exantemas, urticária, entre outros. A intoxicação por essas substâncias é caracterizada por confusão, alucinações, convulsões, alteração da frequência cardíaca, pupilas dilatadas e vômitos (HILLHOUSE *et al.*, 2015; GØTZSCHE *et al.*, 2020).

Após alguns anos, novas classes de antidepressivos começaram a ser desenvolvidas e utilizadas na psiquiatria, diferenciando-se dos ADTs por serem mais seletivos, atenuando a problemática dos efeitos colaterais (MORENO e SOARES, 1999). Diante disso, outra categoria importante de antidepressivos são os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs). Alguns exemplos são: a fluoxetina, a sertralina, a fluvoxamina, a paroxetina e o citalopram. Diferentemente da classe dos tricíclicos, que possuíam uma estrutura cíclica em comum, essas substâncias apresentam diferentes estruturas como pode ser observado na **Figura 2**, sendo agrupadas em uma classe por seus efeitos semelhantes. Seu mecanismo de ação comum envolve a inibição seletiva da serotonina, ligando-se aos receptores pré-sinápticos de serotonina, modulando sua atividade. Assim, sua atividade resulta no aumento da biodisponibilidade de serotonina na fenda sináptica.

Um dos ISRSs mais amplamente prescritos é a fluoxetina, também conhecida como *Prozac*. A fluoxetina é utilizada no tratamento de transtorno depressivo maior, bulimia nervosa, transtorno obsessivo-compulsivo, transtorno do pânico, transtorno disfórico pré-menstrual, entre outros. Ela também possui um produto de biotransformação farmacologicamente ativo, a norfluoxetina. Outro fármaco comumente utilizado é a sertralina, sendo esta indicada para o tratamento de transtorno depressivo maior, transtorno de estresse pós-traumático, transtorno obsessivo-compulsivo, transtorno do pânico, transtorno disfórico pré-menstrual e transtorno de ansiedade social.

Figura 2. Estrutura química linear de antidepressivos ISRSs.



Além dos ADTs, dos IMAOs e dos ISRSs, existem outras classes de antidepressivos, como os inibidores de recaptação de serotonina e noradrenalina, os moduladores de noradrenalina e os moduladores de serotonina. Dentre os inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina, destaca-se a venlafaxina. Esse fármaco age com maior potencial sobre os receptores serotoninérgicos e, em menor grau, nos receptores noradrenérgicos. Altamente seletivo, não afeta receptores muscarínicos, histamínicos ou alfa-adrenérgicos nem inibem a monoaminoxidase (MORENO e SOARES., 1999; SUWAIA *et al.*, 2019).

Outra classe de fármacos psicotrópicos muito utilizada na prática clínica para tratamento de distúrbios de saúde mental é a classe dos benzodiazepínicos. Por apresentarem efeitos ansiolíticos, os benzodiazepínicos têm um papel importante no tratamento de transtornos de ansiedade. Essa classe de substâncias foi, farmacologicamente, uma evolução em relação aos barbitúricos que eram amplamente utilizados como sedativos, visto seus poucos efeitos colaterais quando comparados a estes. Os benzodiazepínicos recebem este nome devido a uma estrutura química comum, formada por um anel de benzeno e um anel de diazepina, como demonstrado na **Figura 3**.

Os benzodiazepínicos se difundem pela barreira hematoencefálica e agem sobre o sistema GABAérgico, exercendo efeitos depressores no SNC. O ácido gama-aminobutírico (GABA) é o neurotransmissor mais comum no SNC e é responsável pela produção efeitos inibitórios. Existem três classes de receptores de GABA: A, B e C. Os benzodiazepínicos atuam como agonistas no receptor GABA_A, acentuando o efeito do neurotransmissor, gerando, assim, seus efeitos sedativos e ansiolíticos. Por fim, os benzodiazepínicos são biotransformados no fígado e excretados por conjugação (EDINOFF *et al.*, 2021).

Um dos primeiros benzodiazepínicos a serem utilizados foi o diazepam, tornando-se muito popular nos anos 60 pelo nome comercial *Valium*, ao ser utilizado por celebridades norte-americanas. Ele possui propriedades ansiolíticas, sedativas, hipnóticas e anticonvulsivantes. Adicionalmente, de acordo com WEINTRAUB (2017), benzodiazepínicos, especialmente o diazepam, apresentaram sucesso em aliviar os efeitos da abstinência moderada a grave de álcool. O diazepam, por possuir uma ação mais rápida que outros fármacos da classe, possibilita um manejo rápido do quadro psiquiátrico, sendo muito utilizado em urgências e emergências hospitalares. Ele também possui importantes produtos de biotransformação, como o nordiazepam, o oxazepam e o temazepam.

Outro importante benzodiazepínico é o alprazolam, conhecido popularmente como *Xanax*. Ele é indicado majoritariamente para o tratamento de transtorno de ansiedade generalizado em adultos. Também, o bromazepam, muito utilizado no tratamento a curto prazo

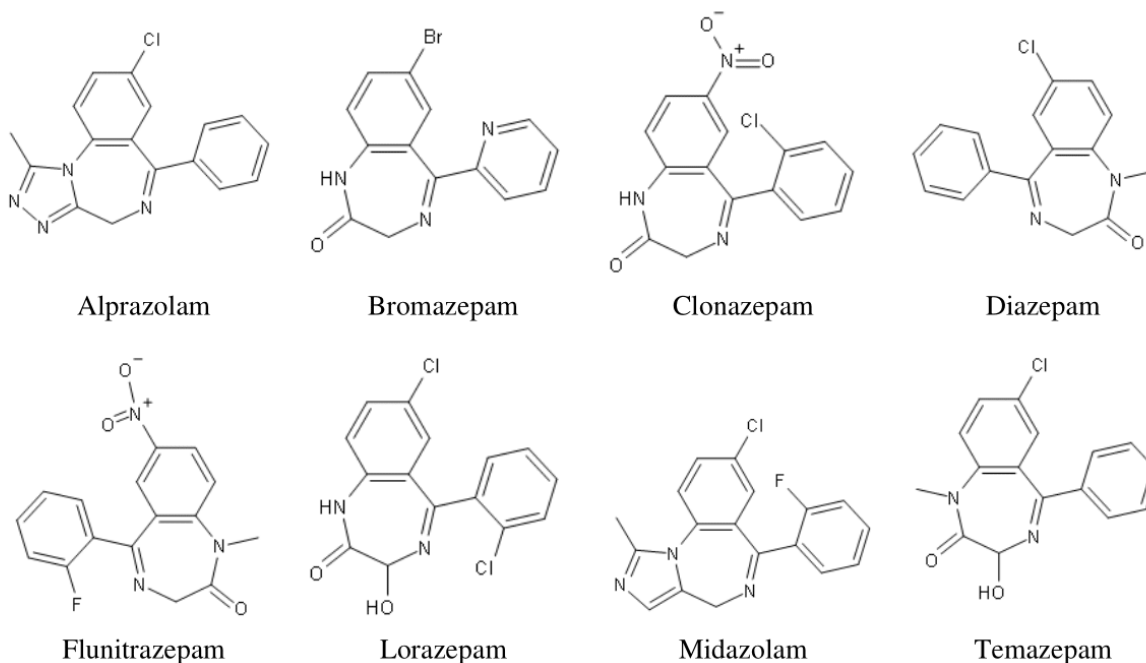
de insônia, ansiedade e ataques de pânico. Quanto à sua farmacocinética, possui um produto de biotransformação ativo e com tempo de meia-vida semelhante ao seu, de aproximadamente 17 horas: o 3-hidroxibromazepam (MANDRIOLI *et al.*, 2008).

Outro fármaco muito utilizado é o clonazepam, de nome comercial *Rivotril*, que passou a ser comercializado no ano de 1975. Ele é indicado para o tratamento de vários distúrbios, como: convulsões, epilepsia, ansiedade, mania aguda, transtorno de pânico, entre outros. Ele se destaca dos demais benzodiazepínicos por possuir alta potência e também uma longa duração de seus efeitos como modulador alostérico do GABA_A. Sua meia-vida é entre 19 e 60 horas, com picos de concentração sanguínea entre 1 e 8 horas. A partir de doses mais altas, cerca de 12 miligramas, o clonazepam induz euforia, explicando o seu uso recreacional e ilegal. Também, diferentemente de outros benzodiazepínicos, ele possui afinidade serotoninérgica (DOKKEDAL-SILVA *et al.*, 2019).

Também, pode-se citar como exemplo de benzodiazepínico o flunitrazepam, conhecido pelo nome comercial de *Rohypnol*, que foi inicialmente desenvolvido como hipnótico e sedativo. Sua aplicação clínica mais comum é para insônia grave não responsiva a outros fármacos. Já o uso recreativo de flunitrazepam pode levar a efeitos perigosos à saúde, incluindo funções cognitivas e motoras prejudicadas, desmaios, amnésia, depressão respiratória e até a morte. No entanto o uso mais conhecido desta substância é o uso criminoso como droga facilitadora de crimes sexuais (MANDRIOLI *et al.*, 2008).

Outro exemplo é o lorazepam, um medicamento benzodiazepínico com potentes efeitos ansiolíticos e sedativos, prescrito para tratar ansiedade, insônia e distúrbios convulsivos. É também utilizado como pré-medicação para procedimentos cirúrgicos ou diagnósticos, pois tem a capacidade de causar amnésia e sedação. Por fim, o midazolam é utilizado principalmente como sedativo pré-anestésico, em pacientes de cuidados intensivos e no tratamento de epilepsia (MANDRIOLI *et al.*, 2008).

Figura 3. Estrutura química linear de benzodiazepínicos.



Apesar de suas diversas aplicações e vantagens, os benzodiazepínicos podem causar importantes efeitos colaterais. Entre esses, o mais relevante é o seu potencial aditivo. A dependência causada pelo uso crônico é capaz de gerar sintomas de abstinência, sendo necessária uma redução gradual ao final do tratamento. Entre os sintomas físicos da dependência de benzodiazepínicos, pode-se destacar: dores de cabeça, convulsões, fadiga, náuseas etc. Quanto aos sintomas psicológicos, destacam-se a ansiedade, insônia, depressão, irritabilidade, alucinações, baixa concentração, ataques de pânico, entre outros (EDINOFF *et al.*, 2021).

Em casos de intoxicação por benzodiazepínico, há um antídoto específico que pode ser utilizado no tratamento: o flumazenil. Este composto é um antagonista seletivo do receptor benzodiazepínico presente no receptor GABA_A no SNC, sendo assim utilizado como antídoto em casos de overdose por esses fármacos, comumente relacionadas com tentativas de suicídio. Este composto age bloqueando a ação dos benzodiazepínicos no receptor GABA_A, revertendo assim os seus efeitos sedativos (MANDRIOLI *et al.*, 2008; EDINOFF *et al.*, 2021).

Além dessas duas classes de medicamentos, outros fármacos amplamente utilizados em tratamentos de transtornos mentais são os antipsicóticos. Um exemplo desta classe é o haloperidol, derivado da butirofenona, muito utilizado para tratar uma variedade de distúrbios psiquiátricos, como esquizofrenia, mania e delírio. Seu mecanismo de ação envolve o bloqueio dos receptores de dopamina no cérebro, levando a uma redução dos sintomas psicóticos, como

delírios e alucinações. O haloperidol também tem propriedades sedativas e antieméticas. Farmacologicamente, ele é classificado como um antipsicótico típico e é um dos antipsicóticos mais utilizados em todo o mundo. Está disponível em várias formas, incluindo comprimidos orais, solução injetável e formulações injetáveis de ação prolongada (BOETTGER *et al.*, 2014).

Outra classe relacionada a distúrbios do SNC é a dos anticonvulsivantes. Como representante pode-se citar a carbamazepina, um medicamento prescrito para tratar diversos distúrbios convulsivos, incluindo epilepsia, e também indicado para o tratamento de transtorno bipolar e a dor neuropática. Ela age estabilizando a atividade elétrica no cérebro e diminuindo os impulsos nervosos que causam convulsões. Farmacologicamente, a carbamazepina é classificada como um bloqueador do canal de sódio, reduzindo assim a probabilidade de convulsões. Está disponível em várias formas, incluindo comprimidos orais, cápsulas e suspensões orais (FRICKE-GALINDO *et al.*, 2018).

Por fim, a cetamina é um medicamento anestésico que tem uma ampla gama de usos tanto na área médica quanto na veterinária. Além de suas propriedades anestésicas, a cetamina também apresenta potencial uso como antidepressivo, especialmente na depressão resistente ao tratamento, e já foi utilizada para tratar dor crônica, TEPT e TOC. Farmacologicamente, a cetamina funciona bloqueando a ação do glutamato, um neurotransmissor responsável por controlar o nível de excitação e consciência no cérebro. Isso leva a um estado de dissociação, onde a pessoa pode experimentar uma sensação de distanciamento do ambiente e uma redução na percepção da dor. Diante dos efeitos mencionados, o uso da cetamina é frequentemente observado em cenário recreacional. A cetamina é classificada como um antagonista não competitivo do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA). O receptor NMDA está envolvido na regulação da dor, memória e aprendizado (SCHWENK *et al.*, 2021). Na **Tabela 1**, são descritas as propriedades físico-químicas dos fármacos descritos anteriormente.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas de substâncias psicoativas.

<i>Nome</i>	<i>Massa Exata</i>	<i>Fórmula estrutural</i>	<i>Log P</i>	<i>pKa</i>
Antidepressivos Tricíclicos				
Amitriptilina	277,183	C ₂₀ H ₂₃ N	5,0	9,40
Desipramina	266,178	C ₁₈ H ₂₂ N ₂	4,9	10,40
Imipramina	280,193	C ₁₉ H ₂₄ N ₂	4,8	9,40
Nortriptilina	263,167	C ₁₉ H ₂₁ N	4,5	9,70
Antidepressivos Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (ISRSs)				
Fluoxetina	309,134	C ₁₇ H ₁₈ F ₃ NO	4,0	9,80
Sertralina	305,073	C ₁₇ H ₁₇ Cl ₂ N	4,8	9,16
Benzodiazepínicos				
Alprazolam	308,082	C ₁₇ H ₁₃ ClN ₄	2,1	18,20 e 5,01
Bromazepam	315,001	C ₁₄ H ₁₀ BrN ₃ O	1,7	12,24 e 2,65
Clonazepam	315,041	C ₁₅ H ₁₀ ClN ₃ O ₃	2,4	11,65 e 1,89
Diazepam	284,071	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O	3,0	2,92
Flunitrazepam	313,086	C ₁₆ H ₁₂ FN ₃ O ₃	2,1	1,72
Lorazepam	320,011	C ₁₅ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	2,4	10,61 e -2,20
Midazolam	325,078	C ₁₈ H ₁₃ ClFN ₃	2,5	6,19
Temazepam	300,066	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O ₂	2,2	10,68 e -1,40
Outros				
Haloperidol	375,140	C ₂₁ H ₂₃ ClFNO ₂	3,2	13,96 e 8,66
Carbamazepina	236,094	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O	2,5	15,96 e -3,8
Cetamina	237,092	C ₁₃ H ₁₆ ClNO	2,2	19,77 e 7,16

Fonte: PubChem e DrugBank.

1.3 Análises toxicológicas postmortem

A toxicologia posmortem é um ramo da toxicologia forense que concentra seus esforços em analisar e procurar evidências a partir de materiais obtidos dos restos mortais das vítimas, em que a investigação apresenta suspeita do envolvimento de substâncias psicoativas. A análise de xenobióticos é imprescindível em investigações em que há suspeita de seu envolvimento no óbito, devido ao seu amplo uso indevido. Através dessas análises, pode-se determinar a causa da morte em inúmeros casos, auxiliando as autoridades responsáveis a chegarem a um fechamento. Para tanto, se faz necessário coletar, conservar, preparar e analisar diversos espécimes de origem biológica (DRUMMER, 2007).

Além disso, é preciso compreender as diferenças e os vieses existentes entre a análise de amostras de indivíduos vivos e aquelas que são coletadas após a morte, pois diversas mudanças na própria composição das matrizes são observadas. Essas modificações são

consequência da progressão natural da decomposição do corpo, e podem ser afetadas por fatores internos do organismo ou por fatores externos, como a temperatura e a umidade. Nas primeiras horas da decomposição, ocorrem três alterações: *algor mortis*, em que a temperatura do corpo se iguala a temperatura do ambiente; *livor mortis*, em que o sangue se acumula devido à ação da gravidade; e *rigor mortis*, em que os músculos enrijecem devido à formação de lactato. Além desses fatores, as matrizes biológicas analisadas, como parte desse organismo em decomposição, também são afetadas pela liberação de substâncias pela morte celular e pela contaminação por bactérias fermentadoras. No entanto, um dos fatores que irá implicar significativamente nas análises postmortem de xenobióticos é o fenômeno da redistribuição, onde as substâncias migram do sangue para outros tecidos do corpo por difusão passiva. Por fim, pode-se ressaltar que quanto maior o decorrer do tempo, maiores serão as alterações observadas (DRUMMER, 2007; GALERA e ROSSATO-GRANDO, 2021).

Entre todas as matrizes biológicas disponíveis para análise postmortem, o padrão-ouro para a maior parte das metodologias é o sangue, por ser a amostra de mais fácil acesso e por ser a mais explorada, tanto em organismos vivos como após a morte. Além disso, é possível relacionar as concentrações encontradas em sangue com o efeito farmacológico da substância, o que pode levar a definição de uma provável causa de morte. Outra amostra extremamente utilizada em análises toxicológicas é a urina por ser uma matriz que possui uma ampla janela de detecção em relação ao sangue e em que as concentrações de xenobióticos são mais elevadas. Contudo, nos casos de toxicologia forense postmortem, nem sempre essas amostras se encontram disponíveis ou adequadas para análise, devido aos processos de decomposição, putrefação, contaminação e redistribuição (MARKOWSKA *et al.*, 2017).

Devido a essas desvantagens, outras matrizes biológicas alternativas foram exploradas nos últimos anos. Entre as matrizes alternativas mais conhecidas, pode-se destacar amostras de tecido queratinizado como cabelo e unha, amostras de tecidos moles como fígado e cérebro, de conteúdo gástrico, de humor vítreo, entre outros. As amostras de unha e de cabelo são de fácil coleta e preservação e são utilizadas para a avaliação do uso crônico de alguma substância, podendo auxiliar em uma investigação retrospectiva, porém não dificilmente fornecem indícios de intoxicação aguda. Já a análise de fígado é interessante pois a grande maioria das substâncias passa por biotransformação neste órgão, dessa forma as concentrações encontradas tanto do xenobiótico inalterado quanto de seus respectivos produtos pode estar mais elevada. Através da análise de conteúdo gástrico é possível identificar substâncias consumidas oralmente antes da sua absorção e biotransformação pelo organismo. Essa característica torna a análise muito vantajosa em casos de intoxicação por via oral, podendo direcionar uma avaliação posterior

mais adequada. Diante do exposto, pode-se compreender que cada tipo de matriz está relacionado com diversos tipos de situações, porém o humor vítreo, por ser acessível, líquido e isolado, apresenta características promissoras para substituir o sangue nos contextos mais variados (MARKOWSKA *et al.*, 2017; GALERA e ROSSATO-GRANDO, 2021; KETOLA e KRIIKKU, 2019).

1.3.1 Humor vítreo

O humor vítreo é um fluido transparente, aquoso e com consistência gelatinosa que se localiza na cavidade ocular posterior, entre a lente e a retina. Ele apresenta a função mecânica de sustentação da estrutura ocular e a função bioquímica de nutrição dos tecidos adjacentes. Seu volume é cerca de 4 mL, e é composto por majoritariamente por água, porém também apresenta carboidratos, lipídeos, proteínas, como a albumina, e eletrólitos em sua composição. Esse líquido é isolado da circulação sanguínea através da barreira hematorretiniana, uma camada dupla de epitélio e endotélio celular, responsável por regular as trocas de substâncias entre o sangue e o humor vítreo (PIGAIANI *et al.*, 2020; HUBBARD *et al.*, 2019).

Devido a suas particularidades de composição e de localização anatômica, o humor vítreo apresenta diversas vantagens em relação a outras matrizes biológicas mais comumente utilizadas nas análises postmortem. Por ser isolado do sangue pela barreira hematorretiniana e ter uma vascularização limitada, esse fluido está protegido de processos que podem alterar a concentração de analitos de interesse, como a contaminação bacteriana, a decomposição, a redistribuição e as reações metabólicas. Além disso, o humor vítreo é uma matriz de composição simples, visto que é majoritariamente aquosa. Por conta dessa característica, os processos de preparo de amostra necessários para tornar a amostra compatível com as técnicas analíticas é usualmente mais simples que aqueles utilizados em matrizes de maior complexidade como por exemplo, os tecidos (CAMPOS *et al.*, 2021; MARKOWSKA *et al.*, 2017).

As amostras de humor vítreo são coletadas durante o procedimento de necropsia, através da inserção cuidadosa de uma seringa e posterior aspiração de até cerca de 2 mL de material por globo ocular. Esse procedimento deve ser feito por profissionais treinados, pois a contaminação por sangue poderá afetar todas as análises posteriores (LEIKIN *et al.*, 2003; KUGELBERG e JONES, 2007).

Uma das substâncias mais analisada na toxicologia postmortem é o álcool etílico. Atualmente, o humor vítreo é a amostra padrão utilizada para a análise de álcool postmortem, através de cromatografia gasosa acoplada a ionização de chama (GC-FID). O humor vítreo é a

amostra mais confiável nesta análise pois, no sangue, os níveis de álcool não se mantêm estáveis após a morte. Isso se deve principalmente à produção de álcool por bactérias no corpo durante a decomposição, podendo elevar os níveis de etanol, o que pode acarretar resultados falsos-positivos ou uma superestimação das concentrações de álcool encontradas (KUGELBERG e JONES, 2007).

Além do álcool, diversos fármacos psicotrópicos já foram detectados e quantificados em humor vítreo por diferentes técnicas. Em 2020, NTOUPA *et al.* validaram uma metodologia em GC-MS para a análise de nove tipos de antidepressivos em sangue e em humor vítreo, detectando os casos positivos em ambas as matrizes. Em 2022, BIRK *et al.* desenvolveram uma metodologia para detectar oito tipos de benzodiazepínicos em humor vítreo através de um método simples de preparo de amostras com precipitação de proteínas e posterior análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS). Em 2023, WACHEIKO *et al.* desenvolveram uma metodologia capaz de determinar 54 tipos de benzodiazepínicos por UHPLC-QqQ-MS/MS. HUBBARD *et al.* quantificaram e compararam a concentração de drogas de caráter ácido em sangue e em humor vítreo através de HPLC-DAD. As substâncias analisadas foram: acetaminofeno, carbamazepina, ibuprofeno, naproxeno, fenobarbital, fenitoína e ácido salicílico. Quando comparadas as matrizes, as concentrações no sangue periférico foram maiores em todos os casos. Neste estudo, uma possível correlação dos níveis sanguíneos e em humor vítreo foi observada para a carbamazepina.

Cocaína, codeína, morfina, MDMA, MDA, MDEA, LSD, oxycodona, fentanil, entre outras substâncias de interesse toxicológico, já foram identificadas em amostras de humor vítreo. Na análise de opioides, foi possível identificar uma vantagem em relação à análise destes em sangue: um importante produto de biotransformação da heroína, a 6-monoacetilmorfina, fica estável por mais tempo no humor vítreo, diferentemente do sangue onde ele se biotransforma em morfina. Assim, se torna possível diferenciar o consumo de morfina ou heroína com maior facilidade. A cocaína e seus produtos também apresentam maior estabilidade em humor vítreo, devido à ausência de esterases, enzimas presentes no sangue que biotransformam a cocaína em benzoilecgonina (MARKOWSKA *et al.*, 2017; ISHIKAWA *et al.*, 2018).

Porém, uma das limitações observadas em alguns estudos foi a dificuldade de detectar e quantificar THC pela análise de humor vítreo. Isso se deve a alta lipofilicidade dessa substância e consequente incompatibilidade com o meio hidrofílico do humor vítreo (JENKINS e OBLOCK, 2008). Ademais, a concentração de substâncias em humor vítreo é muito variável e pouco conhecida, pois a quantidade de amostras reais analisadas ainda é diminuta, já que a

maioria dos estudos publicados analisa um número de amostras reduzido. NTOUPA *et al.* (2020) analisaram antidepressivos em cerca de 43 amostras por GC-MS. BAZMI *et al.* (2016) analisaram 21 amostras e CABARCOS *et al.* (2010) analisaram 6 amostras, ambos por HPLC-DAD. Por fim, a análise de humor vítreo pode ser extremamente vantajosa, quando utilizados os métodos de preparo e de análise adequados. BIRK *et al.* (2022) analisaram um total de 62 amostras para benzodiazepínicos, das quais apenas duas testaram positivo para diazepam, nas concentrações de 6,80 ng/mL e 47,68 ng/mL.

Na **Tabela 2** apresentada abaixo se encontram as concentrações mensuradas em amostras de humor vítreo de casos reais. Nos trabalhos encontrados, não foram identificadas amostras de humor vítreo que testassem positivo para os antidepressivos desipramina e imipramina, e benzodiazepínicos clonazepam, flunitrazepam, midazolam, temazepam. O mesmo se aplica para o haloperidol e a cetamina.

Tabela 2. Concentração de substâncias psicoativas em amostras de humor vítreo encontrados na literatura.

<i>Fármaco</i>	<i>Concentração (ng/mL)</i>
Amitriptilina	49,4 - 147,0
Nortriptilina	45,6 - 58,2
Fluoxetina	34,1 - 90,4
Sertralina	54,1 - 60,4
Alprazolam	8,0 - 1.868,2
Bromazepam	300,0 - 440,0
Diazepam	11,6 - 2.557,3
Lorazepam	1.076,9
Carbamazepina	500,0 - 10.000,0

Fonte: BAZMI *et al.*, 2016; CABARCOS *et al.*, 2010; NTOUPA *et al.*, 2020; ARORA *et al.*, 2015; HUBBARD *et al.*, 2019.

1.4 Métodos analíticos

Para detectar e quantificar as baixas concentrações usualmente presentes no humor vítreo, são necessárias técnicas analíticas de alta sensibilidade. Uma ampla gama de metodologias analíticas pode ser utilizada para a análise de substâncias psicoativas que podem estar presentes nessa matriz, como os fármacos e drogas de abuso. Dentre essas metodologias, pode-se destacar três: cromatografia líquida acoplada a detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD), cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (HPLC-MS) e cromatografia

gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). Cada técnica apresenta suas particularidades e vantagens, devendo ser desenvolvida e validada uma metodologia adequada, seguindo as normas estabelecidas pelos guias de validação internacionais (KRUIVE *et al.*, 2015; ARORA *et al.*, 2015).

A cromatografia gasosa é uma técnica amplamente consolidada e apresenta como principal vantagem seu banco de dados padronizado, facilitando a identificação de compostos conhecidos. NTOUPA *et al.* (2020) quantificaram antidepressivos em humor vítreo através dessa técnica, com limites de quantificação de 5,0 ng/mL para todos os analitos. Entretanto, para a análise de compostos desconhecidos não é a mais indicada, além da falta de compatibilidade de uma gama de substâncias com a técnica devido a características como a polaridade e a volatilidade, sendo necessária a adição de uma etapa de derivatização que torna o método laborioso e oneroso. A HPLC-DAD é uma técnica simples, menos custosa, porém menos sensível que a espectrometria de massas, dessa forma os limites de quantificação são usualmente mais altos. BAZMI *et al.* (2016) e CABARCOS *et al.* (2010) fazem uso dessa metodologia para analisar benzodiazepínicos em humor vítreo, com os limites de quantificação respectivos de 100 ng/mL e 30 ng/mL, para todos os analitos. ARORA *et al.* (2015) desenvolveram um método para a detecção e quantificação de 24 analitos em humor vítreo, obtendo como LLOQ o valor de 7,8 ng/mL e detectando amostras positivas para alprazolam, diazepam, nordiazepam, entre outras substâncias.

A análise por cromatografia líquida de alta performance acoplada a um espectrômetro de massas triplo-quadrupolo (HPLC-MS/MS) apresenta altíssima sensibilidade, detectando concentrações baixíssimas, o que é comum em amostras biológicas. Em 2022, BIRK *et al.* validaram uma metodologia em LC-MS/MS para a análise de oito benzodiazepínicos, estabelecendo um limite de quantificação igual a 1 ng/mL. Consequentemente, é possível utilizar um volume mínimo para realizar as análises, outra vantagem significativa em uma amostra de volume limitado como o humor vítreo. Essa sensibilidade também possibilita o desenvolvimento de metodologias de *screening*, para a análise de diversas substâncias em um mesmo método, poupando material e tempo investido. Assim, fica claro que o padrão-ouro para a análise de amostras biológicas em toxicologia forense envolve cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (MAURER *et al.*, 2007; BIRK *et al.*, 2022).

1.4.1 Técnicas de preparo de amostra

Alinhado a alta sensibilidade do equipamento analítico, a amostra biológica deve ser preparada anteriormente para a análise, devido às baixas concentrações disponíveis para a detecção. Esse processo é responsável por remover interferentes presentes nas complexas matrizes biológicas, tornando a matriz compatível com o instrumento analítico, e tem a função de concentrar os analitos de interesse para facilitar a detecção. Existem diversos métodos de preparo de amostras que podem ser utilizados nas análises toxicológicas, dependendo do objetivo da própria análise, se é uma metodologia qualitativa ou quantitativa; das características da amostra, estado físico e complexidade; e do analito, características físico-químicas e faixa de concentração esperada (HE *et al.*, 2018). Algumas das técnicas clássicas mais utilizadas para o preparo de amostras incluem a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE). A extração líquido-líquido faz uso de solventes orgânicos para extrair os analitos da amostra, como exemplo pode-se citar o hexano e etil acetato utilizados por BAZMI *et al* (2016). para extração de benzodiazepínicos de humor vítreo. Já a extração em fase sólida se utiliza de um material sólido, um sorvente, que irá entrar em contato com a matriz e interagir com os analitos. Na SPE clássica, este sorvente está empacotado em cartuchos pelo qual a amostra será eluída, geralmente resultando em extratos mais puros quando comparado com a LLE.

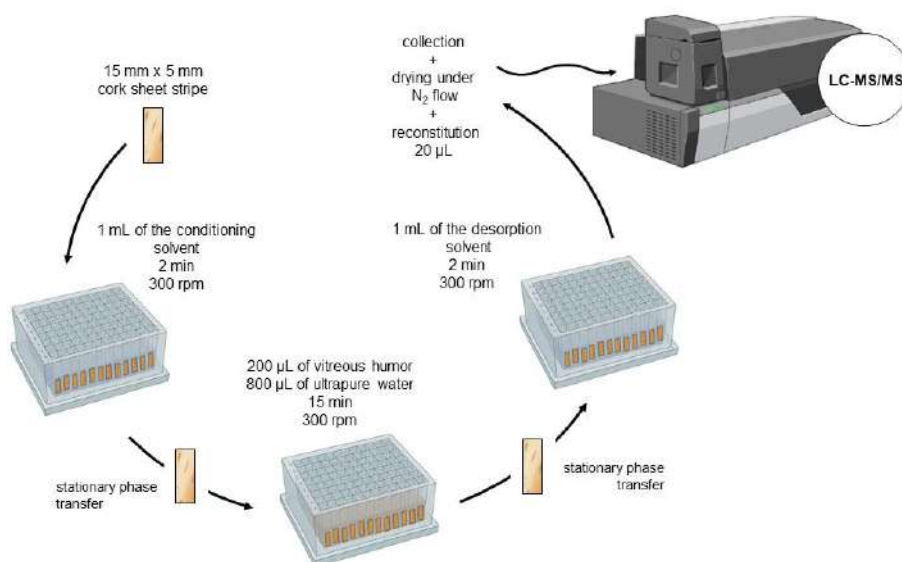
Entretanto, essas técnicas podem gerar um grande volume residual e causar danos ao meio-ambiente. Esse volume é resultado do uso de grandes volumes de solventes orgânicos, muitas vezes com toxicidade elevada, e amostras biológicas. Grandes quantidades de solvente, além do custo elevado, causam maior impacto ambiental e geram riscos de biossegurança no laboratório. Por outro lado, grandes volumes de amostra não são compatíveis com quase nenhuma amostra biológica, em especial humor vítreo, cuja coleta é cerca de 1 a 2 mL em cada olho. Além disso, essas amostras possuem um risco biológico muito elevado, que pode atingir tanto a equipe de laboratório como a população geral. Devido a isso, nos anos recentes vêm ganhando força o uso de técnicas de extração miniaturizadas, também conhecidas como microextrações. Essas técnicas foram desenvolvidas buscando diminuir o uso de solvente nocivos e a geração de resíduos, observando os princípios da química verde. Uma das técnicas em destaque, derivada da SPE, é a microextração em fase sólida, ou SPME (HE *et al.*, 2018).

As microextrações em fase sólida se utilizam de um sorvente ou meio de extração sólido e têm como vantagem: o uso mínimo de solventes, a possibilidade de reutilização de materiais e a extração direta de matrizes complexas sem filtração anterior. A microextração em fase sólida (SPME) é utilizada para diversas análises, além da toxicologia forense, como a toxicologia ambiental e a toxicologia de alimentos. A microextração em fase sólida convencional faz uso de uma fibra que pode ser composta por diferentes materiais, dependendo do tipo de

cromatografia utilizado. Para a cromatografia líquida, essas fibras são normalmente compostas de sílica com grupos de C18 funcionais. O processo de extração se dá em três etapas: o condicionamento da fibra em um solvente, a exposição da fibra na amostra para a extração dos compostos de interesse e, por fim, a dessorção em um solvente específico que é compatível com a injeção no equipamento analítico (HE *et al.*, 2018). Os diversos parâmetros dessas etapas podem ser otimizados utilizando planejamentos univariados e multivariados de experimentos por *softwares* estatísticos.

Além da SPME, outras microextrações em fase sólida que podem ser utilizadas são a microextração por sorvente empacotado (MEPS), a extração sortiva em barra de agitação (SBSE) e a *thin film solid phase microextraction* (TF-SPME). Na MEPS, se utiliza um cartucho, que contém o sorvente, dentro de uma seringa, sendo o condicionamento, extração e dessorção realizados em ciclos de aspiração da seringa. Uma vantagem desse tipo de dispositivo é a possibilidade de lavagem e reutilização, permitindo o uso do mesmo em diversas análises. Na SBSE, é utilizada uma barra de agitação revestida pelo material de extração sólido que é imersa na amostra aquosa. Ambas MEPS e SBSE foram bem-sucedidas na detecção de drogas de abuso em amostras biológicas (SILVA *et al.*, 2013). Por fim, a técnica de microextração por filme fino é amplamente utilizada para análises ambientais, podendo ser aplicado tanto para análises por *headspace* em GC-MS quanto para LC-MS. Seu princípio está no uso de uma folha, tipicamente de carbono, que é impregnada com um solvente, submersa na amostra para extração sendo o material extraído posteriormente dessorvido em um solvente apropriado ou aquecido a altas temperaturas para dessorção térmica, no caso de *headspace* (HE *et al.*, 2018; EMMONS *et al.*, 2020). Um esquema de microextração em fase sólida similar à TF-SPME que utiliza cortiça como sorvente está representado na **Figura 3**. Apesar das diversas técnicas de microextração desenvolvidas nos últimos anos, a grande maioria é somente aplicada a análises ambientais. Não foi encontrada nenhuma publicação referente a uma metodologia miniaturizada desenvolvida para a análise de humor vítreo. Apenas um estudo de 2022, por WOJTOWICZ *et al.*, analisa humor vítreo utilizando uma metodologia de SPME desenvolvida primariamente para a análise de sangue.

Figura 3. Metodologia de extração em fase sólida utilizando folha de cortiça como biossorvente.



1.4.1.1 Química verde e biossorventes

Nos últimos anos, além do crescimento do uso de microextrações, novas tendências em técnicas de extração vêm sendo exploradas e desenvolvidas com o objetivo de reduzir de modo geral a quantidade de reagentes utilizados e seus respectivos resíduos. Essas novas metodologias estão de acordo com os princípios da Química Verde que visam uma redução do impacto ambiental das análises químicas. A Química Verde é um termo que se refere a uma série de princípios que buscam reduzir ou eliminar substâncias e práticas deletérias para o meio-ambiente, estabelecidos por Anastas e Warner em 1998. Existem doze princípios gerais: prevenção, eficiência atômica, síntese segura, desenvolvimento de produtos seguros, uso de solventes seguros, eficiência de energia, uso de fontes de matéria-prima renovável, produtos degradáveis, catálise, análise em tempo real para prevenir poluição e química inerentemente mais segura para prevenir acidentes. Esses princípios são de extrema importância para reduzir o impacto ambiental dessas técnicas, mas ao mesmo tempo, reduzindo seu custo e sua complexidade, otimizando o processo como um todo (ANASTAS *et al.*, 2010).

Dentre as novas tendências em técnicas de extração, está a utilização de materiais sustentáveis, como os biossorventes, em substituição aos materiais comercialmente disponíveis.

Os biossorventes são materiais adsorventes provenientes de fontes biológicas, formados por macromoléculas capazes de interagir com outras moléculas orgânicas, como a celulose e a lignina. Dentre as propriedades dos biossorventes, as principais são a baixa densidade, a capacidade adsortiva, a porosidade e a área de superfície. Além disso, são materiais de baixo custo, reutilizáveis e biodegradáveis. Alguns exemplos de biossorventes encontrados na literatura são: cortiça, casca de amendoim, pó de bráctea (folha modificada de *Araucaria angustifolia*) e cascas de frutas (CARMO *et al.*, 2017; KHIAOPHONG *et al.*, 2022). Em 2021, OLIVEIRA *et al.* utilizaram revestimento de resíduos de biomateriais para o desenvolvimento de um método de microextração por barra adsortiva para detecção de antidepressivos em urina.

A cortiça é um material natural produzido a partir da casca do sobreiro (*Quercus suber*), uma árvore originária da região mediterrânea. A produção da cortiça começa com a retirada da casca da árvore, que é cortada ao redor da base, permitindo que ela cresça posteriormente. Essa casca é então curada, lavada e cortada em lâminas finas. Estas lâminas são prensadas para remover a umidade e produzir blocos de cortiça. A cortiça é composta por polissacarídeos, taninos, ácidos húmicos e alcaloides. Suas propriedades são alta elasticidade, resistência à água e ao calor, e baixo impacto ambiental. Estas propriedades fazem da cortiça um material valioso em uma variedade de aplicações, incluindo revestimentos de pisos e paredes, revestimentos de móveis, produtos de vedação, e aplicações em química analítica, como métodos de extração para análise por espectrometria de massa (PEREIRA, 2015; KNAPIC, 2016).

Recentemente, produtos de cortiça têm sido utilizados como adsorventes em novos métodos de microextração, devido a suas propriedades e a sua sustentabilidade. No ano de 2013, DIAS *et al.* desenvolveram com sucesso uma nova técnica de microextração em fase sólida (SPME), utilizando cortiça como revestimento da fibra de extração, para a determinação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em amostras de água fluvial. Entretanto, o processo de produção das fibras custa tempo e recursos. Em 2019, MANZO *et al.* utilizaram como material a folha de cortiça para a extração de hormônios da água, desenvolvendo um método de extração por disco rotativo sorvente (RDSE). Esta nova técnica provou que a cortiça apresenta vantagens como componente adsortivo em técnicas de extração, não apenas pelas suas propriedades e baixo custo, mas também pela simplicidade e rapidez com que pode ser aplicada, sem grande demanda de processamento anterior. Além disso, apresentou propriedades de ligação superiores a seus equivalentes sintéticos. Em 2017, MORÉS *et al.* analisaram contaminantes da água através de um método de microextração em filme fino de cortiça, aplicando este filme em uma placa de 96 poços, existindo ainda a possibilidade de automatização da técnica.

Diante do exposto, o uso de folhas de cortiça é muito promissor para o desenvolvimento de novas metodologias em conformidade com os princípios da Química Verde. Aliando esse método de preparo inovador ao uso de uma matriz biológica alternativa relativamente limpa como o humor vítreo, esse trabalho buscou desenvolver, otimizar e validar uma metodologia ambientalmente e analiticamente adequada, unindo os princípios da química verde com a melhor metodologia analítica disponível para a análise de uma série de fármacos psicotrópicos de interesse forense em amostras de humor vítreo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar de uma metodologia analítica para a análise de fármacos psicoativos em humor vítreo através do preparo de amostras por microextração utilizando folha de cortiça como biossorvente e posteriormente analisar por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.

2.2 Objetivos Específicos

Entre os objetivos específicos, elencam-se:

- i. Estabelecer da técnica instrumental para as análises;
- ii. Avaliar do procedimento de extração;
- iii. Otimizar das condições de extração;
- iv. Validar da metodologia analítica;
- v. Aplicar em amostras reais provenientes do Serviço de Verificação de Óbitos da Associação Hospitalar Vila Nova.

3 REFERÊNCIAS

- ANASTAS, Paul; EGHBALI, Nicolas. Green Chemistry: principles and practice. **Chem. Soc. Rev.**, [S.L.], v. 39, n. 1, p. 301-312, 2010. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/b918763b>.
- APA. **American Psychiatric Association**. Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5. 992 p. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- ARORA, Beauty; VELPANDIAN, Thirumurthy; SAXENA, Rohit; LALWANI, Sanjeev; DOGRA, T. D; GHOSE, Supriyo. Development and validation of an ESI-LC-MS/MS method for simultaneous identification and quantification of 24 analytes of forensic relevance in vitreous humour, whole blood and plasma. **Drug Testing And Analysis**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 86-97, 27 abr. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/dta.1797>.
- BAZMI, Elham; BEHNOUSH, Behnam; AKHGARI, Maryam; BAHMANABADI, Leila. Quantitative analysis of benzodiazepines in vitreous humor by high-performance liquid chromatography. **Sage Open Medicine**, [S.L.], v. 4, p. 205031211666624, 1 jan. 2016. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/2050312116666243>.
- BIRK, Letícia; OSSANES, Daniela; PETRY, Adriana Ubirajara Silva; MENEZES, Francisco Paz de; GONZAGA, Alexsandro Pinto; SCHLICKMANN, Paula Flores; ELLER, Sarah; OLIVEIRA, Tiago Franco de. Bioanalytical method for simultaneous determination of benzodiazepines in vitreous humor using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal Of Forensic And Legal Medicine**, [S.L.], v. 91, p. 102434, out. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jflm.2022.102434>.
- BOETTGER, Soenke; JENEWEIN, Josef; BREITBART, William. Haloperidol, risperidone, olanzapine and aripiprazole in the management of delirium: a comparison of efficacy, safety, and side effects. **Palliative And Supportive Care**, [S.L.], v. 13, n. 4, p. 1079-1085, 5 set. 2014. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s1478951514001059>.
- CABARCOS, P.; TABERNERO, M.J.; ÁLVAREZ, I.; LÓPEZ, P.; FERNÁNDEZ, P.; BERMEJO, A.M.. Analysis of Six Benzodiazepines in Vitreous Humor by High-Performance Liquid Chromatography-Photodiode-Array Detection. **Journal Of Analytical Toxicology**, [S.L.], v. 34, n. 9, p. 539-542, 1 nov. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jat/34.9.539>.
- CAMPOS, Eduardo Geraldo de; COSTA, Bruno Ruiz Brandão da; SANTOS, Fabiana Spinetti dos; MONEDAIRO, Fernanda; ALVES, Marcela Nogueira Rabelo; SANTOS JUNIOR, Wilson José Ramos; MARTINIS, Bruno Spinosa de. Alternative matrices in forensic toxicology: a critical review. **Forensic Toxicology**, [S.L.], v. 40, n. 1, p. 1-18, 19 ago. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11419-021-00596-5>.
- CARMO, Sângela Nascimento do; MERIB, Josias; DIAS, Adriana Neves; STOLBERG, Joni; BUDZIAK, Dilma; CARASEK, Eduardo. A low-cost biosorbent-based coating for the highly sensitive determination of organochlorine pesticides by solid-phase microextraction and gas chromatography-electron capture detection. **Journal Of Chromatography A**, [S.L.], v. 1525, p. 23-31, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2017.10.018>.
- CHEN, Yun; ZHOU, Hao; ZHOU, Yan; ZHOU, Fang. Prevalence of self-reported depression and anxiety among pediatric medical staff members during the COVID-19 outbreak in Guiyang, China. **Psychiatry Research**, [S.L.], v. 288, p. 113005, jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.psychres.2020.113005>.
- CLACK, Samuel; WARD, Tony. The Classification and Explanation of Depression. **Behaviour Change**, [S.L.], v. 36, n. 1, p. 41-55, 26 fev. 2019. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/bec.2019.4>.
- CLARKE, David M; CURRIE, Kay C. Depression, anxiety and their relationship with chronic diseases: a review of the epidemiology, risk and treatment evidence. **Medical Journal Of**

- Australia**, [S.L.], v. 190, n. 7, p. 1-7, abr. 2009. AMPCo. <http://dx.doi.org/10.5694/j.1326-5377.2009.tb02471.x>.
- DIAS, Taciana G. Costa; KIELING, Christian; GRAEFF-MARTINS, Ana Soledade; MORIYAMA, Tais S.; ROHDE, Luis A.; POLANCZYK, Guilherme V.. Developments and challenges in the diagnosis and treatment of ADHD. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, [S.L.], v. 35, n. 1, p. 40-50, 2013. EDITORA SCIENTIFIC. <http://dx.doi.org/10.1590/1516-4446-2013-s103>.
- DIAS, Adriana Neves; SIMÃO, Vanessa; MERIB, Josias; CARASEK, Eduardo. Cork as a new (green) coating for solid-phase microextraction: determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples by gas chromatography-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, [S.L.], v. 772, p. 33-39, abr. 2013. Elsevier BV.
- DOKKEDAL-SILVA, Vinícius; BERRO, Laís Fernanda; GALDURÓZ, José Carlos Fernandes; TUFIK, Sergio; ANDERSEN, Monica Levy. Clonazepam: indications, side effects, and potential for nonmedical use. **Harvard Review Of Psychiatry**, [S.L.], v. 27, n. 5, p. 279-289, 5 ago. 2019. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/hrp.0000000000000227>.
- DRUMMER, Olaf H.. Post-mortem toxicology. **Forensic Science International**, [S.L.], v. 165, n. 2-3, p. 199-203, jan. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.05.020>.
- EDINOFF, Amber N.; NIX, Catherine A.; HOLLIER, Janice; SAGRERA, Caroline E.; DELACROIX, Blake M.; ABUBAKAR, Tunde; CORNETT, Elyse M.; KAYE, Adam M.; KAYE, Alan D.. Benzodiazepines: uses, dangers, and clinical considerations. **Neurology International**, [S.L.], v. 13, n. 4, p. 594-607, 10 nov. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/neurolint13040059>.
- EMMONS, Ronald V.; LIDEN, Tiffany; SCHUG, Kevin A.; GIONFRIDDO, Emanuela. Optimization of thin film solid phase microextraction and data deconvolution methods for accurate characterization of organic compounds in produced water. **Journal Of Separation Science**, [S.L.], v. 43, n. 9-10, p. 1915-1924, 19 mar. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201901330>.
- FRICKE-GALINDO, Ingrid; LLERENA, Adrián; JUNG-COOK, Helgi; LÓPEZ-LÓPEZ, Marisol. Carbamazepine adverse drug reactions. **Expert Review Of Clinical Pharmacology**, [S.L.], v. 11, n. 7, p. 705-718, 19 jun. 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/17512433.2018.1486707>.
- GALERA, Marina Camargo; ROSSATO-GRANDO, Luciana Grazziotin. Post mortem changes: challenges in drug analysis in the diagnosis of deaths from intoxication. **Drug Analytical Research**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 14-18, 30 jun. 2021. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. <http://dx.doi.org/10.22456/2527-2616.111711>.
- GØTZSCHE, Peter C.; DINNAGE, Olivia. What have antidepressants been tested for? A systematic review. **International Journal Of Risk & Safety In Medicine**, [S.L.], v. 31, n. 3, p. 157-163, 12 ago. 2020. IOS Press. <http://dx.doi.org/10.3233/jrs-200006>.
- HE, Yi; CONCEIRO-GUISAN, Marta. Microextraction sample preparation techniques in forensic analytical toxicology. **Biomedical Chromatography**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 1-12, 20 dez. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bmc.4444>.
- HILLHOUSE, Todd M.; PORTER, Joseph H.. A brief history of the development of antidepressant drugs: from monoamines to glutamate. **Experimental And Clinical Psychopharmacology**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 1-21, fev. 2015. American Psychological Association (APA). <http://dx.doi.org/10.1037/a0038550>.
- HINZ, Júlia S.; MORÉS, Lucas; CARASEK, Eduardo. Exploring the use of cork pellets in bar adsorptive microextraction for the determination of organochloride pesticides in water samples with gas chromatography/electron capture detection quantification. **Journal Of**

- Chromatography A**, [S.L.], v. 1645, p. 462099, maio 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462099>.
- HUBBARD, Jacqueline; NAVARRETE, Aylmer L; FITZGERALD, Robert L; MCINTYRE, Iain M. Acidic Drug Concentrations in Postmortem Vitreous Humor and Peripheral Blood. **Journal Of Analytical Toxicology**, [S.L.], v. 45, n. 1, p. 69-75, 6 nov. 2019. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jat/bkz076>.
- ISHIKAWA, Aline Akemi; BORDIN, Dayanne Mozaner; CAMPOS, Eduardo Geraldo de; BLANES, Lucas; DOBLE, Philip; MARTINIS, Bruno Spinosa de. A Gas Chromatography–Mass Spectrometry Method for Toxicological Analysis of MDA, MDEA and MDMA in Vitreous Humor Samples from Victims of Car Accidents. **Journal Of Analytical Toxicology**, [S.L.], v. 42, n. 9, p. 661-666, 18 set. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jat/bky044>.
- JENKINS, Amanda J.; OBLOCK, Jeffrey. Phencyclidine and cannabinoids in vitreous humor. **Legal Medicine**, [S.L.], v. 10, n. 4, p. 201-203, jul. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.legalmed.2008.01.002>.
- KETOLA, Raimo A.; KRIIKKU, Pirkko. Drug concentrations in post-mortem specimens. **Drug Testing And Analysis**, [S.L.], v. 11, n. 9, p. 1338-1357, 9 jul. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/dta.2662>.
- KHIAOPHONG, Wannipha; JAROENSAN, Jedsada; KACHANGOON, Rawikan; VICHAPONG, Jitlada; BURAKHAM, Rodjana; SANTALADCHAIYAKIT, Yanawath; SRIJARANAI, Supalax. Modified Peanut Shell as an Eco-Friendly Biosorbent for Effective Extraction of Triazole Fungicide Residues in Surface Water and Honey Samples before Their Determination by High-Performance Liquid Chromatography. **Acs Omega**, [S.L.], v. 7, n. 39, p. 34877-34887, 20 set. 2022. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acsomega.2c03410>.
- KRUBE, Anneli; REBANE, Riin; KIPPER, Karin; OLDEKOP, Maarja-Liisa; EVARD, Hanno; HERODES, Koit; RAVIO, Pekka; LEITO, Ivo. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: part i. **Analytica Chimica Acta**, [S.L.], v. 870, p. 29-44, abr. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.017>.
- KUGELBERG, Fredrik C.; JONES, Alan Wayne. Interpreting results of ethanol analysis in postmortem specimens: a review of the literature. **Forensic Science International**, [S.L.], v. 165, n. 1, p. 10-29, jan. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.05.004>.
- LEIKIN, Jerrold B.; WATSON, William A.. Post-mortem Toxicology: what the dead can and cannot tell us. **Journal Of Toxicology: Clinical Toxicology**, [S.L.], v. 41, n. 1, p. 47-56, jan. 2003. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1081/clt-120018270>.
- MANDRIOLI, Roberto; MERCOLINI, Laura; RAGGI, Maria. Benzodiazepine Metabolism: an analytical perspective. **Current Drug Metabolism**, [S.L.], v. 9, n. 8, p. 827-844, 1 out. 2008. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/138920008786049258>.
- MANZO, Valentina; GOYA-PACHECO, Jairón; ARISMENDI, Daniel; BECERRA-HERRERA, Mercedes; CASTILLO-AGUIRRE, Alver; CASTILLO-FELICES, Rosario; ROSERO-MOREANO, Milton; CARASEK, Eduardo; RICHTER, Pablo. Cork sheet as a sorptive phase to extract hormones from water by rotating-disk sorptive extraction (RDSE). **Analytica Chimica Acta**, [S.L.], v. 1087, p. 1-10, dez. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2019.08.069>.
- MARKOWSKA, Joanna; SZOPA, Monika; ZAWADZKI, Marcin; PIEKOSZEWSKI, Wojciech. Vitreous humour – routine or alternative material for analysis in forensic medicine. **Archives Of Forensic Medicine And Criminology**, [S.L.], v. 67, n. 3, p. 201-213, 2017. Termedia Sp. z.o.o.. <http://dx.doi.org/10.5114/amsik.2017.73192>.
- MAURER, Hans H.. Current role of liquid chromatography–mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, [S.L.], v. 388, n. 7, p. 1315-

- 1325, 22 mar. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-007-1248-5>.
- METUSHI, Imir G.; FITZGERALD, Robert L.; MCINTYRE, Iain M.. Assessment and Comparison of Vitreous Humor as an Alternative Matrix for Forensic Toxicology Screening by GC–MS. *Journal Of Analytical Toxicology*, [S.L.], v. 40, n. 4, p. 243-247, 5 mar. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jat/bkw009>. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2013.02.021>.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Linha de cuidado para a atenção às pessoas com transtornos do espectro do autismo e suas famílias na rede de atenção psicossocial do sistema único de saúde. Brasil, 2015. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/linha_cuidado_atencao_pessoas_transtorno.pdf.
- MOITRA, Modhurima; SANTOMAURO, Damian; DEGENHARDT, Louisa; COLLINS, Pamela Y.; WHITEFORD, Harvey; VOS, Theo; FERRARI, Alize. Estimating the risk of suicide associated with mental disorders: a systematic review and meta-regression analysis. *Journal Of Psychiatric Research*, [S.L.], v. 137, p. 242-249, maio 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsychires.2021.02.053>.
- MOORE, R Andrew; DERRY, Sheena; ALDINGTON, Dominic; COLE, Peter; WIFFEN, Philip J. Amitriptyline for fibromyalgia in adults. *Cochrane Database Of Systematic Reviews*, [S.L.], v. 2019, n. 5, p. 1-42, 31 jul. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.cd011824>.
- MORELLI, Diogo C.; MAFRA, Gabriela; SANTOS, Amanda V.; MERIB, Josias; CARASEK, Eduardo. Designing a green device to BAμE: recycled cork pellet as extraction phase for the determination of parabens in river water samples. *Talanta*, [S.L.], v. 219, p. 121369, nov. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121369>.
- MORENO, Ricardo Alberto; MORENO, Doris Hupfeld; SOARES, Márcia Britto de Macedo. Psicofarmacologia de antidepressivos. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 24-40, maio 1999. EDITORA SCIENTIFIC. <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-44461999000500006>.
- MORÉS, Lucas; DIAS, Adriana Neves; CARASEK, Eduardo. Development of a high-throughput method based on thin-film microextraction using a 96-well plate system with a cork coating for the extraction of emerging contaminants in river water samples. *Journal Of Separation Science*, [S.L.], v. 41, n. 3, p. 697-703, 14 dez. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201700774>.
- NTOUPA, Panagoula-Stamatina A.; ARMAOS, Konstantinos P.; ATHANASELIS, Sotiris A.; SPILIOPOULOU, Chara A.; PAPOUTSIS, Ioannis I.. Study of the distribution of antidepressant drugs in vitreous humor using a validated GC/MS method. *Forensic Science International*, [S.L.], v. 317, p. 110547, dez. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110547>.
- OLFSON, Mark; BLANCO, Carlos; MARCUS, Steven C.. Treatment of Adult Depression in the United States. *Jama Internal Medicine*, [S.L.], v. 176, n. 10, p. 1482, 1 out. 2016. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jamainternmed.2016.5057>.
- OLIVEIRA, Mariana N.; GONÇALVES, Oriana C.; AHMAD, Samir M.; SCHNEIDER, Jaderson K.; KRAUSE, Laiza C.; NENG, Nuno R.; CARAMÃO, Elina B.; NOGUEIRA, José M. F.. Application of Bar Adsorptive Microextraction for the Determination of Levels of Tricyclic Antidepressants in Urine Samples. *Molecules*, [S.L.], v. 26, n. 11, p. 3101, 22 maio 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26113101>.
- PARIS, Joel; BLACK, Donald W.. Borderline Personality Disorder and Bipolar Disorder. *Journal Of Nervous & Mental Disease*, [S.L.], v. 203, n. 1, p. 3-7, jan. 2015. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/nmd.0000000000000225>.

- PENNINX, Brenda Wjh; PINE, Daniel s; A HOLMES, Emily; REIF, Andreas. Anxiety disorders. **The Lancet**, [S.L.], v. 397, n. 10277, p. 914-927, mar. 2021. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)00359-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(21)00359-7).
- PIGAIANI, Nicola; BERTASO, Anna; PALO, Elio Franco de; BORTOLOTTI, Federica; TAGLIARO, Franco. Vitreous humor endogenous compounds analysis for post-mortem forensic investigation. **Forensic Science International**, [S.L.], v. 310, p. 110235, maio 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110235>.
- REYES-GARCÉS, Nathaly; GIONFRIDDO, Emanuela; GÓMEZ-RÍOS, German Augusto; ALAM, Md. Nazmul; BOYACđ, Ezel; BOJKO, Barbara; SINGH, Varoon; GRANDY, Jonathan; PAWLISZYN, Janusz. Advances in Solid Phase Microextraction and Perspective on Future Directions. **Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 90, n. 1, p. 302-360, 8 nov. 2017. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04502>.
- ROY-BYRNE, Peter P; CRASKE, Michelle G; STEIN, Murray B. Panic disorder. **The Lancet**, [S.L.], v. 368, n. 9540, p. 1023-1032, set. 2006. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(06\)69418-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(06)69418-x).
- SAMANIDOU, V.F.; NIKA, M.K.; PAPADOYANNIS, I.N.. HPLC and its Essential Role in the Analysis of Tricyclic Antidepressants in Biological Samples. **Recent Advances In Medicinal Chemistry**, [S.L.], p. 332-380, 2014. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-803961-8.50011-7>.
- SANTOMAURO, Damian F; HERRERA, Ana M Mantilla; SHADID, Jamileh; ZHENG, Peng; ASHBAUGH, Charlie; PIGOTT, David M; ABBAFATI, Cristiana; ADOLPH, Christopher; AMLAG, Joanne O; ARAVKIN, Aleksandr y. Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic. **The Lancet**, [S.L.], v. 398, n. 10312, p. 1700-1712, nov. 2021. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)02143-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(21)02143-7).
- SARANGI, Ashish; MCMAHON, Terry; GUDE, Jayasudha. Benzodiazepine Misuse: an epidemic within a pandemic. **Cureus**, [S.L.], v. 6, n. 13, p. 1-9, 21 jun. 2021. Cureus, Inc.. <http://dx.doi.org/10.7759/cureus.15816>.
- SCHWENK, Eric S.; PRADHAN, Basant; NALAMASU, Rohit; STOLLE, Lucas; WAINER, Irving W.; CIRULLO, Michael; OLSON, Alexander; PERGOLIZZI, Joseph V.; TORJMAN, Marc C.; VISCUSI, Eugene R.. Ketamine in the Past, Present, and Future: mechanisms, metabolites, and toxicity. **Current Pain And Headache Reports**, [S.L.], v. 25, n. 9, p. 1-14, 16 jul. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11916-021-00977-w>.
- SILVA, Erica A. Souza; RISTICEVIC, Sanja; PAWLISZYN, Janusz. Recent trends in SPME concerning sorbent materials, configurations and in vivo applications. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 43, p. 24-36, fev. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2012.10.006>.
- SKOPP, Gisela. Postmortem toxicology. **Forensic Science, Medicine, And Pathology**, [S.L.], v. 6, n. 4, p. 314-325, 4 mar. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12024-010-9150-4>.
- SOUZA, Amanda Lacerda de; SILVA, Wagner Resende; PIVA, Leticia. Prescrição e uso de antidepressivos em adolescentes: uma revisão sistemática. **Scire Salutis**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 253-261, 22 out. 2021. Companhia Brasileira de Producao Cientifica. <http://dx.doi.org/10.6008/cbpc2236-9600.2022.001.0028>.
- SUWAłA, Justyna; MACHOWSKA, Marta; WIELA-HOJEńSKA, Anna. Venlafaxine pharmacogenetics: a comprehensive review. **Pharmacogenomics**, [S.L.], v. 20, n. 11, p. 829-845, jul. 2019. Future Medicine Ltd. <http://dx.doi.org/10.2217/pgs-2019-0031>.

- VINDEGAARD, Nina; BENROS, Michael Eriksen. COVID-19 pandemic and mental health consequences: systematic review of the current evidence. **Brain, Behavior, And Immunity**, [S.L.], v. 89, p. 531-542, out. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2020.05.048>.
- WACHEŃKO, Olga; SZPOT, Paweł; TUSIEWICZ, Kaja; NOWAK, Karolina; CHŁOPAŚ-KONOWAŁEK, Agnieszka; ZAWADZKI, Marcin. An ultra-sensitive UHPLC-QqQ-MS/MS method for determination of 54 benzodiazepines (pharmaceutical drugs, NPS and metabolites) and z-drugs in biological samples. **Talanta**, [S.L.], v. 251, p. 123816, jan. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123816>.
- WEINTRAUB, Steven J.. Diazepam in the Treatment of Moderate to Severe Alcohol Withdrawal. **Cns Drugs**, [S.L.], v. 31, n. 2, p. 87-95, 18 jan. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s40263-016-0403-y>.
- WÓJTOWICZ, Anna; RECIĄK, Marcin; NOWAK, Paweł Mateusz; WIETECHAPOSIUSZNY, Renata. A sustainable approach for the stability study of psychotropic substances using vitreous humor and liver as alternative matrices. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, [S.L.], v. 414, n. 21, p. 6355-6370, 5 maio 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-022-04064-w>.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World mental health report: transforming mental health for all. Geneva, 2022. *E-book* (296 p.). ISBN 978-92-4-004933-8. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1433523/retrieve>. Acesso em: 31 jan. 2023.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Suicide worldwide in 2019. Geneva, 2021. 35 p. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240026643>. Acesso em: 31 jan. 2023.
- XIAO, Han; ZHANG, Yan; KONG, Desheng; LI, Shiyue; YANG, Ningxi. The Effects of Social Support on Sleep Quality of Medical Staff Treating Patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in January and February 2020 in China. **Medical Science Monitor**, [S.L.], v. 26, n. 923549, p. 1-8, 5 mar. 2020. International Scientific Information, Inc.. <http://dx.doi.org/10.12659/msm.923549>.

4 MANUSCRITO

O manuscrito “**Cork sheet as an efficient biosorbent for forensic toxicology: application to vitreous humor analysis**”, que conta com a parte experimental desenvolvida nesta dissertação, foi submetido para publicação na revista Journal of Analytical Toxicology (ISSN Online 1945-2403, fator de impacto 3.367, 2022) e está apresentado a seguir. As normas de publicação estão disponíveis no **Anexo A**.

Cork sheet as an efficient biosorbent for forensic toxicology: application to vitreous humor analysis

Daniela Souza Ossanes¹; Letícia Birk¹; Adriana Ubirajara Silva Petry^{1,2}; Francisco Paz de Menezes²; Alessandro Pinto Gonzaga²; Paula Flores Schlickmann²; Sarah Eller¹; Tiago Franco de Oliveira¹.

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

²Division of Postmortem Inspection, Associação Hospitalar Vila Nova, Porto Alegre, RS 91750-040, Brazil.

Corresponding author (T. F. Oliveira)

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

Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil

Phone number: +55 11 94193-1192

Abstract

There is an increasing number of people affected worldwide by mental health disorders such as depression and anxiety. One of the main courses of treatment, along with psychotherapy, is the use of psychoactive medications, like antidepressants and benzodiazepines. Also, the unprescribed use of these substances is a concerning public health issue. Hence, the analysis of psychotropic medications is mandatory in postmortem toxicology and various biological samples can be used for this detection, among them the vitreous humor (VH) stands out. Also, there is a demand for more sustainable and more efficient extraction methodologies according to green chemistry. An example is solid phase microextraction techniques (SPME), which use a solid sorbent and small solvent amounts. Biosorbents are substances of natural origin with sorptive properties, and they have been successfully used in SPME in environmental toxicology for water analysis, mainly. Therefore, this study aimed to develop a sustainable, fast, cheap, and simple SPME methodology using cork sheet stripes as a biosorbent, to extract antidepressants, benzodiazepines, and others from vitreous humor samples by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The extraction methodology was conducted in a 96-well plate and optimization of relevant parameters for extraction was performed. For solvent optimization, two simplex-centroid experiments were planned for extraction and desorption and to evaluate time and pH, a Doehlert design experiment was performed. Subsequently, the analytical method for the determination and quantification of 17 substances by LC-MS/MS was validated. The quantification limits were 5 ng/mL for all analytes and the calibration curves were linear between 5 and 30 ng/mL. This study was able to develop an efficient, cheap, simple, and fast microextraction method for 17 analytes in VH samples, using strips of cork sheet for extraction and a 96-well plate as a container. Furthermore, this approach system could be automated for routine toxicology laboratories.

Keywords: vitreous humor, biosorbent, pharmaceuticals, forensic toxicology, cork.

Introduction

The consumption of psychotropic pharmaceuticals for the treatment of mental health disorders is growing rapidly worldwide. Depression and anxiety disorders are a global health concern and the two drug categories primarily used for the treatment of these diseases are antidepressants and benzodiazepines, respectively (1-4). These substances are widely prescribed, therefore becoming misused by many people (2). In this context these pharmaceuticals can be abused and cause dependence, being an important cause of intoxication and negative outcomes. Therefore, the toxicological analysis of psychotropic pharmaceuticals is extremely relevant in the forensic investigations (5,6).

Postmortem analysis is mandatory to help determine the cause of death in cases involving substance abuse (5). The main sample evaluated in these cases is blood, due to the correlation between the presence of a substance and the related effect. However, there are some issues with blood analysis mainly related to decomposition, putrefaction, redistribution, and contamination postmortem phenomena (6,7). Therefore, new methodologies are required, and the analysis of alternative matrices is a promising resource to overcome these limitations. Over all types of alternative biological samples, the employment of vitreous humor has been showing a great analytical potential for the analysis of drugs (7,8,9).

Vitreous humor has a simple constitution, being mainly composed of water along with collagen and other proteins such as glycosaminoglycans. It is anatomically isolated inside the eyeball, therefore being less prone to contamination, decomposition, and postmortem redistribution than blood. The use of vitreous humor has already been established as the gold standard for the analysis of alcohol (7-10). Gas chromatography coupled to mass spectrometry and high-pressure liquid chromatography with diode array detector methods has already been developed for the analysis of various drugs of abuse in vitreous humor (10-15). However, the

most specific and sensitive analytical technique is liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS/MS) (16-19).

Along with the use of alternative matrices, the search for sustainable microextraction techniques has been growing rapidly in the field of analytical toxicology. These methods are usually concerned with following the principles of Green Analytical Chemistry, pursuing cheaper, faster, safer, and simpler techniques (20-23). Green methods are known for the reduction of reagents and for the use of biodegradable materials which are less toxic for the environment as well for the operator (22,23). Good examples of “green” materials are biosorbents, which are substances with natural origins that are by-products of agricultural production and can be reutilized for sample preparation techniques.

One biosorbent that is gaining attention in this field is cork (24-29). Cork is a plant-derived biodegradable material usually employed in stoppers for wine bottles. Cork sheet has already been successfully applied in extraction methods for environmental toxicological analysis with the detection of various analytes, such as parabens, polycyclic aromatic hydrocarbons, organochloride pesticides, and hormones, among other water pollutants (24-29). Additionally, laminar cork has been used as a sorptive phase for the extraction of hormones in the water. The efficiency of cork sheets in rotating-disk sorptive extraction (RDSE) was compared to commonly used commercial phases. Recovery results for cork were greater or showed no significant difference (26). Moreover, laminar cork was also employed in RDSE for the determination of 20 organic micro-pollutants in water samples (28). However, there has been little exploration of these eco-efficient microextraction methodologies for the analysis of biological samples (29). Therefore, this study aimed to ally the use of an alternative biological sample such as vitreous humor with the development of a sustainable extraction method based on the use of cork as a biosorbent for the analysis of psychoactive pharmaceuticals in forensic cases.

Experimental

Reagents and standards

A work solution containing seventeen substances of interest was prepared. The list of analytes, as well as their formula, pharmaceutical group, and chemical properties are shown in **Table I**. The analytical standards of these substances, along with the internal standard of ketamine-*d*₄, were purchased from Cerilliant Corporation (Round Rock, TX, USA). Work solutions were prepared in concentrations of 100 ng/mL, by the dilution of the analytical standards in ultrapure water. The internal standard work solution of ketamine-*d*₄ was prepared by dilution in ultrapure water at a concentration of 100 ng/mL. All solutions were stored at -20 °C while not in use. LC-MS grade solvents, such as acetonitrile and methanol, and other extraction solvents, such as acetone, ethyl acetate, and methyl-tert-butyl ether (MTBE) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany) while 98% purity formic acid was obtained from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Ultrapure water was achieved using a Milli-Q system (Millipore, Billerica, MA, USA). The cork sheet was purchased from local commercial brand, with 600 x 450 mm dimensions and 1 mm of thickness.

Vitreous humor samples

A pool of blank vitreous humor samples was used for the development, optimization, and validation of the method. To ensure the samples' negativity, they were previously analyzed by the proposed method. All VH samples were obtained from cases attended by the Obits Verification Center of Hospital Vila Nova, in the city of Porto Alegre, Brazil. Collection of specimens was performed by aspiration with a syringe from both eyes and vitreous humor samples were stored at -20 °C. The project was previously approved by the university's ethics committee, approval number 17996819.7.0000.5345.

Cork sheet pretreatment

Before the employment in the extraction, cork sheets were submitted to a pretreatment to avoid possible contamination following a similar protocol as the one described by Manzo *et al.* (2019). This procedure consisted of the addition of methanol to a piece of cork sheet and sonication for 30 minutes. The sonication was performed five times with solvent replacement until the disappearance of the yellow color. Afterward, the sheets were oven dried at 70 °C for 30 minutes and cut into 5 mm x 15 mm stripes.

Sample preparation procedure

The extraction was performed in a 96-deep well plate over an orbital shaker at 300 rpm. The three steps of the extraction procedure were conducted in one well each, accounting for three wells for one experiment. First, a cork sheet stripe was submerged in 1 mL of the conditioning solvent for two minutes being agitated at 300 rpm. Before that, the cork stripe was transferred to 1 mL of a diluted sample solution, containing 200 µL of vitreous humor and 800 µL of ultrapure water and the extraction occurred for 15 min at 300 rpm. Lastly, the cork stripe was transferred to 1 mL of the desorption solvent for two minutes at 300 rpm. Subsequently, the desorption solvent was collected and dried under a nitrogen stream. Finally, the residue was reconstituted with 20 µL LC-MS grade methanol and 2 µL of the extract was injected into the LC-MS/MS system.

Extraction method optimization

Two simplex-centroid design experiments were planned to optimize the best solvents for the conditioning and desorption steps described previously. For the conditioning solvent, mixtures of acetone, acetonitrile, and methanol were tested. Desorption was evaluated employing

mixtures of acetonitrile, ethyl acetate, and MTBE. Afterward, a Doehlert design experiment was performed to determine the optimal conditions of pH and time for this extraction procedure.

LC-MS/MS analysis

Samples were analyzed on a Nexera-i LC-2040C Plus UHPLC system coupled to a LCMS-8045 triple quadrupole mass spectrometer (Shimadzu, Japan). Chromatographic separation was performed on an Acquity UPLC® BEH C18 (1.7 μ m, 2.1 x 50 mm) column (Waters, USA) maintained at 50 °C. The flow rate was 0.3 mL/min while the mobile phases were composed of water (A) and acetonitrile (B) both containing 0.1% formic acid. Gradient elution was as follows: 0 – 0.7 min, 2 % of B; 0.7 – 6.5 min, 100 % of B; 6.5 – 7.5 min, 100% of B; 7.5 – 8 min, 2% of B; 8 – 12 min, 2% of B. Electrospray ionization was performed in positive mode, applying the following parameters: nebulizing gas flow, 3 L/min; heating gas flow, 10 L/min; drying gas flow, 10 L/min; interface temperature, 300 °C; desolvation temperature, 525 °C; DL temperature, 250 °C; heat block temperature, 400 °C. Detection was performed in multiple reaction monitoring (MRM) mode. MRM transitions were optimized automatically by the software through the infusion of each analytical standard at 10 μ g/mL. The optimized transitions and respective collision energies are described in Table I. Data processing was performed using the LabSolutions software (Shimadzu, Japan).

Method validation

The proposed method was validated in accordance with the ANSI/ASB 036 guidelines for Standard Procedures for Method Validation in Forensic Toxicology (30). Lower limits of quantification (LLOQs) were established by analyzing nine replicates of blank matrices from three distinct sources, with concentrations being reduced until the coefficient of variation (CV) of the replicates was less than 20%. The development of calibration curves with the following

concentrations for all analytes allowed for the investigation of linearity: 5, 10, 15, 20, 25, 30, and 30 ng/mL. Cochran's C test was used to assess the calibration curves' homogeneity of variances. Three blank samples were injected following the calibration curves' peak to measure carryover. Three levels of quality control (QC) samples were created for accuracy and precision studies: 12 ng/mL (low QC), 18 ng/mL (medium QC), and 26 ng/mL (high QC). One-way analysis of variance was used to calculate the data within and between precision runs from three replicates of each quality control level in five distinct runs (ANOVA test). The analysis of 10 blank matrices was used to evaluate the endogenous selectivity and verify the existence of interferences. In addition, exogenous selectivity in the low QC was verified by adding caffeine, ephedrine, and cocaine at a concentration of 100 ng/mL. Finally, two sets of tests were conducted to evaluate ionization suppression/enhancement: the first set included six replicates of the analytical standards for both low and high QC levels, and the second set included duplicates of 10 different blank matrices that had been fortified post-extraction, also for both high and low QC.

Results and discussion

Sample preparation procedure

The use of cork as a sorbent material in forensic toxicology assays has shown promising results for the extraction and determination of various analytes in biological samples. The choice of cork as a sorbent is attributed to its high porosity, low cost, and availability. In a study conducted by Birk et al. (31), cork was employed as a sorbent to determine new psychoactive substances (NPS) in postmortem blood samples. The LLOQs obtained for NPS varied from 0.5 to 5 ng/mL. The cork also was utilized in forensic toxicology assays to extract pharmaceuticals from urine samples using disposable pipette extraction. Mafra and collaborators obtained a limit of quantification (LLOQs) ranging from 5 to 10 ng/mL (32). The findings of these studies

suggest that cork can be a valuable alternative to other sorbent materials used in forensic toxicology assays, and further research can be conducted to explore its potential in other applications.

The careful selection of an appropriate extraction solvent is a critical factor that must be evaluated when using cork as a biosorbent material. The choice depends on several factors, including the target analyte's physical and chemical properties and the sample matrix. In the method proposed, both the extraction solvent and desorption solvent were optimized using simplex-centroid planning. The extraction solvent experiments showed that a 1:1 mixture of methanol and acetonitrile was the optimal condition. As for the desorption solvent, the best conditions were found with a mixture of the three solvents used: acetonitrile, ethyl acetate, and MTBE. The selection of the best condition was carried out visually based on the mathematical model generated. This is observed in Figures 1 and 2, respectively, where the red area represents the best response.

The pH adjustment can significantly impact the ionization state of the target analyte, affecting its solubility, stability, and interaction with other molecules in the sample matrix. Therefore, in order to obtain the best condition, the Doehlert design was performed for the analysis of both extraction time and sample pH levels resulting in a better performance at 15 minutes and with a neutral pH of 7, as is observed in Figure 3. This relatively short time interval is advantageous, making the current method fast. Also, the neutral pH is in agreement with the literature findings, as a mean, since benzodiazepines present a wide range of pKa values (33,34). The aqueous medium's pH is also neutral, excluding the need for an adjustment step, contributing to the quickness and simplicity of the method.

Method validation

The current method was successfully validated and showed high sensitivity. The lower limits of quantification (LLOQs) were determined to be 5 ng/mL for all substances. The linearity parameters were satisfied as all seventeen analytes showed a determination coefficient (r^2) higher than 0.99 as can be observed in Table II. Accuracy and precision tests were performed. Bias showed a variation between 85.7 and 117.8% while within-run precision and between-run precision variation coefficients were between 3.07 and 14.75%, as described in Table II. This analytical method has proven to be selective and sensitive, as LC-MS/MS is the most adequate system to perform this analysis. This analytical method has proven to be selective and sensitive, as LC-MS/MS is the most adequate system to perform this analysis. Multiple reaction monitoring (MRM) chromatograms obtained by LC-MS/MS of a low quality control are shown in Figure 4. GC-MS analysis of antidepressants by Ntouna et al. found a LLOQ of 5 ng/mL. Cartiser et al. found a LLOQ of 10 ng/mL for three out of four benzodiazepines. As for LC-MS methods, Birk et al. found a limit of 1 ng/mL in the analysis of eight benzodiazepines. More complex analyses, with more than ten substances of interest, such as Arora et al., found higher LLOQs, ranging from 7.8 to 11.7 ng/mL. As for the extraction procedures used in the vitreous humor, most studies utilized conventional SPE techniques, which require an elevated investment in cartridges (11,12,15,18).

Some studies have developed different SPME methods using cork as a biosorbent in environmental analysis. Most of these analyzed water samples, such as Dias et al., Hinz et al., and Manzo et al. (24-28). Morés et al. successfully applied a 96-well-plate system for the analysis of contaminants in river water (28). However, there has not been any applications of cork as a biosorbent for the extraction of medications in biological samples and only one study by Oliveira et al. developed a bar adsorptive microextraction method for the detection of tricyclic antidepressants in urine (29).

Therefore, the currently developed methodology has many advantages. It is fast, simple, and cheap. The cork sheet material is easily accessible in stationery stores. It not only reduces the cost of extraction materials but also reduces environmental damage since it is biodegradable and reusable. Moreover, it uses a small volume of vitreous humor, which is extremely relevant, since this matrix has limited availability (17).

Analysis of real samples

A total of 56 samples were analyzed, with two samples being positive for the compounds of interest. Fluoxetine and amitriptyline were identified and quantified in one sample each. The respective concentrations were 28.39 ng/mL for fluoxetine and 14.27 ng/mL for amitriptyline. Moreover, nortriptyline was detected in this last sample, but below LLOQ levels. Arora et al. found two positive cases of diazepam, ranging from 11.6 to 16.8 ng/mL (16). Also, Bazmi et al. identified this substance in seven samples, with a higher range of 115.71 to 2557.3 ng/mL (14). As for the antidepressants, both amitriptyline and nortriptyline were identified by Ntoupa et al. in three forensic cases, ranging from 49.4 - 147.0 ng/mL and 45.6 - 58.2 ng/mL, respectively. Fluoxetine and sertraline were detected twice each in this same study, with concentrations ranging from 34.1 - 90.4 ng/mL and 54.1 - 60.4 ng/mL, correspondingly (11). These concentrations found in real cases in the literature are quite similar with the concentrations detected in this study's analysis, thus corroborating these findings.

Conclusion

A novel, cost-effective, time-efficient, sustainable, and miniaturized method for the analysis of multiple psychoactive substances of interest in postmortem toxicology was developed and applied to vitreous humor samples. The method utilizes cork as a biosorbent material, which is a unique feature as there are limited miniaturized methodologies utilizing cork as a biosorbent

in biological matrices, and none using vitreous humor as a matrix. The sample preparation technique employed in this method has the potential to be validated for various other drugs of abuse. The method's simplicity and sustainability make it a promising alternative to conventional techniques, which are often resource-intensive and time-consuming. Therefore, the technique's applicability and potential for automation can facilitate the efficient analysis of large numbers of samples and could have significant implications for forensic toxicology investigations.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the financial support from the Coordination of Improvement of Personal Higher Education, Brazil [CAPES-Finance Code 001].

Conflict of Interest

There are no financial or other relations that could lead to a conflict of interest.

References

1. Penninx, B.W., Pine, D., Holmes, E., and Reif, A. (2021) Anxiety disorders. *The Lancet*, 397, 914-927.
2. Olfson, M., Blanco, C., and Marcus, S. (2016) Treatment of adult depression in the United States. *Jama Internal Medicine*, 176, 1482.
3. Gøtzsche, P.C., and Dinnage, O. (2020) What have antidepressants been tested for? A systematic review. *International Journal of Risk & Safety in Medicine*, 31, 157-163.
4. Edinoff, A.N., Nix, C.A., Hollier, J., Sagrera, C.E., Delacroix, B.M., Abubakar, T., et al. (2021) Benzodiazepines: uses, dangers, and clinical considerations. *Neurology International*, 13, 594-607.
5. Galera, M.C., and Rossato-Grando, L.G. (2021) Post mortem changes: challenges in drug analysis in the diagnosis of deaths from intoxication. *Drug Analytical Research*, 5, 14-18.
6. Campos, E.G., Costa, B.R.B., Santos, F.S., Monedeiro, F., Alves, M.N.R., Santos, W.J.R., et al. (2021) Alternative matrices in forensic toxicology: a critical review. *Forensic Toxicology*, 40, 1-18.
7. Markowska, J., Szopa, M., Zawadki, M., and Piekoszewski, W. (2017) Vitreous humour – routine or alternative material for analysis in forensic medicine. *Archives of Forensic Medicine and Criminology*, 67, 201-213.

8. Ishikawa, A.A., Bordin, D.M., Campos, E.G., Blanes, L., Doble, P., and Martinis, B.S. (2018) A gas chromatography–mass spectrometry method for toxicological analysis of MDA, MDEA and MDMA in vitreous humor samples from victims of car accidents. *Journal of Analytical Toxicology*, 165, 10-29.
9. Kugelberg, F.C., and Jones, A.W. (2007) Interpreting results of ethanol analysis in postmortem specimens: a review of the literature. *Forensic Science International*, 165, 10-29.
10. Santos, M.F., Yamada, A., Seulin, S.C., Leyton, V., Pasqualucci, C.A.G., Muñoz, D.R., et al. (2016) Liquid-phase microextraction and gas chromatographic-mass spectrometric analysis of antidepressants in vitreous humor: study of matrix effect of human and bovine vitreous and saline solution. *Journal of Analytical Toxicology*, 40, 187-193.
11. Ntoupa, P.A., Armaos, K.P., Athanaselis, S.A., Spiliopoulou, C.A., and Papoutsis, I.L. (2020) Study of the distribution of antidepressant drugs in vitreous humor using a validated GC/MS method. *Forensic Science International*. doi: 10.1016/j.forsciint.2020.110547
12. Metushi, I.G., Fitzgerald, R.L., and McIntyre, I.M. (2016) Assessment and comparison of vitreous humor as an alternative matrix for forensic toxicology screening by GC–MS. *Journal of Analytical Toxicology*, 40, 243-247.
13. Cartiser, N., Bévalot, F., Meur, C., Gaillard, Y., Malicier, D., Hubert, N., et al. (2011) Gas chromatography–tandem mass spectrometry assay for the quantification of four benzodiazepines and citalopram in eleven postmortem rabbit fluids and tissues, with application to animal and human samples. *Journal of Chromatography B*, 879, 2909-2918.
14. Bazmi, E., Behnoush, B., Akhgari, M., and Bahmanabadi, L. (2016) Quantitative analysis of benzodiazepines in vitreous humor by high-performance liquid chromatography. *Sage Open Medicine*. doi: 10.1177/2050312116666243
15. Cabarcos, P., Tabernero, M.J., Álvarez, I., López, P., Fernández, P., and Bermejo, A.M. (2010) Analysis of six benzodiazepines in vitreous humor by high-performance liquid chromatography-photodiode-array detection. *Journal of Analytical Toxicology*, 34, 539-542.
16. Arora, B., Velpandian, T., Saxena, R., Lalwani, S., Dogra, T.D., and Ghose, S. (2015) Development and validation of an ESI-LC-MS/MS method for simultaneous identification and quantification of 24 analytes of forensic relevance in vitreous humour, whole blood and plasma. *Drug Testing and Analysis*, 8, 86-97.
17. Birk, L., Ossanes, D., Petry, A.U.S., Menezes, F.P., Gonzaga, A.P., Schlickmann, P.F., et al. (2022) Bioanalytical method for simultaneous determination of benzodiazepines in vitreous humor using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Forensic and Legal Medicine*. doi: 10.1016/j.jflm.2022.102434
18. Pelander, A., Ristimaa, J., and Ojanpera, I. (2010) Vitreous humor as an alternative matrix for comprehensive drug screening in postmortem toxicology by liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 34, 312-318.
19. Øiestad, A.M.L., Karinen, R., Rogde, S., Nilsen, S., Eldor, K.B., Brochmann, G., et al. (2018) Comparative study of postmortem concentrations of antidepressants in several different matrices. *Journal of Analytical Toxicology*, 42, 446-458.
20. Anastas, P., and Eghbali, N. (2010) Green Chemistry: principles and practice. *Chemical Society Reviews*, 39, 301-312.
21. Aly, A., and Górecki, T. (2020) Green approaches to sample preparation based on extraction techniques. *Molecules*, 25, 17-19.
22. Gałaszka, A., Migaszewski, Z., and Namiesnik, J. (2013) The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *Trac:Trends in Analytical Chemistry*, 50, 78-84.

23. López-Lorente, A., Pena-Pereira, F., Pedersen-Bjergaard, S., and Zuin, V.G. (2022) The ten principles of green sample preparation. *Trac:Trends in Analytical Chemistry*. doi: 10.1016/j.trac.2022.116530
24. Dias, A.N., Simão, V., Merib, J., and Carasek, E. (2015) Use of green coating (cork) in solid-phase microextraction for the determination of organochlorine pesticides in water by gas chromatography-electron capture detection. *Talanta*, 134, 409-414.
25. Hinz, J., Morés, L., and Carasek, E. (2021) Exploring the use of cork pellets in bar adsorptive microextraction for the determination of organochloride pesticides in water samples with gas chromatography/electron capture detection quantification. *Journal of Chromatography A*. doi: 10.1016/j.chroma.2021.462099
26. Manzo, V., Goya-Pacheco, J., Arismendi, D., Becerra-Herrera, M., Castillo-Aguirre, A., Castillo-Felices, R., et al. (2020) Cork sheet as a sorptive phase to extract hormones from water by rotating-disk sorptive extraction (RDSE). *Analytica Chimica Acta*. doi: 10.1016/j.aca.2019.08.069
27. Morelli, D.C., Mafra, G., Santos, A.V., Merib, J., and Carasek, E. (2020) Designing a green device to BA μ E: recycled cork pellet as extraction phase for the determination of parabens in river water samples. *Talanta*. doi: 10.1016/j.talanta.2020.121369
28. Morés, L., Dias, A.N., and Carasek, E. (2017) Development of a high-throughput method based on thin-film microextraction using a 96-well plate system with a cork coating for the extraction of emerging contaminants in river water samples. *Journal of Separation Science*, 41, 697-703.
29. Oliveira, M.N., Gonçalves, O.C., Ahmad, S.M., Schneider, J.K., Krause, L.C., Neng, N.R., et al. (2021) Application of bar adsorptive microextraction for the determination of levels of tricyclic antidepressants in urine samples. *Molecules*, 26, 3101.
30. (2019) AAFS Standards Board 2019, Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. American Academy of Forensic Sciences. http://www.asbstandardsboard.org/wp-content/uploads/2019/11/036_Std_e1.pdf
31. Birk, L., Eller, S., & De Oliveira, T. F. (2022). Expanding the use of cork as biosorbent through the determination of new psychoactive substances in postmortem blood samples. *Toxicologie Analytique et Clinique*, 34(3), S24.
32. Mafra, G., Spudeit, D., Brognoli, R., Merib, J., & Carasek, E. (2018). Expanding the applicability of cork as extraction phase for disposable pipette extraction in multiresidue analysis of pharmaceuticals in urine samples. *Journal of Chromatography B*, 1102, 159-166.
33. Westland, J.L., and Dorman, F.L. (2013) QuEChERS extraction of benzodiazepines in biological matrices. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 3, 509-517.
34. Yuan, H., Mester, Z., Lord, H., and Pawliszyn, J. (2000) Automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for the determination of selected benzodiazepines. *Journal of Analytical Toxicology*, 24, 718-725.

Table I. Properties and instrumental parameters of the analytes

Analyte	Formula	Group	pKa*	logP*	Precursor ion	Product ions	Collision energy (V)	Retention time (min)	LLOQ (ng/mL)
Alprazolam	C ₁₇ H ₁₃ ClN ₄	Benzodiazepine	18.2; 5.01	2.1	309.10	281.10 205.10	-26 -40	4.10	5
Amitriptyline	C ₂₀ H ₂₃ N	Tricyclic antidepressant	9.4	5	278.20	91.50 105.05	-27 -25	3.85	5
Bromazepam	C ₁₄ H ₁₀ BrN ₃ O	Benzodiazepine	12.24; 2.65	1.7	316.00	209.05 182.15	-29 -39	3.90	5
Carbamazepine	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O	Anticonvulsant	15.96; -3.8	2.5	237.10	194.00 192.05	-20 -25	3.99	5
Clonazepam	C ₁₅ H ₁₀ ClN ₃ O ₃	Benzodiazepine	11.65; 1.89	2.4	316.10	270.00 214.00	-28 -40	4.06	5
Desipramine	C ₁₈ H ₂₂ N ₂	Tricyclic antidepressant	10.2	4.9	267.25	72.05 44.05	-16 -40	3.82	5
Diazepam	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O	Benzodiazepine	3.4	3	285.10	193.05 154.10	-29 -28	4.30	5
Flunitrazepam	C ₁₆ H ₁₂ FN ₃ O ₃	Benzodiazepine	1.72	2.1	314.05	268.15 239.25	-27 -39	4.15	5
Fluoxetine	C ₁₇ H ₁₈ F ₃ NO	Antidepressant (SSRI)	9.8	4	310.00	44.00	-12 -9	3.89	5
Imipramine	C ₁₉ H ₂₄ N ₂	Tricyclic antidepressant	9.51	4.8	281.20	86.10 58.10	-17 -50	3.85	5
Haloperidol	C ₂₁ H ₂₃ ClFNO ₂	Antipsychotic	8.65	3.2	376.15	165.15 123.10	-25 -42	3.78	5
Ketamine	C ₁₃ H ₁₆ ClNO	Anesthetic	7.5	2.2	238.10	125.00 207.00	-26 -15	3.46	5
Lorazepam	C ₁₅ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	Benzodiazepine	13	2.4	321.00	275.00 229.00	-30 -35	4.08	5
Midazolam	C ₁₈ H ₁₃ ClFN ₃	Benzodiazepine	5.5	2.5	326.10	291.10 223.00	-28 -38	3.75	5
Nortriptyline	C ₁₉ H ₂₁ N	Tricyclic antidepressant	10.13	4.5	264.15	233.10 91.10	-15 -25	3.85	5
Sertraline	C ₁₇ H ₁₇ Cl ₂ N	Antidepressant (SSRI)	9.16	4.8	306.05	275.05 159.00	-15 -26	3.89	5
Temazepam	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O ₂	Benzodiazepine	10.68; -1.4	2.2	301.05	255.10 283.15	-25 -13	4.19	5

* Pubchem and DrugBank databases; SSRI: selective serotonin reuptake inhibitor

Table II. Validation parameters for the analytes

Analyte	Calibration curves			Bias (%)			Within-run precision (% CV)			Between-run precision (% CV)			Ionization suppression/enhancement (%)	
	Linear regression equation	r ²	Weighting factor	LQC	MQC	HQC	LQC	MQC	HQC	LQC	MQC	HQC	LQC	HQC
Alprazolam	y=0.0123x+0.0151	0.9996	none	86.8	92.1	90.6	5.19	6.14	5.61	6.07	4.87	5.35	-0.23	-17.86
Amitriptyline	y=0.0119x+0.0233	0.9968	1/x ²	117.8	111.5	109.0	7.19	5.15	4.46	9.71	7.03	6.86	-9.01	-18.63
Bromazepam	y=0.0025x+0.0021	0.9980	none	101.9	104.1	100.2	5.01	6.44	5.69	10.40	4.59	5.50	0.40	-8.43
Carbamazepine	y=0.0169x+0.0058	0.9981	1/x ²	100.5	102.4	97.3	4.61	6.65	5.95	7.17	4.90	4.73	-28.96	-30.69
Clonazepam	y=0.0255x+0.0361	0.9986	none	89.1	88.9	87.4	5.25	6.19	6.40	7.36	4.29	4.57	-8.99	-24.94
Desipramine	y=0.1042x+0.1887	0.9964	1/x ²	100.5	102.5	99.1	5.89	5.27	5.21	7.12	3.59	4.76	-12.37	-15.64
Diazepam	y=0.0217x+0.0254	0.9987	1/x ²	94.3	95.8	92.7	5.73	6.20	4.01	8.93	5.86	3.07	7.64	-2.92
Flunitrazepam	y=0.0542x+0.1079	0.9995	1/x ²	92.9	99.1	96.2	4.77	4.54	5.80	4.73	3.25	3.68	-0.16	-7.35
Fluoxetine	y=0.0366x+0.0692	0.9973	1/x ²	89.7	96.2	94.8	7.20	5.63	7.14	10.94	6.87	6.93	19.95	-2.38
Imipramine	y=0.0007x+0.0025	0.9935	1/x ²	92.7	100.4	91.0	13.47	6.79	7.65	14.75	4.84	9.86	29.46	15.36
Haloperidol	y=0.0683x+0.1428	0.9963	1/x ²	100.9	103.4	101.8	6.75	6.02	7.08	8.01	4.86	4.33	-13.39	-21.75
Ketamine	y=0.0751x+0.0179	0.9998	none	93.5	94.1	90.7	6.18	4.14	3.95	5.42	2.86	3.21	-7.55	-16.83
Lorazepam	y=0.0181x+0.0177	0.9989	1/x ²	85.7	84.8	85.1	5.67	5.15	6.20	8.06	4.36	4.77	-10.28	-23.81
Midazolam	y=0.0650x+0.1076	0.9980	1/x	99.3	98.0	95.8	5.64	3.10	5.18	5.40	4.30	3.66	4.97	-5.75
Nortriptyline	y=0.0632x+0.1258	0.9973	1/x ²	96.4	99.4	96.7	8.10	5.47	4.84	8.75	4.44	4.88	-2.37	-11.04
Sertraline	y=0.0435x+0.0990	0.9974	1/x ²	95.7	100.8	98.9	8.25	6.68	6.63	9.16	5.16	4.86	-5.09	-15.71
Temazepam	y=0.1001x+0.0844	0.9985	1/x ²	98.2	99.9	96.0	6.16	4.93	5.67	5.64	3.57	4.33	-7.71	-11.87

CV, coefficient of variation; HQC, high quality control; LQC, low quality control; MQC, medium quality control

Figure captions

Figure 1. Triangular surface obtained from the simplex-centroid design for extraction solvent optimization.

Figure 2. Triangular surface obtained from the simplex-centroid design for desorption solvent optimization.

Figure 3. Response surface obtained from the Doehlert design for time and pH optimization.

Figure 4. Multiple reaction monitoring (MRM) chromatograms obtained by LC-MS/MS of a low quality control.

Figure 1.

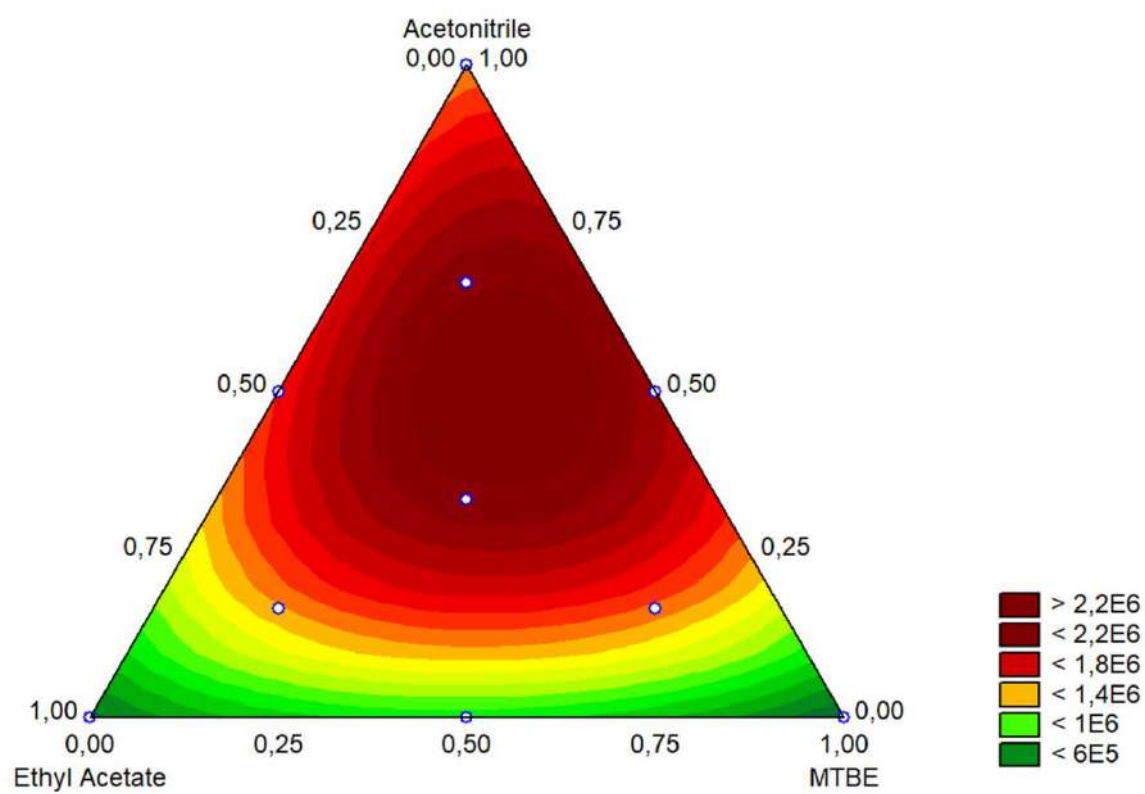


Figure 2.

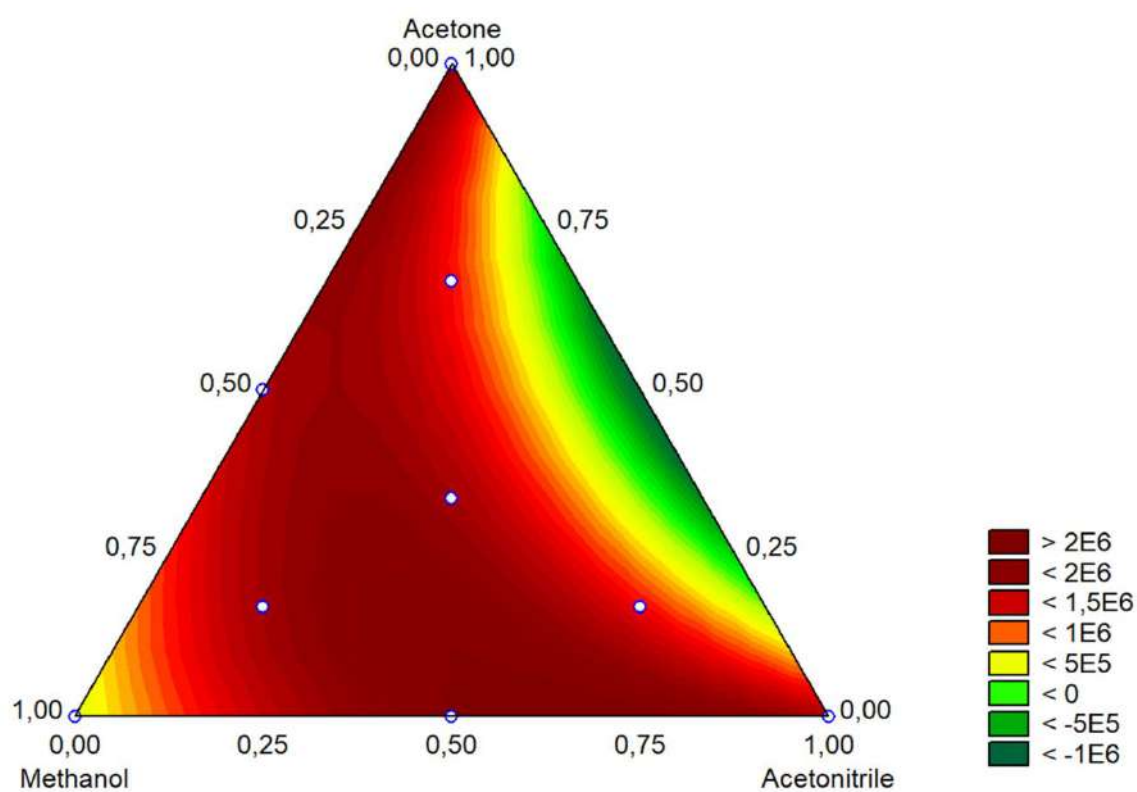


Figure 3.

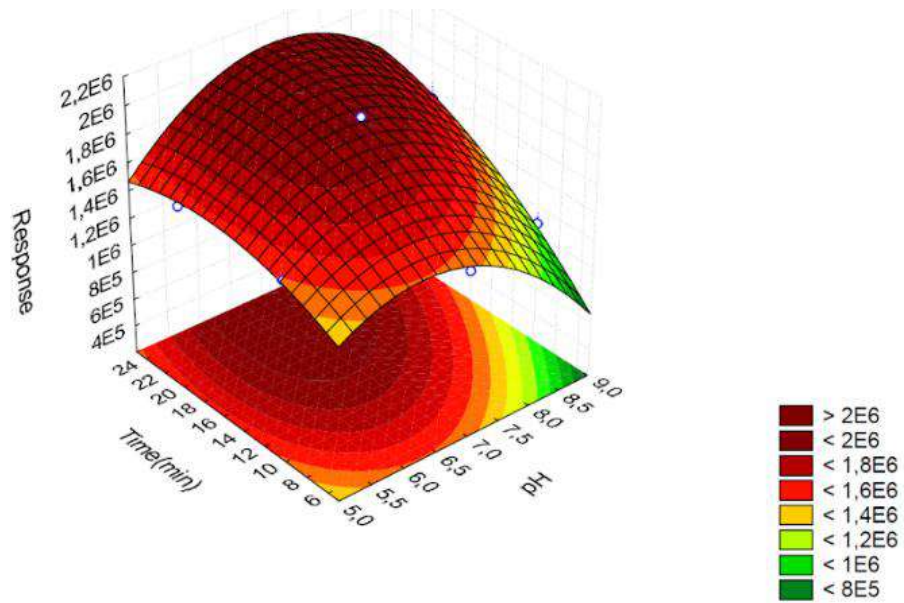
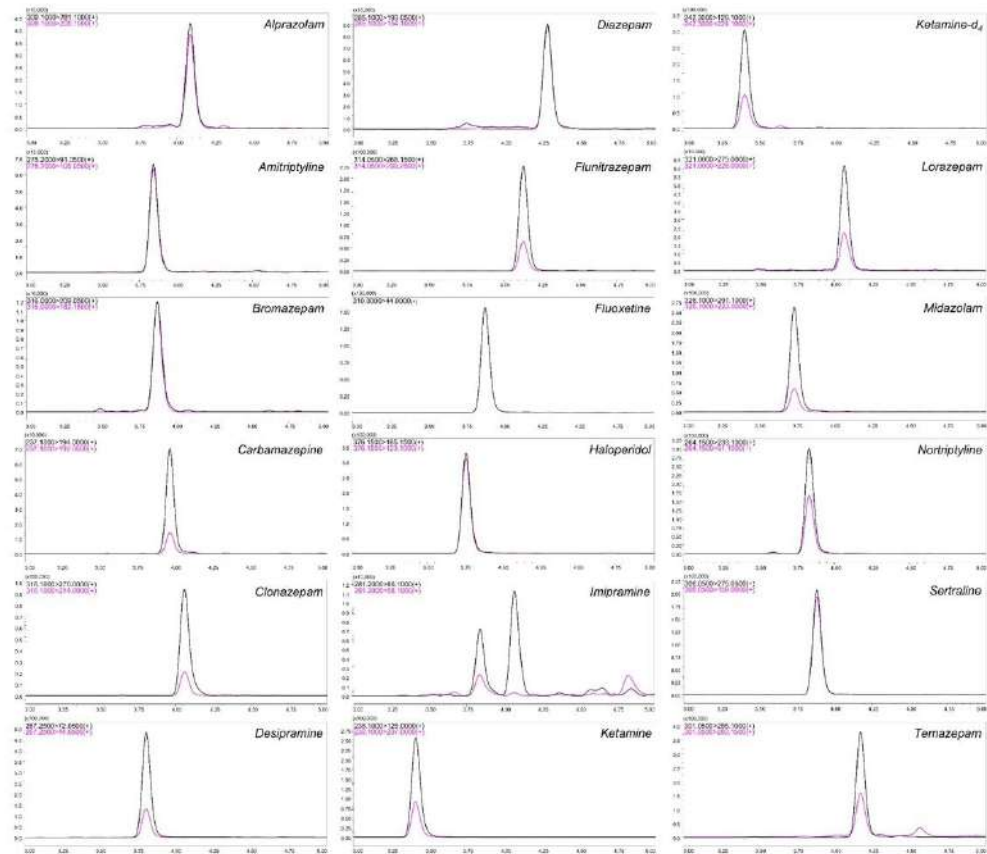


Figure 4.



5 CONCLUSÃO

Foi desenvolvido e aplicado um novo método miniaturizado para análise de diversas substâncias psicoativas em amostras de humor vítreo de forma econômica, eficiente em termos de tempo e sustentável. O método utiliza a cortiça como material biossorvente, o que é uma característica única, pois nenhuma outra metodologia miniaturizada usa a cortiça como biossorvente em matrizes biológicas e nem o humor vítreo como matriz. A técnica de preparação de amostra utilizada tem potencial para ser validada para outras substâncias, como drogas de abuso. A simplicidade e a sustentabilidade do método o tornam uma alternativa promissora às técnicas convencionais, que geralmente consomem muitos recursos e tempo. A aplicabilidade da técnica e o potencial de automação podem facilitar a análise eficiente para grande número de amostras e ter implicações significativas para investigações toxicológicas forenses.

ANEXOS

ANEXO A - Normas da revista

Instructions to Authors

On January 1, 2023, the Journal of Analytical Toxicology will implement double anonymized peer review model, in which both authors and reviewers are unknown to each other. Please reference the Author Guidelines under Peer Review Policy for full details on manuscript formatting.

[Scope](#)

[Ethics](#)

[Peer Review Process](#)

[Conflict of Interest](#)

[Experimental Subjects](#)

[Manuscript Submission](#)

[Manuscript Preparation](#)

[Submitting a Manuscript](#)

[Preparing Documents for Submission](#)

[Safety Considerations](#)

[Figure/Table Permissions](#)

[Figure Submission](#)

[Color Figures](#)

[Supplementary Data](#)

[Analytical Method Validation](#)

[References](#)

[Proofs](#)

[License to Publish](#)

[Open Access Option for Authors](#)

[Funding](#)

[About Advance Access Publication](#)

[Author Self-Archiving/Public Access policy](#)

[Communications](#)

[Author Toll Free Link and Discounts](#)

Scope

JAT accepts for consideration articles relating to the isolation, identification, quantitation, and interpretation of potentially toxic substances and their biotransformation products in specimens of human and animal origin. The articles should pertain especially to the monitoring of drugs and therapeutic agents and environmental and industrial contaminants, clinical reports of poisonings (with analytical data), the development of analytical techniques, and the interpretation of the results of toxicological investigations. The methods should be applicable to the fields of forensic science, therapeutic drug monitoring, drugs-of-abuse testing, clinical and forensic toxicology, and industrial hygiene. The manuscript should conform to one of the following types: Article, Book Review, Case Report, Technical Note, Review or Letter to Editor.

Ethics

Submission of a paper to JAT implies that the manuscript has not been published in and is not under concurrent consideration by any other journal and that the author(s) have obtained appropriate permission to use data obtained for and contained in the manuscript. Previous presentation at professional meetings should be mentioned in a footnote.

Plagiarism will result in the immediate rejection of a manuscript, and the involved authors will be banned from future publication in JAT. Any manuscript submitted to JAT is subject to review by iThenticate software to assist in the

detection of plagiarism and may be rejected as the result of this review.

Additional information about publication ethics policies can be found on our [webpage](#).

Peer Review Process

All manuscripts submitted to the Journal are reviewed by the Editor. Those outside the scope of the Journal are rejected without peer review; all other manuscripts are sent to independent experts for anonymous peer review. The reviewers make an independent scientific assessment and a recommendation to the Editor. The Editor considers the manuscript and the reviewers' comments before making the decision to accept, accept pending revision, or reject a manuscript. Acceptance pending revision does not guarantee eventual acceptance.

The average time from submission to first decision is four weeks.

Peer Review Policy

Single anonymised peer review

This journal operates single-anonymised peer review, meaning that the Authors identity is known to the Editor and to the Reviewers, but that the Reviewers' identities are known only to the Editor and are hidden from the Authors. For full details about the peer review process, see [Fair editing and peer review](#).

[OUP author FAQs](#).

Revisions

Manuscripts accepted pending revision must be returned to the editorial office within 30 or 60 days of the date of the decision letter for minor or major revision, respectively. If an extension is necessary, contact the editorial office. Authors should include

a point-by-point response to the reviewers' and Editor's comments and indicate where changes made based on these comments can be found in the revised manuscript. All revisions to the text must be clearly indicated, such as by track changes, differently colored text and/or highlighting.

Any alteration in authorship, including a change in order of authors, must be agreed upon by all authors, and a statement signed by all authors must be submitted to the editorial office.

Before making a final decision on publication status, the Editor reviews all revised manuscripts to ensure the authors fully and properly address the reviewers' concerns and comments and the revised manuscript meets the Journal's standards of scientific merit, relevance, and novelty. Revised manuscripts are subject to further review at the Editor's discretion.

Appeals

Authors may appeal the Editor's decision if they think it is unwarranted. Appeals must be submitted by email to the editorial office and include explicit detail as to why the manuscript should be reconsidered. Please do not resubmit your article without contacting the editorial office first.

Conflicts of Interest

All potential conflicts of interest must be disclosed at submission. Each author must complete the [ICMJE form](#), and the forms are to be submitted along with the manuscript files. More information can be found [here](#).

Experimental Subjects

When human subjects are used, manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject. Authors should be aware of the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki), which has been printed in the *British Medical Journal* (July 18, 1964). When

Article	An original research article reports a study within the scope of the Journal. The article must be a full scientific paper. It should present research results of scientific merit, novelty, and significance.	Up to 7000 words, including the Abstract, References (~1000 words), and Tables and Figures (considered 500 words each).
Technical Note	A Technical Note describes the process, progress, or results of technical or scientific research.	Up to 4000 words, including the Abstract, References (~1000 words), and Tables and Figures (considered 500 words each).
Book Review	A Book Review is typically an invited review of a book that is relevant to the Journal's scope.	Up to approximately 1000 words; it should be written as concisely as possible.
Case Report	A Case Report presents the details of real cases from practice within the scope of the Journal. If results are presented, the report should provide sufficient validation details such that the results presented can be evaluated for quality.	Up to 4000 words, including the Abstract, References (~1000 words), and Tables and Figures (considered 500 words each); it should contain a case history.
Review	A Review contains a comprehensive survey of topic(s) within the Journal's scope. It should provide a critique of the current literature. It may be invited or interested authors should send an email to the Editor prior to submission.	Up to 10000 words, including the Abstract, References (~1000 words), and Tables and Figures (considered 500 words each).
Letter to the Editor	A Letter to the Editor is generally about the Journal's prior publication or a communication about a policy that would fall within the Journal's scope.	Up to 1000 words, including References (~1000 words), and Tables and Figures (considered 500 words each).

Manuscripts should be subdivided into the following sequence of sections, as applicable:

- Title page
- Abstract
- Keywords
- Introduction
- Experimental
- Materials
- Methods
- Results
- Discussion
- Conclusion
- Funding
- Acknowledgements
- References
- Tables
- Legends to figures
- Figures (if not in a graphic-type file like PDF, tif, eps, etc.)
- Supplementary data

The text should describe the equipment and method(s) in sufficient detail to permit replication of the results. Further details regarding validation requirements are found below in “Analytical Method Validation.”

JAT is an English-language journal. Manuscripts should be written clearly and concisely according to the rules of standard English grammar, and the Editors reserve the right to reject poorly written papers without review. Authors whose first language is not English are encouraged to have their manuscripts reviewed by an editor whose first language is English.

One to ten keywords can be entered at the time of submission.

The Abstract should be no longer than 300 words, be comprehensible to readers, and not contain reference citations.

Case Report manuscripts should not exceed 4000 words, including the Abstract, References (~1000 words), and Tables and Figures (considered 500 words each). Case Reports should include a case history.

Tables must be separate from the manuscript text, numbered consecutively with Roman numerals, cited in the text consecutively, and include a brief descriptive title. Footnotes are acceptable but should not include extensive experimental information.

Any third-party material included must have permission to reproduce from the publisher/rights holder already secured and be properly credited within the manuscript. Documentation should be submitted along with the manuscript. (Additional information may be found [here](#).)

Availability of Data and Materials

Where ethically feasible, JAT strongly encourages authors to make all data and software code on which the conclusions of the paper rely available to readers. Authors are required to include a [Data Availability Statement](#) in their article.

We suggest that data be presented in the main manuscript or additional supporting files, or deposited in a public repository whenever possible. Information on general repositories for all data types, and a list of recommended repositories by subject area, is available [here](#).

Data Availability Statement

The inclusion of a Data Availability Statement is a requirement for articles published in JAT. Data Availability Statements provide a standardised format for readers to understand the availability of data underlying the research results described in the article. The statement may refer to original data generated in the course of the study or to third-party data analysed in the article. The statement should describe and provide means of access, where possible, by linking to the data or providing the required unique identifier.

More information and example Data Availability statements can be found here [Data Availability Statements](#).

Data Citation

JAT supports the [Force 11 Data Citation Principles](#) and requires that all publicly available datasets be fully referenced in the reference list with an accession number or unique identifier such as a digital object identifier (DOI). Data citations should include the minimum information recommended by [DataCite](#):

- [dataset]* Authors, Year, Title, Publisher (repository or archive name), Identifier

*The inclusion of the [dataset] tag at the beginning of the citation helps us to correctly identify and tag the citation. This tag will be removed from the citation published in the reference list.

Preprint policy

Authors retain the right to make an Author's Original Version (preprint) available through various channels, and this does not prevent submission to the journal. For further information see our [Online Licensing, Copyright and Permissions policies](#). If accepted, the authors are required to update the status of any preprint, including your published paper's DOI, as described on our [Author Self-Archiving policy page](#).

Submitting a Manuscript

All manuscripts must be submitted via the [online submission system](#).

All text and tables must be submitted in editable formats (e.g., Word, Excel, etc.). PDFs are not acceptable.

Indicate headings, subheadings, etc. in Journal style.

References should be numbered consecutively in order of citation in the text, (within parentheses, not superscripted) and listed in order at the end of the text. Personal communications,

unpublished results, manuscripts submitted or in preparation, statistical packages, computer programs, and websites should be cited in the text only, not included in the Reference section. (Reference format examples may be found [here](#).)

Figure captions and tables should be at the end of the file or submitted separately.

Do not embed tables or figures in the manuscript text.

Figures should be a minimum of 300 dpi in resolution for print reproduction. (Preparation specifications and details may be found [here](#).) There is a fee for print publication of color figures.

Supplementary data for online-only publication should be submitted in separate files from the manuscript and marked as such. It must be referred to in the text. If you have problems or questions, contact the Editorial Office.

Preparing Documents for Submission

- Enter text in the style and order of the Journal (see "References" section below).
- Include figure captions and tables at the end of the file.
- Save any tables, diagrams, figures, graphs or illustrations generated electronically as separate files and not embedded into the text file. Tables must be in editable format (e.g., Word, Excel). Figures can be in editable or image format.
- Type headings in the style of the Journal.
- Where possible use Times New Roman or Calibri for the text font and Symbol for the Greek and special characters. Please use the word processing formatting features to indicate **Bold**, *Italic*, Greek, Math, Superscript and Subscript characters.

Once your manuscript is ready for submission, please follow the [online submission instructions](#).

Abbreviations and Units

Any word you intend to abbreviate should be spelled out at first occurrence. The first spelled out occurrence should be followed by the abbreviation in parentheses. Standard units of

measurement may be used without definition in the body of the paper. The international system of units (IUPAC) is the preferred system for expressing measurements.

Language Editing:

Language editing, if your first language is not English, to ensure that the academic content of your paper is fully understood by journal editors and reviewers is optional. Language editing does not guarantee that your manuscript will be accepted for publication. For further information on this service, please visit this [webpage](#). Several specialist language editing companies offer similar services and you can also use any of these. Authors are liable for all costs associated with such services.

Safety Considerations

Detailed safety warnings about any procedures that are hazardous and use of any toxic chemicals in significant amounts must be included in the Experimental section (not Supplementary Materials) of the manuscript. Procedures requiring special precautions must be described in enough detail so that workers in the laboratory repeating the experiments can take appropriate safety measures. If appropriate for unusual chemicals, procedures and references describing their ultimate disposal should be included. Use of significantly large amounts of cancer-causing chemicals such as benzene may warrant rejection of the manuscript. The use of chlorinated solvents (which are considered cancer suspect agents) for extraction or as a chromatography mobile phase component is discouraged.

Figure/Table Permissions

In order to reproduce any third-party material, including figures or tables, in an article, authors must obtain permission from the copyright holder and be compliant with any requirements the copyright holder may have pertaining to this reuse.

When seeking to reproduce any kind of third party material authors should request the following:

- i. non-exclusive rights to reproduce the material in the specified article and journal;
- ii. electronic rights, preferably for use in any form or medium;
- iii. the right to use the material for the life of the work; and
- iv. world-wide English-language rights.

Further guidelines on clearing permissions can be found at the [Access and Purchase Resource Centre webpage](#).

Authors should also include a statement indicating that permission has been obtained in the relevant legend/footnote and provide the Editorial Office with copies of any relevant paperwork.

A template permissions request letter can be found at the end of the above document.

Third-Party Content in Open Access papers

If you will be publishing your paper under an Open Access licence but it contains material for which you do not have Open Access re-use permissions, please state this clearly by supplying the following credit line alongside the material:

Title of content

Author, Original publication, year of original publication, by permission of [rights holder]

This image/content is not covered by the terms of the Creative Commons licence of this publication. For permission to reuse, please contact the rights holder.

Figure Submission

1. Figure Types

Line Art

Line art has sharp, clean lines and geometrical shapes against a white background. Line art is typically used for tables, charts,

graphs, and gene sequences. You can use a program like Illustrator to create high-quality line art. A minimum resolution of 300 ppi will maintain the crisp edges of the lines and shapes.

- Format: TIFF or EPS
- Minimum Resolution: 300 ppi

Grayscale

Grayscale figures contain varying tones of black and white. They contain no color, so grayscale is synonymous with "black and white." The gray scale is divided into 256 sections with black at 0 and white at 255. Software for preparation of grayscale art includes Photoshop.

- Format: TIFF or EPS
- Minimum Resolution: 300 ppi

Halftones

The best example of a halftone is a photograph, but halftones include any image that uses continuous shading or blending of colors or grays, such as gels, stains, microarrays, brain scans, and molecular structures. To prepare and manipulate halftone images, use Photoshop or a comparable photo-editing program.

- Format: TIFF
- Minimum Resolution: 300 ppi

Combination Figures

Combination figures contain two or more types of images, for example, a halftone figure containing text. You should embed the images, group the objects, or flatten the layers, and flatten transparencies before saving as TIFF at a minimum of 300 ppi.

- Format: TIFF
- Minimum Resolution: 300 ppi

Convert PowerPoint Files to High-Resolution TIFFs

Caution: Do not add artwork to your PowerPoint slides by copying from another application and then pasting into

PowerPoint. Your figures will be downsampled to screen resolution. Instead use Insert > Picture > From File.

Caution: Do not use File > Save as > TIFF. This will result in a low-resolution, poor-quality figure.

Windows 98, XP, Vista and PowerPoint 2003 or 2007:

Step I: Convert PowerPoint File to PDF

There are two possible ways to create PDFs from PowerPoint files: use the Adobe PDF menu in some versions of PowerPoint, or create a PDF via the Print command.

1. Open your file in PowerPoint. From the Adobe PDF menu, select Change Conversion Settings. The PDFMaker Settings dialog displays.
2. From the Conversion settings dropdown menu, select Press Quality. Uncheck View Adobe PDF result. Click OK.
3. From the Adobe PDF menu, select Convert to Adobe PDF. You will be asked to save the PDF file to a location of your choosing.
4. Click OK.

– OR –

1. Open your file in PowerPoint.
2. Select Print from the File dropdown menu.
3. Select the Adobe PDF (or similar driver) in the Printer Name window.
4. Click Properties. Change the Default Settings pull-down to Press Quality. Uncheck the "View Adobe PDF results" box if you don't want Acrobat to launch.
5. Click OK, then click OK. Pick where the PDF will be created, and click Save. Note: If your PowerPoint file contains figures on multiple slides, print each slide to a separate PDF (if you do this, skip ahead to Step III). Alternately, you can create one PDF file and then use Adobe Acrobat to separate the figures/slides into individual files, as detailed in Step II.

Step II: Convert Multi-Page PDF File to Individual Files

1. Using Adobe Acrobat Standard, open the PDF file that you created in Step 1. From the Document menu, select Pages and then Extract. The Extract Page dialog box displays.
2. Enter the page numbers in the To and From fields and then select the Delete Pages checkbox. Checking this box will delete the page that you entered in the To and From fields from the PDF file.
3. Click OK. The page that you specify in the previous step is now shown in Acrobat.
4. From the File menu, select save and enter the file name (e.g., Figure 1) for the extracted page and then click OK.
5. Repeat this process until a separate file is created for each figure/slide.

Step III: Convert Individual PDF Files to TIFFs

In Photoshop:

1. File→Open the PDF. You will need to do this one page at a time. Make sure you're importing it at 300ppi, RGB.
2. Use the Crop Tool (fifth from the top of the toolbar) to select an area close to the borders of your image. Hit Enter to apply the crop.
3. Layer→Flatten Image
4. Image→Image Size. Uncheck the Resample Image checkbox. If the Width is over 17.35cm, type 17.35 in the Width box (17.35cm is our maximum allowable width for figures). The Resolution will go up automatically as the Width decreases. If the resolution does not hit 300 when you make the Width 17.35, type 300 in Resolution and as long as Width doesn't go below 8.3cm, everything is fine. Also, the height cannot be more than 23.35. If the Height and Width are within these prescribed limits, no adjustment to your figure size needs to be made.
5. File→Save As. Save as TIFF, Image Compression set to LZW, Pixel Order set to Interleaved, Byte Order set to IBM PC.

In GIMP:

1. File→Open the PDF. You will need to do this one page at a time. Open pages as Images at 300ppi. Click Import.
2. Use the Crop Tool (third row, second from the right, looks like a knife blade) to select an area close to the borders of your image. Hit Enter to apply the crop.
3. Image→Scale Image. Set the units of measurement, in the pull down menu next to Height, to millimeters. If the Width is over 173.5mm, type 173.5 in the Width box (17.35cm is our maximum allowable width for figures) and hit Tab. The new Height of the figure will appear, scaled proportionately to the change in Width. The Width cannot be below 83.0mm, and the height cannot be more than 233.5mm. If the Height and Width are within these prescribed limits, no adjustment to your figure size needs to be made.
4. File→Save As. Click the + sign next to "Select File Type (By Extension)". From the menu that appears, select TIFF. Click Save. Set Compression set to LZW. If you're prompted about layers in the file, select Flatten Image.

In Acrobat Pro:

1. File→Open the PDF
2. If necessary, go Document→Rotate Pages to rotate the document to a horizontal orientation.
3. File→Save As. In the "Save as type" pull-down menu, select TIFF.
4. Click the Settings button on the right-hand side of the Save As dialog box. In the top third, under "File Settings", both Grayscale and Color should be set to LZW. In the bottom third, "Conversion," set Colorspace to Color:RGB, and Resolution to 300ppi. Click OK. Click Save.

Note: PDFs converted to TIFFs in this manner should still be opened in Photoshop or GIMP to crop excess white space, and make sure the figure falls within our maximums and minimums.

Convert Excel or Word Files to High-Resolution TIFFs

Windows 98, XP, Vista and Excel/Word 2003 or 2007:

Step I: Convert Excel/Word File to PDF

There are two possible ways to create PDFs from Excel/Word files: use the Adobe PDF menu in some versions of Excel/Word, or create a PDF via the Print command.

1. Open your file in Excel/Word. From the Adobe PDF menu, select Change Conversion Settings. The PDFMaker Settings dialog displays.
2. From the Conversion settings dropdown menu, select Press Quality. Uncheck View Adobe PDF result. Click OK.
3. From the Adobe PDF menu, select Convert to Adobe PDF. You will be asked to save the PDF file to a location of your choosing.
4. Click OK.

– OR –

1. Open your file in Excel/Word.
2. Select Print from the File dropdown menu.
3. Select the Adobe PDF (or similar driver) in the Printer Name window.
4. Click Properties. Change the Default Settings pull-down to Press Quality. Uncheck the "View Adobe PDF results" box if you don't want Acrobat to launch.
5. Click OK, then click OK. Pick where the PDF will be created, and click Save.

Step II: Convert Individual PDF Files to TIFFs

In Photoshop:

1. File→Open the PDF. You will need to do this one page at a time. Make sure you're importing it at 300ppi, RGB.
2. Use the Crop Tool (fifth from the top of the toolbar) to select an area close to the borders of your image. Hit Enter to apply the crop.
3. Layer→Flatten Image

4. Image→Image Size. Uncheck the Resample Image checkbox. If the Width is over 17.35cm, type 17.35 in the Width box (17.35cm is our maximum allowable width for figures). The Resolution will go up automatically as the Width decreases. If the resolution does not hit 300 when you make the Width 17.35, type 300 in Resolution and as long as Width doesn't go below 8.3cm, everything is fine. Also, the height cannot be more than 23.35. If the Height and Width are within these prescribed limits, no adjustment to your figure size needs to be made.

5. File→Save As. Save as TIFF, Image Compression set to LZW, Pixel Order set to Interleaved, Byte Order set to IBM PC.

Images on disk can be accepted in Adobe PhotoShop compatible formats. Images should be saved in TIFF format. Please be aware that the figure requirements for initial online submission (peer review) and for reproduction in the journal are now the same. Authors should now supply final high-resolution .tif or .eps files for reproduction in the journal at the time of submission. Figure legends should be typed separately from the figures and placed in the main text document.

These should be submitted in the desired final printed size so that reduction can be avoided. Ideally figures should fit either a single or a double column. Images should be of sufficiently high quality with respect to detail, contrast, and fineness of grain to withstand the inevitable loss of contrast and detail inherent in the printing process. Image resolution should be a *minimum* of 300 dpi.

All supplementary figures and supplementary figure legends must be separate from the main document file.

Additional clarification on tables and figures can be found on the [Author Resources webpage](#).

Color Figures

The cost of printing color figures is \$600 per figure. Please submit figures in color for print only if you agree to the color charge. Black and white figures may not be substituted for color figures

after a manuscript has been reviewed and accepted. Authors of accepted manuscripts containing color figures in print will be obligated to pay the color figure charges. If you ticked the color charge approval box in ScholarOne Manuscripts, the online submission site for the journal, you will incur color figure charges.

Alternatively, the option of color online-only and black and white figures in print is available for no charge. Please inform the Editorial Office if you would like this option.

Supplementary Data

Supporting material that is not essential for inclusion in the full text of the manuscript, but would nevertheless benefit the reader, can be made available by the publisher as online-only content, linked to the online manuscript. The material should not be essential to understanding the conclusions of the paper, but should contain data that is additional or complementary and directly relevant to the article content. Such information might include more detailed methods, extended data sets/data analysis, or additional figures (including color). It is standard practice for appendices to be made available online-only as supplementary material. All text and figures must be provided in separate files from the manuscript files labeled as supplementary material in suitable electronic formats (instructions for the preparation of supplementary material can be viewed [here](#)).

All material to be considered as supplementary material must be submitted at the same time as the main manuscript for peer review. It cannot be altered or replaced after the paper has been accepted for publication. Please indicate clearly the material intended as supplementary material upon submission. Also ensure that the supplementary material is referred to in the main manuscript where necessary.

Analytical Method Validation

All described analytical methods must be validated. The extent of validation experiments depends on the purpose and use of

the methods. The Journal of Analytical Toxicology recommends the [Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology](#) or the [ANSI/ASB Standard 036 for Method Validation in Forensic Toxicology](#) as a guide for method validation in forensic practice. These references provide specific validation requirements for qualitative and quantitative methods, and generally include calibration model (linearity), limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), bias (accuracy) and precision, carryover potential, interference, ionization suppression/enhancement (for LC–MS and other applicable techniques), dilution integrity, selection of an internal standard, and processed sample stability. It may also be necessary to determine analyte recovery as well as freeze/thaw and long-term stability. While following these standards is highly encouraged, the journal recognizes that not all validations need to meet the standards. Other applications of analytical toxicology in clinical, environmental, and industrial sectors may follow different guidelines for method validation. The Editorial Board and reviewers will assess whether the validation adequately evaluates performance of the method to produce reliable and accurate results. The source of all reference materials should be specified. Further, all methods must utilize an acceptable internal standard(s). An external standard(s) is not an acceptable substitute for an internal standard.

References

Journal article (already published in an issue):

Lee, D. and Stout, P. (2020) Toxicological and demographic profiles of phencyclidine-impaired driving cases in Houston. *Journal of Analytical Toxicology*, 44, 499–503.

Feng, S., Enders, J.R., Cummings, O.T., Strickland, E.C., McIntire, T., and McIntire, G. (2020) A dilute and shoot LC–MS–MS method for antipsychotics in urine. *Journal of Analytical Toxicology*, 44, 331–338.

Journal article (e-pub ahead of print):

Mancini, R., Fernandez-Lopez, L., Falcon, M., Pellegrini, M, Luna, A., and Rotolo, M. (2020) Postmortem analysis of benzodiazepines in human bone by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*. doi: 10.1093/jat/bkaa020

Chapter in a book:

Felsot, A., (2006) The evolution of agricultural practices, pest control technologies, and public expectations. In Felsot, A. and Racke, K. (eds.), *Certified organic and biologically derived pesticides*, 1st edition, Chapter 1. Oxford University Press, New York, NY, pp. 5–130.

Jones, A.W. (2011) Driving under the influence of alcohol. In Moffat, A.C., Osselton, M.D., Widdop, B., and Watts, J. (eds.), *Clarke's analysis of drugs and poisons*, 4th edition, Volume 1, Chapter 4. Pharmaceutical Press, London, U.K., pp. 87–114.

Book (Editor as author):

Tu, A. and Gaffield, W. (eds.) (2000) *Natural and selected synthetic toxins*. Oxford University Press, New York, NY, pp. 50–105.

Book (Editor as author):

Tu, A. and Gaffield, W. (eds.) (2000) *Natural and selected synthetic toxins*. Oxford University Press, New York, NY, pp. 50–105.

Book (no Editor):

Baselt, R.C. (2017) Cocaine. In *Disposition of toxic drugs and chemicals in man*, 11th edition. Biomedical Publications, Seal Beach, CA, pp. 527–531.

Number of authors:

Single author: Goldberger, B.A.

Two authors: Baselt, R.C. and Cravey, R.H.

Three to six authors: Huestis, M.A., Cone, E.J. and Caplan, Y.H.
 More than six authors: retain first six authors and put et al.

Electronic source:

(2006) The Forensic Toxicology Laboratory Guidelines—2006 Version. Society of Forensic Toxicologists/American Academy of Forensic Sciences. http://soft-tox.org/files/Guidelines_2006_Final.pdf (accessed August 14, 2017).

Proofs

Authors are sent page proofs. Please provide an email address to enable page proofs to be sent as PDF files via email. To avoid delays in publication, proofs should be checked immediately for typographical errors.

License To Publish

Upon receipt of accepted manuscripts at Oxford Journals, authors will be invited to complete an online copyright license to publish form.

This ensures that requests from third parties to reproduce articles are handled efficiently and consistently and will also allow the article to be as widely disseminated as possible. In granting an exclusive license, authors may use their own material in publications provided that the Journal is acknowledged as the original place of publication and Oxford University Press is notified in writing and in advance. In consideration for granting an exclusive license, the publisher will provide free online access to your article.

Orders from the UK will be subject to the current UK VAT charge. For orders from elsewhere in the EU you or your institution should account for VAT by way of a reverse charge. Please provide us with your or your institution's VAT number.

Please note that by submitting an article for publication you confirm that you are the corresponding/submitting author and that Oxford University Press ("OUP") may retain your email address for the purpose of communicating with you about the article. You agree to notify OUP immediately if your details change. If your article is accepted for publication OUP will contact you using the email address you have used in the registration process. Please note that OUP does not retain copies of rejected articles.

Open Access Option For Authors

Journal of Analytical Toxicology authors have the option to publish their paper under the [open access](#) initiative; whereby, for a charge, their paper will be made freely available online immediately upon publication. After your manuscript is accepted the corresponding author will be required to accept a mandatory license to publish agreement. As part of the licensing process you will be asked to indicate whether or not you wish to pay for open access. If you do not select the open access option, your paper will be published with standard subscription-based access and you will not be charged.

Open access articles are published under Creative Commons licences.

JAT offers the option of publishing under either a standard licence or an open access licence. Please note that some funders require open access publication as a condition of funding. If you are unsure whether you are required to publish open access, please do clarify any such requirements with your funder or institution.

Should you wish to publish your article open access, you should select your choice of open access licence in our online system after your article has been accepted for publication. You will need to pay an open access charge to publish under an open access licence.

[Details of the open access licences and open access charges.](#)

OUP has a growing number of Read and Publish agreements with institutions and consortia which provide funding for open access publishing. This means authors from participating institutions can publish open access, and the institution may pay the charge. [Find out if your institution is participating.](#)

Please note that open access charges are in addition to any colour/page charges that may occur.

Funding

Please make a cover sheet (the first page of your submission) with author address and contact details, funding sources, word count and any acknowledgements.

For the funding statement the following rules should be followed

The full official funding agency name should be given, i.e. 'the National Cancer Institute at the National Institutes of Health' or simply 'National Institutes of Health' not 'NCI' (one of the 27 subinstitutions) or 'NCI at NIH' ([full RIN-approved list of UK funding agencies](#)) Grant numbers should be complete and accurate and provided in brackets as follows: '[grant number ABX CDXXXXXX]'

Multiple grant numbers should be separated by a comma as follows: '[grant numbers ABX CDXXXXXX, EFX GHXXXXXX]'

Agencies should be separated by a semi-colon (plus 'and' before the last funding agency)

Where individuals need to be specified for certain sources of funding the following text should be added after the relevant agency or grant number 'to [author initials]'

An example is given here: 'This work was supported by the National Institutes of Health [AA123456 to C.S., BB765432 to M.H.]; and the Alcohol & Education Research Council [P50 CA098252 and CA118790 to R.B.S.R.]'

Oxford Journals will deposit all NIH-funded articles in PubMed Central. See this page for details. Authors must ensure that

manuscripts are clearly indicated as NIH-funded using the guidelines above.

Crossref Funding Data Registry

In order to meet your funding requirements authors are required to name their funding sources, or state if there are none, during the submission process. For further information on this process or to find out more about CHORUS, visit the [CHORUS initiative](#).

About Advance Access Publication

Advance Access articles are a mix of papers in manuscript form (labeled as “Accepted Manuscript”) and in final form, except for issue pagination (labeled as “Corrected Proof”). Accepted Manuscripts have been accepted by the journal but have not been copyedited or formatted for publication. Copyediting may lead to minor differences between the Accepted Manuscript and the Corrected Proof; there may also be differences in the quality of the graphics. More information, including how to cite Advance Access papers, can be found [here](#).

Author Self-Archiving/Public Access policy

For information about this journal's policy, please visit our [Author Self-Archiving policy page](#).

Communications

Correspondence should be directed to: jat.editorialoffice@oup.com

Author Toll Free Link and Discounts

All corresponding authors will be provided with a free access link to their article upon publication. The link will be sent via

email to the article's corresponding author who is free to share the link with any co-authors. Please see OUP's Author Self-Archiving policy (as above) for more information regarding how this link may be publicly shared depending on the type of license under which the article has published.

All authors have the option to purchase up to 10 print copies of the issue in which they publish at a 50% discount. Orders should be placed through this [order form](#). Orders must be made within 12 months of the online publication date.

ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Desenvolvimento de métodos analíticos para identificação de novas substâncias psicoativas de interesse forense por espectrometria de massas de alta resolução

Pesquisador: TIAGO FRANCO DE OLIVEIRA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 17996819.7.0000.5345

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.784.184

Apresentação do Projeto:

As drogas naturais, como maconha e cocaína, foram gradativamente substituídas pelas sintéticas. O recente relatório intitulado "Global Synthetic Drugs Assessment", publicado pelo United Nations Office on Drugs and Crime - UNODC, revelou que a produção e o consumo de drogas sintéticas têm alcançado números alarmantes, superando os da heroína e cocaína em muitos lugares do mundo. Segundo o relatório global, foram registradas 348 Novas Substâncias Psicoativas (NPS), de 2008 a 2013, mas o número real de NPS disponível no mundo pode ser significativamente superior, dado que esses números refletem apenas relatos de fontes oficiais e não leva em conta fontes não oficiais. As assim chamadas drogas sintéticas são substâncias ou misturas de substâncias psicoativas produzidas por síntese química a partir de substâncias precursoras encontradas ou não na natureza. A dimensão e os padrões de uso dessas substâncias ainda não são claros e, provavelmente, estão sendo subestimados. Diante do exposto, o objetivo desse projeto é o desenvolvimento de metodologias analíticas para a correta identificação de NPSs (etilona, 2,5-dimetoxi-4-bromoanfetamina, 2,5-dimetoxi-4-metilanfetamina, 25CNBOMe, 25B-NBOMe) e outras substâncias psicoativas em matrizes biológicas por espectrometria de massas de alta resolução. As metodologias aqui desenvolvidas serão disponibilizadas para o Departamento de Perícias Laboratoriais do Instituto Geral de Perícias (DPL-IGP) para a posterior

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245

Bairro: Sarmento

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: 3.784.184

Benefícios:

Não haverá benefícios diretos ao participante da pesquisa, mas o estudo será importante pois será desenvolvido uma metodologia capaz de identificar diferentes substâncias psicoativas em diversas matrizes biológicas que possa ser disponibilizada para os principais serviços de avaliação de intoxicações por drogas de abuso no estado do Rio Grande do Sul. Além disto, espera-se a identificação destes compostos em casos suspeitos possibilitando o mapeamento da distribuição das substâncias elencadas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Amostra: amostras biológicas de rotina (sangue, urina, vísceras) ou de oportunidade (humor vítreo e cabelo) disponibilizadas pelo DPL-IGP de casos com suspeita de ocorrência de NPS, passíveis de análises toxicológicas, atendidos pelo Instituto durante o período de vigência do projeto. Atualmente, estas amostras são analisadas na rotina Departamento de Perícias Laboratoriais e descartadas, conforme a legislação vigente (ANVISA, RDC 306/04, CONAMA, RDC 358/05), que por tratar de resíduos do Grupo A1 são submetidos a processos de tratamento em equipamentos que promova a redução de carga microbiana e encaminhados para aterro sanitário licenciado para disposição final destes resíduos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Solicitam a utilização apenas do TCUD, tendo em vista a impossibilidade de obtenção do TCLE, uma vez que se trata de amostras biológicas oriundas do descarte do laboratório do DPL-IGP e que terão seu uso liberado pelo responsável do laboratório somente após estarem em posição de descarte.
- Não encontra-se anexado o termo de compromisso para entrega dos relatórios parciais e final.

Recomendações:

- O projeto somente poderá ter início após sua aprovação na integralidade pelos CEP's envolvidos.
- Solicita-se encaminhar por notificação o termo de compromisso para entrega dos relatórios parciais e final. Como trata-se de um projeto com período de realização abrangente, os relatórios parciais devem ser anuais além do relatório final. Destaca-se a importância da entrega destes relatórios para acompanhamento do CEP, além de possibilitar ao pesquisador, dentro da vigência do mesmo, o envio de qualquer emenda/notificação.
- Data Final de Vigência do Projeto: 01/09/2023.

Endereço: Rua Sarmento 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: 3.784.184

implementação na rotina laboratorial, objetivando a elucidação e o mapeamento de casos de envolvendo o consumo de NPSs e outras substâncias psicoativas.

Objetivo da Pesquisa:

1) Objetivo Primário:

Desenvolvimento de metodologias analíticas para a correta identificação de NPSs e substâncias psicoativas convencionais em matrizes biológicas por espectrometria de massas de alta resolução, fornecendo assim subsídios para elucidação de casos com suspeita de ocorrência dessa classe de substâncias.

2) Objetivo Secundário:

a) desenvolvimento de métodos multi-analíticos que permitam a análise simultânea em um intervalo curto de tempo, propiciando uma identificação rápida e precisa das substâncias envolvidas em casos suspeitos de NPS;

b) desenvolvimento e validação de estratégias analíticas de screening em cabelo para as classes de substâncias anfetaminas, antidepressivos, antipsicóticos, barbitúricos, benzodiazepínicos e cocaína;

c) desenvolvimento tecnológico adquirido poderá ser facilmente aplicado a outros projetos de pesquisa, contribuindo assim para avanços importantes no que concerne às implicações da toxicologia analítica à ciências forenses;

d) após a validação metodológica, os procedimentos desenvolvidos estarão acessíveis para Departamento de Perícias Laboratoriais do Instituto Geral de Perícias (DPLIGP);

e) para realizar a transferência do know-how as metodologias serão prioritariamente construídas considerando os métodos de rotina e o parque instrumental do DPL-IGP;

f) os dados gerados no trabalho serão tabulados para confecção de artigos científicos construídos em parceria com a equipe do DPL-IGP.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os pesquisadores descrevem que não há riscos para os envolvidos na pesquisa pois as amostras biológicas utilizadas serão oriundas do descarte do laboratório do DPL-IGP. As amostras terão seu uso liberado pelo responsável do laboratório somente após estarem em posição de descarte. Referem ainda que o possível risco é referente a identificação dos indivíduos, no entanto, os pesquisadores garantem que a identificação dos indivíduos será mantida em anonimato, através da utilização de códigos previamente estabelecidos.

Endereço: Rua Sarmento 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: 3.784.184

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

- Os pesquisadores atenderam às solicitações contidas em parecer emitido anteriormente por este CEP.

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_1401883.pdf	06/11/2019 15:31:08		Aceito
Outros	TCUD.pdf	06/11/2019 15:30:43	TIAGO FRANCO DE OLIVEIRA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TemoAnuenciaGerLab.pdf	06/11/2019 15:30:30	TIAGO FRANCO DE OLIVEIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_parceria_UFCSPA_IGP.docx	23/07/2019 16:09:50	TIAGO FRANCO DE OLIVEIRA	Aceito
Outros	Termo_liberacao_amstras.pdf	23/07/2019 16:09:32	TIAGO FRANCO DE OLIVEIRA	Aceito
Outros	Termo_anuencia_instituicao_coparticipante.pdf	23/07/2019 16:09:11	TIAGO FRANCO DE OLIVEIRA	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_Tiago_Oliveira.pdf	23/07/2019 16:06:23	TIAGO FRANCO DE OLIVEIRA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 19 de Dezembro de 2019

Assinado por:

**Luciane Dalcanale Moussalle
(Coordenador(a))**

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245

Bairro: Sarmiento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br