

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

Bruno Pereira dos Santos

**Determinação de fármacos e drogas de
abuso em amostras de emergência
toxicológica por LC-MS/MS**

UFCSPA
Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

**Porto Alegre
2022**

Bruno Pereira dos Santos

Determinação de fármacos e drogas de abuso em amostras de emergência toxicológica por LC-MS/MS

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: Dr. Tiago Franco de Oliveira
Coorientadora: Dra. Sarah Eller

**Porto Alegre
2022**

Catálogo na Publicação

Pereira dos Santos, Bruno

Determinação de fármacos e drogas de abuso em amostras de emergência toxicológica por LC-MS/MS / Bruno Pereira dos Santos. -- 2022.

132 p. : 30 cm.

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

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

1. Multi-analito. 2. Precipitação de proteínas. 3. Emergência. 4. Intoxicação por fármacos e drogas. 5. LC-MS/MS. I. Título.

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

Bruno Pereira dos Santos

**Determinação de fármacos e drogas de abuso em amostras de emergência
toxicológica por LC-MS/MS**

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.

Data: 05 de setembro de 2022

Parecer: **APROVADO**

BANCA EXAMINADORA

Dra. Eliane Dallegrove

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Dr. Josias Merib

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Dr. Fábio de Souza Barbosa

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de iniciar agradecendo aos meus pais, Marcia e Edison, minha irmã, Camila, e meu sobrinho, Nicolas, por sempre estarem ao meu lado durante minha jornada, me apoiando e incentivando de maneira incondicional.

Agradeço à UFCSPA e ao PPG-CS por me proporcionar toda a infraestrutura necessária à realização deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Tiago pela oportunidade que me foi dada, pela orientação, por todos seus ensinamentos, aprendizados em espectrometria de massas, por suas ideias mirabolantes e inesperadas, incentivos e, não menos obstante, pela amizade.

Agradeço a Profa. Sarah pela orientação, por todos seus conhecimentos e suas incansáveis explicações sobre validação, pela paciência e disponibilidade em ajudar a planejar e executar os experimentos deste trabalho, assim como por sua amizade.

Agradeço à Central Analítica e todos os técnicos pelo apoio operacional.

Agradeço ao CIT-RS e todos seus colaboradores, em especial à Viviane, pela oportunidade que me foi dada, pela colaboração, apoio e amizade que já dura anos.

Agradeço à FAPERGS e à CAPES pelo auxílio financeiro para a realização deste estudo.

Agradeço a todos e todas colegas do grupo de Espectrometria de Massas da UFCSPA pelo apoio, companheirismo e troca de experiência ao longo dos últimos anos.

Agradeço à Giovanna e à Gabriela por me acompanharem de perto durante todo o mestrado, pela ajuda nos experimentos, pela amizade, pelas discussões científicas, pelas risadas e por todo apoio incondicional.

Agradeço à Gabriela A., Gabriela B., Andrielly e Petrick por meio apoiarem há mais de 10 anos e continuarem ao meu lado de maneira irrestrita.

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

RESUMO

O manejo e tratamento adequado de um paciente intoxicado deve ser feito assim que possível, de forma a aumentar a efetividade e reduzir possibilidade de consequências da exposição. Para isso, métodos diagnósticos devem estar presentes no cenário de emergência e serem simples, rápidos e eficientes. A precipitação de proteínas combinada com a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tem mostrado ser uma boa estratégia para a determinação simultânea de compostos de interesse toxicológico, como medicamentos e drogas de abuso. Neste estudo, um método multi-analito simples e rápido foi desenvolvido e validado para a quantificação de 57 fármacos e drogas de abuso em amostras de plasma. O preparo da amostra consiste na precipitação proteica de 50 µL da amostra de plasma com 240 µL da mistura de solvente orgânico, com posterior centrifugação e injeção no LC-MS/MS, onde o tempo de corrida cromatográfica foi de 7 minutos. O método foi validado para menor limite de quantificação (LLOQ), interferentes, linearidade, precisão, exatidão, integridade de diluição, *carryover* e efeito matriz. Os LLOQs variaram entre 5 e 20 ng/mL e todos analitos apresentaram respostas lineares ($r^2 > 0.99$) nas concentrações testadas. O método provou ser preciso e exato, com todas concentrações de controle de qualidade para todos analitos dentro dos limites aceitáveis pelo guia de validação utilizado ($CV\% \leq 20\%$ e bias de $\pm 20\%$). Dos 57 analitos, 49 não apresentaram efeito matriz significativo. O método desenvolvido foi aplicado com sucesso em 470 amostras de plasma de casos reais de intoxicação atendidos pelo CIT/RS. Do total de amostras analisadas, 80% foram positivas para ao menos uma substância, como acetaminofeno (32,1%), diazepam (25,1%) e lidocaína (18,9%), sendo as mais detectadas. Benzodiazepínicos foi o grupo mais detectado, presente em torno de 40% das amostras. A circunstância da exposição mais prevalente entre os casos foi tentativa de suicídio. As faixas etárias mais frequentes foram jovens adultos de 20 a 29 anos e crianças menores de 5 anos. A metodologia desenvolvida mostrou-se eficiente na determinação simultânea de 57 substâncias de interesse toxicológico, contribuindo para um diagnóstico correto e, conseqüentemente, para o manejo e tratamento mais adequado do paciente intoxicado.

Palavras-chave: Multi-analito, precipitação de proteínas, emergência, intoxicação por fármacos e drogas, LC-MS/MS.

ABSTRACT

The proper management and treatment of a poisoned patient should be done as soon as possible, in order to increase effectiveness and reduce possible consequences of exposure. For this, diagnostic methods must be present in an emergency scenario and be simple, fast, and efficient. Protein precipitation combined with liquid chromatography coupled to mass spectrometry has been shown to be a good strategy for the simultaneous determination of compounds of toxicological interest, such as medicines and drugs of abuse. In this study, a rapid and simple multi-analyte method was developed and validated for the quantification of 57 pharmaceuticals and illicit drugs in plasma samples. Sample preparation consists of protein precipitation of 50 μ L of the sample with 240 μ L of the organic solvent mixture, centrifugation, and injection into the LC-MS/MS, with a chromatographic run time of 7 minutes. The method was validated for lower limit of quantification (LLOQ), interferences, linearity, precision, accuracy, dilution integrity, carryover, and matrix effect. The LLOQs ranged from 5 to 20 ng/mL and all analytes were linear ($r^2 > 0.99$) in the tested concentration ranges. The method proved to be precise and accurate, with all QC concentrations for all analytes within acceptable limits by the guideline used ($CV\% \leq 20\%$ and bias $\pm 20\%$). Of all 57 analytes, 49 analytes showed no significant matrix effect. The developed method was successfully applied in 470 plasma samples of real cases of poisoning attended by the CIT/RS. 80% of the samples were positive for at least one substance, with acetaminophen (32.1%), diazepam (25.1%), and lidocaine (18.9%) being the most detected. Benzodiazepines were the most detected group, present in around 40% of the samples. The circumstance of exposure with the highest prevalence among the cases was suicide attempt. The most frequent age groups were young adults (20 and 29 years) old and children under 5 years old. The methodology developed proved to be efficient in the simultaneous determination of 57 substances of toxicological interest, contributing to a correct diagnosis and, consequently, to the most appropriate management and treatment of the intoxicated patient.

Keywords: Multi-analyte, protein precipitation, emergency, drugs poisoning, LC-MS/MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas químicas dos principais fármacos antidepressivos.....	23
Figura 2. Estrutura química de benzodiazepina e estrutura base dos benzodiazepínicos.....	28
Figura 3. Principais vias de biotransformação dos benzodiazepínicos.....	30
Figura 4. Principais vias de biotransformação da cocaína.....	34

LISTA DE QUADROS E TABELAS

- Quadro 1.** Principais classes de antidepressivos e respectiva farmacodinâmica, fármacos e manifestações clínicas.....24
- Tabela 1.** Casos de exposição a antidepressivos atendidos pelo CIT/RS entre 2016 e 2020.....25
- Quadro 2.** Estrutura dos benzodiazepínicos conforme substituição dos radicais na estrutura base dos benzodiazepínicos.....29
- Quadro 3.** Principais classes de Novas Substâncias Psicoativas e representantes já apreendidos pela Polícia Federal do território brasileiro entre 2016 e 2020.....38
- Quadro 4.** Principais manifestações clínicas associadas às Novas Substâncias Psicoativas.....39
- Tabela 2.** Concentrações plasmáticas terapêuticas e tóxicas dos compostos incluídos neste estudo, tal como seus respectivos tempos de meia vida ($t_{1/2}$), coeficiente de partição octanol-água (LogP) e constante de acidez (pKa).....43
- Quadro 5.** Principais técnicas preparativas e extrativas com aplicação na análise de fármacos e drogas de abuso em amostras biológicas.....51

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AAFS	Academia Americana de Ciências Forenses, do inglês " <i>American Academy of Forensic Sciences</i> "
ABRACIT	Associação Brasileira de Centros de Informação e Assistência Toxicologia e Toxicologistas Clínicos
ALT	Alanina aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANSI	Instituto Nacional Americano de Padrões, do inglês " <i>American National Standards Institute</i> "
APCI	Ionização química a pressão atmosférica, do inglês " <i>atmospheric-pressure chemical ionization</i> "
APPI	Fotoionização a pressão atmosférica, do inglês " <i>atmospheric pressure photoionization</i> "
AST	Aspartato aminotransferase
ATS	Estimulantes tipo anfetamina
CIAT	Centros de Informação e/ou Assistência Toxicológica
CIT/RS	Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul
CYP450	Citocromo P450
DAT	Transportadores de dopamina, do inglês " <i>dopamine transporter</i> "
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva, do inglês " <i>dispersive liquid-liquid microextraction</i> "
EMCDDA	Observatório Europeu da Droga e da Toxicodepência, do inglês " <i>European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction</i> "
EtOH	Etanol
EUA	Estados Unidos da América
EI	Ionização por elétrons do inglês " <i>electron ionization</i> "
ESI	Ionização por electrospray, do inglês " <i>electrospray ionization</i> "
GABA	Ácido γ -aminobutírico, do inglês " γ -aminobutyric acid"

GC	Cromatografia gasosa, do inglês " <i>gas chromatography</i> "
GC-MS/MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em tandem do inglês " <i>gas chromatography-tandem mass spectrometry</i> "
HF-LPME	Microextração em fase líquida com fibra oca, do inglês " <i>liquid phase microextraction with hollow fiber</i> "
IMAO	Inibidores da monoamino oxidase
LC	Cromatografia líquida, do inglês " <i>liquid chromatography</i> "
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem, do inglês " <i>liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i> "
LLE	Extração líquido-líquido, do inglês " <i>liquid-liquid extraction</i> "
MAO	Monoamino oxidase
MALDI	Ionização por dessorção a laser por matriz assistida, do inglês " <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i> "
MDA	3,4-metilenodioxianfetamina
MDEA	3,4-metilenodioxietilamfetamina
MDMA	3,4-metilenodioximetamfetamina
MEPS	Microextração por sorbente empacotado, do inglês " <i>microextraction by packed sorbent</i> "
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MRM	Monitoramento de reações múltiplas, do inglês " <i>multiple reaction monitoring</i> "
MS	Espectrometria de massas, do inglês " <i>mass spectrometry</i> "
m/z	Razão massa/carga
NAC	N-acetilcisteína
NAPQI	N-acetil-p-benzo-quinona imina
NAT2	N-acetiltransferase 2
NDRI	Inibidores da recaptação de norepinefrina e dopamina
NET	Transportadores de noradrenalina, do inglês " <i>norepinephrine transporter</i> "

ng	Nanograma
NMDA	N-metil-D-aspartato
NPS	Novas substâncias psicoativas
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCP	Fenciclidina
PF	Polícia Federal
pH	Potencial hidrogeniônico
PP	Precipitação de proteínas, do inglês " <i>protein precipitation</i> "
PSI	Ionização por paper spray, do inglês " <i>paper spray ionization</i> "
QTOF	Quadrupolo-tempo-de-voo, do inglês " <i>quadrupole-time-of-flight</i> "
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SERT	Transportadores de serotonina, do inglês " <i>serotonin transporter</i> "
SIM	Monitoramento de íon selecionado, do inglês " <i>selected ion monitoring</i> "
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SNC	Sistema Nervoso Central
SNRI	Inibidores da recaptção de serotonina e norepinefrina, do inglês " <i>serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors</i> "
SPE	Extração em fase sólida, do inglês " <i>solid phase extraction</i> "
SPME	Microextração em fase sólida, do inglês " <i>solid phase microextraction</i> "
SSRI	Inibidores seletivos da recaptção de serotonina, do inglês " <i>selective serotonin reuptake inhibitors</i> "
$t_{1/2}$	Tempo de meia-vida
TCA	Antidepressivos tricíclicos, do inglês " <i>tricyclic antidepressants</i> "
µg	Micrograma
µL	Microlitro
UGT	UDP-Glucuronosiltransferase
UNODC	Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime, do inglês " <i>United Nations Office on Drugs and Crime</i> "

SUMÁRIO

1.	REFERENCIAL TEÓRICO	15
1.1.	Aspectos gerais sobre intoxicações	15
1.2.	Principais medicamentos e drogas de abuso de interesse toxicológico	19
1.3.	Análise toxicológica e métodos analíticos	41
2.	JUSTIFICATIVA	53
3.	OBJETIVOS	54
3.1.	Objetivo geral	54
3.2.	Objetivos específicos	54
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
5.	MANUSCRITO	76
6.	CONCLUSÕES	112
	ANEXOS	113
	ANEXO I – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	113
	ANEXO II – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DO PERIÓDICO	118

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1. Aspectos gerais sobre intoxicações

A intoxicação pode ser definida como o processo de exposição e interação de um agente tóxico junto a um organismo, tendo como resultado efeitos clínicos maléficos (EATON; GILBERT, 2012). Toda intoxicação é dividida em quatro fases: exposição, toxicocinética, toxicodinâmica e clínica. A exposição é a etapa inicial do processo de intoxicação, sendo o instante que o organismo entrará em contato com o agente tóxico, e isto poderá ocorrer de inúmeras formas. A exposição pode ser classificada quanto à via de contato com o organismo (oral, cutânea, intravenosa, inalatória, intranasal, dentre outras) e à duração deste (aguda, subaguda, crônica, subcrônica). Outras condições terão influência na exposição, tais como natureza do composto, apresentação físico-química, assim como dose ou concentração do xenobiótico (HOWLAND, 2011; OLSON; VOHRA, 2018).

A toxicocinética caracteriza-se pela movimentação do agente tóxico até o sítio de ação, havendo quatro etapas essenciais. Todas etapas são multifatoriais, isto é, o seu funcionamento está condicionado a diversos fatores, sejam extrínsecos ou intrínsecos ao organismo. A primeira delas é a absorção, onde é necessário que o toxicante seja absorvido pela corrente sanguínea. As características físico-químicas das substâncias possuem alta influência no processo de absorção, citando-se como exemplo a lipofilicidade e as constantes de acidez e basicidade. Após absorvido, o agente tóxico será distribuído aos tecidos pelo sangue e, novamente, a lipofilicidade dos compostos influenciará nesta etapa, visto que compostos com baixa hidrossolubilidade necessitarão ligar-se às proteínas plasmáticas, para que assim, possam ser transportados (LEHMAN-MCKEEMAN, 2012).

Quando disponível na corrente sanguínea, os agentes tóxicos tornam-se passíveis de biotransformação. A biotransformação é um mecanismo de modificação química das substâncias, as quais passarão por reações bioquímicas gerando uma inativação ou ativação do potencial tóxico. O principal objetivo da biotransformação é promover a excreção da substância, aumentando seu caráter hidrofílico, a partir da adição de grupamentos polares e clivagem de radicais apolares. As reações de biotransformação podem ser divididas em Fase I (oxidação, redução, hidrólise) e Fase

II (conjugação). Grande parte do processo de biotransformação dos compostos tóxicos ocorre no tecido hepático, nas enzimas microsossomais do complexo citocromo P450 (PARKINSON; OGILVIE, 2012).

A etapa final da cinética de uma intoxicação é a excreção do agente tóxico. A principal via excretora do organismo humano é a via renal. A depender da substância, tanto a forma inalterada e seus respectivos produtos de biotransformação podem ser encontrados na urina, tendo em vista que é um processo que ocorre constantemente. Pode-se citar como exemplos de outras vias de excreção a gastrointestinal (fezes) e transpiração (suor) (LEHMAN-MCKEEMAN, 2012). A excreção pode ser modificada para acelerar a eliminação de xenobióticos, a partir da acidificação ou alcalinização da urina, fazendo com que os compostos fiquem na forma ionizada, impedindo a reabsorção renal e aumentando a eliminação (OLSON; VOHRA, 2018).

A ação tóxica de um xenobiótico acontece em decorrência da sua toxicodinâmica, isto é, a partir da sua interação com o sistema biológico. O mecanismo de ação pode acontecer em decorrência da atividade agonista ou antagonista em determinado sítio alvo, modulando o funcionamento fisiológico do organismo. A interação do xenobiótico com os sítios alvos será traduzida em manifestações clínicas (PEREIRA; FRANCO-BERNARDES; DORTA, 2018).

Uma intoxicação pode apresentar síndromes tóxicas específicas, conhecidas também como toxíndromes. Pode citar-se como exemplos as síndromes simpaticomiméticas, colinérgica, anticolinérgica, opioide, dentre outras. Cada uma delas apresenta sinais e sintomas específicos, os quais pode auxiliar no diagnóstico de um paciente intoxicado (HOLSTEGE; BOREK, 2012; WARING, 2017). No entanto, com o crescente poliuso de substâncias têm sido cada vez mais difícil a caracterização de uma síndrome tóxica em um paciente, mostrando a necessidade de dados complementares para o estabelecimento de uma intoxicação, tais como exames laboratoriais de rotina e análises toxicológicas (DOS SANTOS; VIANNA; SEBEN, 2022). A depender da intoxicação, haverá a necessidade de intervenção médica para o controle dos efeitos tóxicos da substância, de forma a estabilizar o paciente, podendo ser realizada administração de antídotos, medidas de descontaminação, como lavagem gástrica, e medidas de eliminação (CANTILENA JR, 2012).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica as intoxicações como um problema global de saúde pública (WHO, 2020). Ao longo dos últimos anos, os

números de intoxicações têm aumentado no Brasil e no mundo, estando estes relacionados a casos de exposição a medicamentos, drogas de abusos, produtos químicos industriais, gases tóxicos, plantas tóxicas, além de acidentes com animais peçonhentos (CIT/RS, 2022; GUMMIN *et al.*, 2021; SINAN, 2022). Uma intoxicação pode ter caráter não intencional (acidentes) ou caráter intencional (tentativas de suicídio, abuso de drogas e medicamentos, entre outros), estando as faixas etárias de crianças e idosos associadas majoritariamente à casos não intencionais, enquanto jovens e adultos estão relacionados a casos intencionais. A frequência de uso para cada grupo ou tipo de substância pode variar de acordo com o sexo e idade do paciente, assim como outras variáveis sociodemográficas (CIT/RS, 2022; GUMMIN *et al.*, 2021).

Marcos temporais podem influenciar diretamente nos padrões de intoxicação por, tal como ocorreu com a pandemia da COVID-19. Conforme Dos Santos *et al.* (2021), a quantidade de casos de intoxicações registrados pelo Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul (CIT/RS) foi modulada durante a primeira onda da pandemia, havendo uma diminuição considerável de exposições a medicamentos de uso psiquiátrico, principalmente devido à redução no número de tentativas de suicídio. Em contrapartida, um aumento de mais de 40% foi visto nas intoxicações envolvendo drogas ilícitas e álcool, durante os meses de março a julho de 2020, em comparação ao mesmo período de 2019 (DOS SANTOS *et al.*, 2021).

No Brasil, os Centros de Informação e/ou Assistência Toxicológica (CIATs) são os locais de referências para casos de intoxicação, prestando atendimento e assistência à população e profissionais da saúde. Ao todo, existem 32 CIATs no território brasileiro, presentes em 18 estados da federação e no Distrito Federal (ABRACIT, 2022). Conhecidos como “*poison control centers*” em outros países, os CIATs são de extrema importância para a saúde pública e um melhor prognóstico do paciente. Galvão *et al.* (2011) examinou casos de intoxicações com e sem assistência remota de um CIATox entre 2005 e 2007, onde foi possível perceber que pacientes com assistência têm menor tempo de permanência no hospital em relação aos pacientes sem assistência do CIAT no caso (GALVÃO *et al.*, 2011). Friedman *et al.* (2014) verificou a partir de casos de intoxicações atendidos pelo Centro de Intoxicações do estado do Illinois (EUA) uma associação entre casos com assistência dos centros de controle de intoxicação e menor taxa de hospitalização dos pacientes.

Além disso, o grupo de pacientes atendidos pelos centros de intoxicação tiveram maior gasto em análises laboratoriais, porém o valor foi compensado com menores gastos com internação, salas de cirurgias e anestesiólogos, chegando a uma economia por volta de 11 milhões de dólares (FRIEDMAN *et al.*, 2014).

Dentre os anos de 2007 a 2021, o Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN), vinculado ao Ministério da Saúde do Brasil, cerca de 1,4 milhão de intoxicações exógenas foram notificadas pelos serviços de saúde brasileiros. Os grupos mais incidentes foram os medicamentos (677.010 casos; 45,9%), drogas de abuso (178.446 casos; 12,1%) e saneantes domissanitários (81.174 casos; 5,5%) (SINAN, 2022).

Nos últimos anos, o Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul (CIT/RS) tem registrado um aumento no número de exposições humanas a agentes tóxicos, tendo o registro de 26.484 casos no ano de 2019 e 24.946 casos no ano de 2020. O número de casos em 2019 representa um aumento de 36,7% em relação aos casos registrados em 2010 e 121,6% aos casos registrados no ano de 2000. Historicamente, os casos envolvendo medicamentos são os mais incidentes, representando 31,9% dos casos atendidos em 2020. Dentre as classes específicas, os benzodiazepínicos e antidepressivos foram as classes de agentes mais frequentes, tendo respectivamente 3.028 (12,1%) e 2.877 (11,5%) casos no mesmo ano (CIT/RS, 2022).

De forma geral, estima-se que estes números, apesar de preocupantes, estão abaixo do quantitativo real, seja pela subnotificação de casos, dificuldade de interligação dos sistemas de notificação brasileiros, assim como a dificuldade de diagnóstico de intoxicações inespecíficas (MAGALHÃES; CALDAS, 2018, 2019). Isso ressalta a importância da necessidade de técnicas laboratoriais para o diagnóstico de pacientes intoxicados, de forma que seja possível proceder o tratamento e manejo mais adequado ao paciente, proporcionando um melhor prognóstico.

Diversos fatores levam um agente ou classe de substância ter números elevados de intoxicações, podendo citar como exemplo a acessibilidade, janela terapêutica estreita, potencial tóxico intrínseco, dentre outros. Além disso, o perfil de intoxicação pode mudar com a localidade geográfica, assim como eventos temporais e fatores sociodemográficos, tais como sexo e idade (CHRZANOWSKA *et al.*, 2021;

DOS SANTOS *et al.*, 2021; ELLER *et al.*, 2020; NISTOR *et al.*, 2017; SPILLER, HENRY A. *et al.*, 2019, 2020; VILAÇA; VOLPE; LADEIRA, 2020).

1.2. Principais medicamentos e drogas de abuso de interesse toxicológico

1.2.1. Acetaminofeno

O acetaminofeno, ou paracetamol, é um fármaco analgésico e antipirético, amplamente utilizado no Brasil e no mundo, por crianças e adultos. O acetaminofeno possui formulações em combinação com outros fármacos, como codeína, difenidramina e pseudoefedrina (OLSON, 2018). Seu mecanismo de ação analgésico está relacionado principalmente à inibição da síntese de prostaglandinas pelas ciclooxigenases. No entanto, pesquisas recentes mostram a ação de seus produtos de biotransformação em receptores moduladores da dor (OHASHI; KOHNO, 2020).

Sua atividade tóxica está relacionada ao seu produto de biotransformação N-acetil-p-benzo-quinona imina (NAPQI), o qual é originado a partir da biotransformação do acetaminofeno pelo complexo citocromo P450, especificamente pelas enzimas CYP2E1 e CYP1A2. Esta via representa cerca de 3-8% da biotransformação do fármaco. O NAPQI possui um elevado potencial eletrofílico, sendo assim altamente reativo, interagindo com macromoléculas. Em condições normais, as baixas concentrações de NAPQI serão detoxificadas pela ligação à glutatona, gerando ácido mercaptúrico. No entanto, em sobredosagens, há saturação da via da glutatona, o que impede a neutralização do NAPQI, o qual fica disponível para causar danos às macromoléculas. A dose tóxica do paracetamol em adultos por via oral é a partir de 6-7,5 gramas (OLSON, 2018; SEBBEN *et al.*, 2010).

Em decorrência da biotransformação e alta reatividade do NAPQI, o local da sua ação tóxica será, majoritariamente, no tecido hepático. As principais manifestações clínicas associadas da exposição ao acetaminofeno são desconforto gastrointestinal, náuseas e vômito. No entanto, grande parte dos pacientes não apresentam manifestações clínicas nas primeiras horas, mostrando a importância da análise toxicológica, visto a necessidade de intervenção precoce. O diagnóstico é baseado na anamnese, biomarcadores clínicos e análise toxicológica. O aumento de

enzimas hepáticas, como a aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) é representativo de necrose hepática (FISHER; CURRY, 2019; OLSON, 2018). Outros exames podem apresentar-se alterados como glicemia e provas de coagulação, além de presença de acidose metabólica (OLSON, 2018).

Apesar da elevada toxicidade em altas doses, o acetaminofeno possui antídoto, a N-acetilcisteína (NAC). O NAC irá prover substrato para a conjugação do NAPQI com glutathione. A hepatotoxicidade do acetaminofeno pode ser predita a partir do nomograma de Rumack-Matthew, onde correlaciona o tempo da exposição com a concentração plasmática de acetaminofeno. A partir dele, é possível também avaliar a necessidade da continuidade do tratamento com NAC (FISHER; CURRY, 2019; OLSON, 2018; SEBEN *et al.*, 2010).

1.2.2. Anestésicos

A lidocaína é um anestésico local amplamente difundido na prática clínica. É classificada dentro do grupo amida, junto com outros anestésicos como bupivacaína e prilocaína. O mecanismo de ação é o bloqueio de canais de sódio nas fibras nervosas, de forma a reduzir a geração do impulso, a partir do aumento do limiar de condução (BENOWITZ, 2018c). Além do uso anestésico, pode ser usado de forma central para correção de arritmias cardíacas, principalmente ventriculares geradas por outras substâncias cardiotoxícas, como digoxina, estimulantes e antidepressivos tricíclicos (KEARNEY, 2018b). As principais manifestações clínicas da exposição tóxica à lidocaína são anestesia prolongada, cefaleia, parestesias periorais, fala arrastada, convulsões, coma e parada respiratória. Além disso, pode ocorrer metemoglobinemia (BENOWITZ, 2018c).

As intoxicações por lidocaína podem advir do uso de cocaína adulterada com lidocaína, podendo ultrapassar a dose única máxima recomendada para adultos, que é de 300 miligramas (BENOWITZ, 2018c). Floriani *et al.* (2014) em estudo onde realizou o perfil químico de apreensões de cocaína no Brasil entre 2007-2012 identificou a presença de lidocaína em aproximadamente 19% das amostras analisadas. Dentre as amostras positivas para lidocaína, o percentual de lidocaína variou entre 1,8 a 93,4% (FLORIANI *et al.*, 2014).

A cetamina e fenciclidina (PCP) são anestésicos dissociativos, com elevada semelhança molecular e farmacológica. Inicialmente, a fenciclidina foi utilizada como anestésico em procedimentos médicos, mas devido aos seus efeitos adversos, foi retirada de uso, mas alcançou popularidade nos anos 60 como droga de abuso, devido os seus efeitos alucinógenos. A cetamina, de modo a substituir a PCP, possui menores efeitos adversos, sendo utilizada como agente anestésico e sedativo, mas também o seu uso abusivo tornou-se popular na década de 90 até os dias de hoje, principalmente em festas (ARMENIAN, 2018; MORGAN; CURRAN, 2012). Em estudo conduzido por Da Cunha et al. (2021), análises de fluido oral de participantes de festas e festivais de música eletrônica indicaram cerca de 75% de presença de cetamina entre as amostras positivas para ao menos uma substância (DA CUNHA *et al.*, 2021).

Terapeuticamente, a cetamina é usada até os dias de hoje para anestesia em procedimentos que não necessitam de relaxamento muscular, sendo empregado principalmente em pacientes pediátricos e na medicina veterinária (MORGAN; CURRAN, 2012). O uso abusivo pode ser feito pelas vias intranasal, intravenosa, respiratória e oral. O mecanismo de ação da cetamina e PCP é baseado no bloqueio alostérico de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), conhecidos também como receptores de glutamato, um importante neurotransmissor estimulante. Além destes, ambas substâncias agem em outras vias, tais como inibição de dopamina, norepinefrina e serotonina e ativação de receptores opioides. As manifestações clínicas vão desde euforia e alucinações até comportamento agressivo, sedação, convulsões e coma. Não existe antídoto específico para a cetamina e PCP, sendo o tratamento de suporte e sintomático (ARMENIAN, 2018).

1.2.3. Antidepressivos

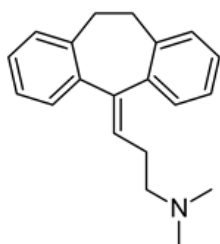
Os antidepressivos são fármacos utilizados para o tratamento da depressão, assim como transtorno de ansiedade e outras comorbidades. A depressão maior, ou depressão unipolar, é um transtorno psiquiátrico onde o indivíduo apresenta episódios depressivos, estes caracterizados por sintomas como tristeza, humor deprimido, anedonia, pessimismo, falta de concentração, distúrbios de sono, alterações alimentares, dentre outros. Cerca de 10 a 15% dos pacientes com depressão grave

podem apresentar ideação suicida, chegando à tentativa ou efetivação do suicídio (O'DONNELL; SHELTON, 2012).

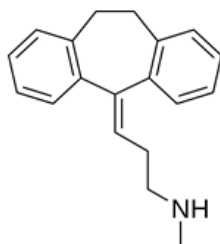
Por outro lado, os transtornos de ansiedade são caracterizados como um conjunto de sintomas e transtornos, tais como transtorno de ansiedade generalizada e transtorno obsessivo-compulsivo. A ansiedade na forma de transtorno é caracterizada como uma ansiedade exacerbada, medo, temor, fobias específicas de forma frequente. O tratamento farmacológico é amplo, podendo ser feito de forma aguda ou crônica (O'DONNELL; SHELTON, 2012).

Os antidepressivos podem ser classificados de acordo com a sua farmacodinâmica. A partir da década de 1960, os primeiros antidepressivos entraram no mercado, os antidepressivos tricíclicos (TCAs) e inibidores da monoamino oxidases (IMAOs). São fármacos utilizados até os dias de hoje, porém na maioria das vezes não são de primeira escolha, visto seus efeitos adversos mais acentuadas e menor efetividade em comparação a outros antidepressivos em certos transtornos. A partir da década de 1980, o surgimento de novos antidepressivos alavancou, originando novas classes, como os inibidores seletivos da recaptção de serotonina (O'DONNELL; SHELTON, 2012; PENN; TRACY, 2012). Na **Figura 1** estão apresentadas as estruturas químicas de alguns dos principais antidepressivos. No **Quadro 1** estão apresentadas as principais classes de antidepressivos, assim como seus respectivos mecanismos farmacodinâmicos, fármacos e manifestações clínicas decorrentes da intoxicação.

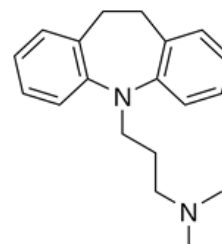
Figura 1. Estruturas químicas dos principais fármacos antidepressivos



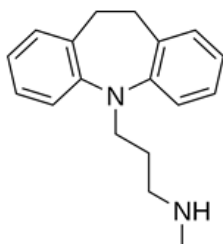
Amitriptylina



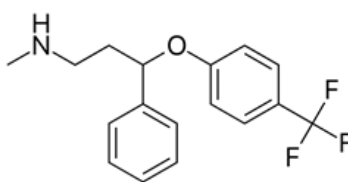
Nortriptylina



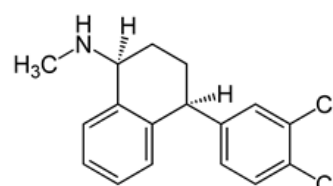
Imipramina



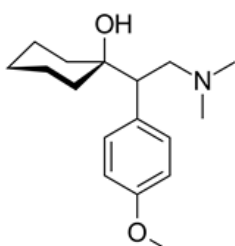
Desipramina



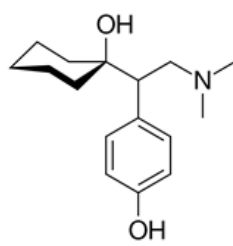
Fluoxetina



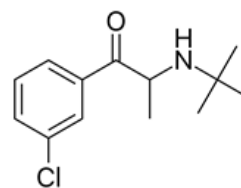
Sertralina



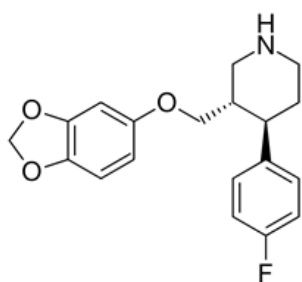
Venlafaxina



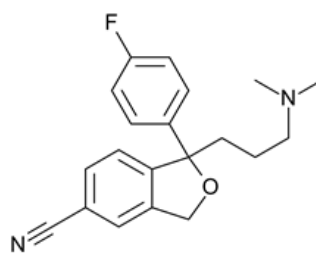
Desvenlafaxina



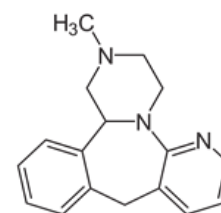
Bupropiona



Paroxetina



Citalopram



Mirtazapina

Quadro 1. Principais classes de antidepressivos e respectiva farmacodinâmica, fármacos e manifestações clínicas.¹

Classe de antidepressivo	Mecanismo de ação farmacológico	Principais fármacos	Principais manifestações clínicas da intoxicação²
Antidepressivos tricíclicos (TCAs)	Inibição dos transportadores de recaptação de serotonina, norepinefrina e dopamina	Amitriptilina Clomipramina Desipramina Imipramina Nortriptilina	Efeitos anticolinérgicos (sedação, boca seca, coma, taquicardia, retenção urinária), arritmias cardíaca, hipotensão e choque
Inibidores da monoamino oxidase (IMAOs)	Inibição (reversível ou irreversível) da monoamino oxidase (MAO)	Fenelzina Moclobemida Tranilcipromina	Taquicardia, hipertensão, hipertermia, arritmias, convulsão, obnubilação e hipotensão ortostática
Inibidores seletivos da recaptação de serotonina (SSRIs)	Inibição dos transportadores de recaptação de serotonina	Citalopram Escitalopram Fluoxetina Fluvoxamina Paroxetina Sertralina	Ataxia, sedação, coma, tremor, agitação, taquicardia, choque, bradicardia sinusal com hipotensão, síndrome serotoninérgica
Inibidores da recaptação de norepinefrina e dopamina (NDRIs)	Inibição dos transportadores de recaptação de norepinefrina e dopamina	Bupropiona	Ansiedade, agitação, tremor, choque, taquicardia sinusal, hipertensão
Inibidores da recaptação de serotonina e norepinefrina (SNRIs)	Inibição dos transportadores de recaptação de serotonina e norepinefrina	Desvenlafaxina Venlafaxina Duloxetina	Tremor, choque, hipertensão

¹Adaptado de PENN, TRACY (2012). ²Fonte: BENOWITZ, 2018a, b; THANACOODY, 2020.

O manejo e tratamento do paciente intoxicado com antidepressivos é sintomático e de suporte. Medidas farmacológicas podem ser utilizadas para reverter determinadas situações, como lidocaína em arritmias ocasionadas por TCAs, bicarbonato de sódio para prolongamento QRS ou hipotensão ou cipro-heptadina e outros antagonistas serotoninérgicos para síndrome serotoninérgica (BENOWITZ, 2018a, b; THANACOODY, 2020). Carvão ativado e lavagem gástrica podem ser realizados em pacientes de gravidade elevada, onde exposição tenha ocorrido em até uma hora antes do atendimento médico (THANACOODY, 2020).

Os antidepressivos compõem o grupo com a segunda maior incidência de casos registrados pelo CIT/RS. Somente no período de 2016 a 2020 foram registrados 12650 casos. 90,0% dos casos de exposição a antidepressivos foram de circunstância intencional, como tentativa de suicídio. Na **Tabela 1** são apresentados os antidepressivos com maior incidência em casos atendidos pelo CIT/RS (CIT/RS, 2022).

Tabela 1. Casos de exposição a antidepressivos atendidos pelo CIT/RS entre 2016 e 2020.

Fármaco	2016	2017	2018	2019	2020	Total	
						n	%
Amitriptilina	378	449	537	667	551	2582	20,4
Bupropiona	69	79	98	132	104	482	3,8
Citalopram	100	98	100	101	109	508	4,0
Clomipramina	15	4	10	22	11	62	0,5
Escitalopram	119	151	205	283	252	1010	8,0
Fluoxetina	392	518	602	772	699	2983	23,6
Imipramina	60	60	64	72	40	296	2,3
Mirtazapina	17	12	13	15	16	73	0,6
Nortriptilina	38	17	20	34	30	139	1,1
Paroxetina	84	97	87	106	75	449	3,5
Sertralina	157	226	267	398	361	1409	11,1
Trazodona	38	50	36	68	66	258	2,0
Venlafaxina	83	66	115	126	119	509	4,0
Outros	245	317	393	491	444	1890	14,9
Total por ano	1795	2144	2547	3287	2877	12650	100,0

Fonte: CIT/RS, 2022.

1.2.4. *Anti-histamínicos e fármacos para resfriado*

Os fármacos anti-histamínicos são utilizados diversas finalidades clínicas, como tratamento da alergia, coceira, enjoo, tosse e indutor do sono. O mecanismo farmacodinâmico baseia-se no antagonismo de receptores H₁. Os anti-histamínicos podem ser divididos em primeira geração, como prometazina, difenidramina, clorfeniramina, ciproheptadina e dimenidrinato; e segunda geração, como a loratadina, desloratadina, cetirizina e levocetirizina. Os anti-histamínicos de primeira geração têm efeitos adversos associados à sua interação antagonista em receptores muscarínicos, serotoninérgicos e α -adrenérgicos. Fármacos como cimetidina e ranitidina também são considerados anti-histamínicos, porém são antagonistas de receptores H₂, inibindo a produção do suco gástrico, sem agir em receptores H₁, tendo mecanismos tóxicos distintos (MANNING, 2018; SIMONS; SIMONS, 2011).

Os sintomas da intoxicação são similares às intoxicações anticolinérgicas. Dentre as principais manifestações clínicas estão sonolência, taquicardia, midríase, delírio e alucinações. Sobredosagens excessivas de difenidramina pode causar cardiotoxicidade, semelhante aos antidepressivos tricíclicos. O tratamento da intoxicação por anti-histamínicos H₁ é de suporte e sintomático. Um ponto importante de cunho toxicológico é que os anti-histamínicos muitas vezes apresentam-se em formulações farmacêuticas com outros fármacos, como analgésicos, anti-inflamatórios e relaxantes musculares. Muitos destes produtos são destinados para tratamento sintomático de resfriado e gripes (MANNING, 2018).

Outros compostos são amplamente utilizados com tal intuito, como descongestionantes nasais. Pode-se citar como exemplos os derivados da imidazolina, sendo eles a nafazolina, tetrahidrozolina e oximetazolina, e efedrina (ou pseudoefedrina). Algumas das imidazolininas têm uso terapêutico como colírio. O mecanismo de ação é agonismo de receptores α_2 -adrenérgicos pré-sinápticos, inibindo a liberação de adrenalina (RANGAN, 2018). Mais recentemente, as alterações cardiovasculares têm sido descritas como resultados da interação em receptores de imidazolininas tipo 1 (LOWRY; BROWN, 2014). A tetrahidrozolina e oximetazolina podem agir de forma agonista em receptores α_1 -adrenérgicos. As manifestações clínicas mais comuns são bradicardia, sudorese, hipotermia e sonolência (RANGAN, 2018; SPILLER, HENRY; GRIFFITH, 2008). As intoxicações

por nafazolina são preocupantes especialmente em pacientes pediátricos, visto que pequenas doses podem levar a intoxicações. O uso de nafazolina em crianças menores de 12 anos é contraindicado (BUCARETCHI; DRAGOSAVAC; VIEIRA, 2003).

1.2.5. Antipsicóticos

Os antipsicóticos, também conhecidos como neurolépticos, são fármacos utilizados para o tratamento da psicose. A psicose está ou pode estar presente em diversos transtornos psiquiátricos, tais como esquizofrenia, transtornos de humor, transtorno delirante e transtorno psicótico. Os sintomas da psicose podem ser divididos em positivos ou negativos. Os sintomas positivos estão atrelados majoritariamente ao aumento de dopamina e cita-se como exemplos alucinações, agitação, delírio e fala desorganizada. Enquanto isso, os sintomas negativos estão relacionados com o aumento de serotonina, além da dopamina, traduzindo-se em manifestações clínicas como isolamento, afeto plano e alogia (MEYER, 2012).

Os antipsicóticos podem ser divididos em típicos e atípicos. Os principais antipsicóticos típicos são os derivados da fenotiazina, como a clorpromazina e levomepromazina, e os derivados da butirofenona, como o haloperidol e droperidol. O mecanismo de ação farmacológico dos antipsicóticos típicos baseia-se no antagonismo de receptores dopaminérgicos pós-sinápticos, atuando prioritariamente nos sintomas positivos. Já os antipsicóticos atípicos são atrelados ao antagonismo serotoninérgico, tendo como principais representantes a risperidona, quetiapina e clozapina (MINNS; CLARK, 2012).

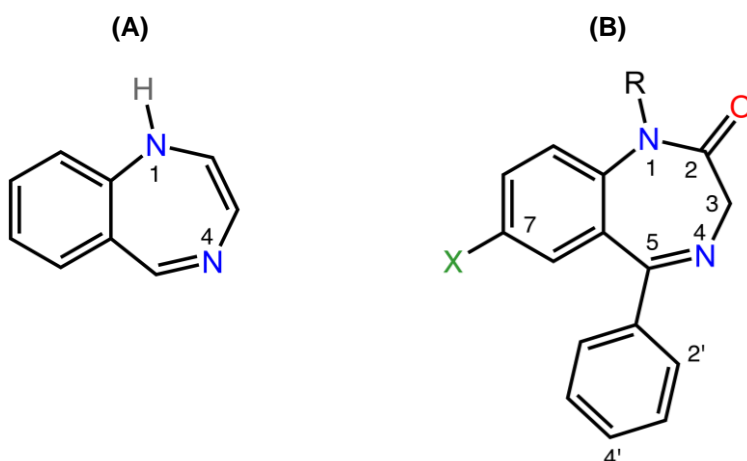
Os neurolépticos típicos, principalmente os fenotiazínicos, possuem diversos efeitos adversos associados e muitas vezes atenuados, como reações extrapiramidais, devido à sua interação inibitória com outros receptores, como receptores de histamina, parassimpáticos, serotoninérgicos e α -adrenérgicos. Por esta razão, alguns destes fármacos, como a clorpromazina, possuem indicação terapêutica antiemética para cinetose. A biotransformação dos antipsicóticos é majoritariamente realizada no tecido hepático (LEWIS, 2018; MEYER, 2012).

As principais manifestações clínicas de intoxicações por antipsicóticos são sedação, hipotensão ortostática, boca seca, retenção urinária, reações extrapiramidais prolongamento do intervalo QT e estado de confusão prolongado (LEWIS, 2018; MINNS; CLARK, 2012). O tratamento da intoxicação é, na maioria das vezes, de suporte e sintomático, podendo haver intervenção farmacológico, como uso de colinérgicos para tratamento de sintomas anticolinérgicos, uso de vasopressores para tratar hipotensão, benzodiazepínicos e outros fármacos, como biperideno, para as reações extrapiramidais (LEWIS, 2018; THANACOODY, 2020).

1.2.6. Benzodiazepínicos

A partir dos anos 50, os benzodiazepínicos foram sintetizados, revolucionando o tratamento psiquiátrico voltado aos transtornos de ansiedade e insônia, de forma a substituir os barbitúricos em diversas indicações clínicas, devido à sua maior segurança. São compostos que estruturalmente são derivados da benzodiazepina, a qual é formada por grupamento cíclicos benzeno e diazepina, como mostrado na **Figura 2**. O clordiazepóxido foi o primeiro benzodiazepínico a entrar no mercado na década de 1960. A partir disto, outros análogos foram desenvolvidos, como diazepam, alprazolam, flunitrazepam e clonazepam. No **Quadro 2** estão descritos os benzodiazepínicos conforme suas substituições radicalares a partir da estrutura base. Entre os anos de 1969 e 1982, o diazepam foi o medicamento mais prescrito nos Estados Unidos da América, mostrando sua larga disseminação e acessibilidade (LADER, 2011).

Figura 2. (A) Estrutura química de benzodiazepina e (B) estrutura base dos benzodiazepínicos.



Quadro 2. Estrutura dos benzodiazepínicos conforme substituição dos radicais na estrutura base dos benzodiazepínicos¹

Benzodiazepínico	Substituinte				
	R1	R2	R3	R7	R2'
Alprazolam	Anel triazol fusionado		-H	-Cl	-H
Clordiazepóxido	(-)	-NHCH ₃	-H	-Cl	-H
Clonazepam	-H	=O	-H	-NO ₂	-Cl
Diazepam	-CH ₃	=O	-H	-Cl	-H
Estazolam	Anel triazol fusionado		-H	-Cl	-H
Lorazepam	-H	=O	-OH	-Cl	-Cl
Midazolam	Anel imidazol fusionado		-H	-Cl	-F
Nitrazepam	-H	=O	-H	-NO ₂	-H
Temazepam	-CH ₃	=O	-OH	-Cl	-H

¹ Adaptado de MIHIC; HARRIS, 2012.

A farmacodinâmica dos benzodiazepínicos é baseada na ligação agonista de forma alostérica em receptores de γ -aminobutírico (GABA), subtipo GABA_A. Essa ligação aumenta a afinidade do GABA pelos receptores GABA, favorecendo a ligação do neurotransmissor. Os receptores GABA são receptores ionotrópicos de cloro e a sua ativação pelo GABA fará com que o canal fique aberto, aumentando o influxo de cloro. Este aumento de cloro na célula nervosa ocasionará uma hiperpolarização, desfavorecendo a transmissão do sinal nervoso (MIHIC; HARRIS, 2012).

Farmacologicamente, isso resultará na sedação, hipnose, relaxamento muscular, diminuição da ansiedade e ação anticonvulsivante (MIHIC; HARRIS, 2012). Em intoxicações, estes efeitos depressores são acentuados, junto ao aparecimento de letargia, ataxia, fala arrastada e, em casos mais graves, coma e parada cardiorrespiratória (TSUTAOKA, 2018). Apesar disso, óbitos induzidos por exposição somente por benzodiazepínicos não são comuns quando comparados a outros sedativos-hipnóticos (CHARLSON *et al.*, 2009).

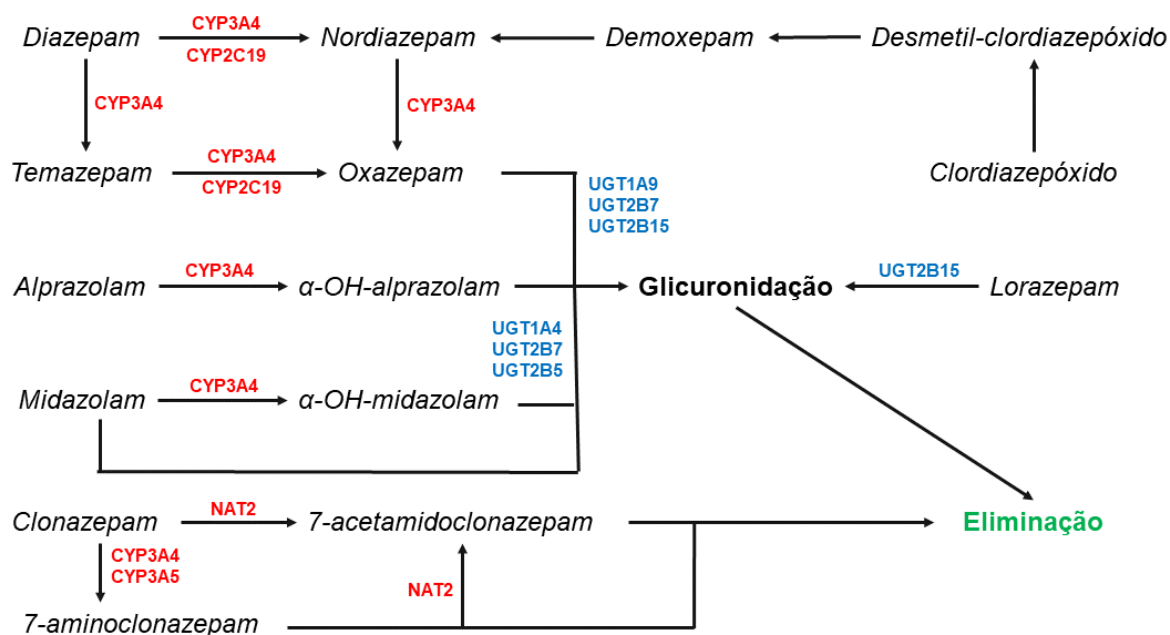
Os benzodiazepínicos vão diferenciar entre si principalmente pela farmacocinética, podendo ser classificados de acordo com o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$): ação rápida ($t_{1/2}$ entre 1-5h, como alprazolam e midazolam), ação média ($t_{1/2}$ entre 6-20h, como flunitrazepam e nitrazepam) e longa ação ($t_{1/2}$ maior que 21h, como diazepam e flurazepam) (TANAKA; NAKAMURA; HONDA, 2004). O tempo de meia-vida é essencial para a escolha do benzodiazepínico para determinada indicação terapêutica. O uso contra ansiedade é realizado com benzodiazepínicos de ação

longa, enquanto o uso destes fármacos como hipnóticos é realizado com benzodiazepínicos de ação rápida. Além disso, os benzodiazepínicos têm usos terapêuticos recomendados para controle de convulsões, insônia, síndrome de abstinência, relaxamento muscular, como medicação pré-anestésica e intraoperatória e agorafobia.

A biotransformação dos benzodiazepínicos ocorre principalmente no tecido hepático, mediada pelo complexo citocromo P450. De forma geral, as reações de Fase I são N-desalquilação e hidroxilação dos compostos, e com subsequente glicuronidação na Fase II (MIHIC; HARRIS, 2012; TANAKA; NAKAMURA; HONDA, 2004). Na **Figura 3** são apresentadas as principais vias de biotransformação dos benzodiazepínicos.

Os benzodiazepínicos são substâncias passíveis de dependência, devido à tolerância desenvolvida, principalmente em altas doses. Com isso, síndromes de abstinência são comuns em indivíduos que interrompem abruptamente o uso de benzodiazepínicos, manifestando sintomas como *delirium tremens*, catatonia, convulsões, depressão e até mesmo ideação suicida (LADER, 2011).

Figura 3. Principais vias de biotransformação dos benzodiazepínicos.



Adaptado de MIHIC; HARRIS, 2012. Em vermelho estão as enzimas envolvidas em reações de Fase I, e em azul estão as enzimas envolvidas em reações de Fase II.

Nas intoxicações por benzodiazepínicos, assim como as outras substâncias, deve haver tratamento de sintomas e suporte, como tratamento de hipotensão, hipotermia e coma. Em adição, os benzodiazepínicos possuem antídoto específico, o flumazenil, o qual também é considerado um benzodiazepínico. No entanto, o flumazenil atua como antagonista dos receptores GABA, revertendo a atividade dos benzodiazepínicos. Contudo, o flumazenil apresenta contraindicações ou desvantagens, tais como redução do limiar convulsivo em indivíduos expostos a outras substâncias com atividade pró-convulsiva. Cita-se como exemplos os antidepressivos tricíclicos e alguns antipsicóticos. Este ponto é importante, pois ressalta a importância da análise toxicológica, de forma a verificar poliuso de substâncias. Ademais, o fármaco pode induzir abstinência aguda em pacientes com dependência de benzodiazepínicos (LADER, 2011; TSUTAOKA, 2018).

Junto aos benzodiazepínicos, estão outros compostos hipnóticos como zolpidem e zopiclona, conhecidos como Compostos-Z ou *Z-drugs*. Estruturalmente, não se assemelham aos benzodiazepínicos, mas tem mecanismo de ação similar, atuando como agonista de receptores GABA. Desde os anos 90, seu uso tem aumentando exponencialmente, usando clinicamente para condições como insônia, vindo a substituir alguns benzodiazepínicos clássicos (MIHIC; HARRIS, 2012).

1.2.7. Carbamazepina

A carbamazepina é um derivado do iminoestilbeno, sendo amplamente utilizada como anticonvulsivante, para o tratamento de convulsões parciais e tônico-clônicas. Além disso, possui outras indicações terapêuticas, como o tratamento da neuralgia do nervo trigêmeo, transtornos psiquiátricos e síndromes de abstinência. Seu mecanismo de ação é baseado no bloqueio de canais de sódio regulados por voltagem. Isso diminuirá a incitação recorrente de potenciais de ação decorrentes de despolarização constantes das células nervosas, diminuindo as epilepsias (MCNAMARA, 2012). No contexto toxicológico, a toxicodinâmica está relacionada também à sua ação anticolinérgica (KEARNEY, 2018a).

Nas intoxicações por carbamazepina, as manifestações clínicas mais comuns são ataxia, nistagmo, discinesia, distonia, midríase e taquicardia sinusal. Em

intoxicações graves, pode ocorrer choque, coma e parada respiratória (KEARNEY, 2018a). O tratamento é sintomático e de suporte. Medidas de eliminação, como doses repetidas de carvão ativado e hemoperfusão podem ser utilizadas devido ao seu menor volume de distribuição em comparação com outros fármacos (GOKTAS; KATI; YUCE, 2010; KEARNEY, 2018a; YANG *et al.*, 2018).

A carbamazepina apresenta uma absorção lenta via oral, tendo o pico plasmático entre 4 a 6 horas após a ingestão. Por conta da cinética lenta, os efeitos clínicos tendem a serem mais demorados (KEARNEY, 2018a). Um fator importante nos indivíduos que fazem uso de carbamazepina é a indução enzimática de isoenzimas do complexo citocromo P450. A expressão das enzimas dos grupos CYP2C, CYP3A e UGT pode estar aumentada com o uso de carbamazepina. Parte destas enzimas estão associadas à biotransformação da própria carbamazepina, de forma a reduzir a sua efetividade, assim como outros compostos biotransformados por estas enzimas, sendo necessário aumento da dose ou troca do fármaco (MCNAMARA, 2012; VLASE *et al.*, 2011).

A faixa terapêutica dos níveis plasmáticos de carbamazepina vai de 4 a 12 µg/mL (KEARNEY, 2018a). Toxicidade já foi observada a partir de 10 µg/mL e níveis acima de 20 µg/mL podem induzir coma e são considerados potencialmente fatais (SCHULZ *et al.*, 2020). Por desta pequena janela terapêutica entre concentrações terapêuticas e tóxicas, o monitoramento terapêutico de carbamazepina já é amplamente estabelecido, presente na grande maioria dos laboratórios clínicos.

1.2.8. Cocaína

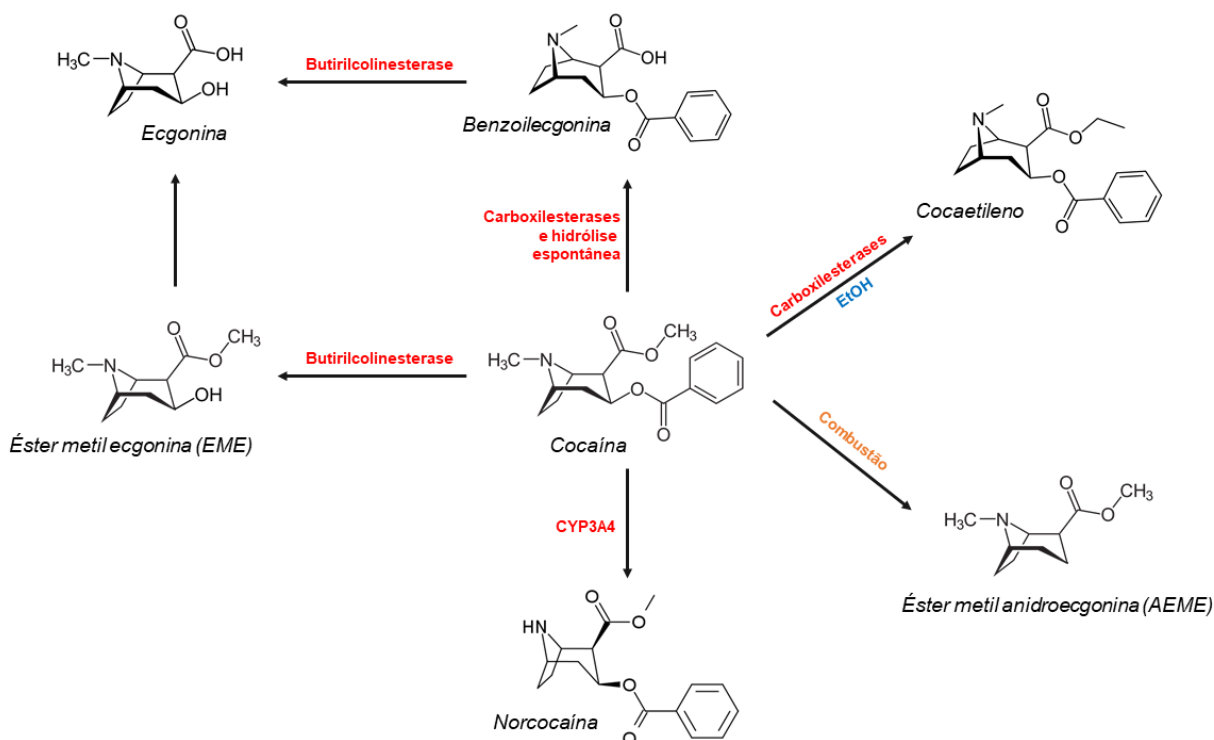
A cocaína é um alcaloide extraído das folhas da planta *Erythroxylum coca* (família das Erythroxylaceae), nativa do norte dos andes da América do Sul. Seu uso como droga de abuso é disseminado pelo mundo e uma das drogas mais prevalentes na América do Sul, devido à proximidade com a cadeia produtiva, o que torna mais acessível do que outras regiões, como Europa e América do Norte (CHASIN; CARVALHO, 2018; ISENSCHMID, 2020). De acordo com o III Levantamento Nacional sobre o uso de drogas pela população brasileira, a cocaína é a segunda droga ilícita com maior prevalência de uso, com estimativa de que 3,1% da população brasileira já

tenha utilizado a substância ao menos uma vez na vida (BASTOS *et al.*, 2017). A cocaína considerada substância proscrita no Brasil, conforme a resolução RDC nº 344/1998, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (ANVISA, 1998).

A cocaína pode estar apresentada ao consumidor final de várias formas, principalmente na forma de sal (cloridrato de cocaína) e crack (forma fumável). O uso da cocaína ocorre principalmente devido aos seus intensos efeitos estimulantes e isso pode ser modulado de acordo com a dose e via de administração usada (nasal, inalatória, intravenosa, oral) (CHASIN; CARVALHO, 2018). Por ser uma droga ilícita, não há quaisquer procedimentos que atestam a qualidade do produto. A cocaína é uma droga altamente adulterável, principalmente com diluentes ou outras substâncias que mimetizem seus efeitos, tais como lidocaína, cafeína, tetracaína, levamisol e fenacetina (BROSÉUS; GENTILE; ESSEIVA, 2016).

A velocidade do início dos efeitos clínicos e pico plasmático dependerá da via de administração. Quando utilizada via intranasal, a cocaína demorará cerca de 10 a 15 minutos para atingir o pico plasmático, enquanto quando fumável este tempo será de poucos segundos. A cocaína será amplamente biotransformada por diversas rotas, principalmente pelas colinesterases e carboxilesterases. As principais vias de biotransformação e seus respectivos produtos estão demonstrados na **Figura 4**. Juntamente na mesma figura, é mostrado a formação do cocaetileno, produto formado quando há a exposição concomitante de cocaína e etanol (ISENSCHMID, 2020).

Figura 4. Principais vias de biotransformação da cocaína.



Adaptado de CHASIN; CARVALHO, 2018.

O mecanismo de ação da cocaína é centrado no bloqueio de transportadores de dopamina, de forma a aumentar a quantidade do neurotransmissor na fenda sináptica, o que será traduzido na euforia e estimulação do sistema nervoso central (CHASIN; CARVALHO, 2018). Os transportadores de outras catecolaminas podem ser bloqueados, mas em menor quantidade. O efeito anestésico local da cocaína é devido ao bloqueio de canais de sódio. Enquanto isso, efeitos cardiovasculares podem ser relacionados também à sua atuação em receptores α -adrenérgicos (ZIMMERMAN, 2012).

A intoxicação por cocaína é caracterizada por euforia, agitação, taquicardia, hipertensão, ansiedade, tremor, hiperatividade muscular, surtos psicóticos e convulsões. Os óbitos em decorrência do uso de cocaína podem ocorrer em função de arritmias cardíacas, hemorragia intracraniana, hipertermia e estados epiléticos. Não existe tratamento específico, sendo de suporte e sintomático (GUGELMANN; BENOWITZ, 2018; ZIMMERMAN, 2012). Ademais, é importante um olhar tendo em vista a exposição aos adulterantes, os quais podem causar intoxicação, como o levamisol, o qual é associado a agranulocitose e vasculite (MARQUEZ *et al.*, 2017). Por conta disso, associado à mioglobinúria, é essencial monitorar a função renal do

paciente intoxicado, sendo este muitas vezes um usuário crônico (GUGELMANN; BENOWITZ, 2018).

1.2.9. Estimulantes tipo anfetamina

Os estimulantes tipo anfetamina (ATS) ou anfetamínicos são uma classe de substância com semelhança molecular e biológica à anfetamina. O histórico das anfetaminas inicia-se no final do século XIX com o isolamento da efedrina a partir da planta *Ephedra vulgaris* (da família Ephedraceae). Disso em diante, a efedrina teve seu uso farmacológico reconhecido, inicialmente para o tratamento da asma, perpetuando-se até os dias de hoje como um eficaz descongestionante nasal. A partir disso, na década de 1930 foi sintetizado um análogo da efedrina, a anfetamina, comercializado inicialmente como descongestionante nasal e posterior aprovação e uso para depressão, obesidade e narcolepsia. Desde então, inúmeros compostos anfetamínicos foram sintetizados, sendo utilizados até hoje de forma lícita ou ilícita (MORELLI; TOGNOTTI, 2021).

Alguns ATS têm uso regulamento no Brasil, principalmente com indicação para tratamento da obesidade e déficit de atenção (ANVISA, 1998). No entanto, o uso ilícito dessas substâncias não é incomum. Estima-se que 1,4% da população brasileira já tenha usado algum anfetamínico lícito sem prescrição médica (BASTOS *et al.*, 2017). De acordo com a UNODC, em 2020 estima-se que 34 milhões de indivíduos usaram algum tipo de anfetamina, mostrando um crescimento constante na última década. Enquanto isso, estima-se 20 milhões de pessoas usaram substâncias relacionadas ao *ecstasy* (MDMA), representando uma redução, porém é ressaltado que o uso deste tipo de droga é predominantemente em ambiente de festa, os quais tiveram impacto com a pandemia da COVID-19 (UNODC, 2022).

Dentre os principais representantes das ATS está a própria anfetamina, metanfetamina, efedrina, sibutramina, femproporex, dietilpropiona, 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) e 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA). As catinonas sintéticas também são consideradas ATS, mas serão abordados mais à frente na seção de novas substâncias psicoativas (CRUZ *et al.*, 2018).

O mecanismo de ação das anfetaminas é baseado no aumento de catecolaminas na fenda sináptica a partir de inibição dos transportadores de recaptação de dopamina, noradrenalina e serotonina, inibição da monoamino oxidase e estimulação da liberação de catecolaminas em vesículas intracelulares (CRUZ *et al.*, 2018). A afinidade de cada ATS pelos transportadores varia, tendo, por exemplo, a anfetamina e metanfetamina maior afinidade pelos transportadores de noradrenalina (NET), enquanto o MDMA possui afinidade igual pelos NET e transportadores de serotonina (SERT). Esta afinidade modulará as manifestações clínicas em decorrência da exposição aos ATS (CRUZ *et al.*, 2018).

Comumente, os ATS são utilizados por via oral, mas outras vias de administração podem ser vistas no contexto toxicológico, como uso de anfetamina por via inalatória. São substâncias bem absorvidas por via oral e os efeitos iniciam entre 0,5-1h após a ingestão. No processo de eliminação, a excreção renal é modulada de acordo com o pH da urina, sendo o pH ácido ideal para a eliminação aumentada, por conta da ionização das moléculas e, subsequente, diminuição da reabsorção renal. A biotransformação é realizada, majoritariamente, no fígado (ALBERTSON, 2018). Nos exames toxicológicos, alguns ATS podem estar presentes por conta da biotransformação de outro ATS, e não necessariamente porque o indivíduo foi exposto a tal substância. Como exemplos pode citar-se a metanfetamina convertida a anfetamina e o MDMA convertido a MDA (HARTMAN *et al.*, 2014).

As principais manifestações clínicas relacionadas às intoxicações por ATS são euforia, taquicardia, hipertensão, agitação, sudorese, hipertermia, choque e coma. Surtos psicóticos, alucinações e delírios estão mais associados ao uso de MDMA e derivados, por conta da ação na via serotoninérgica (ALBERTSON, 2018; HORWITZ *et al.*, 2017). Vivolo-Kantor *et al.* (2020) descreveu um aumento nos últimos anos de admissões em emergências por intoxicação envolvendo o uso de algum anfetamínico. No mesmo estudo, mostrou-se que pacientes expostos a algum ATS tem 1,9 mais chances de desenvolver efeitos cardiovasculares do que pacientes expostos a outras classes de substâncias (VIVOLO-KANTOR *et al.*, 2020).

1.2.10. Novas substâncias psicoativas

As novas substâncias psicoativas (NPS, do inglês “*New Psychoactive Substances*”), também conhecidas como *designer drugs*, são compostos sintéticos produzidos e comercializados com o intuito de substituir as drogas ilícitas clássicas (SHAFI *et al.*, 2020). De acordo com o *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction* (EMCDDA), NPS são aquelas substâncias não controladas pela Convenção Única sobre Entorpecentes de 1961 e pela Convenção sobre Substâncias Psicotrópicas de 1971, porém representam ameaça à saúde pública, podendo causar efeitos deletérios comparados às substâncias contidas em tais convenções (EMCDDA, 2022).

Historicamente, parte das NPS foram sintetizadas pela primeira vez em meados do século XX, mas ganharam notoriedade somente a partir dos anos 2000. As NPS inicialmente conhecidas como “*legal highs*” tinham como principal intuito burlar as legislações sobre controle de drogas, visto que estas substâncias não estavam descritas como proscritas, não caracterizando o processo de produção e venda como crime. Desde então, inúmeros países, incluindo o Brasil, proibiram estas substâncias e, como no caso do Brasil a partir de 2016, proibição por classe estrutural, impedindo que novos análogos de canabinóides sintéticos (ANVISA, 2016), catinonas sintéticas (ANVISA, 2017) e fenetilaminas sintéticas (ANVISA, 2019) ficassem de fora da legislação.

As NPS podem ser classificadas de acordo com sua estrutura molecular ou toxicodinâmica. O mecanismo de ação da grande maioria das NPS não é bem estabelecido, porém grande parte se assemelha a outras drogas de abuso. No entanto, obviamente, a potência das NPS é superior, necessitando de quantidades muitas pequenas para desencadear fortes efeitos. Isso pode ser constatado nos estudos analíticos em amostras biológicas, visto que as concentrações em intoxicações são menores em relativamente menores comparadas às drogas clássicas (SHAFI *et al.*, 2020). No **Quadro 3** estão apresentadas as principais classes de NPS, princípios tóxicos dinâmicos e exemplos de substâncias já detectadas no Brasil (PF, 2020).

Quadro 3. Principais classes de Novas Substâncias Psicoativas e representantes já apreendidos pela Polícia Federal do território brasileiro entre 2016 e 2020.

Classe	Mecanismo de ação^{1,2}	Exemplos de NPS já apreendidas no Brasil³
Benzodiazepínicos sintéticos	Agonismo de receptores GABA _A	Flubromazepam
Canabinóides sintéticos	Agonismo de receptores canabinóides tipo CB1 e CB2	JWH-073, JWH-210, 5F-MDMB-PICA, ADB-FUBINACA, AMB-FUBINACA, 4F-MDMB-BINACA, 5F-MDMB-PINACA
Catinonas sintéticas	Bloqueio de transportadores de NE, DA e 5HT e estimulação para liberação de vesículas de catecolaminas	N-etilpentilona, eutilona, etilona, metilona, MDPV, TH-PVP, pentilona, MMC, 4F-PHP, dibutilona, 4-CMC, Alfa-PVP
Fenetilaminas sintéticas	Agonismo de receptores 5-HT2A	25B-NBOMe, 25C-NBOMe, 25I-NBOMe, 25B-NBOH, 25C-NBOH, 25E-NBOH, 25I-NBOH, 2C-I, 2C-E, 2C-B-Fly, 30C-NBOMe
Opióides sintéticos	Agonismo de receptores opioides tipo mu (μ), kappa (κ) e delta (δ)	Furanil fentanil, U-47700
Substâncias tipo cetamina ou fenciclidina	Antagonismo não-competitivo de receptores glutamatergicos do tipo NMDAR	2-fluoro-desclorocetamina, 3-MeO-PCP
Triptaminas e piperazinas	Agonismo de receptores 5-HT2A	5-MeO-DMT

¹ Fonte: Shafi et al., 2020. ² Estão descritos somente os principais mecanismos descritos na literatura. Dentro da mesma classe pode haver diferença de afinidade entre sítios alvo. ³ Fonte: Polícia Federal, 2020.

As intoxicações por NPS são difíceis de diagnosticar devido à sintomatologia inespecífica e semelhante à outras substâncias clássicas. No **Quadro 4** estão dispostos exemplos de manifestações clínicas associadas ao uso de algumas classes de NPS (PEACOCK *et al.*, 2019). O uso de NPS está muitas vezes associado ao ambiente de festa, onde é comum o poliuso de substâncias (DA CUNHA *et al.*, 2021). Além disso, as NPS podem ser comercializadas em misturas com outras NPS ou

drogas clássicas, como detectado em amostras apreendidas pela Polícia Federal, no Brasil, entre 2016 e 2020 (PF, 2020).

Quadro 4. Principais manifestações clínicas associadas às Novas Substâncias Psicoativas.

Classe de NPS	Manifestações clínicas
Benzodiazepínicos sintéticos	Depressão do SNC, depressão respiratória, inconsciência, taquicardia, hipertensão, depressão, paranoia, delírio e alucinações
Canabinóides sintéticos	Agitação, confusão, taquicardia, ansiedade, ataques de pânico, surtos psicóticos, alucinações, ideação suicida, hipertermia e náusea
Catinonas sintéticas	Hipertensão, taquicardia, agitação, agressividade, alucinações, surtos psicóticos, dor de cabeça, síndrome serotoninérgica e convulsões
Fenetilaminas sintéticas	Delírio, alucinações, surtos psicóticos, agitação, agressividade, taquicardia, dor de cabeça, hipertermia, rabdomiólise e hipertermia
Opioides sintéticos	Depressão do SNC, depressão respiratória, miose, inconsciência, taquicardia, hipertensão, depressão, paranoia, delírio e alucinações

¹ Adaptado de PEACOCK *et al.*, 2020.

O manejo e tratamento de intoxicações por NPS é similar a outros grupos já aqui apresentados, sendo sintomático e de suporte na maioria das vezes (HIEGER *et al.*, 2015; SCHIFANO *et al.*, 2020; TAIT *et al.*, 2016; TYRKKO; ANDERSSON; KRONSTRAND, 2016). Para os benzodiazepínicos sintéticos, o uso de flumazenil mostrou-se eficaz para reversão de coma induzido por flubromazolam ou clonazolam (ŁUKASIK-GŁĘBOCKA *et al.*, 2016; SOMMERFELD-KLATTA *et al.*, 2020). Nas intoxicações por opióides sintéticos, antagonistas opioides, como naloxona e naltrexona, também mostraram efetividade (SKOLNICK, 2022).

No Brasil e no mundo, diversos casos de intoxicações por NPS, fatais ou não, têm sido registrados nos últimos anos. Costa *et al.* (2019) reportou seis casos intoxicação por N-etilpentilona ocorridos no Brasil, onde um dos casos foi fatal e outro o paciente evoluiu com sequelas neurológicas (COSTA *et al.*, 2019). Adams *et al.* (2017) descreveu os casos de intoxicações pelo canabinóides sintético AMB-FUBINACA registrados na cidade de Nova Iorque (EUA), que ficaram conhecidos como “ataque zumbi” devido à aparência dos indivíduos intoxicados (ADAMS *et al.*,

2017). Ferrari Júnior e Caldas (2022) constataram, em análises de sangue e urina, presença de catinonas sintéticas (N-etilpentilona e eutilona) em casos *ante e postmortem* ocorridos no Brasil (FERRARI JÚNIOR; CALDAS, 2022). Kraemer *et al.* (2019) realizou extensa revisão da literatura compilando dezenas de óbitos envolvendo NPS publicados na literatura (KRAEMER *et al.*, 2019). La Maida *et al.* (2021) também revisou a literatura com casos fatais envolvendo catinonas sintéticas publicados entre 2017 e 2020 (LA MAIDA *et al.*, 2021). Tais estudos ressaltam a necessidade eminente do desenvolvimento e implementação de metodologias analíticas para a determinação destas substâncias no contexto clínico-forense.

1.2.11. Opiáceos e opioides

Os opiáceos são compostos de origem natural, derivados do ópio, este extraído da papoula (*Papaver somniferum*, da família Papaveraceae), usados desde 4000 a.C. A morfina é o principal alcaloide presente no ópio, tendo intensa ação analgésico. Outros alcaloides como codeína e papaverina também estão presente no ópio. Com avanço da indústria farmacêutica, os compostos puderam ser sintetizados em laboratórios, assim como outros análogos, sendo conhecidos como opioides. Pode-se citar exemplos como tramadol, metadona, diidrocodeína, buprenorfina, oxicodona, heroína e fentanil (TEIXEIRA, 2018).

O mecanismo de ação dos opioides é baseado o agonismo (total ou parcial) de receptores opioides. Os receptores opioides podem ser divididos em mu (μ), kappa (κ) e delta (δ). A afinidade por cada receptor varia conforme o opioide, assim como a ação clínica gerada. Os receptores μ estão relacionados à nocicepção, respiração e trânsito intestinal; os receptores κ são relacionados à nocicepção, termorregulação, diurese e regulação de secreção neuroendócrina; e os receptores δ estão relacionados à analgesia, funções cognitivas e dependência física (MARTINS *et al.*, 2012; TEIXEIRA, 2018).

O quadro de intoxicação por opioides é bem característica, tendo uma síndrome tóxica específica observada. As manifestações clínicas são sedação, miose, bradicardia e bradipneia. Casos fatais estão associados principalmente à depressão respiratória causada pelos compostos, com subsequente parada respiratória. Os

opioides possuem antídotos específicos (naloxona e naltrexona), os quais são capazes de reverter o quadro de intoxicação.

Nos últimos anos, outros países têm enfrentado graves problemas de saúde pública em razão da pandemia de opioides. Desde o início da década de 2010, os casos de óbitos em decorrência de intoxicação por essa classe de substâncias cresceram exponencialmente nos Estados Unidos da América (EUA). Em 2019, aproximadamente 70 mil óbitos por overdose foram registrados nos EUA, sendo que deste 71% eram envolvendo opioides. O composto com maior aparição neste cenário é o fentanil, sendo amplamente utilizado de forma ilícita (ARMENIAN *et al.*, 2018; BALDWIN; SETH; NOONAN, 2021; MATTSON *et al.*, 2021). O fentanil têm indicação clínica para anestesia e analgesia, tendo potência de 50 a 200 vezes mais que a morfina em receptores μ (ARMENIAN *et al.*, 2018; SHAFI *et al.*, 2020).

1.3. Análise toxicológica e métodos analíticos

O diagnóstico dos agentes envolvidos na intoxicação representa uma etapa crucial para o prognóstico do paciente. De forma clínica, cada vez tem sido mais difícil executar essa identificação devido às manifestações inespecíficas, assim como aumento do poliuso de substâncias. Nesse contexto, a implementação das análises toxicológicas emergências é considerada uma ferramenta imprescindível para confirmar ou não a exposição a um determinado xenobióticos (DOS SANTOS; VIANNA; SEBEN, 2022; UGES, 2011).

A análise toxicológica no escopo de emergência é importante pois auxilia na escolha do manejo e tratamento adequado do paciente, no monitoramento do processo de detoxificação, auxilia no prognóstico clínico, assim como pode ajudar a evitar medidas terapêuticas desnecessárias (OLSON; VOHRA, 2018; UGES, 2011). Para uma boa execução, diversas variáveis estão associadas, tais como metodologia analítica, tipo de amostra, tempo entre exposição e coleta e até mesmo a investigação do histórico da intoxicação. Este último torna-se importante por favorecer o direcionamento da própria análise, resultando em processo analítico mais eficiente. No entanto, nem sempre informações da exposição estão presentes, fazendo

necessário o uso de métodos analíticos de triagem ou *screening* na rotina laboratorial (DOS SANTOS; VIANNA; SEBBEN, 2022).

Na prática clínica, devido a disponibilidade, o sangue e urina são as matrizes biológicas mais frequentemente utilizadas. Entretanto, o sangue adquire caráter prioritário no momento das análises uma vez que a eventual positividade indica a biodisponibilidade do toxicante. Em muitos casos, as concentrações sanguíneas de fármacos e drogas de abuso podem ser correlacionáveis com os efeitos clínicos. Em contraponto, a depender do $t_{1/2}$ do composto, concentrações detectáveis dos compostos podem ser encontradas em até poucas horas após a exposição (KERRIGAN, 2011; VERSTRAETE, 2004). Na **Tabela 2** são apresentadas as concentrações plasmáticas terapêuticas e tóxicas dos principais agentes envolvidos em casos de intoxicações e que foram incluídos no presente estudo.

A urina por sua vez possui uma janela de detecção maior, até dias a depender da substância, e pode estar em maior abundância. No entanto, a presença do toxicante na urina não necessariamente terá ligação com o quadro clínico de um paciente (KERRIGAN, 2011; VERSTRAETE, 2004).

Na rotina de laboratórios de emergência, as análises de triagem são amplamente empregadas. Como exemplos pode-se citar os imunoensaios, tais como imunocromatografia e imunofluorescência (NIEDBALA; GONZALEZ, 2011). Estes testes são específicos, sendo comum a ocorrência de resultados falso-positivos. Por este motivo, resultados positivos ou duvidosos obtidos na triagem devem ser confirmados por metodologia mais sensível e específica, como métodos cromatográficos e espectrométricos (EUROPE WORKPLACE DRUG TESTING SOCIETY, 2015; RENGARAJAN; MULLINS, 2013; SAITMAN; PARK; FITZGERALD, 2014).

Tabela 2. Concentrações plasmáticas terapêuticas e tóxicas dos compostos incluídos neste estudo, tal como seus respectivos tempos de meia vida ($t_{1/2}$), coeficiente de partição octanol-água (LogP) e constante de acidez (pKa).

Substância	Classe	Concentrações plasmáticas (ng/mL) ¹			Características físico-químicas ²			
		Terapêutica	Tóxica (a partir de)	t 1/2 (h)	Massa molecular	Massa monoisotópica	LogP	pKa
Acetaminofeno	<i>Analgésico</i>	10000-25000	100000-150000	2-4	151,16	151,063329	0,46	9,4 ^a ; -4,4 ^b
Carbamazepina	<i>Anticonvulsivante</i>	4000-12000	10000-12000	12-60	236,27	236,092042	2,45	13,9
Amitriptilina	<i>Antidepressivo</i>	50-300	500-600	30-50	277,40	277,183050	4,92	9,5
Bupropiona		50-100	1200-2000	10-20	239,74	239,107692	3,60	8,3
Citalopram		15-80	160	27-32	324,40	324,163791	3,76	9,4
Desipramina		10-50	300	12-54	266,40	266,178299	4,90	10,2
Desvenlafaxina		10-40	80	10-17	263,37	263,188529	2,72	10,1 ^a ; 8,9 ^b
Fluoxetina		120-500	1000	48-144	309,33	309,134049	4,05	9,8
Imipramina		50-350	500-1000	11-25	280,40	280,193949	4,80	9,2
Nortriptilina		70-170	300	18-44	263,40	263,167400	4,71	10,5
Sertralina		10-150	300	24-28	306,20	306,073805	5,51	9,6
Venlafaxina		100-400	1000-1500	3-7	277,40	277,204179	2,70	14,4 ^a ; 8,9 ^b
Prometazina	<i>Anti-histamínico</i>	10-50	1000-2000	5-20	284,40	284,134720	4,81	9,0
Difenidramina		50-100	1000-2000	3-14	255,35	255,162314	3,27	8,9
Fenciclidina	<i>Anestésico dissociativo</i>	10-20	7-240	1-12	243,40	243,198700	4,69	10,6
Cetamina		100-6000	20; 420; 7000	1-3	237,72	237,092042	3,12	19,8 ^a ; 7,1 ^b
Lidocaína	<i>Anestésico local</i>	500-5000	6000-7000	1-4	234,34	234,173213	2,44	13,8 ^a ; 7,7 ^b
Buspirona	<i>Ansiolítico</i>	1-4	30	1-5	385,50	385,247775	1,95	7,6
Clorpromazina	<i>Antipsicótico</i>	30-100	1000-2000	10-30	318,90	318,095748	5,41	9,2
Haloperidol		5-17	6; 23; 15; 50	10-35	375,90	375,140135	4,30	14,0 ^a ; 8,0 ^b
Levomepromazina		5-25	320-400	1-3	328,50	328,160935	4,68	9,4
Quetiapina		100-500	1000	5-7	383,50	383,166748	2,81	15,1 ^a ; 7,1 ^b

¹ Retirado de SCHULZ *et al.*, 2020. ² Retirado de DRUGBANK, 2022. ^a pKa do ácido mais forte; ^b pKa da base mais forte;

Tabela 2. Concentrações plasmáticas terapêuticas e tóxicas dos compostos incluídos neste estudo, tal como seus respectivos tempos de meia vida ($t_{1/2}$), coeficiente de partição octanol-água (LogP) e constante de acidez (pKa). *continuação*

Substância	Classe	Concentrações plasmáticas (ng/mL) ¹			t 1/2 (h)	Características físico-químicas ²			
		Terapêutica	Tóxica (a partir de)			Massa molecular	Massa monoisotópica	LogP	pKa
Anfepramona	<i>Estimulante tipo anfetamina</i>	20	2000	4-8	205,30	205,146664	2,80	17,7 ^a ; 7,4 ^b	
Anfetamina		20-100	200	4-8	135,21	135,104799	1,76	10,0	
Efedrina		20-200	150; 1000	3-11	165,23	165,115364	1,13	13,9 ^a ; 9,5 ^b	
Femproporex		-	-	-	188,27	188,131349	2,14	7,9	
MDA		(-400)	1500	10,5-12,5	179,21	179,094628	1,15	10,0	
MDEA		(-200)	-	4-8	207,27	207,125929	2,25	10,2	
MDMA		100-350	350-500	7-8	193,24	193,110279	1,86	10,1	
Metanfetamina		(-100)	200-1000	6-15	149,23	149,120449	2,23	10,2	
Sibutramina		10-100	110	4-8	279,80	279,175378	5,20	9,8	
Alprazolam	<i>Benzodiazepínico</i>	5-50	100-400	12-15	308,80	308,088740	2,12	18,2 ^a ; 5,0 ^b	
Clonazepam		20-70	(-80)	20-60	315,71	315,041069	2,41	11,6 ^a ; 1,9 ^b	
Diazepam		100-2000	(-3000)	24-48	284,74	284,071641	2,82	2,9	
Flunitrazepam		5-15	50	10-20	313,28	313,086269	2,06	1,7	
Midazolam		40-100	1000-1500	1-3	325,80	325,078203	3,89	6,2	
Temazepam		20-150	1000	6-25	300,74	300,066555	2,19	10,7 ^a ; -1,4 ^b	
Cocaína		<i>Cocaína</i>	50-300	500-1000	0,5-1	303,35	303,147058	2,30	8,8
Benzoilecgonina	(-100)		-	4-5	289,33	289,131408	-0,30	3,1 ^a ; 9,5 ^b	
AEME	-		-	-	181,23	181,110279	1,10	-	
Cocaetileno	-		-	-	317,40	317,162708	2,70	-	
EME	-		-	-	199,25	199,120843	0,60	-	
Hidroxicoocaína	-		-	-	319,40	319,141973	1,90	-	
Zolpidem	<i>Sedativo-hipnótico</i>		80-160	320; 500	1-5	307,40	307,168462	3,02	5,4

¹ Retirado de SCHULZ *et al.*, 2020. ² Retirado de DRUGBANK, 2022. ^a pKa do ácido mais forte; ^b pKa da base mais forte;

Tabela 2. Concentrações plasmáticas terapêuticas e tóxicas dos compostos incluídos neste estudo, tal como seus respectivos tempos de meia vida ($t_{1/2}$), coeficiente de partição octanol-água (LogP) e constante de acidez (pKa). *continuação*

Substância	Classe	Concentrações plasmáticas (ng/mL) ¹			Características físico-químicas ²			
		Terapêutica	Tóxica (a partir de)	t 1/2 (h)	Massa molecular	Massa monoisotópica	LogP	pKa
Fentanil	<i>Opiáceos e opioides</i>	0,3-300	(-30)	1-3,5	336,47	336,220163	4,12	8,8
Morfina		10-100	100	1-4	285,34	285,136493	0,89	10,3 ^a ; 9,1 ^b
LSD	<i>Outras drogas de abuso</i>				323,40	323,199762	2,95	17,0 ^a ; 8,0 ^b
25B-NBOMe	<i>Fenetilamina sintética</i>	-	38	-	380,30	379,078300	3,90	-
25C-NBOMe		-	0,16	-	335,80	335,128821	3,80	-
25I-NBOMe		-	0,3-2,8	-	427,30	427,064440	3,80	-
ADB-FUBINACA	<i>Canabinóide sintético</i>	-	-	-	382,40	382,180504	3,60	-
Etilona	<i>Catinona sintética</i>	-	-	0,038-2,57	221,25	221,105193	1,80	-
Mefedrona		-	-	-	177,24	177,115364	2,00	-
N-etilpentilona		-	-	-	249,30	249,136493	2,70	-
Pentilona		-	-	-	235,28	235,120843	2,30	-
Levamisol	<i>Anti-helmintico</i>	100-700	-	2-8	204,29	204,072119	2,20	7,0
Nafazolina	<i>Vasoconstritor tipo imidazolina</i>	-	-	-	210,27	210,115698	3,88	10,2

¹ Retirado de SCHULZ *et al.*, 2020. ² Retirado de DRUGBANK, 2022. ^a pKa do ácido mais forte; ^b pKa da base mais forte;

1.3.1. Métodos cromatográficos

A cromatografia é uma técnica de separação química de larga utilização dentro da toxicologia analítica (COUCHMAN; MORGAN, 2011). Baseia-se na separação de compostos a partir da interação com uma fase estacionária e uma fase móvel. As técnicas cromatográficas mais comuns são as gasosas e as líquidas (DAWLING, 2011; MAURER, 2011).

Na cromatografia gasosa (GC), gases inertes são utilizados como fase móvel, sendo ideal para a análise de compostos voláteis ou termicamente estáveis (FLANAGAN *et al.*, 2020). Contudo, compostos que não respeitem essas regras podem ser analisados a partir da realização de reações de derivatização, tais como siliilação, alquilação e acilação. A partir delas, é possível realizar e/ou melhorar a performance da análise de compostos polares que apresentam grupos como -COOH, -NH₂ e -OH. Entretanto, não são todos compostos em que a derivatização será efetiva a ponto de permitir a análise por GC, devendo assim buscar alternativas, como o uso de outros sistemas de separação (GLICKSBERG; KERRIGAN, 2020; MOHAMED; BAKDASH, 2017). Na GC, a eluição do analito ocorrerá de acordo com a fase estacionária (polaridade da coluna), fluxo do gás de arraste e a temperatura do forno, podendo assim configurar um método de forma isotérmica ou então utilizando uma programação de temperatura (DAWLING, 2011).

A cromatografia líquida (LC) é um método de separação que tem como fase móvel substâncias em estado líquido, como solventes orgânicos e água (KUPIEC; KEMP, 2011). Ao contrário da cromatografia gasosa, a cromatografia líquida é ideal para a análise de compostos com grupos polares, não necessitando de etapas adicionais como a derivatização, tendo maior versatilidade no escopo de analitos passíveis de serem analisados (WU *et al.*, 2012). Uma das vantagens é a possibilidade da injeção de amostras aquosas no sistema analítico, podendo ter uma diluição da amostra como único passo preparativo (COUCHMAN; MORGAN, 2011). Na cromatografia líquida, a eluição do analito ocorrerá de acordo com a fase estacionária (polaridade da coluna), fluxo da fase móvel, pH da fase móvel e concentrações das fases móveis, podendo ser usada de forma isocrática ou então é realizado um gradiente de concentração (KUPIEC; KEMP, 2011).

Na LC, uma etapa crítica para uma boa separação dos compostos é o tipo de fase estacionária a ser utilizada em combinação com os solventes da fase móvel, de forma que os compostos apresentem uma retenção adequada, gerando cromatogramas com um bom nível de resolução. Os tipos de materiais de empacotamento de colunas cromatográficas mais comumente utilizados são os baseados em sílica. Na sílica, diversas reações são realizadas para a incorporação de grupamentos funcionais, podendo assim modular a polaridade da fase. Na análise de medicamentos e drogas de abuso, devido às suas características físico-químicas, a fase estacionária mais comum é a octadecil (C18) ligado à sílica (ODS), visto a boa separação de compostos com elevado grau de lipofilicidade. No entanto, outras fases contendo C8, C6, fenil e amino, por exemplo, têm elevada empregabilidade neste contexto (KUPIEC; KEMP, 2011).

Quanto à fase móvel, o solvente universal polar é água purificada, utilizada em combinação isocrática ou gradiente com um solvente apolar. Os solventes apolares mais comuns em serem utilizados são a acetonitrila e metanol. Um importante parâmetro da fase móvel é o controle do pH, de forma a auxiliar na separação, compatibilidade com a fase estacionária, assim como na protonação ou desprotonação quando o LC é acoplado junto ao um espectrômetro de massas. Tampões de amônio ou formiato são extensivamente empregados no contexto de análises toxicológicas, apresentando alta versatilidade (MAURER, 2011).

1.3.2. Espectrometria de massas

Na toxicologia, a espectrometria de massas (MS) é a metodologia recomendada para a determinação de xenobióticos em diversas matrizes, biológicas ou não, devido a sua alta seletividade, especificidade, precisão e sensibilidade. Na toxicologia clínica, está associada principalmente com a identificação e quantificação de fármacos, drogas de abuso, agrotóxicos, além de marcadores de exposição ou efeito (COUCHMAN; MORGAN, 2011; MAURER, 2018; VIETTE *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2012).

A MS é uma técnica analítica de identificação molecular baseada na análise da relação massa carga (m/z) do composto. A técnica consiste na ionização do

composto, que será ordenado por sua massa molecular no analisador de massa e por fim atingirá o detector, o qual transformará a corrente iônica em corrente elétrica, gerando um sinal que será traduzido em um espectro de massas (VORCE, 2020). Estão disponíveis diversos espectrômetros de massas, que irão se diferenciar principalmente pelo seu analisador de massas, o qual definirá a resolução do equipamento. Analisadores como quadrupolo-tempo-de-voo (QTOF do inglês, *quadrupole-time-of-flight*) e Orbitrap apresentam resolução superior aos demais e, quando combinados de forma híbrida com outros analisadores, podem gerar resultados de m/z com até quatro casas decimais, sendo possível a análise dos compostos com massa exata (MAURER; MEYER, 2016; WU *et al.*, 2012). Outra apresentação comum dos MS é a utilização de dois quadrupolos de modo sequencial ou *tandem* (MS/MS), sendo denominados como triplo quadrupolo. Em espectrômetros de massas deste tipo, diversos experimentos de massas podem ser realizados, como monitoramento de reações múltiplas (MRM, do inglês *multiple reaction monitoring*), perda neutral e *scan* (WATSON, 2011).

Existem diversos tipos de ionização, tais como ionização por *electrospray* (ESI), ionização por elétrons (EI), ionização por dessorção a laser por matriz assistida (MALDI), ionização química a pressão atmosférica (APCI), fotoionização a pressão atmosférica (APPI), ionização por *paper spray* (PSI), dentre outras. A escolha do modo de ionização dependerá principalmente do tipo de analito (polaridade e tamanho da molécula) e do tipo de método de separação acoplado (cromatografia líquida ou gasosa) (VORCE, 2020).

Uma das fontes de ionização mais comumente utilizada é a ESI, na qual as moléculas são ejetadas para em um capilar estreito em pressão atmosférica, sendo aplicado alta voltagem e um gás nebulizador, criando um spray no formato de cone. Com isso, é feita a dessolvatação da amostra e ejeção dos íons no *inlet* do analisador de massas (BANERJEE; MAZUMDAR, 2012; VORCE, 2020). É um tipo de ionização versátil, sendo a mais utilizada para análise de pequenas moléculas (100-2000 daltons). Ainda assim, é possível a análise de compostos com peso molecular superior a 30000 daltons. Espectrômetros de massas que possuem a ESI como fonte de ionização normalmente estão acoplados junto a cromatógrafos líquidos (COUCHMAN; MORGAN, 2011).

A análise espectrométrica pode ser realizada utilizando diferentes modos de aquisição. No modo *scan* é realizada a aquisição de uma grande faixa de m/z , e no modo SIM (monitoramento de íon selecionado, do inglês *selected ion monitoring*) seleciona-se os íons de interesse para aquisição. Além disso, quando espectrômetro de massas está presente em modo *tandem*, a análise pode ser realizada por MRM, a partir da monitorização das reações de fragmentação, analisando íons precursores e íons produtos (VORCE, 2020). Em métodos multi-analitos, isto é, que analisam diversas substâncias simultaneamente na mesma corrida cromatográfica, o modo de aquisição MRM tem sido difundido em estudos com este propósito. Os sistemas analíticos mais empregados nos métodos multi-analitos para análise de fármacos e drogas de abuso são os LC-MS/MS e GC-MS/MS, os quais oferecem elevada sensibilidade comparados a outras técnicas analíticas (AL-SAFFAR; STEPHANSON; BECK, 2013; BANASZKIEWICZ *et al.*, 2020; FRANCO DE OLIVEIRA *et al.*, 2019; GIACHETTI *et al.*, 2020; GIORGETTI *et al.*, 2022; REMANE *et al.*, 2010; SEMPIO *et al.*, 2014; TANG *et al.*, 2014; WOŹNIAK *et al.*, 2018, 2020).

1.3.3. Preparo de amostras

Uma etapa essencial na análise toxicológica é o preparo de amostra. Métodos preparativos ou extrativos são empregados de forma a aumentar a sensibilidade, remover interferentes endógenos da matriz ou como tornar a amostra compatível com o sistema analítico. Diversos tipos de extração e preparo são utilizados na determinação de fármacos e drogas de abuso no contexto clínico e forense (COUCHMAN; MORGAN, 2011; MOEIN; EL BEQQALI; ABDEL-REHIM, 2017). As principais técnicas empregadas neste cenário estão apresentadas no **Quadro 5**.

A escolha do método de preparo da amostra depende da sensibilidade requerida, rapidez, disponibilidade de materiais e reagentes, assim como as características físico-químicas dos analitos, como constante de ionização ácida (pK_a) e coeficiente de partição octanol-água ($\log P$) (COUCHMAN; MORGAN, 2011).

No cenário clínico forense, o uso da precipitação proteica (PP) tem sido cada vez mais frequente em métodos multi-analitos utilizando matrizes biológicas como sangue total e plasma. É uma técnica extremamente rápida quando comparada aos outros tipos de extração, proporcionando extratos prontos para injeção no sistema

analítico em poucos minutos, tendo um tempo total de preparo de em torno de 5 a 10 minutos (COUCHMAN; MORGAN, 2011). A PP proporciona uma boa sensibilidade e, quando necessário, menores limites de detecção e quantificação podem ser obtidos através da adição de uma etapa de secagem do solvente, de forma a concentrar a amostra (ADAMOWICZ; TOKARCZYK, 2016; GIORGETTI *et al.*, 2022; LEAL CUNHA *et al.*, 2021; STEUER *et al.*, 2015). A sua seletividade é inferior a técnicas como SPE e LLE, porém, tendo em vista o desenvolvimento de métodos com análise simultânea de substâncias com características físico-químicas variadas, isso torna-se um atrativo (MOEIN; EL BEQQALI; ABDEL-REHIM, 2017).

Em contrapartida, a remoção de interferentes, como lipídios, na PP é a menor dentre todas as técnicas apresentadas no **Quadro 5**, mostrando-se como uma limitação deste tipo de preparo. Isso torna os métodos usando PP suscetíveis à ocorrência de efeito matriz significativo, podendo gerar supressão a ionização (ISMAIEL *et al.*, 2010). Ademais, uso da PP apresenta resultados satisfatórios e robustos, tendo aplicabilidade no ambiente de emergência, tornando-se uma excelente alternativa para um diagnóstico rápido e eficiente.

Quadro 5. Principais técnicas preparativas e extrativas com aplicação na análise de fármacos e drogas de abuso em amostras biológicas.

Extração ou preparo da amostra	Princípio da técnica	Vantagens	Limitações	Exemplos de aplicação
Precipitação de proteínas (PP)	Adição de solventes orgânicos para a precipitação de proteínas da amostra. Empregada normalmente em amostras de sangue.	Rápida, barata, pequenas quantidades de amostras e solventes orgânicos e simples manuseio.	Baixa capacidade de remoção de interferentes.	ADAMOWICZ; TOKARCZYK, 2016; FRANCO DE OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2019; GIORGETTI <i>et al.</i> , 2022; LEAL CUNHA <i>et al.</i> , 2021; SEMPIO <i>et al.</i> , 2014
Extração líquido-líquido (LLE)	Extração do analito pela partição, a partir da adição de um solvente orgânico imiscível.	Relativamente barata e boa sensibilidade.	Recuperação baixa a média e altas quantidades de solventes orgânicos. Extração pH dependente.	BANASZKIEWICZ <i>et al.</i> , 2020; REMANE <i>et al.</i> , 2010; WOŹNIAK <i>et al.</i> , 2020
Extração em fase sólida (SPE)	Extração do analito a partir da sua retenção em um sorvente sólido e posterior eluição com solvente.	Alta capacidade de remoção de interferentes, aumento da sensibilidade, boa recuperação e possibilidade de automação.	Insumos de elevado custo e consumo considerável de solventes orgânicos.	CONCHEIRO <i>et al.</i> , 2015; GIACHETTI <i>et al.</i> , 2020; TANG <i>et al.</i> , 2014; TRUTA <i>et al.</i> , 2016
<i>Dilute-and-shoot</i>	Diluição e injeção direta da amostra no sistema analítico. Aplicável em amostras aquosas, como urina.	Rápida, barata, simples manuseio e possibilidade de automação.	Baixa capacidade de remoção de interferentes.	DEVENTER <i>et al.</i> , 2014; KONG <i>et al.</i> , 2017; LAWSON <i>et al.</i> , 2016; MALACA <i>et al.</i> , 2019

Quadro 5. Principais técnicas preparativas e extrativas com aplicação na análise de fármacos e drogas de abuso em amostras biológicas.

continuação

Extração ou preparo da amostra	Princípio da técnica	Vantagens	Limitações	Exemplos de aplicação
Microextração em fase sólida (SPME)	Extração dos analitos (em fase gasosa ou líquida) por adsorção e absorção em fibra polimérica.	Possibilidade de não utilizar solventes orgânicos e fibra reutilizável várias vezes.	Fibras são caras e frágeis e maior tempo de extração.	LIZOT <i>et al.</i> , 2020; MASTROGIANNI <i>et al.</i> , 2012; SAITO, KOICHI <i>et al.</i> , 2019; SAITO, TAKESHI <i>et al.</i> , 2013
Microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME)	Extração usando fibra oca polimérica e porosa contendo fase aceptora (solvente), submersa em uma fase doadora (amostra).	Insumos de baixo custo e quantidades pequenas de solvente orgânico.	Baixa recuperação. Extração pH dependente. Dificuldade de automação e maior tempo de extração.	DOS SANTOS, MARCELO FILONZI <i>et al.</i> , 2014; MENG <i>et al.</i> , 2015; SILVEIRA <i>et al.</i> , 2020; XIAO; HU, 2010
QuEChERS	Extração utilizada diluição em solvente orgânico, com etapas de <i>salting out</i> e <i>clean-up</i> por dispersão de sorventes sólidos.	Alta capacidade de remoção de interferentes e versatilidade de compostos extraídos no mesmo protocolo.	Custo mediano dos insumos e recuperação variável.	FERRARI JÚNIOR; CALDAS, 2022; MATSUTA <i>et al.</i> , 2013; ORFANIDIS <i>et al.</i> , 2021
Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)	Extração do analito pela partição, a partir da adição de um dispersor e solvente extrator.	Rápida e necessita de pouca quantidade de amostra e de solvente.	Baixa recuperação. Extração pH dependente. Protocolos para sangue podem necessitar de etapa adicional de precipitação.	CHEN <i>et al.</i> , 2017; FISICHELLA; ODOARDI; STRANO-ROSSI, 2015; KAHL <i>et al.</i> , 2021
Microextração por sorbente empacotado (MEPS)	Miniaturização da SPE. Extração pela adsorção dos analitos em cartucho de sorbente acoplado a seringa.	Rápida e necessita de pouca quantidade de amostra e de solvente. Possibilidade de automação e cartucho é reutilizável.	Insumos de elevado custo.	PRATA <i>et al.</i> , 2019; SAID <i>et al.</i> , 2010; VEJAR-VIVAR <i>et al.</i> , 2021

2. JUSTIFICATIVA

A toxicologia de emergência requer métodos analíticos capazes de identificar e, muitas vezes, quantificar substâncias envolvidas em uma intoxicação. Além disso, o uso associado de diversos agentes tóxicos dificulta a análise, já que estes podem apresentar características químicas diversas, e com isso é imprescindível o aprimoramento de técnicas seletivas que possam analisar diversos analitos, como fármacos e drogas de abuso, de modo simultâneo (OLSON, 2014; RAINEY, 2011; UGES, 2011). Tendo em vista tudo que fora exposto no referencial teórico, a cromatografia líquida acoplada espectrometria de massas é a técnica que supre as demandas analíticas da toxicologia clínica, já que permite a identificação inequívoca, a quantificação precisa, limites de detecção e quantificação pequenos, além da rapidez em que se realiza a análise (MAURER, 2018; RAINEY, 2011). Combinado a isso, o preparo de amostra utilizando PP tem demonstrando excelente aplicabilidade em métodos multi-analitos no contexto clínico-forense (COUCHMAN; MORGAN, 2011). Sendo assim, é necessário o desenvolvimento, validação e implementação de técnicas robustas, simples e eficientes, como a PP-LC-MS/MS, de forma que seja possível identificar substâncias com elevada confiabilidade em amostras de pacientes intoxicados, priorizando o uso de pequenas quantidades de amostra e solvente, assim como rapidez e facilidade no processo, podendo auxiliar no manejo e tratamento de uma intoxicação.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Desenvolver e validar metodologia analítica para determinação simultânea de fármacos e drogas de abuso por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, em amostras de plasma de pacientes com suspeita de intoxicação atendidos pelo Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul.

3.2. Objetivos específicos

- Desenvolver e otimizar método cromatográfico e espectrométrico para determinação simultânea de cinquenta e sete (57) medicamentos e drogas de abuso em amostras de plasma;
- Otimizar solvente para precipitação proteica do plasma;
- Validar o método conforme parâmetros preconizados pelo guia de validação ANSI/ASB Standard 036 (First Edition), da *American Academy of Forensic Science* (AAFS);
- Aplicar o método em amostras de plasma em casos suspeitos de intoxicações atendidos pelo Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul;
- Caracterizar variáveis clínicas e sociodemográficas dos pacientes com suspeita de intoxicação.

4. REFERÊNCIAS

ABRACIT. **Centros - CIATox**. Disponível em: <<https://abracit.org.br/centros/>>. Acesso em: 22 jul. 2022.

ADAMOWICZ, Piotr; TOKARCZYK, Bogdan. Simple and rapid screening procedure for 143 new psychoactive substances by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Drug Testing and Analysis**, v. 8, n. 7, p. 652–667, 2016.

ADAMS, Axel J. et al. “Zombie” Outbreak Caused by the Synthetic Cannabinoid AMB-FUBINACA in New York. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 3, p. 235–242, 2017.

AL-SAFFAR, Yasir; STEPHANSON, Niclas Nikolai; BECK, Olof. Multicomponent LC-MS/MS screening method for detection of new psychoactive drugs, legal highs, in urine-Experience from the Swedish population. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 930, p. 112–120, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.04.043>>. Acessado em 18 jul 2022.

ALBERTSON, Timothy E. Amphetamines. In: OLSON, KENT R (Org.). **Poisoning & Drug Overdose**. 7. ed. New York: McGraw-Hill Education, 2018. p. 81–84.

ANVISA. **Portaria n.º 344, de 12 de maio de 1998: Aprova o Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. , 1998

ANVISA. **Resolução - RDC nº 175, de 15 de setembro de 2017: Dispõe sobre a atualização do Anexo I (Listas de Substâncias Entorpecentes, Psicotrópicas, Precursoras e Outras sob Controle Especial) da Portaria SVS/MS nº 344, de 12 de maio de 1998**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. , 2017

ANVISA. **Resolução - RDC nº 325, de 3 de dezembro de 2019: Dispõe sobre a atualização do Anexo I (Listas de Substâncias Entorpecentes, Psicotrópicas, Precursoras e Outras sob Controle Especial) da Portaria SVS/MS nº 344, de 12 de maio de 1998.** Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. , 2019

ANVISA. **Resolução - RDC nº 79, de 23 de maio de 2016: Dispõe sobre a atualização do Anexo I (Listas de Substâncias Entorpecentes, Psicotrópicas, Precursoras e Outras sob Controle Especial) da Portaria SVS/MS nº 344, de 12 de maio de 1998, e dá outras providências.** Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. , 2016

ARMENIAN, Patil et al. Fentanyl, fentanyl analogs and novel synthetic opioids: A comprehensive review. **Neuropharmacology**, v. 134, p. 121–132, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.10.016>>. Acessado em 17 jul 2022.

ARMENIAN, Patil. Phencyclidine (PCP) and ketamine. In: OLSON, KENT R (Org.). **Poisoning & Drug Overdose**. 7. ed. New York: McGraw-Hill Education, 2018. p. 365–368.

BALDWIN, Grant T; SETH, Puja; NOONAN, Rita K. Continued Increases in Overdose Deaths Related to Synthetic Opioids: Implications for Clinical Practice. **JAMA**, v. 325, n. 12, p. 1151–1152, 23 mar. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1001/jama.2021.1169>>. Acessado em 17 jul 2022.

BANASZKIEWICZ, Laura et al. Rapid and simple multi-analyte LC–MS/MS method for the determination of benzodiazepines and Z-hypnotic drugs in blood samples: Development, validation and application based on three years of toxicological analyses. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 191, 2020.

BANERJEE, Shibdas; MAZUMDAR, Shyamalava. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2012, p. 1–40, 2012.

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

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

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

BENOWITZ, Neal L. Local anesthetics. In: OLSON, KENT R (Org.). **Poisoning & Drug Overdose**. 7. ed. New York: McGraw-Hill Education, 2018c. p. 84–87.

BROSÉUS, Julian; GENTILE, Natacha; ESSEIVA, Pierre. The cutting of cocaine and heroin: A critical review. **Forensic Science International**, v. 262, p. 73–83, 2016.

BUCARETCHI, Fábio; DRAGOSAVAC, Sanja; VIEIRA, Ronan J. Acute exposure to imidazoline derivatives in children. **Jornal de Pediatria**, v. 79, n. 6, p. 519–524, 2003.

CANTILENA JR, Louis R. Toxicologia clínica. In: KLAASSEN, CURTIS D.; WATKINS III, JOHN B. (Org.). **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull** N. 2. ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda., 2012. p. 419–428.

CHARLSON, Fiona et al. A systematic review of research examining benzodiazepine-related mortality. **Pharmacoepidemiology and drug safety**, v. 18, n. 2, p. 93–103, fev. 2009.

CHASIN, Alice Aparecida da Matta; CARVALHO, Virgínia Martins. Cocaína. In: DORTA, DANIEL JUNQUEIRA et al. (Org.). **Toxicologia Forense**. 1. ed. São Paulo: Blucher, 2018. p. 143–164.

CHEN, Xiujuan et al. Ultrasound-assisted low-density solvent dispersive liquid–liquid

microextraction for the simultaneous determination of 12 new antidepressants and 2 antipsychotics in whole blood by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 142, p. 19–27, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.04.032>>. Acessado em 22 jul 2022.

CHRZANOWSKA, Agata et al. Unintentional and intentional drug poisoning deaths, Australia, 2012–2016: Drug pattern profile and demographic characteristics. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 229, n. PB, p. 109112, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2021.109112>>. Acessado em 05 jul 2022.

CIT/RS. **Relatório Anual 2020**. . Porto Alegre: Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul. Disponível em: <http://www.cit.rs.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=137&Itemid=61>. , 2022. Acessado em 04 jul 2022.

CONCHEIRO, Marta et al. Simultaneous determination of 40 novel psychoactive stimulants in urine by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry and library matching. **Journal of Chromatography A**, v. 1397, p. 32–42, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.04.002>>. Acessado em 23 jul 2022.

COSTA, Jose Luiz et al. Analytical quantification, intoxication case series, and pharmacological mechanism of action for N-ethylnorpentylone (N-ethylpentylone or ephylone). **Drug Testing and Analysis**, v. 11, n. 3, p. 461–471, 1 mar. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/dta.2502>>. Acessado em 15 jul 2022.

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

CRUZ, Fábio Cardoso et al. Anfetamina e derivados. In: DORTA, DANIEL JUNQUEIRA et al. (Org.). **Toxicologia Forense**. 1. ed. São Paulo: Blucher, 2018. p. 165–177.

DA CUNHA, Kelly Francisco et al. Prevalence of new psychoactive substances (NPS)

in Brazil based on oral fluid analysis of samples collected at electronic music festivals and parties. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 227, n. August, 2021.

DAWLING, S. Gas Chromatography. In: MOFFAT, ANTHONY C; OSSELTON, M DAVID; WIDDOP, BRIAN (Org.). . **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons**. 4. ed. London: Pharmaceutical Press, 2011. p. 636–717.

DEVENTER, K. et al. Dilute-and-shoot-liquid chromatography-mass spectrometry for urine analysis in doping control and analytical toxicology. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 55, p. 1–13, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2013.10.012>>. Acessado em 21 jul 2022.

DOS SANTOS, Bruno Pereira et al. Is COVID-19 the current world-wide pandemic having effects on the profile of psychoactive substance poisonings? **Forensic Toxicology**, v. 39, n. 1, p. 282–285, 1 jan. 2021.

DOS SANTOS, Bruno Pereira; VIANNA, Renata Loureiro; SEBBEN, Viviane Cristina. O papel do laboratório (exames de rotina) e análise toxicológica de emergência. In: SILVA, CARLOS AUGUSTO MELLO DA (Org.). **Emergências toxicológicas: princípios e prática do tratamento de intoxicações agudas**. 1. ed. Santana de Parnaíba: Editora Manole, 2022. p. 13–24.

DOS SANTOS, Marcelo Filonzi et al. Determination of antidepressants in whole blood using hollow-fiber liquid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Forensic Toxicology**, v. 32, n. 2, p. 214–224, 2014.

DRUGBANK. **Drugbank Online**. Disponível em: < <https://go.drugbank.com/>>. Acesso em: 07 set 2022.

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

ELLER, Sarah et al. Multivariate analysis applied in dataset of Poison Control Center of São Paulo, Brazil. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–8, 2020.

EMCDDA. **New psychoactive substances (NPS)**. Disponível em: <https://www.emcdda.europa.eu/topics/nps_en>.

EUROPE WORKPLACE DRUG TESTING SOCIETY. **Europe Guidelines for Workplace Drug in Urine**. [S.l.]: European Workplace Drug Testing Society. Disponível em: <<http://www.ewdts.org/data/uploads/documents/ewdts-urine-guideline-2015-11-01-v2.0.pdf>>. , 2015

FERRARI JÚNIOR, Ettore; CALDAS, Eloisa Dutra. Determination of new psychoactive substances and other drugs in postmortem blood and urine by UHPLC–MS/MS: method validation and analysis of forensic samples. **Forensic Toxicology**, v. 40, n. 1, p. 88–101, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11419-021-00600-y>>. Acessado em 23 jul 2022.

FISHER, Erik S.; CURRY, Steven C. **Evaluation and treatment of acetaminophen toxicity**. 1. ed. [S.l.]: Elsevier Inc., 2019. v. 85. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/bs.apha.2018.12.004>>.

FISICHELLA, Marco; ODOARDI, Sara; STRANO-ROSSI, Sabina. High-throughput dispersive liquid/liquid microextraction (DLLME) method for the rapid determination of drugs of abuse, benzodiazepines and other psychotropic medications in blood samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and app. **Microchemical Journal**, v. 123, p. 33–41, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2015.05.009>>. Acessado em 21 jul 2022.

FLANAGAN, Robert J et al. Gas Chromatography. In: FLANAGAN, ROBERT J et al. (Org.). **Fundamentals of analytical toxicology**. 2. ed. Hoboken: Wiley, 2020. p. 193–222.

FLORIANI, Gisele et al. Development and validation of an HPLC-DAD method for

simultaneous determination of cocaine, benzoic acid, benzoylecgonine and the main adulterants found in products based on cocaine. **Forensic Science International**, v. 235, p. 32–39, 2014.

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

FRIEDMAN, L S et al. The association between U.S. Poison Center assistance and length of stay and hospital charges. **Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.)**, v. 52, n. 3, p. 198–206, mar. 2014.

GALVÃO, Taís Freire et al. Impact of a poison control center on the length of hospital stay of poisoned patients: retrospective cohort. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 129, n. 1, p. 23–29, 2011.

GIACHETTI, Alexander D et al. Method Validation of Seven Synthetic Cathinones by LC–MS-MS Analysis and the Prevalence of N-Ethylpentylone in Postmortem Casework. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 122–127, 2020.

GIORGETTI, Arianna et al. Development and validation of a rapid LC-MS/MS method for the detection of 182 novel psychoactive substances in whole blood. **Drug Testing and Analysis**, v. 14, n. 2, p. 202–223, 2022.

GLICKSBERG, Lindsay; KERRIGAN, Sarah. Derivatization. In: LEVINE, BARRY S; KERRIGAN, SARAH (Org.). **Principles of Forensic Toxicology**. 5. ed. Cham: Springer Nature Switzerland AG, 2020. p. 162–176.

GOKTAS, Ugur; KATI, Ismail; YUCE, Hasan Husnu. Management of a severe carbamazepine overdose with continuous venovenous hemodiafiltration. **American Journal of Emergency Medicine**, v. 28, n. 2, p. 260.e1-260.e2, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajem.2009.06.013>>. Acessado em 11 jul 2022.

GUGELMANN, Hallam M.; BENEWITZ, Neal L. Cocaine. In: OLSON, KENT R (Org.). **Poisoning & Drug Overdose**. 7. ed. New York: McGraw-Hill Education, 2018. p. 201–204.

GUMMIN, David D et al. 2020 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS): 38th Annual Report. **Clinical Toxicology**, v. 59, n. 12, p. 1282–1501, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/15563650.2021.1989785>>. Acessado em 08 jul 2022.

HARTMAN, Rebecca L. et al. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and metabolites disposition in blood and plasma following controlled oral administration. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 2, p. 587–599, 2014.

HIEGER, M A et al. Severe poisoning after self-reported use of 2-(4-iodo-2,5-dimethoxyphenyl)-N-[(2-methoxyphenyl)methyl]ethanamine, a novel substituted amphetamine: a case series. **The American Journal of Emergency Medicine**, v. 33, n. 12, p. 1843.e1-1843.e3, 1 dez. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ajem.2015.04.065>>. Acessado em 16 jul 2022.

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

HORWITZ, Henrik et al. The prognosis following amphetamine poisoning. **Scandinavian Journal of Public Health**, v. 45, n. 8, p. 773–781, 2017.

HOWLAND, Mary Ann. Pharmacokinetic and toxicokinetic principles. In: NELSON, LEWIS S et al. (Org.). **Goldfrank's Toxicologic Emergencies**. 9. ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2011. p. 119–134.

ISENSCHMID, Daniel S. Cocaine. In: LEVINE, BARRY S; KERRIGAN, SARAH (Org.). **Principles of Forensic Toxicology**. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 371–387. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-42917-1_23>. Acessado em 12 jul 2022.

ISMAIEL, Omnia A. et al. Investigation of endogenous blood plasma phospholipids, cholesterol and glycerides that contribute to matrix effects in bioanalysis by liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 878, n. 31, p. 3303–3316, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.10.012>>. Acessado em 22 jul 2022.

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

KEARNEY, Thomas E. Carbamazepine and oxcarbamazepine. In: OLSON, KENT R (Org.). **Poisoning & Drug Overdose**. 7. ed. New York: McGraw-Hill Education, 2018a. p. 178–181.

KEARNEY, Thomas E. Lidocaine. In: OLSON, KENT R (Org.). **Poisoning & Drug Overdose**. 7. ed. New York: McGraw-Hill Education, 2018b. p. 573–574.

KERRIGAN, S. Sampling, Storage and Stability. In: MOFFAT, ANTHONY C; OSSELTON, M DAVID; WIDDOP, BRIAN (Org.). **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons**. 4. ed. London: Pharmaceutical Press, 2011. p. 445–457.

KONG, Tae Yeon et al. Rapid analysis of drugs of abuse and their metabolites in human urine using dilute and shoot liquid chromatography—tandem mass spectrometry. **Archives of Pharmacal Research**, v. 40, n. 2, p. 180–196, 2017.

KRAEMER, Michael et al. Death cases involving certain new psychoactive substances: A review of the literature. **Forensic Science International**, v. 298, p. 186–267, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.02.021>>. Acessado em 16 jul 2022.

KUPIEC, T; KEMP, P. High Performance Liquid Chromatography. In: MOFFAT, ANTHONY C; OSSELTON, M DAVID; WIDDOP, BRIAN (Org.). **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons**. 4. ed. London: Pharmaceutical Press, 2011. p. 718–757.

LA MAIDA, Nunzia et al. A Review of Synthetic Cathinone-Related Fatalities From 2017 to 2020. **Therapeutic drug monitoring**, v. 43, n. 1, p. 52–68, 2021.

LADER, Malcolm. Benzodiazepines revisited-will we ever learn? **Addiction**, v. 106, n. 12, p. 2086–2109, 2011.

LAWSON, Alexander J. et al. A Novel “dilute-and-shoot” liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the screening of antihypertensive drugs in urine. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 40, n. 1, p. 17–27, 2016.

LEAL CUNHA, Ricardo et al. Fast determination of amphetamine-type stimulants and synthetic cathinones in whole blood samples using protein precipitation and LC-MS/MS. **Microchemical Journal**, v. 163, n. September 2020, 2021.

LEHMAN-MCKEEMAN, Lois D. Absorção, Distribuição e Excreção de Toxicantes. In: KLASSEN, CURTIS D.; WATKINS III, JOHN B. (Org.). **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull**. 2. ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda., 2012. p. 57–70.

LEWIS, Justin C. Antipsychotic drugs, including phenothiazines. In: OLSON, KENT R (Org.). **Poisoning & Drug Overdose**. 7. ed. New York: McGraw-Hill Education, 2018. p. 130–132.

LIZOT, Lilian De Lima Feltraco et al. Simultaneous Determination of Cocaine and Metabolites in Human Plasma Using Solid Phase Micro-Extraction Fiber Tips C18 and UPLC-MS/MS. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 44, n. 1, p. 49–56, 2020.

LOWRY, J. A.; BROWN, J. T. Significance of the imidazoline receptors in toxicology. **Clinical Toxicology**, v. 52, n. 5, p. 454–469, 2014.

ŁUKASIK-GŁĘBOCKA, Magdalena et al. Flubromazolam - A new life-threatening designer benzodiazepine. **Clinical Toxicology**, v. 54, n. 1, p. 66–68, 2016.

MAGALHÃES, Andrea Franco Amoras; CALDAS, Eloisa Dutra. Two health information systems to characterize poisoning in Brazil-a descriptive study. **Journal of Public Health (United Kingdom)**, v. 41, n. 1, p. 203–211, 2019.

MAGALHÃES, Andrea Franco Amoras; CALDAS, Eloisa Dutra. Underreporting of fatal poisonings in Brazil – A descriptive study using data from four information systems. **Forensic Science International**, v. 287, p. 136–141, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.03.040>>. Acessado em 06 jul 2022.

MALACA, Sara et al. Dilute and shoot ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS) analysis of psychoactive drugs in oral fluid. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 170, p. 63–67, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.02.039>>. Acessado em 20 jul 2022.

MANNING, Beth. Antihistamines. In: OLSON, KENT R (Org.). **Poisoning & Drug Overdose**. 7. ed. New York: McGraw-Hill Education, 2018. p. 110–112.

MARQUEZ, Javier et al. Cocaine-Levamisole-Induced Vasculitis/Vasculopathy Syndrome. **Current Rheumatology Reports**, v. 19, n. 6, p. 1–5, 2017.

MARTINS, Rodrigo T. et al. Opioid receptors to date. **Revista Dor**, v. 13, n. 1, p. 75–79, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rdor/v13n1/en_a14v13n1.pdf>.

MASTROGIANNI, O. et al. Determination of venlafaxine in post-mortem whole blood by HS-SPME and GC-NPD. **Forensic Science International**, v. 215, n. 1–3, p. 105–109, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.05.008>>. Acessado em 20 jul 2022.

MATSUTA, Shuntaro et al. Development of a simple one-pot extraction method for

various drugs and metabolites of forensic interest in blood by modifying the QuEChERS method. **Forensic Science International**, v. 232, n. 1–3, p. 40–45, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.06.015>>. Acessado em 22 jul 2022.

MATTSON, Christine L et al. Morbidity and Mortality Weekly Report Trends and Geographic Patterns in Drug and Synthetic Opioid Overdose Deaths-United States, 2013-2019. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 70, n. 6, p. 202–207, 2021. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/nchs/data/nvsr/nvsr61/>>.

MAURER, H. H.; MEYER, Markus R. High-resolution mass spectrometry in toxicology: current status and future perspectives. **Archives of Toxicology**, v. 90, n. 9, p. 2161–2172, 2016.

MAURER, Hans H. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. In: MOFFAT, ANTHONY C; OSSELTON, M DAVID; WIDDOP, BRIAN (Org.). **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons**. 4. ed. London: Pharmaceutical Press, 2011. p. 594–599.

MAURER, Hans H. Mass spectrometry for research and application in therapeutic drug monitoring or clinical and forensic toxicology. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 40, n. 4, p. 389–393, 2018.

MCNAMARA, James O. Farmacoterapia das epilepsias. In: BRUNTON, LAURENCE L.; CHABNER, BRUCE A.; KNOLLMANN, BJÖRN C. (Org.). **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda., 2012. p. 583–607.

MENG, Liang et al. Comparison of hollow fiber liquid-phase microextraction and ultrasound-assisted low-density solvent dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of drugs of abuse in biological samples by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 989, p. 46–53, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.02.039>>. Acessado em 22 jul 2022.

MEYER, Jonathan M. Farmacoterapia da psicose e da mania. In: BRUNTON, LAURENCE L.; CHABNER, BRUCE A.; KNOLLMANN, BJÖRN C. (Org.). **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda., 2012. p. 417–455.

MIHIC, S. John; HARRIS, R. Adron. Hipnóticos e sedativos. In: BRUNTON, LAURENCE L.; CHABNER, BRUCE A.; KNOLLMANN, BJÖRN C. (Org.). **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda., 2012. p. 457–479.

MINNS, Alicia B.; CLARK, Richard F. Toxicology and overdose of atypical antipsychotics. **Journal of Emergency Medicine**, v. 43, n. 5, p. 906–913, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jemermed.2012.03.002>>. Acessado em 11 jul 2022.

MOEIN, Mohammad Mahdi; EL BEQQALI, Aziza; ABDEL-REHIM, Mohamed. Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1043, p. 3–11, 2017.

MOHAMED, Khaled M.; BAKDASH, Abdulsallam. Comparison of 3 Derivatization Methods for the Analysis of Amphetamine-Related Drugs in Oral Fluid by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry Insights**, v. 12, 2017.

MORELLI, Micaela; TOGNOTTI, Eugenia. Brief history of the medical and non-medical use of amphetamine-like psychostimulants. *Experimental Neurology*, v. 342, n. March, p. 113754, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113754>>.

MORGAN, Celia J.A.; CURRAN, H. Valerie. Ketamine use: A review. **Addiction**, v. 107, n. 1, p. 27–38, 2012.

NIEDBALA, RS; GONZALEZ, JM. Immunoassays. In: MOFFAT, ANTHONY C; OSSELTON, M DAVID; WIDDOP, BRIAN (Org.). **Clarke's Analysis of Drugs and**

Poisons. 4. ed. London: Pharmaceutical Press, 2011. p. 496–506.

NISTOR, Nicolai et al. Epidemiologic profile and triggering factors of voluntary poisoning in teenagers. **Medicine (United States)**, v. 96, n. 5, p. 1–5, 2017.

O'DONNELL, James M.; SHELTON, Richard C. Tratamento farmacológico da depressão e dos transtornos de ansiedade. In: BRUNTON, LAURENCE L.; CHABNER, BRUCE A.; KNOWLLMANN, BJÖRN C. (Org.). **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda., 2012. p. 397–415.

OHASHI, Nobuko; KOHNO, Tatsuro. Analgesic Effect of Acetaminophen: A Review of Known and Novel Mechanisms of Action. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, n. November, p. 1–6, 2020.

OLSON, Kent R. Acetaminophen. In: OLSON, KENT R (Org.). **Poisoning & Drug Overdose**. 7. ed. New York: McGraw-Hill Education, 2018. p. 73–76.

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

ORFANIDIS, Amvrosios et al. A UHPLC-MS-MS Method for the Determination of 84 Drugs of Abuse and Pharmaceuticals in Blood. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 28–43, 2021.

PARKINSON, Andrew; OGILVIE, Brian W. Biotransformação de Xenobióticos. In: KLASSEN, CURTIS D.; WATKINS III, JOHN B. (Org.). **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull**. 2. ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda., 2012. p. 71–98.

PEACOCK, Amy et al. New psychoactive substances: challenges for drug surveillance, control, and public health responses. **The Lancet**, v. 394, n. 10209, p. 1668–1684, 2019. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32231-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32231-7)>. Acessado

em 17 jul 2022.

PENN, Elizabeth; TRACY, Derek K. The drugs don't work? antidepressants and the current and future pharmacological management of depression. **Therapeutic Advances in Psychopharmacology**, v. 2, n. 5, p. 179–188, 2012.

PEREIRA, Lilian Cristina; FRANCO-BERNARDES, Mariana Furio; DORTA, Daniel Junqueira. Fundamentos em Toxicodinâmica. In: DORTA, DANIEL JUNQUEIRA et al. (Org.). **Toxicologia Forense**. 1. ed. São Paulo: Blucher, 2018. p. 79–99.

PF, Polícia Federal. **Relatório 2020 - Drogas sintéticas**. . Brasília: [s.n.], 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/pf/pt-br/aceso-a-informacao/acoes-e-programas/relatorio-de-drogas-sinteticas2020/relatorio_drogas_sinteticas_2020.pdf>.

PRATA, Margarida et al. Determination of opiates in whole blood using microextraction by packed sorbent and gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1602, p. 1–10, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.05.021>>. Acessado em 17 jul 2022.

RANGAN, Cyrus. Clonidine and related drugs. In: OLSON, KENT R (Org.). **Poisoning & Drug Overdose**. 7. ed. New York: McGraw-Hill Education, 2018. p. 197–199.

REMANE, Daniela et al. Fast and simple procedure for liquid-liquid extraction of 136 analytes from different drug classes for development of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric quantification method in human blood plasma. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 6, p. 2303–2314, 2010.

RENGARAJAN, Arvind; MULLINS, Michael E. How often do false-positive phencyclidine urine screens occur with use of common medications? **Clinical Toxicology**, v. 51, n. 6, p. 493–496, 2013.

SAID, Rana et al. Microextraction by packed sorbent for LC-MS/MS determination of drugs in whole blood samples. **Bioanalysis**, v. 2, n. 2, p. 197–205, 2010.

SAITMAN, Alec; PARK, Hyung Doo; FITZGERALD, Robert L. False-positive interferences of common urine drug screen immunoassays: A review. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 38, n. 7, p. 387–396, 2014.

SAITO, Koichi et al. Confirmation of synthetic cannabinoids in herb and blood by HS-SPME-GC/MS. **Forensic Chemistry**, v. 13, n. March, p. 100156, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.forc.2019.100156>>. Acessado em 22 jul 2022.

SAITO, Takeshi et al. SPME-GC-MS analysis of α -pyrrolidinovalerophenone in blood in a fatal poisoning case. **Forensic Toxicology**, v. 31, n. 2, p. 328–332, 2013.

SCHIFANO, Fabrizio et al. The clinical challenges of synthetic cathinones. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 86, n. 3, p. 410–419, 2020.

SCHULZ, Martin et al. Revisited: Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 1100 drugs and other xenobiotics. **Critical Care**, v. 24, n. 1, p. 1–4, 2020.

SEBBEN, Viviane Cristina et al. Validação de metodologia analítica e estudo de estabilidade para quantificação sérica de paracetamol. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 2, p. 143–148, 2010.

SEMPIO, Cristina et al. Simple and sensitive screening and quantitative determination of 88 psychoactive drugs and their metabolites in blood through LC-MS/MS: Application on postmortem samples. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 970, p. 1–7, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.08.039>>. Acessado em 21 jul 2022.

SHAFI, Abu et al. New psychoactive substances: a review and updates. **Therapeutic Advances in Psychopharmacology**, v. 10, p. 204512532096719, 2020.

SILVEIRA, Gabriela de Oliveira et al. Fast Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction as a Greener Alternative for the Determination of N,N-Dimethyltryptamine and Harmala Alkaloids in Human Urine. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, n. October, p. 1–13, 2020.

SIMONS, F. Estelle R.; SIMONS, Keith J. Histamine and H1-antihistamines: Celebrating a century of progress. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 128, n. 6, p. 1139- 1150.e4, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2011.09.005>>. Acessado em 14 jul 2022.

SINAN. **Intoxicação exógena**. Disponível em: <<http://portalsinan.saude.gov.br/intoxicacao-exogena>>. Acesso em: 8 jul. 2022.

SKOLNICK, Phil. Treatment of overdose in the synthetic opioid era. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 233, p. 108019, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.108019>>. Acessado em 16 jul 2022.

SOMMERFELD-KLATTA, Karina et al. Clonazolam a new designer benzodiazepine intoxication confirmed by blood concentration. **Forensic Science International**, v. 310, 2020.

SPILLER, Henry A. et al. Sex- and Age-specific Increases in Suicide Attempts by Self-Poisoning in the United States among Youth and Young Adults from 2000 to 2018. **Journal of Pediatrics**, v. 210, p. 201–208, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2019.02.045>>. Acessado em 05 jul 2022.

SPILLER, Henry A. et al. Suicide attempts by self-poisoning in the United States among 10–25 year olds from 2000 to 2018: substances used, temporal changes and demographics. **Clinical Toxicology**, v. 58, n. 7, p. 676–687, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/15563650.2019.1665182>>. Acessado em 05 jul 2022.

SPILLER, Henry; GRIFFITH, Jill. Prolonged cardiovascular effects after unintentional ingestion of tetrahydrozoline. **Clinical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 171–172, 2008.

STEUER, Andrea E. et al. Comparison of conventional liquid chromatography-tandem mass spectrometry versus microflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry within the framework of full method validation for simultaneous quantification of 40 antidepressants and neuroleptics. **Journal of Chromatography**

A, v. 1381, p. 87–100, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.12.084>>. Acessado em 23 jul 2022.

TAIT, Robert J. et al. A systematic review of adverse events arising from the use of synthetic cannabinoids and their associated treatment. **Clinical Toxicology**, v. 54, n. 1, p. 1–13, 2016.

TANAKA, Einosuke; NAKAMURA, Takako; HONDA, Katsuya. Toxicological interactions between alcohol and benzodiazepines. **The Japanese journal of toxicology**, v. 17, n. 4, p. 313–319, 2004.

TANG, Magdalene H.Y. et al. Simultaneous detection of 93 conventional and emerging drugs of abuse and their metabolites in urine by UHPLC-MS/MS. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 969, p. 272–284, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.08.033>>. Acessado em 22 jul 2022.

TEIXEIRA, Helena Maria de Sousa Ferreira e. Opiáceos e opioides. In: DORTA, DANIEL JUNQUEIRA et al. (Org.). **Toxicologia Forense**. 1. ed. São Paulo: Blucher, 2018. p. 179–200.

THANACOODY, Ruben. Antidepressant and antipsychotic poisoning. **Medicine**, v. 48, n. 3, p. 194–196, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357303919303275>>. Acessado em 13 jul 2022.

TRUTA, Liliana et al. Antidepressants detection and quantification in whole blood samples by GC–MS/MS, for forensic purposes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 128, p. 496–503, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.06.027>>. Acessado em 21 jul 2022.

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

TYRKKO, Elli; ANDERSSON, Mikael; KRONSTRAND, Robert. The toxicology of new psychoactive substances: Synthetic cathinones and phenylethylamines. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 38, n. 2, p. 190–216, 2016.

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

UNODC. **World Drug Report 2022**. . Vienna: [s.n.], 2022. Disponível em: <<https://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/world-drug-report-2022.html>>. Acessado em 16 jul 2022.

VEJAR-VIVAR, Carmina et al. Direct coupling of MEPS to ESI-QqTOF-MS for the simultaneous analysis of tricyclic antidepressants and benzodiazepines in postmortem blood. **Microchemical Journal**, v. 171, n. September, p. 106797, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106797>>. Acessado em 20 jul 2022.

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

VIETTE, Véronique et al. Current role of liquid chromatography coupled to mass spectrometry in clinical toxicology screening methods. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 49, n. 7, p. 1091–1103, 2011.

VILAÇA, Luciana; VOLPE, Fernando Madalena; LADEIRA, Roberto Marini. Accidental poisoning in children and adolescents admitted to a referral toxicology department of a Brazilian emergency hospital. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 38, 2020.

VIVOLO-KANTOR, Alana M. et al. Recent trends and associated factors of amphetamine-type stimulant overdoses in emergency departments. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 216, n. July, p. 108323, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2020.108323>>. Acessado em 13 jul 2022.

VLASE, L. et al. Pharmacokinetic interaction between ivabradine and carbamazepine in healthy volunteers. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 36, n. 2, p. 225–229, 2011.

VORCE, Shawn P. Mass Spectrometry. In: LEVINE, BARRY S; KERRIGAN, SARAH (Org.). **Principles of Forensic Toxicology**. 5. ed. Cham: Springer Nature Switzerland AG, 2020. p. 197–220.

WARING, William Stephen. The acute management of poisoning. **Medicine (United Kingdom)**, v. 45, n. 2, p. 104–109, 2017.

WATSON, D. Mass Spectrometry. In: MOFFAT, ANTHONY C; OSSELTON, M DAVID; WIDDOP, BRIAN (Org.). **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons**. 4. ed. London: Pharmaceutical Press, 2011. p. 577–593.

WHO. **Guidelines for Establishing a Poison Centre**. [S.l.]: World Health Organization, 2020. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/338657/9789240009523-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acessado em 05 jul 2022.

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

WOŹNIAK, Mateusz Kacper et al. Development and validation of a GC–MS/MS method for the determination of 11 amphetamines and 34 synthetic cathinones in whole blood. **Forensic Toxicology**, v. 38, n. 1, p. 42–58, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11419-019-00485-y>>. Acessado em 22 jul 2022.

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

XIAO, Qin; HU, Bin. Hollow fiber-liquid phase microextraction combined with gas

chromatography for the determination of phenothiazine drugs in urine. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 878, n. 19, p. 1599–1604, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.04.023>>. Acessado em 20 jul 2022.

YANG, Xiangming et al. Early hemoperfusion for emergency treatment of carbamazepine poisoning. **American Journal of Emergency Medicine**, v. 36, n. 6, p. 926–930, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ajem.2017.10.048>>. Acessado em 11 jul 2022.

ZIMMERMAN, Janice L. Cocaine Intoxication. **Critical Care Clinics**, v. 28, n. 4, p. 517–526, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccc.2012.07.003>>. Acessado em 14 jul 2022.

5. MANUSCRITO

O manuscrito “***A multi-analyte LC-MS/MS method for the determination of 57 pharmaceuticals and illicit drugs in plasma, and its application to poisoning cases***”, que conta com a parte experimental desenvolvida nesta dissertação, foi submetido e publicado na revista *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (ISSN 0731-7085, fator de impacto 3.571, 2021) e está apresentado a seguir. As normas de publicação estão disponíveis no Anexo II.

Artigo:

DOS SANTOS, Bruno Pereira et al. A multi-analyte LC-MS/MS method for the determination of 57 pharmaceuticals and illicit drugs in plasma, and its application to poisoning cases. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, p. 115082, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.115082>

A multi-analyte LC-MS/MS method for the determination of 57 pharmaceuticals and illicit drugs in plasma, and its application to poisoning cases

Bruno Pereira dos Santos^{1,2}, Sarah Eller¹, Gabriela Ramos Borges¹, Giovanna Cristiano de Gouveia¹, Viviane Cristina Sebben³, Marcelo Dutra Arbo², Tiago Franco de Oliveira^{1*}

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

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

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

*Corresponding Author (T. F. Oliveira)

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

Abstract

The diagnostic methods in an emergency scenario must be simple, fast, and efficient to provide an effectiveness and efficient treatment, thus reducing the consequences of exposure. Considering the sample analysis, the protein precipitation combined with LC-MS/MS has been shown to be a good strategy for the simultaneous determination of compounds of toxicological interest, such as medicines and drugs of abuse. In this study, a rapid and simple multi-analyte method was developed and validated for the quantification of 57 pharmaceuticals and illicit drugs in plasma samples. Sample pre-treatment consists of protein precipitation of 50 μ L of the sample with 240 μ L of organic solvent mixture (MeOH:ACN, 3:1, v/v), centrifugation, and injection into the LC-MS/MS, with a chromatographic run time of 7 min. The method was validated considering lower limit of quantification (LLOQ), interferences, linearity, precision, accuracy, dilution integrity, carryover, and matrix effect. The LLOQs ranged from 5 to 20 ng/mL and all analytes were linear ($r^2 > 0.99$) in the tested concentration ranges. The method proved to be precise and accurate, presenting QC concentrations for all analytes within acceptable limits by the guideline used (CV% \leq 20% and bias \pm 20%). The developed method was successfully applied in 470 plasma samples of real cases of poisoning. A total of 80% of the samples were positive for at least one substance, with acetaminophen (32.1%), diazepam (25.1%), and lidocaine (18.9%) being the most detected. The most prevalent exposure circumstance among the cases was suicide attempt. The most frequent age groups were young adults between 20 and 29 years old and children under 5 years old. The methodology developed proved to be efficient in the simultaneous determination of 57 substances of toxicological interest, contributing to a correct diagnosis and, consequently, to the most appropriate management and treatment of the intoxicated patient. Furthermore, it is possible to observe the most commonly involved toxic agents in the Rio Grande do Sul, southern Brazil, helping to

trace a profile of the poisoning patient, important in toxicovigilance actions. **Keywords:** Multi-analyte, protein precipitation, plasma, drugs poisoning, LC-MS/MS.

1. Introduction

Over the last few years, an increase in the number of intoxication cases has been registered around the globe, and Brazil is not an exception [1,2]. Pharmaceuticals and classic illicit drugs are the major agents used, and the poisoning profile can change according to characteristics such as sex, age, and circumstance of intoxication, as well as geographic location [2,3]. Furthermore, in the last two decades, an explosive increase in the use of new psychoactive substances such as synthetic cathinones, synthetic phenethylamines, and synthetic cannabinoids were observed [4,5]. Countless cases of intoxication by these new drugs were registered in Brazil and in the world [6-8].

The clinical diagnosis of the intoxicated patient has been increasingly difficult, due to the polyuse of substances and nonspecific clinical manifestations. The determination of the toxic agents involved in intoxication is crucial for clinical prognosis, once provide to medical team an appropriate management for the patient [9].

In clinical emergency, screening methodologies, such as immunoassays, are widely used, due to their quick results and ease of handling. Nevertheless, false positive or false negative results are considered a disadvantage of this technique, requiring more sensitive and specific methodologies for confirmation analysis [10]. Analytical methods GC-MS or LC-MS are the gold standards in diagnosis within the scope of emergency toxicology [11,12]. Additionally, MS in sequential mode, mainly LC-MS/MS, has enabled the development of multi-analyte methods with greater sensitivity and specificity, making possible the

simultaneous identification and quantification of dozens of compounds of toxicological interest in biological samples [13–15].

One of the challenges in multi-analyte methods is sample preparation, considering the different physicochemical characteristics of the compounds. Classical extractions, such as solid phase extraction (SPE) and liquid-liquid extraction (LLE), present excellent results for the determination of medicines and drugs in biological samples. However, they use high volumes of samples and organic solvents, in addition to demanding time [16]. An alternative is the use of protein precipitation (PP), once is based on the addition of a precipitating solvent to blood, plasma, or serum samples, agitation, centrifugation, and injection into the analytical system. The PP preparation combined with LC-MS/MS provides fast and reliable analysis, essential attributes in the diagnosis of poisoned patients [17]. Several studies have demonstrated satisfactory results using PP as sample preparation in the clinical or forensic context for the determination of toxic compounds in plasma, whole blood, and serum samples [18–21].

In this context, this study aims to develop and validate a screening analytical method for quantification of pharmaceuticals and drugs of abuse in plasma samples, using PP and LC-MS/MS, to provide a rapid diagnosis in intoxication cases. In addition, from the analysis of real samples, it is expected to prospect the main substances of toxicological interest involved in poisoning cases that occurred in Rio Grande do Sul state, Brazil.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals and reagents

Acetonitrile, isopropanol, methanol, and formic acid 98% were purchased from Merck® (Darmstadt, Germany). 25B-NBOMe, 25C-NBOMe, 25I-NBOMe, anhydrous ester methyl ecgonine (AEME), amphetamine, alprazolam, amitriptyline hydrochloride, buspirone,

citalopram hydrobromide, chlorpromazine hydrochloride, clonazepam, desipramine hydrochloride, diazepam, diethylpropion, diphenhydramine hydrochloride, ephedrine, ethylone, fenproporex hydrochloride, fentanyl, flunitrazepam, fluoxetine hydrochloride, hydroxycocaine, imipramine hydrochloride, levamisole hydrochloride, lidocaine, lysergic acid diethylamide (LSD), mephedrone, 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), midazolam, nortriptyline hydrochloride, pentylone, promethazine hydrochloride, sertraline hydrochloride, sibutramine hydrochloride, temazepam, venlafaxine hydrochloride, and zolpidem(1 mg/mL) were purchased from Cerilliant® (Round Rock, TX, USA). Benzoyllecgonine, bupropion, cocaethylene, cocaine, desvenlafaxine, ester methyl ecgonine (EME), ketamine, methamphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDEA), quetiapine fumarate, and phencyclidine (PCP)(1 mg/mL) used as calibrators were purchased from LGC Standards® (Manchester, NH, USA). N-ethylpentylone and ADB-FUBINACA (5 mg total) were purchased from Cayman Chemical® (Ann Arbor, MI, USA). Acetaminophen (10 g total) was purchased from Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA). Carbamazepine (1 g total) and naphazoline hydrochloride (25 g total) were purchased from Acros Organics® (Geel, Belgium).The internal standards amphetamine-D5, benzoyllecgonine-D3, cocaine-D3, diazepam-D5, haloperidol-D4, ketamine-D4, MDMA-D5, and PCP-D5(1 mg/mL) were purchased from Cerilliant® (Round Rock, TX, USA).Ultrapure water was supplied through a Milli-Q water system, with a resistivity of 18.18 MΩ * cm and conductivity of 0.05 μS/cm and, both at 25 °C (Millipore, Billerica, MA, USA).

2.2. Solutions

Working solutions were prepared in water, with a concentration of 100 μg/mL, except for ADB-FUBINACA, ethylone, mephedrone, n-ethylpentylone, pentylone, 25B-NBOMe, 25C-NBOMe, and 25I-NBOMe which were prepared at 10 μg/mL. Solutions were stored in borosilicate vials at -20°C when not in use. Working solutions were added to the blank plasma

samples to obtain the fortified solutions for optimization and validation. All optimization and validation were performed with blank plasma samples collected from the researchers themselves and previously tested. The internal standards pool solution was prepared at 1 µg/mL, with amphetamine-D5, benzoylecgonine-D3, cocaine-D3, diazepam-D5, haloperidol-D4, ketamine-D4, MDMA-D5, and PCP-D5.

2.3. LC-MS/MS conditions

All samples were analyzed using a liquid chromatographic system coupled to a triple quadrupole mass spectrometer, model LCMS-8045 (Shimadzu, Kyoto, Japan). The chromatographic separation was performed with an Acquity UPLC® C18 column (2.1 mm × 50 mm, 1.7 µm particle size) (Waters Corporation, Ireland), heated at 60 °C, with a flow rate of 0.4 mL/min. The mobile phase used was ultra-pure water (A) and acetonitrile (B), both fortified with formic acid (0.1%, v/v). The run was performed using a gradient, where the concentration of mobile phase B started at 2%, increased to 100% up to 2.5 min, and stabilized at 100% up to 3 min. Afterward, mobile phase B returned to 2% until 3.1 min, where it remained stable until the end of the run (7 min). The time the system takes to inject the next sample is 0.4 min. The acquisition in the mass spectrometer for all compounds was performed using electrospray ionization, in positive mode. The instrumental parameters were set as follows: heat block temperature 400 °C; capillary voltage, 4.5 kV; nebulizer gas (N₂) flow, 3 L/min; desolvation line temperature, 250 °C; drying gas (N₂) flow, 10 L/min; and collision induced dissociation gas pressure (Ar), 230 kPa. The analyses were performed in multiple reaction monitoring (MRM) mode. Two MRM transitions were selected, being one for the quantification and another for qualification of each analyte. The transitions of each compound, their respective collision energies, and retention time are presented in **Table 1**. Data were extracted using LabSolutions® software (Shimadzu, Kyoto, Japan).

2.4. Sample preparation

Into a 50 μL aliquot of plasma, 10 μL of an internal standard pool (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and 240 μL of a cold solution of methanol and acetonitrile (3:1, v/v) were added. The mixture was shaken for 15 seconds and centrifuged at 12,000 rpm for 6 minutes. Afterward, 3 μL of the supernatant was injected into the LC-MS/MS.

2.5. Optimization of precipitation solvent

The optimization of sample preparation supporting the proper fit of variables involved in the process. In protein precipitation, a variable with a high influence on analytical sensitivity is the precipitating agent, which can be optimized by a mixture design [22]. In this study, the organic solvent was optimized using a centroid-simplex design with a three-component mixture system and special cubic model.

The evaluated solvents were acetonitrile, isopropanol, and methanol. The mixtures evaluated were each pure solvent, binary mixtures 1:1 (v/v), ternary mixture 1:1:1 (v/v/v), and mixtures with 2/3 of one of the components and 1/6 of the other two components, totaling ten experiments. Extractions were performed in plasma samples spiked with all analytes, with a concentration of 500 ng/mL. The experimental data obtained from the optimization were evaluated using the software Statistica10.0 (Statsoft, Tulsa, OK, USA).

2.6. Validation

Validation was conducted in accordance with ANSI/ASB Standard 036, from the American Academy of Forensic Science [23]. The parameters evaluated were the lower limit of quantitation (LLOQ), interference studies, linearity, carryover, precision, accuracy, dilution integrity, and matrix effect.

The LLOQ was performed experimentally, where three different blank plasma samples were fortified with increasing concentrations of each analyte, which were characterized as the lowest quantifiable concentration of each substance. The parameter was performed in three replicates in each plasma sample and the acceptability criteria was a coefficient of variation (CV%) lower than 20%.

In the interference studies, endogenous and exogenous interference was evaluated. Endogenous interference was performed from the analysis of ten different blank plasma samples. Exogenous interference studies were conducted with the addition of other substances likely to be present in real samples, and the evaluated substances were acetylsalicylic acid, atenolol, cannabinal, chlorpheniramine, codeine, phenytoin, propranolol, tetrahydrocannabinol, topiramate, and valproic acid.

Furthermore, interference from stable-isotopes internal standards was investigated in two steps. First, with the addition of the internal standards without the analytes of interest, the signal of the analytes should be lower than the LLOQ response. Second, from the analysis of a matrix fortified with the analytes at the concentration of the highest point of linearity and without the addition of an internal standard, to verify possible interference of the analytes in the stable-isotopes internal standards response.

Linearity was performed using calibration curves with blank samples spiked at six concentration levels, in five replicates. Homoscedasticity was evaluated using the F-test, and in the presence of heteroscedasticity between the lowest and highest point of the calibration curve, a weighted least squares model was tested for a better fit of the linear regression. The weights used were 1, $1/x$, $1/x^2$, $1/x^{1/2}$, $1/y$, $1/y^2$, and $1/y^{1/2}$. The weight with the best fit and, consequently, used in the validation and application, will be the one with the lowest sum of residues. In addition, the coefficient of determination (r^2) should be at least 0.99.

To verify the possibility of contamination in subsequent runs, the carryover was performed. For this, after injecting the highest concentration of the calibration curve, a blank sample was injected. The process was replicated six times and, if a carryover is present, the peak intensity must be less than the LLOQ of the analyte.

Precision and accuracy were conducted from the analysis of plasma samples spiked at three different quality control (QC) concentrations (low, medium, and high). The QC concentrations for each analyte are described in **Table 2**. For each QC, five runs were performed, each one in three replicates. For precision, within-run CV% and between-run CV% were evaluated, where the acceptable limit for both is 20%. In the accuracy, the percentage of the average concentration measured in relation to the nominal concentration was verified, which must be $\pm 20\%$ at each QC.

The dilution integrity was evaluated for all analytes using a factor of 1:10, with blank plasma as the diluent. The plasma samples were spiked with 5,000 ng/mL of compounds, except for ADB-FUBINACA, ethylone, mephedrone, n-ethylpentylone, pentylone, 25B-NBOMe, 25C-NBOMe, and 25I-NBOMe, which were evaluated at 500 ng/mL, and fentanyl spiked with 1,250 ng/mL. Afterwards, the samples were prepared and analyzed.

The matrix effect was determined according to Matuszewskiet al. (2003) [24]. Six replicates of plasma from six different individuals were analyzed spiked with QC low and high concentrations in comparison to neat standards at same concentration in solution of methanol:acetonitrile (3:1, v/v). The matrix effect is presented as the mean of the replicates of the six different samples and expressed as a percentage from the calculation, in which $ME\% = (\text{peak area in matrix}/\text{peak area neat standard solution}) * 100$. When the ME% is greater than 100%, it means that there has been an enhancement in ionization. In contrast, if the ME% value is less than 100%, it demonstrates that ionization has been suppressed. Together, the normalized

matrix effect (NME%) was calculated, where the analyte/IS ratio was considered instead of the absolute area, either in the matrix or neat standard solution.

2.7. Application to authentic samples

To verify the method applicability, 470 plasma samples from suspected cases of poisoning attended by the Toxicological Information Center of Rio Grande do Sul (CIT/RS), Brazil, were submitted for analysis. Concomitantly, data from patients were collected, such as gender, age, the circumstance of poisoning, the severity of poisoning, and case evolution were collected. This study was approved by the Ethical Committee for Human Studies of the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Brazil, and by the Ethical Committee for Human Studies of the School of Public Health, from the Health State Department of Rio Grande do Sul, Brazil (CAAE 31992920.3.0000.5345).

3. Results and discussion

The use of LC-MS is widespread in the clinical-forensic scenario, offering greater sensitivity and reliability to the analytical results, besides enabling the simultaneous analysis of several compounds. Allied to this, PP has been shown to be a fast and efficient sample preparation, which are important characteristics for emergency toxicological analyses.

Compared to other protocols using PP, the developed method required smaller amounts of sample (50 μ L) and solvent (240 μ L), in addition to dispensing with the solvent drying step [20,21,25,26]. Besides that, the chromatographic run time was 7 minutes, shorter than other multi-analyte studies using LC-MS/MS already published [14,21,26,27].

3.1. Optimization and method validation

For optimization of precipitation solvent, the geometric mean of the absolute areas of the peaks of all analytes was calculated. The surface plot, presented in **Figure 1**, showed a higher intensity (red color) in the region with 75% methanol and 25% acetonitrile. The r^2 of the statistical model was 0.95, showing that the composition of precipitation solvent influences the analytical response. Thus, the final mixture used for sample preparation was methanol:acetonitrile (3:1, v/v).

In the interference assays, no significant responses (<LLOQ response) were observed in the MRM transitions of the analytes, either in the exogenous evaluation with other compounds, or in the analysis of blank plasma samples from other sources, showing that the method developed is selective.

The LLOQ of the analytes ranged between 5 and 20 ng/mL, in agreement with or below other published methods [15,25,27,28]. The limits of each analyte are shown in **Table 2**. LLOQs are below or within the therapeutic plasma concentration range of the compounds, except for buspirone and flunitrazepam, where both therapeutic ranges are below 20 ng/mL. However, the reported toxic plasma concentration of these compounds is from 30 ng/mL and 50 ng/mL, respectively [29]. The LLOQs of all analytes had a CV% lower than 20%, as recommended in the guideline [23].

For linearity, all 57 analytes showed a coefficient of determination (r^2) greater than 0.99, as shown in **Table 2**, along with the resulting weighting factors. The upper limit of quantification of the analytes was 1,000 ng/mL, except for fentanyl and the new psychoactive substances (NBOMes, synthetic cathinones, and ADB-FUBINACA), which the plasma concentrations with clinical effects are lower than the rest of the compounds. The intervals were constructed in accordance with concentrations above the therapeutic range, covering concentrations known to be toxic [29]. In cases where the toxic concentration was greater than

the highest point of linearity, e.g., carbamazepine and acetaminophen, this can be corrected in some cases by dilution integrity.

In precision assays, all analytes obtained CV% below 20% for all QC levels, as recommended by the guideline [23]. Within-run precision ranged from 3.7% to 16.0%, correspondingly to the low QC of 25C-NBOMe and medium QC of sertraline. Meanwhile, the between-run precision ranged from 4.2% to 17.4%, representing the low QCs of 25C-NBOMe and diazepam, respectively. The bias was within the limit of $\pm 20\%$, with accuracy, considering all compounds and QC levels, ranging from 82 to 119%. Precision and accuracy data by substance are also displayed in **Table 2**.

No carryover was observed in the injection of drug-free samples after the upper limit of quantification run. The dilution integrity had within-run CV% ranging from 4.7% to 13.2%, referring, respectively, to fenproporex and flunitrazepam. The between-run CV% ranged from 5.8% to 14.1%, corresponding to MDEA and alprazolam. In this parameter, the lowest accuracy was registered for cocaine (82.0%) and the highest for acetaminophen (116.8%).

One of the disadvantages of using PP as a preparative method is the low clean-up when compared to other classical extraction techniques, such as LLE and SPE. The remaining concentrations of compounds such as phospholipids, cholesterol, and acylglycerols are significantly higher in PP than in LLE and SPE [30]. This can affect the ionization of the analytes, thus showing the PP more susceptible to the matrix effect [16]. In this study, 49 of the 57 compounds analyzed had no significant matrix effect (75%-125%). Five substances showed signal suppression ($ME\% < 75\%$) and three obtained signal enhancement ($ME\% > 125\%$). The ME% of all analytes are exhibit in **Table 2**.

Substances that showed pronounced suppression of ionization had ME% of 70.2% (chlorpromazine), 66.1% (levomepromazine), 65.1% (sibutramine), 48.7% (morphine) and 34.6% (EME). Remane *et al.* (2010) reported a mean ME% of 100% for chlorpromazine, 102%

for levomepromazine, and 68% for morphine, in a method using LLE by LC-MS/MS [15]. Bae *et al.* (2011) obtained ME% between 97.6% and 100.1% for sibutramine in plasma, also using LLE by LC-MS/MS [31]. Lizot *et al.* (2020) showed ME% of 100.1% for EME in plasma samples, extracted with solid phase microextraction (SPME) LC tips and analyzed on LC-MS/MS [32]. However, all these cited works used exhaustive extraction methods or offered an efficient clean-up in the sample, resulting in much lower suppressions than those presented in methods with PP as a single step, such as this study. In contrast, AEME, levamisole, and ephedrine had ME% greater than 25%. Despite significant suppression or enhancement, the CV% for all analytes, at low and high QC, was less than 20%, indicating that the matrix effect does not influence the precision of the method.

When analyzing the values obtained in the NME%, it was observed that the matrix effect was corrected for some analytes only, mainly those with their respective internal deuterated standards, such as haloperidol, ketamine, MDMA, and phencyclidine. However, most of the analytes that showed matrix effect were not corrected for not having their IS-deuterated, a possible effect, as verified by Hegstad *et al* (2013) [33]. Morphine, for example, which had a ME% of 48.7%, obtained an NME% of 67.2%, showing a slight decrease in ion suppression with the correction of the IS, but which could be improved with the use of a stable isotope.

The substances contained in this method were selected from their respective frequencies of poisoning cases evaluated by the CIT/RS between the years 2016-2020. A limitation of this method is the absence of tetrahydrocannabinol (THC) and its metabolites in the list of analyzed substances, due to the lack of sensitivity observed using the sample preparation and instrumental conditions of this study. More exhaustive extractive methods would probably be needed for substances with the chemical characteristics of THC.

3.2. Application to samples from poisoning cases

The method was successfully applied to 470 plasma samples from poisoning cases attended by the Toxicological Information Center of Rio Grande do Sul, Brazil. The chromatograms obtained by LC-MS/MS from a plasma sample spiked with the substances in medium quality control concentration were illustrated in **Figure 2**. Of the 470 samples analyzed, 376 (80.0%) were positive for at least one substance. 35.1% were positive for one substance, 21.1% for two, 9.8% for three, 6.8% for four, 2.8% for five, 2.1% for six, 0.4% for seven, eight and nine (each) and 0.2% for ten substances. The most detected substance was acetaminophen (n=151, 32.1%), followed by diazepam (n=118, 25.1%) and lidocaine (n=89, 18.9%). The compounds that had at least one positive result are shown in **Table 3**. Specific chromatograms, in the LLOQ, of the substances with the highest positivity in the 470 real samples analyzed were illustrated in **Figure 3**.

All samples positive for levamisole were positive for at least benzoylecgonine and EME, showing that its consumption is linked to its use as a cutting agent in cocaine. In addition, all samples positive for fentanyl were positive for midazolam, indicative of use for analgesia and anesthesia in medical procedures, as verified by the case history and the measured concentrations. Therefore, it is important to consider that not every positive result is due to poisoning by this compound. In initial care, medications such as benzodiazepines, antipsychotics, and anesthetics are commonly used to stabilize the patient [9,34]. This may explain, for example, the high number of positive samples for midazolam and lidocaine.

Some substances were only (or almost only) positive in the presence of their precursor. All samples positive for temazepam (n=23) were positive for diazepam. 20 of 21 positive samples for nortriptyline also were positive for amitriptyline. Obviously, in both cases, there may have been exposure to both substances, but there is an indication that the presence of

temazepam and nortriptyline in these cases comes from the metabolism of diazepam and amitriptyline, respectively [14,35].

As for the quantitative results, quantified concentrations for four substances (acetaminophen, carbamazepine, ketamine, and midazolam) were higher than the concentrations validated in this method. This occurs due to the high plasma concentrations for the occurrence of the toxic effect of these substances [29].

When compared to other studies, e.g. Franco de Oliveira *et al* (2019), the positivity rate of this study was similar to that found by the authors in analyzes of whole blood samples (82%), and the most commonly detected classes were drugs of abuse, benzodiazepines and acetaminophen [18]. In a study conducted by Di Rago *et al* (2014), acetaminophen was also the most detected substance, present in about 25.2% of cases, in post-mortem samples using LC-MS/MS [19].

The low percentage or non-detection of some substances, such as amphetamines and NPS, is not synonymous with that there is no use in Brazilian territory, but that there is a low incidence in the researched population, thus requiring a larger sample number or a more targeted sampling. In a toxicological analysis of party participants in Brazil, Cunha *et al* (2021) found high percentages of MDMA (88.5%), in addition to considerable amounts of N-ethylpentylone (10.5%), which was included in this study [5].

Information from poisoning cases with analyzed samples are shown in **Table 4**. No gender differences were observed. The most prevalent age groups were 20-29 years old and 1-4 years old. Meanwhile, suicide attempt was the most prevalent circumstance, being approximately 30% of cases, considering cases with unknown circumstance. Mostly, home was the most frequent exposure site and cure was the most recorded evolution of patients. In all, 7 patients died during the management and treatment of poisoning.

In general, toxicological analysis is extremely important in the emergency scenario, providing a correct diagnosis, especially in patients with unspecific symptoms [9]. As shown in Table 4, a high number of cases with unknown information was observed, which makes an adequate diagnosis of intoxication difficult. Therefore, toxicological analysis is an important tool in this scenario, helping to choose the most appropriate management and treatment, administration of antidotes when appropriate, and improving the prognosis of the intoxicated patient, since it depends on a good and correct diagnosis [9].

4. Conclusion

In this study, a rapid and efficient LC-MS/MS method was developed and successfully validated for the simultaneous determination of 57 pharmaceuticals and drugs in plasma samples. The use of protein precipitation proved to be adequate, cheap, and viable, ideal in a toxicological emergency scenario. The method showed satisfactory results of linearity, precision, accuracy, and selectivity within the linear range for all substances. A total of 470 samples from real cases of poisoning were analyzed using the developed method, where positive results were observed in 80% of the samples, mainly for acetaminophen, diazepam, and lidocaine, showing its applicability as laboratorial diagnosis in clinical toxicology. The toxicological findings are important to characterize the poisoning cases that occurred the Rio Grande do Sul, southern Brazil, forming a solid base for the toxicovigilance system.

Author Contributions

Bruno Pereira dos Santos: Conceptualization, Methodology, Validation, Writing - review & editing; **Sarah Eller:** Conceptualization, Validation, Supervision, Writing - review & editing;

Gabriela Ramos Borges: Methodology, Validation; **Giovanna Cristiano de Gouveia:** Methodology, Validation; **Viviane Cristina Sebben:** Conceptualization, Formal analysis, Writing; **Marcelo Dutra Arbo:** Funding acquisition, Supervision, Writing; **Tiago Franco de Oliveira:** Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Writing - review & editing.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the financial support from Foundation for Research Support of the State of Rio Grande do Sul (FAPERGS, FAPERGS/MS/CNPq 08/2020 – PPSUS21/2551-0000101-1) and Coordination of Improvement of Personal Higher Education – Brazil (CAPES – Finance Code 001).

Conflict of interests

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

References

- [1] WHO, Guidelines for Establishing a Poison Centre, World Health Organization, 2020. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/338657/9789240009523-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- [2] CIT/RS, Relatório Anual 2020, (2022) 83. http://www.cit.rs.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=137&Itemid=61.
- [3] D.D. Gummin, J.B. Mowry, M.C. Beuhler, D.A. Spyker, A.C. Bronstein, L.J. Rivers, N.P.T. Pham, J. Weber, 2020 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS): 38th Annual Report, *Clin. Toxicol.* 59 (2021) 1282–1501. <https://doi.org/10.1080/15563650.2021.1989785>.
- [4] A. Peacock, R. Bruno, N. Gisev, L. Degenhardt, W. Hall, R. Sedefov, J. White, K. V. Thomas, M. Farrell, P. Griffiths, New psychoactive substances: challenges for drug surveillance, control, and public health responses, *Lancet.* 394 (2019) 1668–1684. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32231-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32231-7).
- [5] K.F. da Cunha, K.D. Oliveira, M.S. Cardoso, A.C.F. Arantes, P.H.P. Coser, L. de N. Lima, A.C.S. Maluf, M.A. de C. Comis, M.A. Huestis, J.L. Costa, Prevalence of new psychoactive substances (NPS) in Brazil based on oral fluid analysis of samples collected at electronic music festivals and parties, *Drug Alcohol Depend.* 227 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2021.108962>.
- [6] A.J. Adams, S.D. Banister, L. Irizarry, J. Trecki, M. Schwartz, R. Gerona, “Zombie” Outbreak Caused by the Synthetic Cannabinoid AMB-FUBINACA in New York, N. Engl. J. Med. 376 (2017) 235–242. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1610300>.
- [7] M. Kraemer, A. Boehmer, B. Madea, A. Maas, Death cases involving certain new

- psychoactive substances: A review of the literature, *Forensic Sci. Int.* 298 (2019) 186–267. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.02.021>.
- [8] J.L. Costa, K.F. Cunha, R. Lanaro, R.L. Cunha, D. Walther, M.H. Baumann, Analytical quantification, intoxication case series, and pharmacological mechanism of action for N-ethylnorpentylone (N-ethylpentylone or ephylone), *Drug Test. Anal.* 11 (2019) 461–471. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/dta.2502>.
- [9] K.R. Olson, R. Vohra, Emergent Evaluation and Treatment, in: K.R. Olson (Ed.), *Poisoning Drug Overdose*, 7th ed., McGraw-Hill Education, New York, 2018: pp. 1–72.
- [10] A. Saitman, H.D. Park, R.L. Fitzgerald, False-positive interferences of common urine drug screen immunoassays: A review, *J. Anal. Toxicol.* 38 (2014) 387–396. <https://doi.org/10.1093/jat/bku075>.
- [11] V. Viette, M. Fathi, S. Rudaz, D. Hochstrasser, J.L. Veuthey, Current role of liquid chromatography coupled to mass spectrometry in clinical toxicology screening methods, *Clin. Chem. Lab. Med.* 49 (2011) 1091–1103. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2011.182>.
- [12] G.M.J. Meyer, A.A. Weber, H.H. Maurer, Development and validation of a fast and simple multi-analyte procedure for quantification of 40 drugs relevant to emergency toxicology using GC-MS and one-point calibration, *Drug Test. Anal.* 6 (2014) 472–481. <https://doi.org/10.1002/dta.1555>.
- [13] M.H.Y. Tang, C.K. Ching, C.Y.W. Lee, Y.H. Lam, T.W.L. Mak, Simultaneous detection of 93 conventional and emerging drugs of abuse and their metabolites in urine by UHPLC-MS/MS, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 969 (2014) 272–284. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.08.033>.
- [14] L. Banaszekiewicz, M.K. Woźniak, M. Kata, E. Domagalska, M. Wiergowski, B. Szpiech, A. Kot-Wasik, Rapid and simple multi-analyte LC–MS/MS method for the determination of benzodiazepines and Z-hypnotic drugs in blood samples: Development,

- validation and application based on three years of toxicological analyses, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 191 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113569>.
- [15] D. Remane, M.R. Meyer, F.T. Peters, D.K. Wissenbach, H.H. Maurer, Fast and simple procedure for liquid-liquid extraction of 136 analytes from different drug classes for development of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric quantification method in human blood plasma, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 2303–2314. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3820-7>.
- [16] M.M. Moein, A. El Beqqali, M. Abdel-Rehim, Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1043 (2017) 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.09.028>.
- [17] C. Bylda, R. Thiele, U. Kobold, D.A. Volmer, Recent advances in sample preparation techniques to overcome difficulties encountered during quantitative analysis of small molecules from biofluids using LC-MS/MS, *Analyst.* 139 (2014) 2265–2276. <https://doi.org/10.1039/c4an00094c>.
- [18] S.C.W.S.E. Franco de Oliveira, A.D. Zucoloto, C.D.R. de Oliveira, E.M.M. Hernandez, L.V.G. Fruchtengarten, T.F. de Oliveira, M. Yonamine, A fast and simple approach for the quantification of 40 illicit drugs, medicines, and pesticides in blood and urine samples by UHPLC-MS/MS, *J. Mass Spectrom.* 54 (2019) 600–611. <https://doi.org/10.1002/jms.4369>.
- [19] M. Di Rago, E. Saar, L.N. Rodda, S. Turfus, A. Kotsos, D. Gerostamoulos, O.H. Drummer, Fast targeted analysis of 132 acidic and neutral drugs and poisons in whole blood using LC-MS/MS, *Forensic Sci. Int.* 243 (2014) 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.03.021>.
- [20] A. Giorgetti, R. Barone, G. Pelletti, M. Garagnani, J. Pascali, B. Haschimi, V. Auwärter, Development and validation of a rapid LC-MS/MS method for the detection of 182 novel

- psychoactive substances in whole blood, *Drug Test. Anal.* 14 (2022) 202–223. <https://doi.org/10.1002/dta.3170>.
- [21] F. Vaiano, F.P. Busardò, D. Palumbo, C. Kyriakou, A. Fioravanti, V. Catalani, F. Mari, E. Bertol, A novel screening method for 64 new psychoactive substances and 5 amphetamines in blood by LC–MS/MS and application to real cases, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 129 (2016) 441–449. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.07.009>.
- [22] M.A. Bezerra, V.A. Lemos, C.G. Novaes, R.M. de Jesus, H.R.S. Filho, S.A. Araújo, J.P.S. Alves, Application of mixture design in analytical chemistry, *Microchem. J.* 152 (2020) 104336. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104336>.
- [23] American Academy of Forensic Science, Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology, (2019) 1–40. https://www.aafs.org/sites/default/files/media/documents/036_Std_e1.pdf.
- [24] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3019–3030. <https://doi.org/10.1021/ac020361s>.
- [25] R. Leal Cunha, C. da Silva Lima Oliveira, A. Lima de Oliveira, A.O. Maldaner, P.A. Pedro, Fast determination of amphetamine-type stimulants and synthetic cathinones in whole blood samples using protein precipitation and LC-MS/MS, *Microchem. J.* 163 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105895>.
- [26] P. Adamowicz, B. Tokarczyk, Simple and rapid screening procedure for 143 new psychoactive substances by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Drug Test. Anal.* 8 (2016) 652–667. <https://doi.org/10.1002/dta.1815>.
- [27] C. Sempio, L. Morini, C. Vignali, A. Groppi, Simple and sensitive screening and quantitative determination of 88 psychoactive drugs and their metabolites in blood through LC-MS/MS: Application on postmortem samples, *J. Chromatogr. B Anal.*

Technol. Biomed. Life Sci. 970 (2014) 1–7.

<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.08.039>.

- [28] X. Chen, S. Zheng, J. Le, Z. Qian, R. Zhang, Z. Hong, Y. Chai, Ultrasound-assisted low-density solvent dispersive liquid–liquid microextraction for the simultaneous determination of 12 new antidepressants and 2 antipsychotics in whole blood by gas chromatography–mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 142 (2017) 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.04.032>.
- [29] M. Schulz, A. Schmoldt, H. Andresen-Streichert, S. Iwersen-Bergmann, Revisited: Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 1100 drugs and other xenobiotics, *Crit. Care.* 24 (2020) 1–4. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-02915-5>.
- [30] O.A. Ismaiel, T. Zhang, R.G. Jenkins, H.T. Karnes, Investigation of endogenous blood plasma phospholipids, cholesterol and glycerides that contribute to matrix effects in bioanalysis by liquid chromatography/mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 878 (2010) 3303–3316. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.10.012>.
- [31] J.W. Bae, C.I. Choi, C.G. Jang, S.Y. Lee, Simultaneous determination of sibutramine and its active metabolites in human plasma by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study, *Biomed. Chromatogr.* 25 (2011) 1181–1188. <https://doi.org/10.1002/bmc.1587>.
- [32] L.D.L.F. Lizot, A.C.C. Da Silva, M.F. Bastiani, T.F. Maurer, R.Z. Hahn, M.S. Perassolo, M.V. Antunes, R. Linden, Simultaneous Determination of Cocaine and Metabolites in Human Plasma Using Solid Phase Micro-Extraction Fiber Tips C18 and UPLC-MS/MS, *J. Anal. Toxicol.* 44 (2020) 49–56. <https://doi.org/10.1093/jat/bkz042>.
- [33] S. Hegstad, S. Hermansson, I. Betnér, O. Spigset, B.M.H. Falch, Screening and quantitative determination of drugs of abuse in diluted urine by UPLC-MS/MS, *J.*

Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 947–948 (2014) 83–95.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.12.014>.

- [34] M.P. Wilson, D. Pepper, G.W. Currier, G.H. Holloman, D. Feifel, The psychopharmacology of agitation: Consensus statement of the American Association for emergency psychiatry project BETA psychopharmacology workgroup, *West. J. Emerg. Med.* 13 (2012) 26–34. <https://doi.org/10.5811/westjem.2011.9.6866>.
- [35] L. Mifsud Buhagiar, C. Sammut, Y. Chircop, K. Axisa, N. Sammut Bartolo, J. Vella Szijj, A. Serracino Inglott, G. LaFerla, Practical liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of amitriptyline, nortriptyline and their hydroxy metabolites in human serum, *Biomed. Chromatogr.* 33 (2019) e4679. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bmc.4679>.

Table 1. Analytes and their respective MRM transitions and internal standards, according to retention time.

Analyte	MRM transitions (m/z)	CE (V)	RT (min)	IS
EME	<u>200.0 → 182.1</u>	-20	0.41	Cocaine-D3
	200.0 → 82.2	-26		
Morphine	<u>286.1 → 165.1</u>	-44	0.70	Haloperidol-D4
	286.1 → 153.1	-45		
AEME	<u>182.1 → 91.2</u>	-26	0.88	Cocaine-D3
	182.1 → 122.1	-22		
Acetaminophen	<u>152.0 → 110.0</u>	-18	1.22	Amphetamine-D5
	152.0 → 65.0	-30		
Ephedrine	<u>166.1 → 148.1</u>	-15	1.75	Amphetamine-D5
	166.1 → 117.1	-22		
Levamisole	<u>205.0 → 178.1</u>	-25	1.83	Ketamine-D4
	205.0 → 123.0	-30		
Amphetamine	<u>136.0 → 91.1</u>	-15	1.89	Amphetamine-D5
	136.0 → 65.1	-39		
Amphetamine-D5	<u>141.0 → 93.1</u>	-20	1.89	-
	141.0 → 124.2	-15		
MDA	<u>180.0 → 163.0</u>	-13	1.94	Amphetamine-D5
	180.0 → 105.1	-23		
Ethylone	<u>222.0 → 173.9</u>	-21	1.96	MDMA-D5
	222.0 → 203.9	-15		
MDMA	<u>194.0 → 163.1</u>	-11	1.98	MDMA-D5
	194.0 → 133.1	-21		
MDMA-D5	<u>199.0 → 165.1</u>	-10	1.98	-
	199.0 → 135.1	-22		
Methamphetamine	<u>150.0 → 91.1</u>	-20	1.99	Amphetamine-D5
	150.0 → 119.2	-15		
Fenproporex	<u>189.0 → 91.0</u>	-15	2.01	Amphetamine-D5
	189.0 → 119.0	-30		
Diethylpropion	<u>206.0 → 105.0</u>	-30	2.06	Amphetamine-D5
	206.0 → 100.0	-30		
Mephedrone	<u>178.0 → 160.1</u>	-15	2.09	MDMA-D5
	178.0 → 145.1	-21		
Ketamine	<u>238.0 → 125.0</u>	-25	2.10	Ketamine-D4
	238.0 → 207.0	-15		
Ketamine-D4	<u>242.0 → 129.0</u>	-25	2.10	-
	242.0 → 211.0	-20		
MDEA	<u>208.0 → 163.1</u>	-15	2.10	MDMA-D5
	208.0 → 135.2	-22		
Desvenlafaxine	<u>264.1 → 58.1</u>	-20	2.11	Haloperidol-D4
	264.1 → 246.1	-13		
Lidocaine	<u>235.0 → 86.1</u>	-19	2.11	Ketamine-D4
	235.0 → 58.1	-45		

Analyte	MRM transitions (m/z)	CE (V)	RT (min)	IS
Benzoylecgonine	<u>290.0 → 168.2</u>	-20	2.14	Benzoylecgonine-D3
	290.0 → 77.0	-55		
Benzoylecgonine-D3	<u>293.1 → 171.2</u>	-20	2.14	-
	293.1 → 77.2	-55		
Naphazoline	<u>211.0 → 141.1</u>	-33	2.16	Amphetamine-D5
	211.0 → 115.2	-38		
Pentylone	<u>236.0 → 217.8</u>	-20	2.16	MDMA-D5
	236.0 → 188.0	-15		
N-ethylpentylone	<u>250.0 → 232.1</u>	-15	2.21	MDMA-D5
	250.0 → 174.1	-33		
Cocaine	<u>304.0 → 182.1</u>	-20	2.24	Cocaine-D3
	304.0 → 82.1	-32		
Cocaine-D3	<u>307.0 → 185.1</u>	-20	2.24	-
	307.0 → 85.1	-32		
Cocaethylene	<u>318.0 → 196.1</u>	-20	2.24	Cocaine-D3
	318.0 → 82.2	-35		
Hydroxycocaine	<u>320.3 → 200.2</u>	-20	2.24	Cocaine-D3
	320.3 → 182.1	-30		
Zolpidem	<u>308.1 → 235.1</u>	-35	2.26	Haloperidol-D4
	308.1 → 236.0	-30		
LSD	<u>324.2 → 223.1</u>	-25	2.30	MDMA-D5
	324.2 → 208.0	-35		
Bupropion	<u>240.0 → 184.0</u>	-13	2.31	Amphetamine-D5
	240.0 → 166.0	-16		
Buspirone	<u>386.2 → 122.1</u>	-30	2.33	Haloperidol-D4
	386.2 → 109.1	-49		
Venlafaxine	<u>278.1 → 58.1</u>	-20	2.33	Haloperidol-D4
	278.1 → 260.1	-14		
Phencyclidine	<u>244.1 → 86.1</u>	-15	2.39	Phencyclidine-D5
	244.1 → 159.1	-15		
Phencyclidine-D5	<u>249.3 → 96.1</u>	-30	2.39	-
	249.3 → 164.1	-15		
Fentanyl	<u>337.1 → 188.1</u>	-37	2.40	Haloperidol-D4
	337.1 → 105.0	-24		
Quetiapine	<u>384.1 → 221.1</u>	-40	2.41	Amphetamine-D5
	384.1 → 279.0	-26		
Citalopram	<u>325.1 → 109.1</u>	-30	2.44	Haloperidol-D4
	325.1 → 234.1	-31		
Diphenhydramine	<u>256.2 → 152.0</u>	-36	2.45	Phencyclidine-D5
	256.2 → 165.1	-38		
Haloperidol	<u>376.1 → 123.1</u>	-25	2.45	Haloperidol-D4
	376.1 → 165.1	-42		

Analyte	MRM transitions (m/z)	CE (V)	RT (min)	IS
Haloperidol-D4	<u>380.0 → 127.2</u>	-44	2.45	-
	380.0 → 169.0	-26		
Midazolam	<u>326.1 → 291.1</u>	-28	2.46	Diazepam-D5
	326.1 → 223.0	-38		
Promethazine	<u>285.1 → 86.2</u>	-16	2.49	Amphetamine-D5
	285.1 → 71.1	-45		
25C-NBOMe	<u>336.1 → 121.1</u>	-20	2.53	MDMA-D5
	336.1 → 91.1	-47		
Desipramine	<u>267.2 → 72.0</u>	-16	2.53	Amphetamine-D5
	267.2 → 44.0	-40		
25B-NBOMe	<u>380.1 → 121.1</u>	-21	2.54	MDMA-D5
	380.1 → 91.1	-49		
Nortriptyline	<u>264.1 → 233.1</u>	-15	2.54	Amphetamine-D5
	264.1 → 91.1	-25		
Imipramine	<u>281.2 → 86.1</u>	-17	2.55	Amphetamine-D5
	281.2 → 58.1	-50		
Levomepromazine	<u>329.1 → 100.2</u>	-59	2.56	Amphetamine-D5
	329.1 → 58.1	-25		
Amitriptyline	<u>278.2 → 91.1</u>	-27	2.57	Amphetamine-D5
	278.2 → 105.1	-25		
25I-NBOMe	<u>428.0 → 121.1</u>	-21	2.58	MDMA-D5
	428.0 → 91.2	-54		
Chlorpromazine	<u>319.2 → 58.2</u>	-30	2.59	Amphetamine-D5
	319.2 → 86.2	-15		
Fluoxetine	<u>310.0 → 44.0</u>	-12	2.60	Amphetamine-D5
	310.0 → 184.4	-9		
Sertraline	<u>306.0 → 275.0</u>	-15	2.60	Haloperidol-D4
	306.0 → 159.0	-26		
Sibutramine	<u>280.2 → 125.0</u>	-25	2.62	Amphetamine-D5
	280.2 → 139.0	-20		
Carbamazepine	<u>237.1 → 194.0</u>	-20	2.66	Amphetamine-D5
	237.1 → 192.0	-25		
Clonazepam	<u>316.1 → 270.0</u>	-28	2.73	Diazepam-D5
	316.1 → 214.1	-40		
Alprazolam	<u>309.1 → 281.1</u>	-26	2.76	Diazepam-D5
	309.1 → 205.1	-40		
Flunitrazepam	<u>314.0 → 268.1</u>	-27	2.82	Diazepam-D5
	314.0 → 239.2	-39		
Temazepam	<u>301.0 → 255.1</u>	-25	2.84	Diazepam-D5
	301.0 → 283.1	-13		
Diazepam	<u>285.1 → 193.0</u>	-29	2.96	Diazepam-D5
	285.1 → 154.1	-28		

Analyte	MRM transitions (m/z)	CE (V)	RT (min)	IS
Diazepam-D5	<u>290.2</u> → <u>154.0</u>	-30	2.96	-
	290.2 → 227.0	-30		
ADB-FUBINACA	<u>383.1</u> → <u>338.0</u>	-26	3.03	Phencyclidine-D5
	383.1 → 253.1	-17		

¹Quantification MRM transitions are underlined and highlighted in bold. Abbreviations: CE, collision energy; MRM: multiple reaction monitoring; IS: internal standard; RT: retention time.

Table 2. Analytical validation results, including lower limit of quantification (LLOQ), linearity, precision, accuracy and matrix effect.

Analyte	LLOQ (ng/mL)	LR (ng/mL)	Weighting factor	r^2	QC (ng/mL)			Within-run precision (CV%)	Between-run precision (CV%)	Accuracy (%)	ME (%)	NME (%)
					Low	Medium	High					
25B-NBOMe	10	5-200	1	0.995	30	86	172	6.9-13.1	8.3-15.9	88-102	91.9	97.4
25C-NBOMe	5	5-200	1	0.995	15	86	172	3.7-12.6	4.2-13.2	84-116	90.8	101.6
25I-NBOMe	5	5-200	1	0.996	15	86	172	10.4-11.8	9.8-11.5	89-105	83.4	94.4
Acetaminophen	20	20-1000	1	0.998	60	430	860	8.1-12.9	10.3-14.0	97-111	99.1	97.9
ADB-FUBINACA	10	10-200	1	0.990	30	86	172	10.3-15.2	10.1-16.2	93-103	114.1	130.4
AEME	20	20-1000	1	0.992	60	430	860	6.7-9.4	8.3-11.4	103-109	133.8	139.1
Alprazolam	20	20-1000	1	0.999	60	430	860	5.9-13.6	9.3-15.0	98-112	94.7	102.0
Amitriptyline	20	20-1000	1	0.999	60	430	860	4.9-6.7	5.7-8.0	87-108	81.5	80.9
Amphetamine	20	20-1000	1/x	0.997	60	430	860	6.0-8.1	7.7-10.3	94-108	93.1	92.5
Benzoylcegonine	5	5-1000	1	0.999	15	430	860	10.1-11.6	9.3-11.8	86-97	111.6	107.7
Bupropion	20	20-1000	1/x ²	0.997	60	430	860	7.8-9.6	9.1-9.8	96-115	88.0	87.9
Buspirone	20	20-1000	1	0.991	60	430	860	11.0-12.5	12.1-13.5	97-112	85.4	105.8
Carbamazepine	20	20-1000	1/x ²	0.993	60	430	860	7.3-13.0	8.8-12.1	103-112	78.4	78.5
Citalopram	20	20-1000	1/x ²	0.999	60	430	860	9.3-13.0	11.7-14.0	102-111	81.9	102.1
Chlorpromazine	20	20-1000	1/y	0.999	60	430	860	11.1-14.3	10.1-16.3	93-96	70.2	73.1
Clonazepam	20	20-1000	1/x ²	0.996	60	430	860	10.7-14.9	12.6-15.6	103-105	81.5	87.9
Cocaethylene	5	5-1000	1	0.999	15	430	860	4.3-9.5	4.8-11.1	104-112	98.6	96.6
Cocaine	5	5-1000	1	0.997	15	430	860	7.4-10.2	7.2-11.6	98-113	101.9	104.0
Desipramine	20	20-1000	1	0.998	60	430	860	5.2-10.1	6.1-11.7	91-115	83.6	83.0
Desvenlafaxine	20	20-1000	1	0.991	60	430	860	7.4-9.4	8.7-9.4	91-101	93.5	117.0
Diazepam	20	20-1000	1	0.996	60	430	860	8.6-13.0	8.2-17.4	94-104	90.1	96.2
Diethylpropion	20	20-1000	1/x ²	0.997	60	430	860	7.0-8.3	7.9-9.3	94-104	90.8	90.4
Diphenhydramine	20	20-1000	1/y ²	0.996	60	430	860	7.3-10.3	7.5-14-2	101-117	84.9	84.2

Analyte	LLOQ (ng/mL)	LR (ng/mL)	Weighting factor	r^2	QC (ng/mL)			Within-run precision (CV%)	Between-run precision (CV%)	Accuracy (%)	ME (%)	NME (%)
					Low	Medium	High					
EME	20	20-1000	$1/x^{1/2}$	0.991	60	430	860	5.7-8.2	5.9-9.7	85-99	34.6	36.2
Ephedrine	20	20-1000	$1/x^2$	0.996	60	430	860	6.5-9.6	6.4-10.5	100-103	166.3	165.0
Ethylone	5	5-200	1	0.997	15	86	172	8.5-11.9	9.2-11.3	86-89	106.4	118.1
Fenproporex	20	20-1000	$1/x$	0.997	60	430	860	7.3-9.2	7.1-11.1	101-109	94.2	92.9
Fentanyl	5	5-500	$1/y^{1/2}$	0.996	15	215	430	9.3-13.5	10.7-13.8	92-113	90.1	110.8
Flunitrazepam	20	20-1000	1	0.996	60	430	860	7.3-15.0	8.3-15.8	100-107	87.1	94.1
Fluoxetine	20	20-1000	$1/y$	0.999	60	430	860	8.4-11.2	11.0-13.2	92-99	84.1	84.5
Haloperidol	5	5-1000	$1/x^2$	0.999	15	430	860	9.7-13.2	10.9-14.2	99-106	77.2	95.7
Hydroxycocaine	20	20-1000	$1/x^2$	0.991	60	430	860	6.4-8.8	8.8-10.2	92-106	86.9	85.3
Imipramine	20	20-1000	$1/x^2$	0.998	60	430	860	6.4-13.7	7.0-16.6	89-108	79.9	79.6
Ketamine	10	10-1000	$1/y^{1/2}$	0.997	30	430	860	6.5-11.5	7.1-12.0	96-114	90.9	103.7
Levamisole	20	20-1000	1	0.995	60	430	860	6.9-11.2	7.8-12.0	103-113	150.4	167.6
Levomepromazine	20	20-1000	$1/x^2$	0.997	60	430	860	8.4-9.7	9.0-12.7	86-96	66.1	65.2
Lidocaine	10	10-1000	$1/y^{1/2}$	0.993	30	430	860	6.7-8.2	7.7-8.9	86-111	88.9	101.4
LSD	10	10-1000	$1/x^2$	0.997	30	430	860	10.0-13.2	10.7-15.9	94-108	81.9	88.7
MDA	20	20-1000	$1/x$	0.997	60	430	860	9.2-10.8	8.9-13.1	102-110	102.7	102.1
MDEA	10	10-1000	1	0.995	30	430	860	6.4-8.7	6.7-9.9	94-103	86.3	90.4
MDMA	5	5-1000	1	0.997	15	430	860	8.8-10.2	9.0-10.3	93-112	86.0	96.0
Mephedrone	5	20-1000	1	0.996	15	430	860	9.3-13.5	11.2-15.3	100-107	89.9	99.9
Methamphetamine	20	20-1000	$1/x^2$	0.997	60	430	860	6.9-10.8	7.3-11.5	102-104	90.8	90.3
Midazolam	20	20-1000	1	0.997	60	430	860	7.3-15.5	9.2-15.2	109-111	86.2	92.3
Morphine	20	20-1000	$1/x^{1/2}$	0.991	60	430	860	5.9-13.5	7.4-17.0	101-119	48.7	67.2
Naphazoline	20	20-1000	1	0.996	60	430	860	8.5-10.6	7.9-10.4	111-116	90.9	90.4

Analyte	LLOQ (ng/mL)	LR (ng/mL)	Weighting factor	r^2	QC (ng/mL)			Within-run precision (CV%)	Between-run precision (CV%)	Accuracy (%)	ME (%)	NME (%)
					Low	Medium	High					
N-ethylpentylone	5	5-200	1	0.994	15	86	172	8.8-12.2	9.1-14.6	99-112	99.1	110.6
Nortriptyline	20	20-1000	1/x	0.999	60	430	860	9.2-12.6	9.2-13.6	89-103	79.4	79.3
Pentylone	5	5-200	1	0.992	15	86	172	6.3-14.7	6.1-14.7	83-93	102.7	114.2
Phencyclidine	20	20-1000	1/x ²	0.998	60	430	860	7.2-10.1	7.0-9.3	93-115	84.2	101.4
Promethazine	10	10-1000	1	0.996	30	430	860	6.9-13.5	7.9-13.3	101-112	79.4	73.0
Quetiapine	10	10-1000	1/x ²	0.996	30	430	860	11.1-13.9	12.3-15.0	94-100	82.9	94.6
Sertraline	20	20-1000	1	0.995	60	430	860	14.0-16.0	13.7-15.6	88-117	87.3	104.0
Sibutramine	20	20-1000	1/x ^{1/2}	0.990	60	430	860	6.1-7.2	6.0-9.0	88-112	65.7	65.7
Temazepam	20	20-1000	1	0.995	60	430	860	9.0-12.3	8.7-14.6	105-113	94.1	101.2
Venlafaxine	20	20-1000	1	0.999	60	430	860	6.2-8.9	6.4-11.6	97-103	92.2	114.6
Zolpidem	10	10-1000	1/y ^{1/2}	0.996	30	430	860	7.9-11.5	8.4-12.5	99-107	98.6	123.3

Abbreviations: CV, coefficient of variation; LLOQ, lower limit of quantification; LR, linearity range; ME, matrix effect; NME, normalized matrix effect; QC, quality control; r^2 , coefficient of determination.

Table 3. Positivity frequencies of the analytes with at least one positive result in the samples and their respective concentration ranges.

Substance	n	%	Range (ng/mL)
Acetaminophen	151	32.1	39.3 - >5000
Diazepam	118	25.1	30.5 - 3837.4
Lidocaine	89	18.9	10.7 - 1269.1
Midazolam	52	11.1	26.0 - >5000
Benzoylcegonine	46	9.8	6.3 - 2042.3
Clonazepam	46	9.8	23.0 - 257.3
Carbamazepine	39	8.3	28.3 - >5000
Fluoxetine	34	7.2	20.4 - 1102.6
Amitriptyline	25	5.3	35.7 - 709.9
Ketamine	23	4.9	10.9 - >5000
Temazepam	23	4.9	20.2 - 106.0
Chlorpromazine	21	4.5	20.5 - 224.0
Nortriptyline	21	4.5	21.9 - 315.4
Promethazine	19	4.0	10.0 - 52.4
EME	16	3.4	33.7 - 270.5
Haloperidol	11	2.3	5.1 - 13.7
Cocaine	9	1.9	8.7 - 59.2
Desvenlafaxine	9	1.9	35.8 - 651.4
Escitalopram	9	1.9	21.7 - 171.6
Sertraline	9	1.9	88.8 - 3879.7
Ephedrine	7	1.5	20.0 - 556.7
Diphenhydramine	5	1.1	59.4 - 321.5
Flunitrazepam	5	1.1	28.5 - 92.0
Fentanyl	4	0.9	7.0 - 12.4
Levamisol	4	0.9	21.1 - 64.9
Quetiapine	4	0.9	41.6 - 1027.0
Alprazolam	3	0.6	27.5 - 125.6
Cocaethylene	3	0.6	5.6 - 8.4
MDA	3	0.6	80.4 - 1307.9
Zolpidem	3	0.6	24.3 - 2547.5
Bupropion	2	0.4	35.6 - 367.0
AEME	1	0.2	770.5
Desipramine	1	0.2	244.8
Imipramine	1	0.2	37.9
MDMA	1	0.2	197.3
Naphazoline	1	0.2	22.4
Sibutramine	1	0.2	28.2
Venlafaxine	1	0.2	57.4

Table 4. Characterization of intoxication cases in which toxicological analysis was performed.

Variable	n	%	Variable	n	%
Total	470	100.0	Exposure site		
Gender			External ambient	13	2.8
Female	224	47.7	Home	289	61.5
Male	235	50.0	Public space	3	0.6
Unknown	11	2.3	School	3	0.6
Age group			Unknown	162	34.5
<1 year old	17	3.6	Elapsed time from exposure		
1-4 years old	77	16.4	<1 h	58	12.3
5-9 years old	57	12.1	2-3 h	56	11.9
10-14 years old	53	11.3	4-5 h	33	7.0
15-19 years old	62	13.2	6-12 h	59	12.6
20-29 years old	90	19.1	13-18 h	18	3.8
30-39 years old	38	8.1	19-24 h	31	6.6
40-49 years old	25	5.3	>24 h	24	5.1
50-59 years old	16	3.4	Chronic	16	3.4
60-69 years old	11	2.3	Unknown	175	37.2
70-79 years old	3	0.6	Evolution		
>80 years old	1	0.2	Cure	327	69.6
Unknown	20	4.3	Cure with sequel	3	0.6
Circumstance			Death	7	1.5
Abuse	41	8.7	Unknown	133	28.3
Administration error	4	0.9	Poisoning assessment		
Coletive accident	1	0.2	Mild	142	30.2
Individual accident	72	15.3	Moderate	116	24.7
Misuse	1	0.2	Severe	40	8.5
Suicide attempt	139	29.6	Fatal	7	1.5
Terapheutic use	2	0.4	Differential diagnosis	66	14.0
Violente, mistreatment or homicide attemp	15	3.2	Not toxic	33	7.0
Unknown	195	41.5	Poisoning not excluded	52	11.1
			Unknown	14	3.0

Figures Captions

Fig. 1. Surface plot of simplex-centroid design for optimization of precipitation solvent.

Fig. 2. Chromatogram obtained by LC-MS/MS from a plasma sample spiked with the substances in medium quality control concentration, which have been submitted to the developed method.

Fig. 3. Specific chromatograms, in the LLOQ, of the substances with the highest positivity in the 470 real samples analyzed.

Figure 1

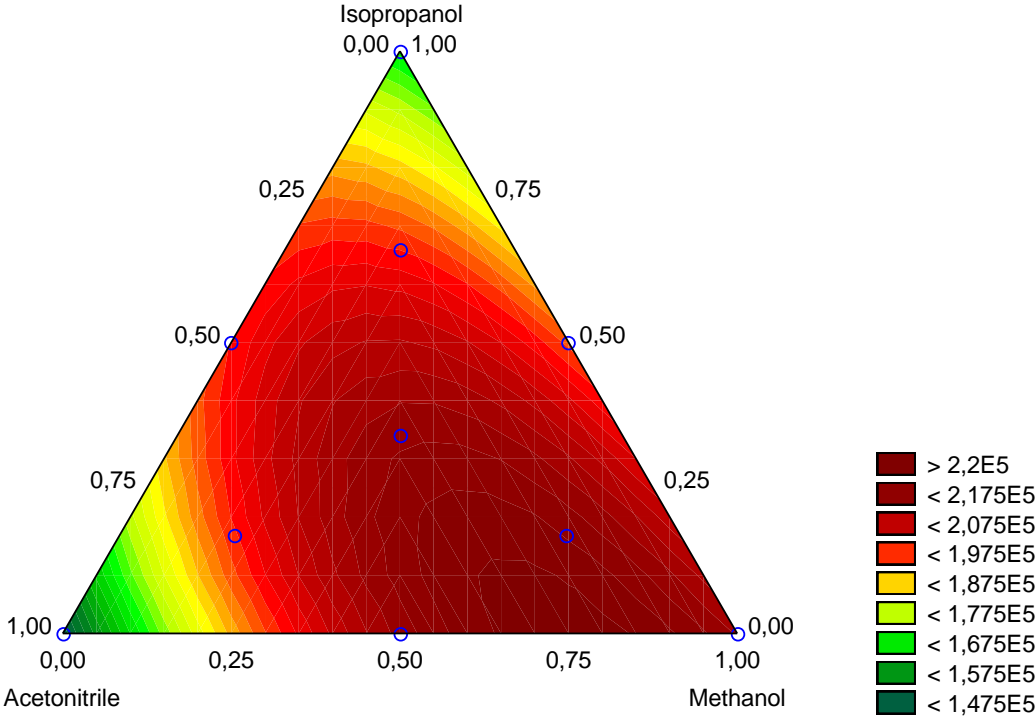


Figure 2

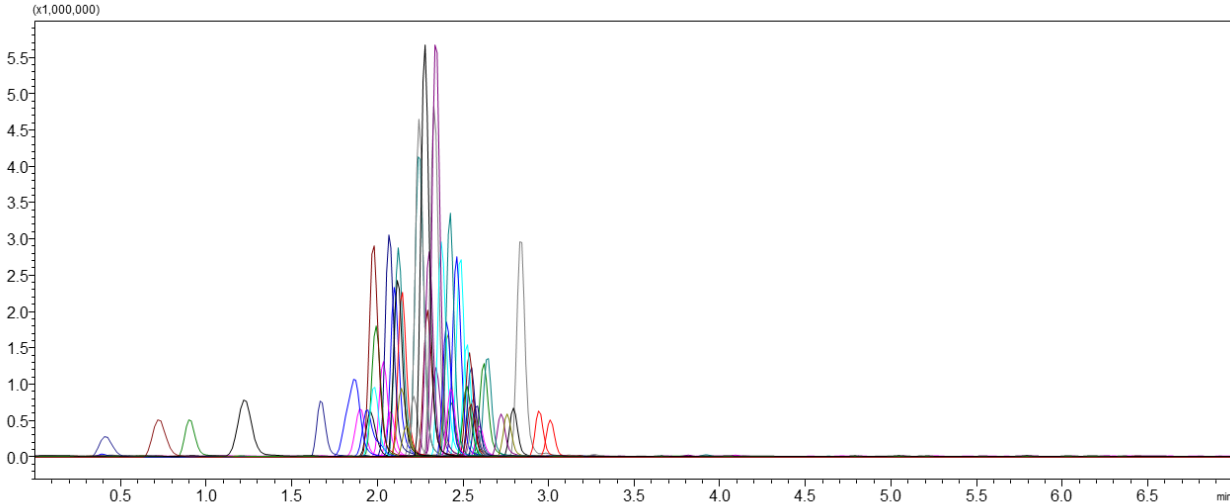
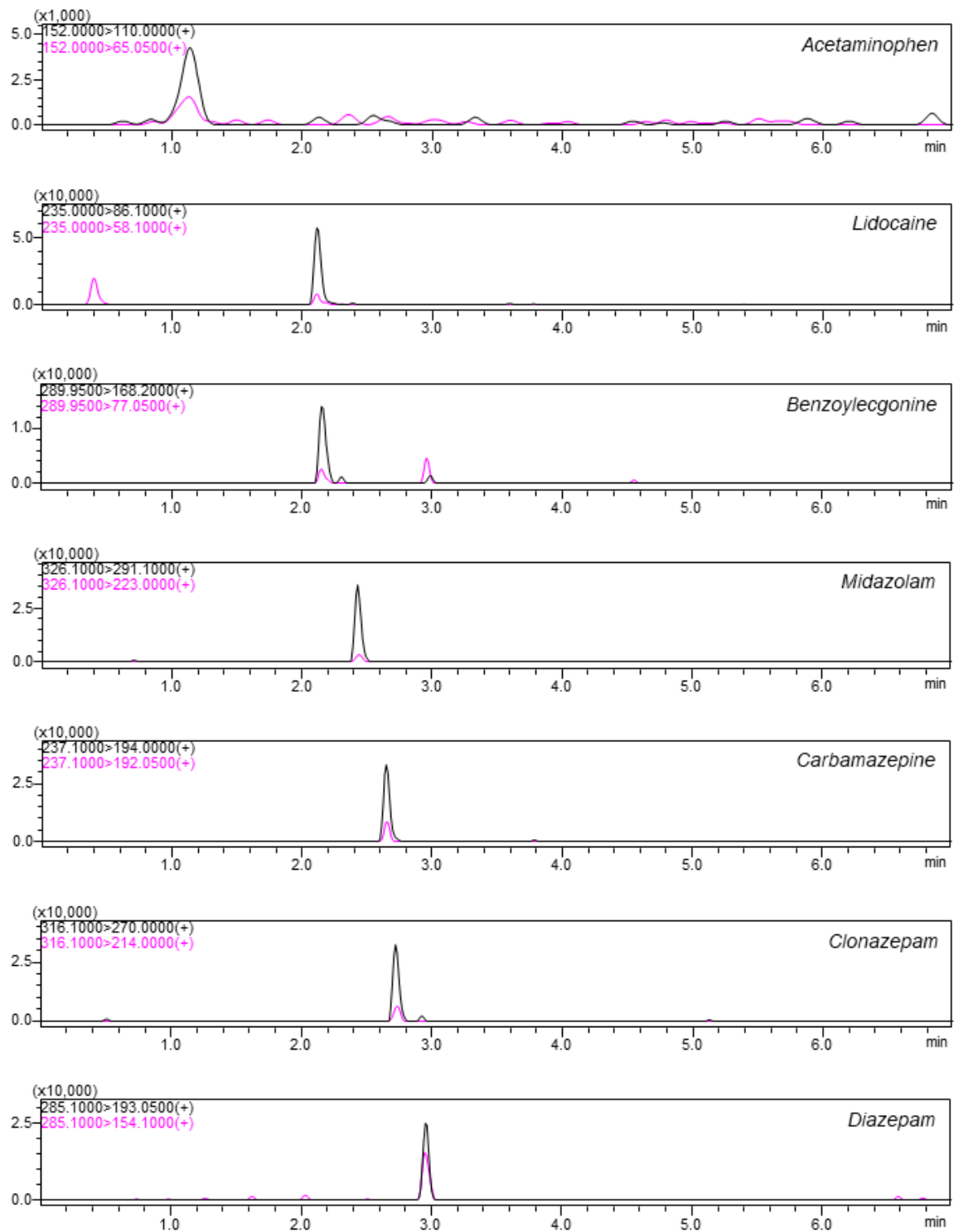


Figure 3



6. CONCLUSÕES

Neste estudo, um método multi-analito rápido, simples e eficiente foi desenvolvido e validado com sucesso para a quantificação simultânea de 57 fármacos e drogas de abuso em amostras de plasma de pacientes intoxicados. O método foi otimizado e validado conforme guia de validação internacional, mostrando-se robusto para tal finalidade. Os resultados encontrados foram satisfatórios, estando dentro dos limites preconizado pelo guia de validação e recomendações internacionais. Os limites de quantificação mostraram-se adequados, tendo em vista à prática clínica. A precipitação de proteínas mostrou-se como uma excelente técnica preparativa, sendo barata e de fácil manuseio, além de demandar pequenas quantidades de amostra e solvente. A rapidez do preparo aliado a corrida cromatográfica relativamente rápida (7 minutos) mostrou-se como pontos positivos tendo em vista a aplicação no cenário de emergência toxicológica.

O método foi aplicado com sucesso em 470 amostras de plasma, oriundas de casos de intoxicação de atendidos pelo Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul. Um alto índice de positividade (80%) foi verificado nas amostras, sendo um demonstrativo da aplicabilidade e importância do desenvolvimento de método multi-analitos no contexto da toxicologia clínica. Do total de amostras analisadas, aproximadamente 40% foi positiva para ao menos um benzodiazepínico, 15% para ao menos antidepressivo e 10% para cocaína e produtos relacionados. Acetaminofeno e diazepam foram as substâncias com maior prevalência, estando presente, respectivamente em 32,1% e 25,1% das amostras de plasma. Quanto aos dados sociodemográficos, não foram observadas diferenças entre sexo e os grupos etários de 20-29 anos e 1-4 anos foram os mais prevalentes. Além disso, as tentativas de suicídio foi a circunstância de exposição mais relatada e a residência representou quase que a totalidade dos casos com local de exposição conhecido. Ademais, os dados analíticos são importantes para o correto diagnóstico das intoxicações e subsequente manejo e tratamento do paciente. Além disso, tais informações servem como evidências de alta qualidade, auxiliando em ações direcionadas à toxicovigilância e promoção da saúde.

ANEXO I – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: TIAGO FRANCO DE OLIVEIRA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 31992920.3.0000.5345

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.328.757

Apresentação do Projeto:

Resumo:

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

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

Continuação do Parecer: 4.328.757

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

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

Objetivo Secundário:

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

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O risco à sua saúde dos participantes voluntários da pesquisa será mínimo, uma vez que a coleta de 3 mL de sangue periférico e 10 mL de urina já foi realizada durante o atendimento do caso pelo CIT/RS, na unidade de saúde onde o paciente fora atendido para envio ao laboratório do CIT/RS. A coleta de sangue pode ter alguns efeitos indesejados, como hematomas e dor no local da picada, assim como a coleta de urina pode gerar constrangimento ao paciente. No entanto, pelo projeto usar amostras de descarte, não será solicitada/realizada nenhuma coleta com pacientes. Além disso, um possível risco será a quebra accidental o sigilo, por meio da utilização dos dados de atendimentos. Para evitar isso, serão tomadas medidas para que essa quebra não venha a ocorrer de forma alguma, tais como identificação das amostras e casos com código numérico próprio, diferente do já existente na rotina do CIT/RS. Nenhum dos pesquisadores terá acesso ao nome dos pacientes ou quaisquer outra informação não citada no projeto. Todas informações serão guardadas em arquivos do tipo Excel ou Word com login e senha, tendo acesso a estes arquivos somente os pesquisadores integrantes deste projeto de pesquisa. Além disso, uma lista mestra com os códigos numéricos das amostras e relação com a numeração própria do CIT/RS será feita e mantida exclusivamente em guarda com a responsável e chefe de divisão do CIT/RS, MSc. Viviane Cristina Sebben.

Benefícios:

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

Continuação do Parecer: 4.328.757

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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

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

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

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

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 4.328.757

esse valor.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica.

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o parecer do Relator.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

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

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 4.328.757

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 08 de Outubro de 2020

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

Endereço: Rua Sarmiento Leite ,245
Bairro: Sarmiento **CEP:** 90.050-170
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3303-8804 **E-mail:** cep@ufcspa.edu.br

ANEXO II – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DO PERIÓDICO



JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.2
• Impact Factor	p.2
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.4



ISSN: 0731-7085

DESCRIPTION

This journal is an international medium directed towards the needs of academic, clinical, government and industrial analysis by publishing original research reports and critical reviews on **pharmaceutical** and **biomedical analysis**. It covers the interdisciplinary aspects of analysis in the pharmaceutical, biomedical and **clinical sciences**, including developments in analytical methodology, instrumentation, computation and interpretation. Submissions on novel applications focusing on drug purity and stability studies, pharmacokinetics, therapeutic monitoring, metabolic profiling; drug-related aspects of analytical biochemistry and forensic toxicology; quality assurance in the pharmaceutical industry are also welcome.

Studies from areas of well established and poorly selective methods, such as UV-VIS spectrophotometry (including derivative and multi-wavelength measurements), basic electroanalytical (potentiometric, polarographic and voltammetric) methods, fluorimetry, flow-injection analysis, etc. are accepted for publication in exceptional cases only, if a unique and substantial advantage over presently known systems is demonstrated. The same applies to the assay of simple drug formulations by any kind of methods and the determination of drugs in biological samples based merely on spiked samples. Drug purity/stability studies should contain information on the structure elucidation of the impurities/degradants.

Papers dealing with the analytical aspects of traditional folk medicines are acceptable if the results are expected to attract the interest of readers also outside the area of origin, i.e. they have a focus on innovative analytical approaches. Regional differences in the phytochemical content of traditional folk medicine will not be considered. Manuscripts reporting on the analysis of novel phytochemicals will only be considered if their biological activity has been previously published in an international medium. Pharmacokinetic studies of traditional folk medicine will only be considered if only the identified components have been demonstrated to be solely responsible for the pharmacological activity.

Bioanalytical papers (pharmacokinetic, bioequivalence, protein and DNA binding studies) are accepted if the focus is on innovative analytical methodology. Manuscripts describing the pharmacokinetic profile of a single compound will not be considered for review. Pharmacokinetic studies will only be considered if they offer new profiles of a drug(s) and its metabolite(s) or new understandings of the mechanisms in drug disposition or response of existing drugs. Analytical studies on new investigational drugs that are currently in the preclinical phase are only acceptable if their pharmacological activity is well documented in an international medium.

Human subjects research must provide ethical approval and should include the name of the approving committee and the name of the institution and reference number where approval was granted. Animal studies must be approved from their Institutions Animal Care and Use Committee or any equivalent ethics committee accompanied by the reference number. For blood sampling procedures in rodents, retro-orbital bleeding will only be considered if a minimum of 7 days is allowed between repeat sampling. Furthermore, in the evaluation of the manuscript the editors reserve the right to determine whether the animal experimental technique is appropriate.

In determining the suitability of submitted articles for publication, particular scrutiny will be placed on the degree of novelty and significance of the research and the extent to which it adds to existing knowledge in pharmaceutical and biomedical analysis. In all submissions to the journal, authors must address the question of how their proposed methodology compares with previously reported methods. A substantial body of work cannot be fractionated into different shorter papers.

AUDIENCE

Analytical scientists, management in the pharmaceutical industry, clinical chemistry laboratories, academic institutions, government agencies, biochemists, microbiology specialists, pharmaceutical formulation scientists

IMPACT FACTOR

2021: 3.571 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2022

ABSTRACTING AND INDEXING

Analytical Abstracts
Research Alert
Current Contents - Life Sciences
Current Contents - Social & Behavioral Sciences
Current Contents
Elsevier BIOBASE
Cambridge Scientific Abstracts
Chemical Abstracts
Embase
BIOSIS Citation Index
PubMed/Medline
Current Contents
Scopus

EDITORIAL BOARD

Editors

Bezhan G. Chankvetadze, Ivane Javakhishvili Tbilisi State University, T'bilisi, Georgia
Chirality, Enantioseparations, High-performance liquid chromatography, Capillary Electrophoresis, Capillary Electrochromatography, Pharmaceutical and biomedical analysis
Sandra Furlanetto, University of Florence, Florence, Italy
Markus Ganzer, University of Innsbruck, Innsbruck, Austria
Jun Haginaka, Mukogawa Women's University, Nishinomiya, Japan
Zhengjin Jiang, Jinan University College of Pharmacy, Guangzhou, China
Shaoping Li, University of Macau, Taipa, Macao
Herbal glycol-analysis; standard development of Chinese medicines; development of quality control methods; culture, fermentation, active ingredients and quality control of medicinal mushroom
Michał Markuszewski, Medical University of Gdansk, Gdansk, Poland
Ruin Moaddel, National Institute on Aging, Bethesda, Maryland, United States of America
Sibel A. Ozkan, Ankara University Faculty of Pharmacy, Ankara, Turkey
Electroanalysis, Biosensors, Biomarkers, Nanosensors, MIP sensors, chiral sensors

Editorial Advisory Board

Steven Baertschi, Eli Lilly and Company, Indianapolis, Indiana, United States of America
Coral Barbas, University San Pablo CEU Center for Metabolomics and Bioanalysis, Boadilla del Monte, Spain
Carlo Bertucci, IRCCS Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna, Bologna, Italy
Francesco Busardò, Polytechnic University of Marche, Ancona, Italy
Lukasz Ciesla, The University of Alabama, Tuscaloosa, Alabama, United States of America
Salvatore Fanali, University of Verona, Verona, Italy
Szabolcs Fekete, University of Geneva School of Pharmaceutical Sciences, Geneva, Switzerland
Antonia Garcia, San Pablo CEU University, Boadilla, Spain
Sándor Görög, Gedeon Richter Plc, Budapest, Hungary
Roberto Gotti, University of Bologna, Bologna, Italy
Kenji Hamase, National University Corporation Kyushu University, Fukuoka, Japan
Taijun Hang, China Pharmaceutical University, Nanjing, China
Brian L. He, Bristol-Myers Squibb Co Research & Development New Brunswick, New Brunswick, New Jersey, United States of America
Tatsuya Higashi, Tokyo University of Science - Noda Campus, Noda, Japan
Ulrike Holzgrabe, University of Würzburg, Würzburg, Germany
Philippe Hubert, University of Liege, Liege, Belgium
Krzysztof Jozwiak, Medical University of Lublin, Lublin, Poland
Wongoo Kang, Chung-Ang University, Seoul, South Korea
Michael Lämmerhofer, Eberhard Karls University Tübingen Institute of Pharmaceutical Sciences, Tübingen, Germany
Laura Mercolini, University of Bologna, Bologna, Italy
Ramesh Mullangi, LAXAI Life Sciences Pvt Ltd, Hyderabad, India
Emirhan Nemutlu, Hacettepe University, Ankara, Turkey
Reinhard H.H. Neubert, Martin Luther University Halle Wittenberg, Halle, Germany
Regina Oliveira, Federal University of Sao Carlos, Sao Carlos, Brazil
Bernard Olsen, Eli Lilly and Company, Indianapolis, Indiana, United States of America
Serena Orlandini, University of Florence, Florence, Italy
Federica Pellati, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy
Simona Pichini, National Institute of Health, Roma, Italy
Serge Rudaz, University of Geneva School of Pharmaceutical Sciences, Geneva, Switzerland
Antonio Salgado, University of Alcalá, Alcalá De Henares, Madrid, Spain
Gerhard Scriba, Friedrich Schiller University Jena, Jena, Germany
Kazutake Shimada, Kanazawa University, Kanazawa, Japan
Nagendra Singh, Catalent Pharma Solutions, Cell and Gene Therapy, Baltimore, Maryland, United States of America
Saranjit Singh, National Inst. of Pharma. Education & Research, Dept. of Pharmaceutical Analysis, Punjab, India
Eva Szökö, Semmelweis University, Budapest, Hungary
Makoto TSUNODA, The University of Tokyo, Tokyo, Japan
Tung-Hu Tsai, National Yang Ming University, , Taiwan
Ann Van Schepdael, KU Leuven Association, Leuven, Belgium
Bastiaan Venhuis, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, Netherlands
Jean-Luc Veuthey, University of Geneva, Geneva, Switzerland
Xin Wang, East China Normal University Institute of Biomedical Sciences, Shanghai, China
Caroline West, University of Orléans, Orleans, France
Ian Wilson, Imperial College London, London, United Kingdom
Min Ye, Peking University, Beijing, China

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

This journal is an international medium directed towards the needs of academic, clinical, government and industrial analysis by publishing original research reports and critical reviews on pharmaceutical and biomedical analysis. It covers the interdisciplinary aspects of analysis in the pharmaceutical, biomedical and clinical sciences, including developments in analytical methodology, instrumentation, computation and interpretation. Submissions on novel applications focusing on drug purity and stability studies, pharmacokinetics, therapeutic monitoring, metabolic profiling; drug-related aspects of analytical biochemistry and forensic toxicology; quality assurance in the pharmaceutical industry are also welcome.

Studies from areas of well established and poorly selective methods, such as UV-VIS spectrophotometry (including derivative and multi-wavelength measurements), basic electroanalytical (potentiometric, polarographic and voltammetric) methods, fluorimetry, flow-injection analysis, etc. are accepted for publication in exceptional cases only, if a unique and substantial advantage over presently known systems is demonstrated. The same applies to the assay of simple drug formulations by any kind of methods and the determination of drugs in biological samples based merely on spiked samples. Drug purity/stability studies should contain information on the structure elucidation of the impurities/degradants.

Papers dealing with the analytical aspects of traditional folk medicines are acceptable if the results are expected to attract the interest of readers also outside the area of origin, i.e. they have a focus on innovative analytical approaches. Regional differences in the phytochemical content of traditional folk medicine will not be considered. Manuscripts reporting on the analysis of novel phytochemicals will only be considered if their biological activity has been previously published in an international medium. Pharmacokinetic studies of traditional folk medicine will only be considered if only the identified components have been demonstrated to be solely responsible for the pharmacological activity.

Bioanalytical papers (pharmacokinetic, bioequivalence, protein and DNA binding studies) are accepted if the focus is on innovative analytical methodology. Manuscripts describing the pharmacokinetic profile of a single compound will not be considered for review. Pharmacokinetic studies will only be considered if they offer new profiles of a drug(s) and its metabolite(s) or new understandings of the mechanisms in drug disposition or response of existing drugs. Analytical studies on new investigational drugs that are currently in the preclinical phase are only acceptable if their pharmacological activity is well documented in an international medium.

Human subjects research must provide ethical approval and should include the name of the approving committee and the name of the institution and reference number where approval was granted. Animal studies must be approved from their Institutions Animal Care and Use Committee or any equivalent ethics committee accompanied by the reference number. For blood sampling procedures in rodents, retro-orbital bleeding will only be considered if a minimum of 7 days is allowed between repeat sampling. Furthermore, in the evaluation of the manuscript the editors reserve the right to determine whether the animal experimental technique is appropriate.

In determining the suitability of submitted articles for publication, particular scrutiny will be placed on the degree of novelty and significance of the research and the extent to which it adds to existing knowledge in pharmaceutical and biomedical analysis. In all submissions to the journal, authors must address the question of how their proposed methodology compares with previously reported methods.

Types of Paper

The following types of papers will be considered for publication:

Reviews: Authors wishing to submit a review should send a short synopsis to one of the editors before starting detailed work on a manuscript. The structure and presentation of a review article will normally be at the author's discretion. Reviews may be relatively short, i.e. dealing with a limited subject, or longer and more general in nature, however, reviews of the analysis of single drugs will not be considered.

Full Length Research Papers: These papers should describe in detail original and important pieces of work in the fields covered by the Journal.

Short Communications: These should describe complete and original pieces of research whose length and/or importance do not justify a full-length paper. The format is the same as that for a full-length Research Paper, except that the total number of figures and/or tables should not normally exceed six. This approximate length of the manuscript should be 10 pages excluding Tables and Figures, Keywords are essential. The Editors reserve the right to publish as a Short Communication a paper originally submitted as a full-length Research Paper.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information on [Ethics in publishing](#).

Declaration of competing interest

Corresponding authors, on behalf of all the authors of a submission, must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. All authors, including those *without* competing interests to declare, should provide the relevant information to the corresponding author (which, where relevant, may specify they have nothing to declare). Corresponding authors should then use [this tool](#) to create a shared statement and upload to the submission system at the Attach Files step. **Please do not convert the .docx template to another file type. Author signatures are not required.**

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that

its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Preprint posting on SSRN

In support of [Open Science](#), this journal offers its authors a free preprint posting service. Preprints provide early registration and dissemination of your research, which facilitates early citations and collaboration.

During submission to Editorial Manager, you can choose to release your manuscript publicly as a preprint on the preprint server [SSRN](#) once it enters peer-review with the journal. Your choice will have no effect on the editorial process or outcome with the journal. Please note that the corresponding author is expected to seek approval from all co-authors before agreeing to release the manuscript publicly on SSRN.

You will be notified via email when your preprint is posted online and a Digital Object Identifier (DOI) is assigned. Your preprint will remain globally available free to read whether the journal accepts or rejects your manuscript.

For more information about posting to [SSRN](#), please consult the [SSRN Terms of Use](#) and [FAQs](#).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. When coding terminology is used, we recommend to avoid offensive or exclusionary terms such as "master", "slave", "blacklist" and "whitelist". We suggest using alternatives that are more appropriate and (self-) explanatory such as "primary", "secondary", "blocklist" and "allowlist". These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. [More details and an example](#).

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information](#).

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement, it is recommended to state this.

Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Please submit your article via <https://www.elsevier.com/locate/jpba>

Suggesting reviewers

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential reviewers.

You should not suggest reviewers who are colleagues, or who have co-authored or collaborated with you during the last three years. Editors do not invite reviewers who have potential competing interests with the authors. Further, in order to provide a broad and balanced assessment of the work, and ensure scientific rigor, please suggest diverse candidate reviewers who are located in different countries/regions from the author group. Also consider other diversity attributes e.g. gender, race and ethnicity, career stage, etc. Finally, you should not include existing members of the journal's editorial team, of whom the journal are already aware.

Note: the editor decides whether or not to invite your suggested reviewers.

All manuscripts will be assessed by two independent Reviewers. Reviews will be assessed by one Reviewer. Authors will be informed of the Reviewers' comments.

Authors are required to ensure that each line of their manuscript is numbered consecutively.

PREPARATION

Queries

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our [Support Center](#).

Peer review

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review](#).

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

When describing mixed solvents for chromatography, extraction or other purposes, the following convention must be adopted: solvent A-solvent B-solvent C (a:b:c, v/v/v) or (a:b:c, w/w/w) where a:b:c are the proportions (by volume or weight as appropriate) of the components A, B and C, respectively.

The method of preparation of buffers should be clearly expressed, with the pH value and molarity stated in parentheses, e.g. sodium acetate (pH 4.7; 0.1 M). For mixed solvent systems, it should be clearly stated whether the pH value quoted is the pH of the original aqueous component or the apparent pH (i.e. pH*) of the mixed solvent system. Typical examples of mobile phases employed in liquid chromatography might be: acetonitrile-sodium octylsulphate (10 mM)-sodium acetate (pH 4.7; 0.1 M) (25:25:50, v/v/v), and acetonitrile-sodium octylsulphate (10 mM)-sodium acetate (0.1 M) (25:25:50, v/v/v) (pH* 4.7). Discussion of the optimisation procedure for the proposed method / assay should be given in detail.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field on their first appearance in the text. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there. Do not include a separate Abbreviation list. Ensure consistency of abbreviations throughout the article. [List of Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis abbreviations](#).

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

The Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis as a guideline allows up to 35 references for Full length articles and 25 references for Short Communications. There is no limit for Review articles

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Preprint references

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, the formal publication should be used as the reference. If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but are not yet formally published, these may be referenced. Preprints should be clearly marked as such, for example by including the word preprint, or the name of the preprint server, as part of the reference. The preprint DOI should also be provided.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use

reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software.](#)

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference formatting

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result' List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51-59.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon.* 19, e00205.

Reference to a book:

[3] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age, E-Publishing Inc.*, New York, 2009, pp. 281-304.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/, 2003> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[6] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, *Mendeley Data*, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the <https://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-Itwa/>

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal requires and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. When sharing data in one of these ways, you are expected to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data page](#).

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into a data article published in *Data in Brief*. A data article is a new kind of article that ensures that your data are actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and made publicly available to all upon publication (watch this [video](#) describing the benefits of publishing your data in *Data in Brief*). You are encouraged to submit your data article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed, published open access and linked to your research article on ScienceDirect. Please note an [open access fee](#) is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your *Data in Brief* data article.

MethodsX

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple *MethodsX* articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. *MethodsX*, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their *MethodsX* article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to *MethodsX* where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in *MethodsX*. Full details can be found on the [MethodsX website](#). Please use the [methods template](#) or [protocol template](#) to prepare your *MethodsX* article.

Data statement

To foster transparency, we require you to state the availability of your data in your submission if your data is unavailable to access or unsuitable to post. This may also be a requirement of your funding body or institution. You will have the opportunity to provide a data statement during the submission process. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

For more recommendations to authors of JPBA, [please click here](#).

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>