Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Farmácia

(Fisiopatologia e Toxicologia)

Estudo de estabilidade de anfetaminas e produtos de biotransformação de cocaína e tetraidrocanabinol em amostras de urina seca em papel (*dried urine spots*)

Felipe de Almeida Mendes

Orientador: Prof. Dr. Maurício Yonamine

São Paulo

2021

Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Fisiopatologia e Toxicologia

Estudo de estabilidade de anfetaminas e produtos de biotransformação de cocaína e tetraidrocanabinol em amostras de urina seca em papel (dried urine spots)

Felipe de Almeida Mendes

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Maurício Yonamine

São Paulo

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:

Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

```
Mendes, Felipe de Almeida

Estudo de estabilidade de anfetaminas e produtos de biotransformação de cocaína e tetraidrocanabinol em amostras de urina seca em papel (dried urine spots) / Felipe de Almeida Mendes. - São Paulo, 2021.

92 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.

Orientador: Yonamine, Maurício

1. Desenvolvimento de método analítico. 2.
Estabilidade de drogas de abuso. 3. Dried urine spots. 4. Toxicologia analítica. 5. Cromatografia líquida. I. T. II. Yonamine, Maurício, orientador.
```

MENDES, F. A. Estudo de estabilidade de anfetaminas e produtos de biotransformação de cocaína e tetraidrocanabinol em amostras de urina seca em papel (dried urine spots). 2021. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Toxicologia) — Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Aprovado em:	
Ва	nca Examinadora
Prof. Dr.:	
Instituição:	
Julgamento:	
Profa. Dra.	
Instituição:	
Julgamento:	
Prof. Dr.:	
Instituição:	
Julgamento:	

Dedicatória

"Todos aqueles que aqui chegaram".

Apoio Financeiro

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): Processo 2018/24770-3

Agradecimentos

Agradeço a todos que estiveram comigo nesta trajetória.

Aos meus amigos que se tornaram família, e familiares que estiveram atentos aos meus passos, dispostos a contribuir com o que podiam. Todos em especial, fazendo morada construção de ser e, consequentemente, no meu modo de ser.

Em ressalto, Dora, que me ensinou que os objetivos mudam, sentimento mudam e pessoas sempre podem se transformar. A Beatriz e Bruno, família que me proporcionou força e vontade para almejar muito mais.

Ao Professor Maurício Yonamine, por enxergar potencial em mim, por toda paciência e orientação e aprendizado.

Aos caros Jeferson, Ana Luiza, Gabriela Oliveira, Kátia, Beatriz, Idylla, Gabriela Meirelles, Fabiana, André, Karina e Marcelo, amizades que fiz e contribuíram muito no meu aprendizado. Pessoas sem o qual, o caminhar deste trabalho teria sido mais tortuoso.

Cada pessoa que contribuiu com este trabalho, de qualquer forma e em qualquer tempo, meus mais sinceros agradecimentos.

Resumo

MENDES, F. A. Estudo de estabilidade de anfetaminas e produtos de biotransformação de cocaína e tetraidrocanabinol em amostras de urina seca em papel (dried urine spots). 2021. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Toxicologia) — Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

O número de pessoas utilizando substâncias ilícitas de forma recreativa aumenta a cada ano, chamando a atenção de estudiosos de diversas áreas do conhecimento. Com isso, a demanda de exames toxicológicos exigida para trabalhadores, vítimas de crimes e esportistas também tem crescido. A amostra biológica mais utilizada para análises toxicológicas continua sendo a urina, visto que sua obtenção é menos invasiva, possibilita coletar grande volume de amostra e pode-se detectar substâncias até dias após ter ocorrido a exposição ou consumo. Entretanto, estas amostras necessitam de um grande volume físico para serem armazenadas e transportadas aos laboratórios, devendo ser mantidas em temperatura baixa e controlada para conservação. Outro ponto a se considerar é a quantidade de amostra insuficientemente coletada, ou extravasamento do conteúdo, contaminando outras amostras e muitas vezes, inviabilizando a análise. Uma alternativa recente para tais problemas é utilizar a técnica chamada de "dried urine spots" (DUS), onde poucos microlitros de urina são colocados em um papel absorvente e secos sob temperatura ambiente, preservando de agentes degradantes os componentes presentes na urina. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar a estabilidade das substâncias do presente estudo em alta temperatura, temperatura ambiente e em temperaturas de 4°C e -20°C. Para este fim, foi necessário desenvolver, validar e aplicar métodos de extração e determinação de anfetaminas e produtos de biotransformação de cocaína e tetraidrocanabinol carboxílico (THCCOOH) em amostras dried urine spot, utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Os picos foram identificados por UPLC-ESI-MS/MS, com tempo total de 5 mins utilizando fase A- água, formiato de amônio e 0,1% ácido fórmico, e B- metanol: acetonitrila (6:4) + 0,1% de ácido fórmico. A extração foi feita utilizando acetonitrila: metanol: acetona (1:1:1) +ácido fórmico 0,1%. Não foi possível iniciar a validação de THCCOOH, visto uma possível complexação do analito com o papel. Para as outras substâncias, o método cromatográfico desenvolvido se mostrou eficiente e seletivo, com LOD e LOQ de 10 ng/mL para todos os analitos, sendo linear até 1000 ng/mL, atendeu as especificações de precisão e exatidão e carryover. As amostras permaneceram estáveis ao longo de 32 dias nas temperaturas estudadas, demonstrando a segurança em se utilizar a técnica de DUS para armazenamento e transporte de amostras biológicas dentro da faixa de temperatura do estudo até 32 dias.

Palavras chave: Dried urine spots, anfetaminas, cocaína, UPLC-MS/MS, estabilidade.

Abstract

MENDES, F. A. **Stability study of amphetamines, biotransformation products of cocaine and tetrahydrocannabinol in dried urine spots)**. 2021. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Toxicologia) — Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

The number of people using illegal substances in a recreational way increases each year, drawing the attention of scholars from different areas of knowledge. As a result, the demand for workplace's drug tests, toxicological tests for victims of crimes and dopping has also grown. The biological sample most used for toxicological tests remains urine, since obtaining it is less invasive, it is possible to collect a large volume of sample and it is possible to detect substances up to days after exposure or consumption has occurred. However, these samples require a large physical volume to be stored and transported to the laboratories, and must be kept at a low temperature for conservation. Another point to consider is the amount of sample insufficiently collected, or leakage of the content, causing contamination of other samples and often making the analysis unfeasible. A recent alternative to such problems is to use "dried urine spots" (DUS), where few microliters of urine are placed on absorbent paper and dried at room temperature, preserving the components present in the urine from degrading agents. Thus, the objective of this work is to evaluate the stability of the substances in this study at high temperature, room temperature and at temperatures of 4°C and -20°C. For this purpose, it was necessary to develop, validate and apply methods of extraction and determination of amphetamines and biotransformation products of cocaine and carboxylic tetrahydrocannabinol (THCCOOH) in dried urine spot samples, using liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS). The peaks were identified liquid chromatography coupled to a mass spectrometer (UPLC-ESI-MS/MS), with a total time of 5 mins using phase A- water, ammonium formate and 0.1% formic acid, and B- methanol: acetonitrile (6:4) + 0.1% formic acid. Extraction was done using acetonitrile: methanol: acetone (1:1:1) + 0.1% formic acid. It was not possible to perform the validation of THCCOOH, given a possible complexation of the analyte with the paper. To the others substances, the chromatographic method developed proved to be efficient and selective, with LOD and LOQ of 10 ng/mL for all analytes, being linear up to 1000 ng/mL, meeting the specifications of precision and accuracy and carryover. The samples remained stable for 32 days at the temperatures studied, demonstrating the safety of using the DUS technique for storage and transport of biological samples until 32 days on temperature range studied.

Keywords: Dried urine spots, amphetamines, cocaine, UPLC-MS/MS, stability.

Lista de Figuras

Figura 1 - Principais produtos de biotransformação da cocaína22
Figura 2: Biotransformação da metanfetamina e femproporex em anfetamina e sua
semelhança estrutural com a molécula de fenetilamina (PEA)23
Figura 3: Biotransformação do MDMA em MDA24
Figura 4: Biotransformação do THC28
Figura 5 - Fluxograma de preparo de amostra em DUS39
Figura 6 - Gráfico de eventos principais, obtidos pelo Minitab, de canabinoides do estudo .47
Figura 7 - Gráfico de eventos principais, obtidos pelo Minitab, de cocaína (COC) e ecgonina
metil éster (EME)48
Figura 8 - Gráfico de eventos principais, obtidos pelo Minitab, de cocaetileno (CET) e anidro
ecgonina (AEME)48
Figura 9 - Gráfico de eventos principais, obtidos pelo Minitab, de benzoilecgonina (BZE) e
MDA49
Figura 10 - Gráfico de eventos principais, obtidos pelo Minitab, de metanfetamina (Meta) e
MDMA49
Figura 11 - Gráfico de eventos principais, obtidos pelo Minitab, de anfetamina e femproporex
(FEM)50
Figura 12 - Perfil cromatográfico completo50
Figura 13 - Cromatograma das substâncias utilizadas na seletividade53
Figura 14 - Gráfico 4 em 1 das condições de estabilidade da anfetamina62
Figura 15 - Gráfico 4 em 1 das condições de estabilidade de femproporex63

Figura 16 - Gráfico 4 em 1 das condições de estabilidade do MDMA	64
Figura 17 - Gráfico 4 em 1 das condições de estabilidade do MDA	65
Figura 18 - Gráfico 4 em 1 das condições de estabilidade da metanfetamina	66
Figura 19 - Gráfico 4 em 1 das condições de estabilidade da AEME	67
Figura 20 - Gráfico 4 em 1 das condições de estabilidade da benzoilecgonina	68
Figura 21 - Gráfico 4 em 1 das condições de estabilidade da cocaína	69
Figura 22 - Gráfico 4 em 1 das condições de estabilidade do cocaetileno	70

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Consumo de substâncias ilícitas por indivíduos de 15 a 65 anos no Brasil e	m 2017.
	19
Gráfico 2 - Publicações sobre DUS em LC-MS	32

Lista de Tabelas

abela 1: Parâmetros utilizados no método cromatográfico4
abela 2: Parâmetros inseridos para MRM40
abela 3: Parâmetros de ionização dos íons precursores4
abela 4 - Íons precursores, íons produto e tempo de retenção das substâncias de estudo. 4
abela 5 - Propriedades físico-químicas das substâncias de estudo4
abela 6 - Coeficientes de regressão estimados como ponto ótimo4
abela 7 - Substâncias exógenas utilizadas na seletividade do método5.
abela 8 - equações das curvas de calibração da linearidade, valor de ponderação e correlação a reta5
abela 9 - Concentração de amostras no LOQ do método quantificados5
abela 10 - Precisão e exatidão do método cromatográfico5
abela 11 - Valores de recuperação e efeito matriz obtidos com análise de dried urine spot

Lista de Abreviaturas

11-OH-THC 11-hidroxi-THC

ACN Acetonitrila

BZE Benzoilecgonina

CE Cocaetileno

COC Cocaína

DBS Dried blood spots

DLLME Microextração líquido-líquido dispersiva

DMS Dried matrix spots

DUS Dried urine spots

EME Ecgonina metil éster

ESI Ionização por eletrospray

EWDTS European Workplace Drug Testing Society

FDA Food and Drug Administration

FE Fase estacionária

FEM Femproporex

FM Fase móvel

GC Cromatografia gasosa

H2O Água ultra pura

HPLC Cromatografia líquida de alta eficiência

III LNUD Terceiro levantamento completo sobre uso de drogas no território

nacional

LC-MS Cromatografia líquida ligada a espectrometria de massas

LC-MS/MS Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

LLE Extração líquido-líquido

LOD Limite de detecção

LOQ Limite de quantificação

LPME Microextração em fase líquida

m/z Massa/carga

MDA Metilenodioxianfetamina

MDEA 3,4 metilenodioxi-N-etilanfetamina

MDMA Metilenodioximetanfetamina

MeOH Metanol

MRM Multiple reaction monitoring

MS/MS Duplo quadrupolo

PEA Fenetilamina

SAMHSA Substance Abuse and Menthal Health Services Administration

SPE Extração em fase sólida

SPME Microextração em fase sólida

TDAH Transtorno Déficit de Atenção

THC Δ -9-tetra-hidrocanabinol

THCCOOH 11-nor-9-carboxy-THC

THCCOOH-glu 11-nor-9-carboxy-THC- glucuronídeo

Tr Tempo de retenção

UNODC Escritório da Nações Unidas sobre Drogas e Crimes

UPLC-ESI-MS/MS Cromatografia líquida de alta pressão acoplada ao espectrômetro de

massas

Sumário

1	Intro	Introdução				
	1.1	Características das drogas em estudo				
		1.1.1 Cocaína	20			
		1.1.2 Anfetaminas	22			
		1.1.3 Cannabis sativa	26			
	1.2	Análises toxicológicas de drogas de abuso	28			
		1.2.1 Matriz urina	28			
		1.2.2 Dried urine spot	30			
		1.2.3 Revisão sobre análises cromatográficas	32			
	1.3	Estabilidade de amostras biológicas	34			
2	Objet	tivos	38			
3	Mate	rial e métodos	38			
	3.1	Equipamento:38				
	3.2	Reagentes e padrões3				
	3.3	Material biológico	38			
	3.4	Metodologia	39			
	3.5	Parâmetros cromatográficos				
	3.6	Parâmetros espectrométricos	40			
	3.7	Guia para validação de metodologia em análises toxicológicas	41			
4	Resul	ultados e discussão				

	4.1	Método cromatográfico42				
	4.2	Métod	o de preparo de amostra4	13		
	4.3	Valida	ção5	1		
		4.3.1	Seletividade5	1		
		4.3.2	Linearidade5	3		
		4.3.3	Carryover5	4		
		4.3.4	Limite de detecção e quantificação5	54		
		4.3.5	Precisão e exatidão5	55		
		4.3.6	Efeito matriz e recuperação5	56		
		4.3.7	Estabilidade5	8		
5	Conclu	são	7	1		
6	Referê	ncias bi	bliográficas7	72		
ANEXO) I		8	1		
ANEXO) II		8	3		
ANEXO)		8	7		
ANEXO) IV		8	39		
ANEXO	V		9	1		
ANEXO) VI		9)2		

1 Introdução

O abuso de drogas é um problema global que cresce ano a ano, atingindo diversos setores da sociedade, sem distinção de idade ou nível social, apresentando diversos fatores para sua prática (KIM et al., 2019). Segundo dados do Escritório da Nações Unidas sobre Drogas e Crimes (*United Nations Office on Drugs and Crimes,* UNODC), num estudo feito em 2017, estima-se que 271 milhões de pessoas, cerca de 15,5% da população mundial, na faixa de 15 a 64 anos fizeram uso de alguma droga ilícita no ano de 2016, sendo a *Cannabis*, popularmente conhecida como maconha, utilizada por aproximadamente 188 milhões de indivíduos, tornando-se a droga mais prevalente (UNITED NATION OFFICE ON DRUG AND CRIME, 2019).

Neste mesmo relatório são elencadas outras drogas de abuso, usadas sem a prescrição de um profissional da saúde, como as anfetaminas e outros estimulantes, os quais, 29 milhões de indivíduos fizeram utilização sem receituário, sendo mais prevalente tanto o uso, quanto as apreensões na América do Norte. Em seguida, observa-se o uso de *ecstasy* por 21 milhões de pessoas e finalmente, mas não menos preocupante, a cocaína, utilizada por 18 milhões de pessoas (UNITED NATION OFFICE ON DRUG AND CRIME, 2019). As Américas são líderes em apreensões de maconha dentre todo o mundo, representando juntas, mais de 50%. A América do Sul é o continente com o maior número de apreensões de maconha não medicinal, um total de 38% no mundo. Seguido pela América do Norte com 21% das apreensões (UNITED NATION OFFICE ON DRUG AND CRIME, 2019).

O consumo de drogas é o maior causador, direta ou indiretamente, de mortes no mundo. Dados apresentados por Ritchie & Roser em 2020 em estudo metanalítico demonstraram que, até o ano de 2017, o consumo de álcool, tabaco e drogas ilícitas foram responsáveis por 11,8 milhões de mortes, correspondendo a aproximadamente uma em cada cinco mortes no mundo. O consumo de drogas não é letal apenas em casos de overdose, mas também em situações que aumentam o risco do usuário de contrair alguma doença ou ferirse, podendo levar a uma morte prematura, suicídio, hepatites e/ou infecção por HIV (HANNAH; MAX, 2019).

No Brasil em 2018, foi publicado o terceiro levantamento completo sobre uso de drogas no território nacional (BASTOS, 2018) referente ao ano de 2017, pela Fundação Oswaldo Cruz, abrangendo a faixa etária de 12 a 65 anos, constatando que 4,9 milhões de pessoas fizeram uso de drogas ilícitas. A maioria dos usuários é do sexo masculino, chegando a ser 4 vezes maior que o feminino no que diz respeito ao uso nos últimos 12 meses, principalmente entre 25 e 34 anos. A maconha é a droga mais consumida entre brasileiros de 12 a 65 anos, em que 2,2 milhões de indivíduos fazem uso, seguida pelo cloridrato de cocaína no qual, aproximadamente 461 mil afirmaram ter utilizado, e por fim, *ecstasy* usado por 53 mil indivíduos, nos últimos 30 dias anteriores à pesquisa. No gráfico 1, pode-se ter uma visão mais abrangente das substâncias abordadas (BASTOS, 2018).

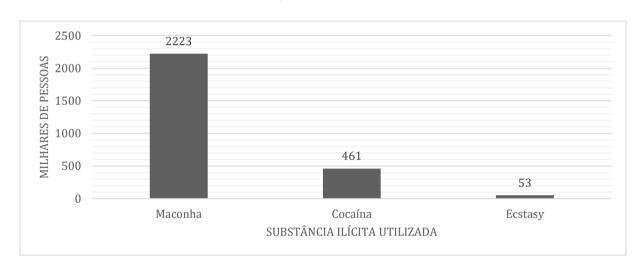


Gráfico 1 - Consumo de substâncias ilícitas por indivíduos de 15 a 65 anos no Brasil em 2017.

Adaptado de (BASTOS, 2018).

Não existe uma distinção estatisticamente relevante a respeito do nível de escolaridade e o consumo de substâncias ilícitas. Entretanto, uma diferença estatística pode ser observada entre regiões onde o consumo é mais iminente, como nas grandes cidades e capitais, comparado a cidades menores e regiões rurais, com destaque a região sudeste que apresenta o maior índice de consumo no Brasil (BASTOS, 2018).

Indivíduos com escolaridade entre médio completo e superior incompleto, tendem a misturar álcool com substâncias ilícitas ou não prescritas. Com relação à dependência de substâncias, aproximadamente 1,2 milhões de indivíduos sofriam de dependência de drogas ilícitas ou não prescritas, dentre elas, as mais comuns, maconha, benzodiazepínicos e cocaína

em pó, e também anfetaminas, em menor frequência. Destes, 43,08% são adultos na faixa de 25 a 34 anos. Na faixa entre 12 e 17 anos, totalizam 3,17% e 9,75% corresponde a faixa acima de 55 anos (BASTOS, 2018).

A mortalidade entre usuários de drogas no Brasil, direta ou indiretamente, também é alta, já que no ano de 2017 foram registradas aproximadamente 15 mil mortes diretamente relacionadas ao uso de drogas de abuso, 45% maior que o ano de 2007 (HANNAH; MAX, 2019).

1.1 Características das drogas em estudo

1.1.1 Cocaína

Há mais de 4.500 anos, as folhas do arbusto *Erythroxylum coca* são utilizadas por tribos indígenas da América do Sul em rituais, que diziam ser um presente dos deuses. Por volta do século XV, foi utilizada na Europa como anestésico oftálmico e otorrinolaringológico (KARCH, 1999). Muitas outras formas de utilização foram dadas à cocaína anos depois, desde composto no preparo de bebidas, até formulações para tratamento de desconfortos gástricos, dores de cabeça e cansaço, sendo banido nos EUA, em 1914, na primeira guerra mundial. No Brasil, sua proibição ocorreu em 1921 pelo decreto-Lei Federal n°4.292 de 06 de julho de 1921, ressurgindo na década de 70, como droga recreativa (FERREIRA; MARTINI, 2001; KARCH, 1999).

Hoje no Brasil, tanto a planta, quanto a substância são proibidas. A *Erythroxylum coca* é apresentada na portaria 344 de 12 de maio de 1998, na lista "E", à qual elenca plantas que podem originar substâncias entorpecentes e/ou psicoativas, enquanto que a cocaína é listada na mesma portaria, na lista "F1", que se refere à substâncias entorpecentes de uso proscrito (BRASIL, 1998). Em países como Bolívia, Peru e Colômbia, o consumo das folhas de *coca* é cultural, utilizado pela população em virtude da característica broncodilatadora, promovendo a melhora dos efeitos provindos do ar mais rarefeito (GOLDSTEIN et al., 2009).

A forma mais comum de uso da cocaína é através da inalação do cloridrato de cocaína, na forma de pó esbranquiçado, derivado da pasta base de *coca*, ocasionalmente também, é adicionada à cigarros de maconha ou tabaco. Pode se apresentar na forma de pedra amarelada, quando a base não é clorada, fumada por cachimbo, que produz um som

semelhante a um estalo, o que originou seu nome de *crack*. Outras formas como, injetada ou diluída na bebida também são relatadas e popularmente denominadas como merla, branquinha, s*now e blow* (FERREIRA; MARTINI, 2001).

A velocidade de absorção da cocaína é alta, leva cerca de 5 segundos para início dos efeitos na forma de *crack;* de 10 a 60 segundos quando administrado pela via intravenosa, e pela via intranasal por volta de 3 a 5 minutos. A cinética destes últimos é semelhante, sendo que o período na duração do efeito das doses, intravenosa e inalada (pulmonar) é menor, conduzindo assim o usuário a intervalos menores entre as doses administradas para manutenção do efeito. A disponibilidade da cocaína administrada pela via intranasal varia entre 49% a 94%, com absorção mais lenta e duração maior dos efeitos (GOLDSTEIN et al., 2009).

A cocaína possui efeito sobre o sistema nervoso central. Ela age no bloqueio na recaptação de dopamina e norepinefrina, neurotransmissores responsáveis por diversas funções ligadas ao prazer e funções do sistema nervoso autônomo. Dentre estas funções, pode-se citar elevação da pressão arterial e dos batimentos cardíacos, aumento da temperatura corporal e euforia. Outros efeitos visíveis são prejuízos nas funções cognitivas e motoras, além de oscilações bruscas de humor (CARRERA; MEIJLER; JANDA, 2004).

A utilização de cocaína pode causar desregulação química cerebral, em especial, diminuição na produção de dopamina no núcleo *accumbens*, região do cérebro responsável pelo prazer e recompensa. Essa diminuição ocasiona no indivíduo uma sensação depressiva, forçando-lhe a utilizar doses maiores da droga para sentir-se bem, levando à um quadro dependência e síndrome de abstinência por conta da tolerância adquirida, sendo mais grave em usuários de *crack*, uma vez que seus efeitos são rapidamente sentidos e possuem curta duração (CARRERA; MEIJLER; JANDA, 2004).

A cocaína é biotransformada pela carboxilesterases e butirilcolinesterase no fígado, ou no plasma e por hidrólise espontânea, em benzoilecgonina (BZE) e ecgonina metil éster (EME). Por processo de pirólise, há a absorção da molécula de anidro ecgonina metil éster (AEME), encontrada na urina, o que indica o consumo de crack. O consumo de cocaína em conjunto com álcool gera, no fígado por transesterificação, a formação de cocaetileno (CET),

produto que possui atividade simpatomimética semelhante à cocaína, com maior tempo de meia vida (cerca de 2,5 horas) o que prolonga a euforia, mas com maior grau de toxicidade. Além deles, nor-cocaína e outros produtos de biotransformação menos abundantes, como para-hidroxi-cocaína e meta-hidroxi- benzoilecgonina podem ser formados (DE LIMA FELTRACO LIZOT et al., 2019). A figura 1 ilustra os principais produtos de biotransformação da cocaína.

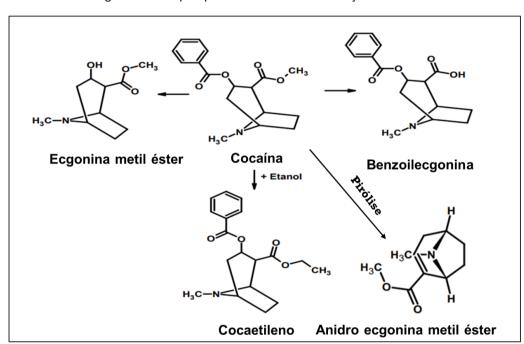


Figura 1 - Principais produtos de biotransformação da cocaína.

Adaptado de DE LIMA FELTRACO LIZOT et al., 2019.

Após biotransformação, a eliminação é majoritariamente renal, sendo excretada na urina. Apenas uma pequena porcentagem se encontra inalterada na urina como cocaína, enquanto que benzoilecgonina e ecgonina metil éster é mais abundantemente encontrada e, quando na presença de etanol, o cocaetileno. O tempo de detecção dos produtos de biotransformação varia conforme a forma de administração. Uma dose de aproximadamente 20 mg pode ser detectada entre 1 e 2 dias quando injetada e de, 2 a 3 dias por administração intranasal. Quando usado cronicamente, é possível a detecção entre 10 e 14 dias (CARRERA; MEIJLER; JANDA, 2004; DE LIMA FELTRACO LIZOT et al., 2019).

1.1.2 Anfetaminas

As anfetaminas, também conhecidas como "rebites", por motoristas rodoviários, ou "balinha" por estudantes, são drogas sintéticas estimulantes do sistema nervoso central, utilizadas com o intuito de deixar as pessoas mais despertas e regularem o apetite, auxiliando na perda de peso. Atualmente, são utilizados no tratamento de transtornos como o Déficit de Atenção (TDAH) e narcolepsia, entretanto, com venda liberada apenas com retenção de receituário médico (CORTESE et al., 2018; TAKITANE et al., 2013).

As anfetaminas são um grupo de análogos estruturais da fenetilamina (phenethylamine - PEA), molécula produzida endogenamente a partir do consumo de fenilalanina, considerada um neurotransmissor amina-traço, que quando ligado a receptores sinápticos, estimulam a liberação de dopamina, serotonina e noradrenalina e reduz a recaptção, através de reações de substituição dos átomos de hidrogênio na sua estrutura. Anfetamina, metanfetamina, femproporex, metilenodioxianfetamina (MDA), metilenodioximetanfetamina (MDMA), fentermina, 3,4 metilenodioxi-N-etilanfetamina (MDEA), entre outras, são consideradas como o segundo grupo de drogas mais utilizadas no mundo (UNITED NATION OFFICE ON DRUG AND CRIME, 2019; WOŹNIAK et al., 2018). A biotransformação das principais anfetaminas no presente estudo é apresentada nas Figuras 2 e 3.

Figura 2: Biotransformação da metanfetamina e femproporex em anfetamina e sua semelhança estrutural com a molécula de fenetilamina (PEA).

Adaptado de WOŹNIAK et al., 2018.

Figura 3: Biotransformação do MDMA em MDA.

Adaptado de ANGOA-PÉREZ; ANNEKEN; KUHN, 2016.

As anfetaminas são comercializadas apenas sob prescrição médica, retenção de receituário e constam na portaria SVS/344/98, na lista "A3 — lista de substâncias psicotrópicas" (BRASIL, 1998). Apesar disso, a utilização da droga por motoristas rodoviários e jovens, seja para estudarem mais, ou em festas para se sentirem mais desinibidos, e indivíduos que procuram emagrecer de forma rápida é grande e preocupante para saúde pública, principalmente, tendo em vista a onda crescente de síntese de novas drogas psicoativas (WOŹNIAK et al., 2018).

As anfetaminas possuem um caráter relativamente lipofílico, o que auxilia na distribuição corpórea e chegada ao cérebro, onde exercem sua ação. Seus efeitos são semelhantes aos do uso de cocaína, uma vez que estimulam receptores adrenérgicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos centrais e periféricos, trazendo uma sensação de euforia, insônia e excitação em seu uso agudo, podendo levar a sintomas como tremores, confusão mental, alucinações e efeito rebote, expressando exaustão, sono e depressão (HEAL et al., 2013; WOŹNIAK et al., 2018). Estudos recentes indicam que sua utilização prolongada leva a morte neuronal.

A biotransformação é feita em maior parte por via hepática pelo citocromo CYP2D6 e reações de desmetilação. A excreção é feita majoritariamente na urina pelos rins, dependente do pH da urina. As anfetaminas são bases-fracas, ou seja, tendem a ionizar em meio ácido,

visto que seu valor de pKa está em torno de 10, faz com que um meio mais alcalino, dificulte sua excreção. Enquanto o meio ácido torna sua excreção facilitada (HEAL et al., 2013).

A MDMA, também conhecido como *ecstasy*, é uma molécula do grupo das anfetaminas que tem efeito empatogênico, elevando a sensação de prazer e empatia do usuário. Seu pico plasmático é atingido entre 30 e 45 minutos, podendo durar de 3 a 6 horas e é eliminada pela urina na forma de MDA (Figura 3)(ANGOA-PÉREZ; ANNEKEN; KUHN, 2016). Níveis altos da substância no organismo podem levar a quadros de insônia, paranoia, bruxismo, sede intensa, sudorese e ritmo cardíaco elevado. Em usuários mais sensíveis, já foram observados quadros de hipertermia, muitos levando à morte do usuário. É muito associado com festas raves e música eletrônica, vendida associada à outras substâncias como efedrina e anfetamina (XAVIER et al., 2008).

Seu uso é proibido por não ter utilidade na terapêutica, entretanto, recentemente tem sido estudada como potencial auxiliador na terapia de pacientes que sofrem de transtorno pós-traumático (MITCHELL et al., 2021). No Brasil, sua comercialização é proibida, constando na lista "F" da portaria SVS/344/98.

O femproporex (Lista "B – lista de substâncias psicotrópicas anorexígenas" – portaria SVS/344/98) é um moderador de apetite, muito utilizado no Brasil no início na década de 90 para diminuição da obesidade, principalmente em homens, mas teve grande popularidade com mulheres. Seu uso foi descontinuado devido à falta de eficácia na manutenção da obesidade e risco de dependência e síndrome de abstinência, além dos sintomas clássicos associados ao uso de anfetaminas como comportamento agressivo, ansiedade, irritabilidade e insônia. Em 2017 foi novamente liberado para produção e comercialização sob prescrição médica (PAUMGARTTEN; PEREIRA; DE OLIVEIRA, 2016; PELISSIER-ALICOT et al., 2006).

Diversos estudos de caso foram publicados reportando os riscos do uso prolongado de femproporex, principalmente por mulheres em busca de emagrecimento, muitas vezes fazendo uso de ansiolíticos e benzodiazepínicos para mascarar os efeitos adversos do uso de femproporex. A exemplo, uma mulher de 26 anos que se queixava de insônia, palpitações no peito, enxaqueca e fadiga. Ela fazia uso de femproporex a pelo menos 2 anos, associado a ansiolíticos para conseguir dormir e reduzir as crises de irritabilidade. Outro caso, um

caminhoneiro de 38 anos que foi suspenso de seu trabalho por uso de anfetaminas. Ele fazia uso de femproporex, medicamento este que havia sido prescrito para outra pessoa. Queixava-se de insônia e palpitações cardíacas. Ambos os casos reportados apresentaram quadros de depressão menor após a suspensão da medicação e, após algumas semanas, o desaparecimento completo dos sintomas (COHEN, 2009; NAPPO, 1996).

O femproporex age diretamente nas vesículas pré-sinápticas, controlando a liberação de dopamina no centro de alimentação, localizado no hipotálamo lateral. Outro efeito promovido por ele é a manutenção de leptina no cérebro, que concede uma sensação de saciedade e assim, inibe a fome. Sua conversão em anfetamina acontece por N-desalquilação, biotransformada em anfetamina quase que completamente em 4 horas (PAUMGARTTEN; PEREIRA; DE OLIVEIRA, 2016).

O tempo de meia vida das anfetaminas é variado. A anfetamina apresenta meia vida entre 8 e 30 horas, a MDMA por volta de 5 a 10 horas e o femproporex por volta de 2 horas. Logo, a procura por anfetamina na urina é mais segura para identificação do consumo, enquanto que a presença de produtos não biotransformados das drogas precursoras nos dá a ideia da substância consumida ou administrada (PAUMGARTTEN; PEREIRA; DE OLIVEIRA, 2016; XAVIER et al., 2008).

1.2.1 Cannabis sativa

A *Cannabis sativa*, possui registros de seu cultivo datados de 12.000 anos. Foi muito utilizada desde a China antiga para tratamentos de diversas enfermidades como, dores reumáticas, ansiedade, desconfortos no sistema reprodutor feminino e auxilio no tratamento da malária (ZUARDI, 2006).

A cannabis é formada por diversos compostos dentre eles, os canabinoides como o canabidiol e o canabinol, com maior destaque por seu potencial psicoativo o Δ -9-tetrahidrocanabinol (THC). O THC possui características químicas mais lipofílicas e possui ação rápida, capaz de sensibilizar os receptores canabinoides CBD 1 e 2 e capaz de causar dependência (RUSSO, 2016). Alguns tipos de canabinoides são produzidos endogenamente,

sendo os mais elucidados na literatura a anandamida e 2-aracdonoil glicerol (JAMWAL et al., 2017).

Sua forma mais comum de consumo é através da pirólise enrolado como cigarro. O usuário de maconha apresenta efeitos como fala mais lenta, calma, aumento da temperatura corporal, na percepção de cores, sons e texturas, regulação de apetite e maior tolerância a dor, além de diversos estudos demonstrarem os benefícios do uso de seus compostos em diversas doenças como câncer, epilepsia, Alzheimer e Parkinson (MEIER et al., 2018; PAMPLONA; TAKAHASHI, 2012).

O cigarro de maconha é feito com as folhas e flores da planta fêmea, que pode conter entre 10% a 69% de THC, dependendo da região de cultivo e estrutura da planta (UNITED NATION OFFICE ON DRUG AND CRIME, 2019). Os efeitos analgésicos provêm da sua ligação com receptores ligados à proteína G, e estudos recentes demonstram a possibilidade de ligação também com receptores *delta* e *kappa*, no cérebro, o que explicaria seu efeito relaxante e sedante (PAMPLONA; TAKAHASHI, 2012).

Quando fumada, sua absorção é rápida, atingindo pico plasmático entre 3 e 10 minutos, podendo ser sentido e observado efeito psicoativo em 15 a 30 minutos após seu consumo. A duração dos efeitos pode variar entre 2 e 3 horas, dependendo de fatores individuais do usuário, como peso e frequência de uso (ADAMS; MARTIN, 1996).

Outras formas de administração não terapêutica como, consumo de alimentos à base da erva e chás também são observadas, entretanto, tais vias de administração levam à uma absorção mais lenta e aparecimento dos efeitos mais tardiamente, podendo levar de 1h – 1h30mins para atingir concentração plasmática máxima e efeitos mais intensos e prolongados (FOSTER; ABRAMOVICI; HARRIS, 2019).

As características lipofílicas do THC permitem que ele tenha uma grande perfusão nos tecidos, além de uma deposição no tecido adiposo, o que torna sua eliminação do organismo mais lenta. A biotransformação ocorre no fígado, através da enzima oxidativa da família citocromo P450. O THC é biotransformado, dentre outros produtos, em 11-hidroxi-THC (11-OH-THC) e posteriormente em ácido 11-nor-9-THC carboxílico (THCCOOH), produto este que

é acoplado ao ácido glicurônico por conjugação e eliminado, em grande parte, nas fezes, por volta de 80%, e 20% na urina (DEL MAR RAMIREZ FERNANDEZ et al., 2008), como ilustra a figura 4.

Hidroxilação

Carboxilação

HO

Ho

H3C

H3C

H3C

HCOOH

Glucoronidação

Glucoronidação

THCCOOH- glu

THCCOOH- glu

Figura 4: Biotransformação do THC

Adaptado de DEL MAR RAMIREZ FERNANDEZ et al., 2008. Legenda: Ácido glucurônico (glu)

1.2 Análises toxicológicas de drogas de abuso

1.2.1 Matriz urina

As drogas de abuso sofrem diversos processos de biotransformação que ocorrem principalmente no fígado, assim como também em outros tecidos do corpo, com o objetivo de tornar as moléculas mais hidrossolúveis, possibilitando assim, que elas sejam excretadas na urina pelos rins (ADACHI et al., 2006).

A urina produzida por mamíferos tem coloração acastanhada translúcida, estéril e com volume abundante, entre 1,2 a 2,0 L por dia. Composta majoritariamente por água, nela encontram-se os produtos já sem serventia ao organismo, ou em excesso na corrente sanguínea, como açúcares, lipídios, sais inorgânicos, creatinina, amônia, proteínas, entre outros (BOUATRA et al., 2013), sendo a primeira rota de excreção. Esta eliminação pode ser

influenciada pela ingestão de líquidos, estado de saúde, uso de drogas e fatores ambientais (ADACHI et al., 2006).

Nas análises toxicológicas, as matrizes escolhidas necessitam passar por etapas de preparo de amostra, para remoção de componentes que possam dificultar a detecção do analito. A estes componentes, da- se o nome de interferentes. Estes podem ser definidos como qualquer componente da matriz que não seja o analito desejado, especialmente proteínas, peptídeos, células, entre outras estruturas que possam estar contidas na matriz (BORDIN et al., 2015).

O preparo de amostra também contribui para a concentração dos analitos na amostra, facilitando sua detecção. Para isso, diversos tipos de extração são empregados no preparo de amostras, como as técnicas miniaturizadas microextração em fase líquida (LPME), microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), microextração em fase sólida (SPME), e as técnicas convencionais como a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE), dentre diversas outras. A técnica de escolha varia dependendo da matriz com etapas adicionais de extração e limpeza da amostra (BORDIN et al., 2015).

A urina é o material biológico mais amplamente utilizado para identificação de uso de drogas, lícitas ou ilícitas. Seu processo de análise vem sendo melhorado ao longo dos anos e oferece um período de detecção relativamente longo, comparado a outras matrizes como sangue, sendo possível ter uma estimativa de quanto tempo o indivíduo faz uso de uma determinada substância (KOSTER et al., 2014; OTERO-FERNÁNDEZ et al., 2013).

Nos exames toxicológicos envolvendo matrizes biológicas, a confirmação da presença de uma substância na matriz não depende unicamente da sua detecção, mas também da concentração que esta é encontrada na amostra. Para isso, órgãos internacionais como Substance Abuse and Menthal Health Services Administration (SAMHSA), e a European Workplace Drug Testing Society (EWDTS) estabelecerem guias contendo uma concentração de corte, denominada de cut-off. Nas análises toxicológicas, é o cut-off que determina se uma amostra é positiva ou negativa. Valores acima do valor de corte estabelecido são consideradas positivas, enquanto que abaixo, podem ser detectadas, mas consideradas negativas. Esta determinação auxilia na interpretação de resultados, dando uma ideia de uso da substância,

exposição passiva ou se a substância, quando produzida endogenamente, se encontra nos níveis endógenos (CUYPERS; FLANAGAN, 2018; TSANACLIS; WICKS, 2008).

Com o tempo, o preparo de amostras tem se tornado mais simples e menores volumes de amostras biológicas tem sido necessárias, visto que os equipamentos de análises também têm evoluído na sua capacidade de detectar e quantificar moléculas de baixo peso molecular, como é o caso das técnicas cromatográficas acopladas a detectores cada vez mais sensíveis e eficientes na identificação de diferentes moléculas. Logo, a necessidade de grande volume de amostras se fez desnecessária e as análises puderam ser feitas a partir de microlitros de matriz, secas em um papel absorvente.

1.2.2 Dried urine spot

Dried matrix spots (DMS - ponto de matriz seca) é uma técnica de acondicionamento de amostra que, ao longo dos últimos anos, tem sido avaliada em análises toxicológicas. Esta técnica consiste em colocar uma gota da matriz em um cartão de papel filtro absorvente e deixar que este seque em temperatura ambiente, preservando os constituintes da matriz e, desta forma, inibindo a degradação deles por hidrólise ou ação de agentes patogênicos (SADONES et al., 2014).

A primeira técnica de DMS foi desenvolvida por Robert Guthrie, em 1963, que utilizou sangue seco em papel para triagem de doenças metabólicas em neonatos com fenilcetonúria. Após seco o conteúdo aquoso do sangue, ficou preservado por semanas no papel. Esta técnica foi chamada de *dried blood spots* (DBS) (GRÜNER; STAMBOULI; ROSS, 2015).

São inúmeras as vantagens de se utilizar esta técnica em comparação às matrizes na forma convencional. São mais seguras, em comparação com o sangue e plasma, por exemplo, já que, uma vez seca, inativa proteínas e a ação de enzimas, inibindo também o crescimento de bactérias. Outra vantagem encontrada é a maior preservação de substâncias, sensíveis à fotodegradação (AYRE et al., 2018). As amostras secas em DBS podem não necessitar de refrigeração, seja em geladeira, freezer ou mesmo serem preservadas em nitrogênio, podendo ser guardadas em temperatura ambiente por dias ou semanas sem haver perda considerável dos constituintes da amostra. São amplamente utilizadas em triagem de doenças

metabólicas neonatais, estudos do DNA, proteínas, pequenas moléculas, traços de elementos, estudos de farmacocinética e toxicocinética, monitoramento terapêutico, análises forenses *antemortem* e *post-mortem*, entre outras (GAUGLER et al., 2019).

Diversos papéis foram aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para esta finalidade. O mais usualmente reportado é o *Whatman* 903, que contém cartões com número variado de poços para acondicionar a amostra. Não é necessário um grande volume amostra, 20ul são suficientes para preencher a área indicada no papel para depositar a amostra, ocupando um diâmetro de 12mm. Nestes poços, cortes de 3mm equivalem a aproximadamente 3µl (SADONES et al., 2014).

Diversas outras matrizes foram utilizadas nos princípios desta técnica, como suor, saliva, plasma, leite materno e urina. O *dried urine spots* (DUS), nos últimos anos, começou a ser utilizado para triagem de funcionamento renal e consumo de drogas, sendo ressignificado. Há relatos de monitoramento de doenças congênitas, uma vez relatado seu potencial de armazenamento e conservação alto (AYRE et al., 2018; DELABY et al., 2014). O uso de DUS é uma técnica vantajosa por necessitar de pequena quantidade de urina, assim como DBS, cuja aquisição é pouco invasiva, e de fácil obtenção, baixo custo, possibilitando a análise de diversos produtos de biotransformação, sendo de grande auxílio no monitoramento de exposição a drogas em neonatos, crianças, acamados e vítimas de intoxicação por drogas facilitadoras de crimes (LEE; LAI; SADRZADEH, 2013).

Sua forma de condicionamento e rapidez de análise torna-se um problema quando se está frente a uma grande quantidade de amostras a serem analisadas. Situações como, acondicionamento, temperatura para armazenamento de amostra, diluição da amostra, contaminação cruzada, baixo volume coletado e possível depuração da amostra são problemas comuns encontrados (JAIN et al., 2017; KIM et al., 2019).

A urina continua sendo a matriz biológica mais escolhida para as análises toxicológicas, levando em conta sua facilidade de obtenção, quantidade suficiente de volume coletado e larga janela de detecção de compostos presentes nela. Contudo, somente nos últimos anos é que estudos estão sendo feitos com DUS para validação de metodologias analíticas, apresentando ótimos resultados, ao utilizar equipamentos sensíveis como a cromatografia

líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS), como indicado no gráfico 2 (DA SILVA; COLLINS, 2011).

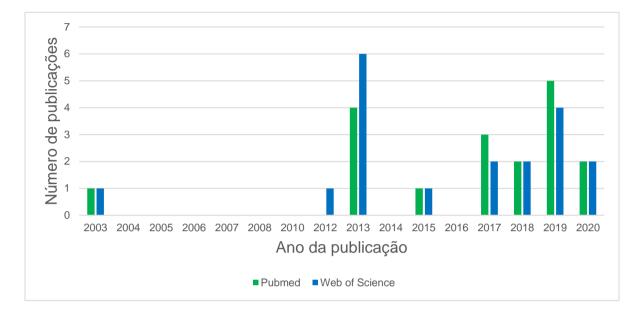


Gráfico 2 - Publicações sobre DUS em LC-MS.

Fonte: Pubmed; Web of Science, 2020.

1.2.3 Revisão sobre análises cromatográficas

A cromatografia é uma poderosa técnica de separação de compostos que constitui no contato e na passagem de um solvente por uma superfície de contato fixa. Esta superfície de contato é a coluna cromatográfica, que leva o nome de fase estacionária (FE), enquanto o solvente leva o nome de fase móvel (FM). Ao passo que a fase móvel percola pela fase estacionária, os compostos, dependendo das interações dos analitos pelas duas fases, são carregados pela FM e separados (FISCHER, 2006).

Diversas técnicas cromatográficas existem, onde a composição das FE e FM pode mudar de acordo com as necessidades da análise. As técnicas mais utilizadas hoje são a cromatografia gasosa (gas chromatography, GC) e a cromatografia líquida de alta eficiência (high performance liquid chromatography, HPLC). Estas técnicas, além de permitirem uma separação eficiente dos compostos, ainda possibilitam a quantificação dos analitos encontrados (LANÇAS, 2009).

Na cromatografia gasosa, a fase móvel é um gás inerte, normalmente hélio, argônio, nitrogênio ou hidrogênio, que ao passar pela fase estacionária, arrasta consigo as moléculas pela coluna cromatográfica. É utilizada para analisar moléculas voláteis, e termoestáveis. Amplamente presente na indústria química e farmacêutica, nas análises de produtos petroquímicos, laboratórios forenses e de análises ambientais (LANÇAS, 2009).

As amostras, após extração, podem ser injetadas no equipamento na forma de líquido ou como gás. São expostos à alta temperatura no injetor, volatilizando todo e qualquer resquício do líquido antes de entrar na coluna cromatográfica. As substâncias não voláteis dependem de um processo extra no preparo de amostra, chamado derivatização, que muitas vezes, torna o preparo de amostra muito longo e tedioso. Outro ponto a se destacar, compostos não estáveis sob elevada temperatura, acabam degradando, tornando a identificação impossível (PEREZ et al., 2016).

A cromatografia líquida de alta eficiência por outro lado, é uma técnica que raramente necessita de derivatização. Ótima para analisar compostos não voláteis e termicamente instáveis, dado ao fato de sua fase móvel ser um líquido e a separação ser feita sob alta pressão e temperaturas entre 20° e 40°C normalmente. A fase móvel pode ser aquosa, orgânica, ou uma mistura das duas, afim de melhorar a separação dos analitos, enquanto que a fase estacionária é sólida, presente na parte interna da coluna cromatográfica (MICHELY; MEYER; MAURER, 2017).

A fase estacionária na HPLC utilizada na toxicologia, normalmente tem característica apolar do que a fase móvel, principalmente nas análises toxicológicas, sendo denominada fase reversa. O contrário, apesar de não muito frequente, também acontece, sendo denominada como fase normal. Esta diferença de polaridade entre as fases é de suma importância para a separação dos analitos, visto que, na fase reversa, por exemplo, compostos polares tendem a interagir menos com a fase estacionária e mais com a fase móvel, enquanto que composto mais apolares tendem a ficar mais tempo retidos na coluna cromatográfica (DA SILVA; COLLINS, 2011).

Posterior à separação cromatográfica, os analitos são levados ao detector. Diversos detectores podem ser utilizados, acoplados ao sistema cromatográfico. O padrão ouro a

respeito dos detectores é o espectrômetro de massas, muito requerido nas análises de amostras biológicas.

O espectrômetro de massas é composto por uma fonte de ionização, um analisador de massas, que separa as moléculas por sua relação massa/carga (m/z), e um detector para transformar o sinal medido em um plano gráfico.

Diversas fontes de ionização existem, sendo a mais comum na cromatografia líquida, ionização por *eletrospray* (ESI). O ESI é um poderoso aliado na produção de íons em fase gasosa, onde forma um fino *spray* de íons vindos da solução e, posteriormente, passando por um gás de dissolvatação, formando microgotas e nebulizando a amostra. Este tipo de ionização é muito indicado para moléculas que possuem pouca pressão de vapor ou termicamente instáveis, como as proteínas e açúcares (FENN et al., 1989).

Após a ionização, o analito passa para o analisador de massa. Dos mais usuais, temos analisador por tempo de voo, captura de íons e quadrupolo. Estes analisadores têm a finalidade de resolver os íons, segundo a relação *m/z* deles. Diversas técnicas utilizam mais de um analisador acoplado, o que é chamado de espectrometria de massas híbrida ou sequencial, com o intuito de ter um equipamento mais sensível de detecção das moléculas. Comumente utilizado, o duplo quadrupolo (MS/MS) é uma técnica muito sensível que possibilita a identificação da molécula por seu perfil de fragmentação. No primeiro quadrupolo, o íon, chamado de íon pai ou precursor, é detectado. Então esse íon é levado à uma célula de colisão, que fragmenta a molécula e os fragmentos, também chamados de íons filho, são analisados no segundo quadrupolo. O perfil de fragmentação é a identidade única de cada molécula visto a passagem do íon precursor, para o fragmento gerado (LANÇAS, 2009).

1.3 Estabilidade de amostras biológicas.

Diversos são os desafios envoltos na coleta e análise de amostras na toxicologia. A estabilidade de substâncias psicoativas em matrizes biológicas é uma delas. Por meio dela, é possível decidir na fase pré-analítica, qual condição de armazenamento, transporte e tempo para armazenagem a amostra coletada deve ser submetida para garantir um resultado

fidedigno qualitativa ou quantitativamente. Não respeitar estas condições, leva à degradação acelerada da amostra e consequentemente, a um resultado analítico sub ou superestimado (DINIS-OLIVEIRA et al., 2010; PELLEGRINI et al., 2017).

Frequentemente há um período de atraso entre a hora da coleta da amostra e a sua análise. Estes atrasos podem ser justificados pela distância entre o local da coleta e o laboratório destinatário, ou até mesmo por processos jurídicos envolvendo a origem da amostra e se esta deverá ser armazenada para nova análise. Durante este tempo, é passível de ocorrer degradação dos analitos de interesse, sendo aceitável pelos guias internacionais de validação, uma variação de até 20% do analito, em função do tempo que a matriz é armazenada (MATA, 2016).

Diversos fatores levam a degradação de amostras biológicas, sejam estas antemortem ou post-mortem. Dentre os mecanismos envolvidos mais frequentes são processos físico-químicos da própria matriz como pH, presença de água, atividade enzimática e tendência a conjugação ou desconjugação, assim como fatores externos, tais como contaminação bacteriana, temperatura, exposição à luz e deposição do analito no material de coleta (PELLEGRINI et al., 2017).

A presença de água na matriz gera maior instabilidade em substâncias. A mudança de pH exerce um potencial de biotransformação nos analitos, podendo ativar ou inativar enzimas, quebrar ligações na molécula do analito alvo, em principal aqueles que possuem em sua estrutura enxofre, nitratos e outros grupos facilmente hidrolisáveis como grupamentos éster, como presente nos produtos da cocaína, o que pode dificultar a detecção e/ou quantificação do analito por sua degradação (PETERS, 2007).

Este ambiente também fornece um meio favorável para o crescimento bacteriano, importante contaminante e potente agente degradante que pode alterar a concentração dos analitos, ou produzindo compostos derivados, dando resultados imprecisos e liberando interferentes no meio, dificultando ainda mais o processo de extração (BUTZBACH, 2010).

Quando a análise toxicológica não é feita logo após sua coleta, situação frequente em laboratórios, dada a quantidade de amostras, conservantes podem ser adicionados à matriz e/ou ser armazenada em baixas temperaturas. É recomendado que para amostras que serão analisadas em até 15 dias, considerado curto prazo, o armazenamento deve ser feito em geladeira, em temperatura menor que 4 °C. Já aquelas que serão analisadas após este

período, consideradas de longo prazo, ou armazenadas para reanálise futura, devem ser armazenadas em *freezers*, sob temperaturas de -20 °C ou -80°C (KERRIGAN, 2013).

O material escolhido para coleta pode interagir com os analitos da matriz, aderindo à parede do recipiente, reduzindo o poder extrativo do método. Exemplo disto, os ftalatos são compostos plastificantes, encontrados em ponteiras descartáveis, recipientes de solventes, tubos de coleta e outros materiais utilizados em laboratório. Esta substância pode eluir na amostra por diversos fatores físico-químicos, e sua presença é um grande interferente em métodos de detecção que façam utilização de espectrometria de massas (HÖGBERG et al., 2008).

O material para coleta de urina normalmente consiste em um pote de fundo reto, feito de plástico com tampa, podendo ser de poliestireno ou polipropileno, com adição ou sem conservante, normalmente fluoreto de sódio. Uma situação a ser observada é a durabilidade deste material no armazenamento. O poliestireno tende a apresentar rachaduras quando submetido à baixas temperaturas, enquanto que o polipropileno tende a ser mais resistente (DINIS-OLIVEIRA et al., 2010).

Também cabe dizer que analitos fotossensíveis, devem ser armazenados, preferivelmente em frascos âmbar, ou em recipientes cobertos com papel alumínio, ao abrigo da luz e, preferencialmente, sob baixa temperatura. Ciclos de congelamento e descongelamento devem ser evitados, preservando de uma depuração da amostra (DINIS-OLIVEIRA; VIEIRA; MAGALHÃES, 2016).

Idealmente, diversas condições devem ser avaliadas em um estudo de estabilidade. Preferencialmente aqueles em que as amostras são normalmente submetidas. Dentre eles, pode-se elencar estabilidade de longo prazo (*freezer*), efeitos de ciclos de congelamento e descongelamento, estabilidade de curto prazo (geladeira), estabilidade em temperatura ambiente e estabilidade após extração são alguns dos mais comuns, presentes nos guias de validação. Valendo lembrar que, a matriz em que o estudo é conduzido pode interferir nos fatores gerais de estabilidade do analito (BUTZBACH, 2010).

Na urina, poucos estudos de estabilidade longitudinais ou multifatoriais foram conduzidos. Clauwaert e colaboradores, em estudo com diferentes temperaturas de armazenamento e abrigo da luz, visando estabilidade de anfetaminas em diferentes matrizes, verificou-se que MDMA e MDA permaneceram estáveis em temperaturas de 20°C, 4°C e -20°C

por período de 21 semanas na urina, tendo sido a melhor matriz neste quesito (CLAUWAERT; VAN BOCXLAER; DE LEENHEER, 2001).

A estabilidade da cocaína em urina é um problema em diversos estudos. Sua estabilidade é prejudicada principalmente por conta do pH da amostra, meio aquoso e temperatura do armazenamento. Em relação ao pH, ambientes mais básicos contribuem para hidrolise da porção éster da cocaína, ocorrendo de forma espontânea, tornando-se benzoilecgonina. Pouca diferença no valor do pH pode alterar drasticamente a concentração da cocaína em temperatura ambiente. Temperaturas de -20°C são mais indicadas para preservação da cocaína e seus produtos de biotransformação das ações físico-químicas (MOODY et al., 1999).

Já estudos sobre canabinoides indicam que os fatores mais relevantes para sua instabilidade são luminosidade, mudanças de temperatura e interação com a parede do recipiente. Os canabinoides tendem a aderir à parede dos frascos plásticos após uma hora da coleta da urina. O meio ácido da urina, leva à desconjudação do THCCOOH-glu, alterando assim, a concentração final do THCCOOH. O THCCOOH é mais resistente à degradação mediante mudanças no pH, sendo mais frequente uma descarboxilação mediada por ação bacteriana, após 15 dias em temperatura ambiente. Em temperaturas de 4°C e -20°C, os canabinoides se mantem estáveis por período próximo a seis meses em urina (SKOPP; PÖTSCH, 2004).

A utilização de matriz seca neste contexto apresenta grandes vantagens, não apenas nos exames toxicológicos, como também em ensaios clínicos e monitoramento terapêutico. O volume de amostra a ser coletada é menor e sem a necessidade de um rápido transporte e armazenamento refrigerado. Para coletas feitas em áreas remotas e afastadas, os custos referentes ao transporte e materiais de coleta também são minimizados, além de possibilitar comodidade para o desenvolvimento de estudos longitudinais de um indivíduo ou possível hospedagem, nos casos de ensaios clínicos, promovendo uma redução de espaço para o armazenamento e custos referentes às amostras (PALMER; COOPER; DUNN, 2019).

Cada caso é único, sendo que cada composto na matriz, possui sua particularidade e estabilidade, sendo praticamente impossível conhecer exatamente a concentração de um analito. Entretanto, estudos voltados para melhorar a estabilidade destes compostos são de suma importância para ter o resultado mais fidedigno possível (DINIS-OLIVEIRA et al., 2010).

2 Objetivos

Avaliar a estabilidade de anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, femproporex, COC, BZE, EME, CET e THCCOOH em amostras *dried urine spot* em 40°C, temperatura ambiente e em temperaturas de 4°C e -20°C, visto que estas são as temperaturas frequentemente utilizadas para armazenamento de amostras biológicas.

Desenvolver, validar e aplicar métodos de extração e determinação dos analitos utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS/MS)

3 Material e métodos

3.1 Equipamento:

• Equipamento de cromatografia líquida modelo UPLC® Acquity acoplado à espectrometria de massas modelo Micromass Quattro Premier, ambos da Waters Corporations (Milford, MA, EUA), disponível no Laboratório de Análises Toxicológicas – USP.

3.2 Reagentes e padrões

- Reagentes: Metanol, formiato de amônio, ácido fórmico, acetonitrila grau HPLC, obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha) e água ultrapura produzida pelo sistema de filtragem Milli-Q (Billerica, MA, USA).
- Papel de filtro Whatman 903 Protein Saver Cards da GE Healthcare (Dassel, Alemanha).
- Padrões de referência: cocaína, benzoilecgonina, ecgonina metil éster, anidro ecgonina metil éster, cocaetileno; anfetamina, metanfetamina, femproporex, MDMA e MDA; ácido-11-nor-THC carboxílico, ácido-11-nor-THC carboxílico conjugado, cocaína-d₃, anfetamina-d₅, ácido-11-nor-THC carboxílico-d₃, obtidas da *Cerilliant Corporation* (Round Rock, Texas, EUA).

3.3 Material biológico

As amostras foram coletadas de uma clínica de tratamento para dependentes químicos, pela equipe da clínica. A coleta das amostras já faz parte da rotina da clínica, logo, será cedida uma alíquota de amostra positiva, com a aprovação do doador considerado apto.

Para a validação, amostras negativas foram coletadas de pessoas que não fazem uso das substâncias pesquisadas. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob o CAAE 19941319.1.0000.0067, como consta no Anexo II. As amostras coletadas neste estudo não foram analisadas devido ao período de quarentena, em decorrência à Covid-19.

3.4 Metodologia

Os analitos foram adicionados em uma amostra de urina negativa, nas concentrações de 10, 50, 100, 250, 500 e 1000 ng/ml. Após, 20 μl foram colocados em cada *spot* e deixados secar por 2 horas. Após esse tempo, um poço foi manualmente cortado (12 mm), colocado em tubo *eppendorf* contendo 500 μl de fase extratora (MeOh/ACN/acetona), contendo P.I. a 100 ng/mL. O tubo foi levado à agitação branda em agitador mecânico por 40 min, seguido de 5min em centrifugação a 14.000 rpm. Todo o solvente foi retirado e seco em fluxo de nitrogênio por 8 min, ressuspendido em 50 μl de gradiente inicial (20% Fase B) e injetado 10 μl no UPLC, conforme demonstrado na Figura 5.



Figura 5 - Fluxograma de preparo de amostra em DUS.

Fonte: Autor. Legenda: Solução extratora (S.E.)

3.5 Parâmetros cromatográficos.

O método de separação cromatográfica foi desenvolvido para determinação de anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, femproporex, COC, BZE, EME, AEME, CET, THCCOOH, THCCOOH-glu e seus respectivos padrões deuterados em uma única corrida.

Os padrões foram infundidos diretamente no espectrômetro de massas, a fim de encontrar o íon precursor e os respectivos produtos de cada um dos analitos, conforme apresentado na tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros utilizados no método cromatográfico.

Parâmetros cromatográficos	
Composição da fase móvel A	Água + Formiato de amônio (1mM) +Ácido fórmico 0,1%
Composição da fase móvel B	Metanol: Acetonitrila (6:4) + Ácido fórmico 0,1%
Temperatura da coluna	40°C
	0.00 Min - Fluxo: 0.300 %Fase B: 10
	1.00 Min - Fluxo: 0.300 %Fase B: 10
Gradiente da fase móvel	3.50 Min - Fluxo: 0.400 %Fase B: 100
	5.00 Min - Fluxo: 0.300 %Fase B: 10

3.6 Parâmetros espectrométricos

Para monitorar os íons ao chegarem no detector MS/MS, um método MRM foi otimizado para adequar a melhor sensibilidade de detecção como apresentado na tabela 2 e 3.

Tabela 2: Parâmetros inseridos para MRM.

Método MS	

Modo de ionização	Eletrospray
Capilar (kV)	3,00
Cone (V)	32
Extrator (V)	1
Temperatura da fonte (°C)	12
Temperatura do gás de desolvatação (°C)	450
Fluxo de gás no cone (L/h)	50
Fluxo do gás de desolvatação (L/h)	900

Tabela 3: Parâmetros de ionização dos íons precursores.

Método MS/MS				
Resolução LM 1	15,0			
Resolução HM 1	14,0			
Entrada	1			
Colisão	24			
Saída	1.0			
Resolução LM 2	15,0			
Resolução HM 2	14.0			
Multiplicadora (V)	650			
Pressão da célula de colisão				
Pressão (m bar)	3.45e-3			
Fluxo do gás de colisão (mL/Min)	0,18			

3.7 Guia para validação de metodologia em análises toxicológicas

Para a validação do método, o guia da ANSI/ASB Standard 036 - Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology, 2019 foi utilizado, atentando-se aos parâmetros limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), linearidade, precisão e exatidão interdia e intra-dia, especificidade, efeito matriz, recuperação, *carryover* e estabilidade em temperatura ambiente, 4°C e -20°C e 40°C, esta última, simulando o transporte das amostras por serviços de entrega não refrigerados, em amostras de DUS.

4 Resultados e discussão

4.1 Método cromatográfico

Os 15 analitos foram infundidos separadamente no espectrômetro de massa (anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, femproporex, COC, BZE, EME, CE, AEME, THCCOOH, THCCOOH-glu e os deuterados de anfetamina d5, cocaína d3, THCCOOH d3 e THCCOOH-glu d3). Todos os analitos estavam diluídos em metanol, na concentração de 1000 ng/mL. Os parâmetros espectrométricos como voltagem do cone, energia de colisão e voltagem do capilar foram otimizados para se obter o melhor sinal para cada um dos analitos e seus respectivos íons produto.

A partir da otimização de cada analito, o arquivo de monitoramento MRM foi desenvolvido contendo as informações colhidas na infusão. Na tabela 4 foram colocadas as 2 transições mais abundantes de cada analito e seus respectivos parâmetros.

Tabela 4 - Íons precursores, íons produto e tempo de retenção das substâncias de estudo.

Analito	ĺon	Íon produto	Tr	Dwell	Voltagem	Energia de
	precursor	•			do cone	colisão
Anfetamina d₅	141	96 – 68	1,18	0.03	17	9 - 17
Anfetamina	136	90 – 61	2,79	0.03	15	9 - 17
Femproporex	188	119 – 91	2,84	0.03	20	11 – 23
MDA	180	163 – 133	2,87	0.03	15	11 – 17
MDMA	194	162 – 105	2,81	0.03	20	13 – 21
Metanfetamina	150	119 – 91	2,79	0.03	20	11 – 17
Cocaína d₃	307	185 – 85	3,13	0.03	35	20 – 36
AEME	199	117 – 90	1,53	0.03	40	21 – 25
Cocaína	304	182 – 82	3,13	0.03	35	20 – 36
Cocaetileno	318	196 – 82	3,32	0.03	30	23 – 33

Benzoilecgonina	290	167 – 105	3,00	0.03	30	21 – 31
Ecgonina metil éster	200	182 – 82	1,02	0.03	35	24 – 24
THCCOOH d₃	348	302 – 330	4,54	0.03	35	20 – 22
ТНССООН	345	327 – 299	4,57	0.03	35	20 – 22
THCCOOH-glu d₃	524	348 – 330	4,63	0.03	40	15 – 28
THCCOOH-glu	521	345 – 327	4,57	0.03	40	15 – 28

Legenda: Tempo de retenção (Tr).

4.2 Método de preparo de amostra

Para o preparo de amostra, foi conduzida uma pesquisa sobre propriedades físicoquímicas das moléculas, identificando a forma mais eficiente de extração do analito de interesse, como demonstra tabela 5.

Tabela 5 - Propriedades físico-químicas das substâncias de estudo.

Substância	Estrutura	рКа	Log P	Período de detecção na urina
Cocaína	H ₃ C CH ₃	8,7	2,3	72 ~ 124h
Benzoilecgonina	H ₃ C N	3,1 9,5	1,3	24 ~ 192h

Anidro ecgonina metil éster	H ₃ C H ₃ C H	9,04	1,1	4,2h
Ecgonina metil éster	H ₃ C—N	9	3,8	~ 48h
Cocaetileno	H ₃ C-N H	3,2 10,1	2,5	~ 60h
Anfetamina	NH ₂	9,9	1,8	115 ~ 216h
Metanfetamina	NH _{CH3}	9,8	1,9	1 ~ 34h
MDMA	H ₃ C NH CH ₃	10,1	1,8	~ 48h
MDA	O CH ₃	9,6	1,6	~ 48h
Femproporex	CH ₃	7,8	1,7	~ 117h

Fonte: Adaptado de MAQUILLE et al., 2009; MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2011.

Com auxílio da ferramenta de análises de misturas do Minitab®, um limiar ótimo para extração dos analitos de estudo foi estipulado, utilizando como variáveis acetonitrila (ACN)(LEE; LAI; SADRZADEH, 2013; OTERO-FERNÁNDEZ et al., 2013), metanol (MeOH), diclorometano (Diclme) (MICHELY; MEYER; MAURER, 2017), acetato de etila (Acet), e acetona (THOMAS et al., 2012), isolados e misturas de 2 a 5 solventes em triplicata, com volumes igualmente proporcionais e volume final de 1 ml.

O processo de extração foi conduzido utilizando a total circunferência de cada *spot* de amostra, contendo padrão + PI (200 ng), imersa em 1 ml de solvente orgânico, mais 500 μl de água + ac. Fórmico (pH 3), seguido de agitação branda em vórtex por 40 min, centrifugação à 14.000 rpm por 5 min, recolhimento de 700 μl do solvente sobrenadante e transferido para *vials* submetidos à secagem em fluxo de nitrogênio. Por fim, ressuspensão dos analitos em 50 μl do gradiente cromatográfico inicial e injeção no equipamento.

Após aquisição e análise dos dados, utilizando a área relativa na resposta e o *p*-valor das variáveis, constatou-se que o grupo de anfetaminas possuía uma afinidade maior por solventes menos apolares, como misturas contendo acetona, enquanto COC e seus produtos afins retornavam melhores resultados quando o solvente extrator era mais apolar como ACN. O THCCOOH e THCCOOH-glu foram pouco extraídos em praticamente todos os solventes utilizados, obtendo o melhor resultado quando utilizado uma mistura contendo iguais proporções de ACN e MeOH contendo acetona. A utilização de Acet e Diclme demostraram uma interação negativa nas misturas, reduzindo a eficiência da extração. Os valores obtidos são demonstrados na tabela 6.

Tabela 6 - Coeficientes de regressão estimados como ponto ótimo.

Substância	Porção de solvente	Coef	Ep de coef	Valor-	Valor- p	Vif
ANF	ACN* ACN *MeOH*acetona	1827	362	5,04	0,000	367,27
FEM	ACN *acetona	0,61	0,1	4,61	0,000	2,42
MDMA	ACN * MeOH	55,0	19,7	2,79	0,010	5,02
MDA	ACN * ACN * MeOH *acetona	5320	1674	3,18	0,004	2,00
Meta	ACN * ACN * MeOH *acetona	-3067	1167	-2,63	0,015	303,62
сос	MeOH *acetona	- 131,6	25,6	-5,14	0,000	2,76
BZE	ACN *acetona	-60,1	27,6	-2,18	0,037	2,55
EME	MeOH *acetona	-11,3	2,5	-4,41	0,000	2,66
AEME	ACN *Acet	-3,4	0,7	-4,58	0,000	2,81
CET	Acet*acetona	-26,4	10,1	-2,62	0,014	2,48
ТНССООН	MeOH * MeOH *Acet*acetona	-3578	413	-8,67	0,000	2,13
THCCOOH-glu	MeOH *acetona	-85,8	20,5	-4,18	0,000	44,99

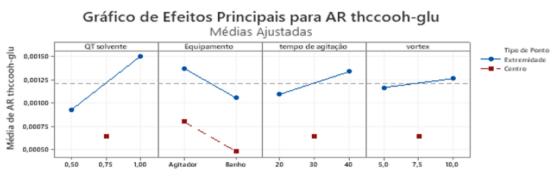
Legenda: Acetonitrila (ACN), metanol (MeOH), acetato de etila (Acet).

Desta forma, visando um setor ótimo para extração da maioria dos analitos e priorizando aqueles que possuíam baixo valor extraído, uma mistura de ACN:MeOH:Acetona (1:1:1) foi escolhida como solvente de extração, incluindo 200 μ l de H_2O + ác. fórmico, uma vez que sua presença se mostrou eficiente no processo de extração dos analitos do papel.

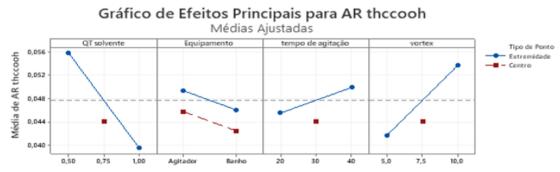
Logo após escolha do melhor solvente para extração, utilizando a mesma ferramenta estatística, foi conduzido um experimento fatorial em busca da melhor condição para extração. Os fatores escolhidos para otimização foram o volume de solvente extrator (500 μl e 1000 μl), equipamento utilizado (agitador mecânico ou sonicador), tempo de agitação/sonicação (20 e 40 min) e tempo de vórtex (5 e 10 min). Todos em triplicata e 3 pontos centrais.

Assim como o experimento de misturas, o critério de aceitação da melhor combinação foi aquele que melhor extraísse a maior parte dos analitos. Assim, identificando os pontos relevantes pela análise do *p*-valor das combinações, a melhor combinação foi 500 µl de solvente extrator, 40 min em agitador mecânico, seguido de 5 mins em vórtex. As Figuras de 6 a 11 apresentam o resultado das análises dos parâmetros otimizados. Os pontos azuis demostram a resposta obtida por cada parâmetro. Aqueles pontos acima da linha tracejada, indicam a melhor condição para a extração e, quanto maior a inclinação da reta azul, maior o impacto do parâmetro na extração.

Figura 6 - Gráfico de eventos principais, obtidos pelo Minitab, de canabinoides do estudo



Todos os termos exibidos estão no modelo.



Todos os termos exibidos estão no modelo.

Figura 7 - Gráfico de eventos principais, obtidos pelo Minitab, de cocaína (COC) e ecgonina metil éster (EME).



Médias Ajustadas

Official Sajustadas

Tipo de Pento

Extremidade

Ocentro

Todos os termos exibidos estão no modelo.

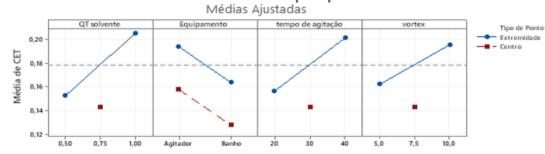
Gráfico de Efeitos Principais para EME

Médias Ajustadas QT solvente Tipo de Ponto Extremidade - Centro Média de EME 1,0 0,9 5,0 0,50 0,75 Banho 10,0 Agitador 20 40 7,5

Todos os termos exibidos estão no modelo.

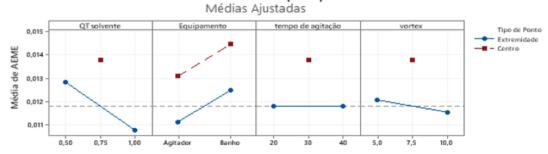
Figura 8 - Gráfico de eventos principais, obtidos pelo Minitab, de cocaetileno (CET) e anidro ecgonina (AEME).

Gráfico de Efeitos Principais para CET



Todos os termos exibidos estão no modelo.

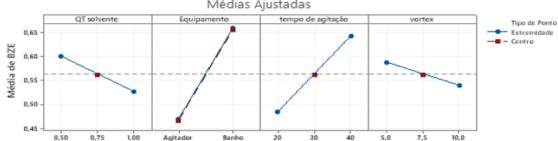
Gráfico de Efeitos Principais para AEME



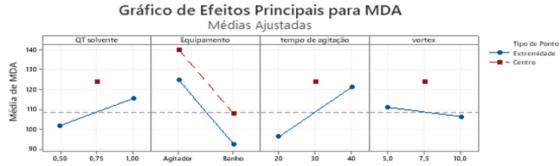
Todos os termos exibidos estão no modelo.

Figura 9 - Gráfico de eventos principais, obtidos pelo Minitab, de benzoilecgonina (BZE) e MDA.



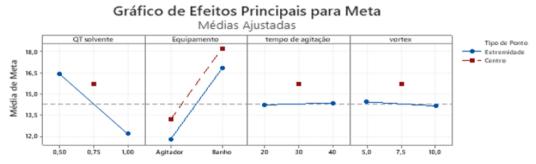


Todos os termos exibidos estão no modelo.

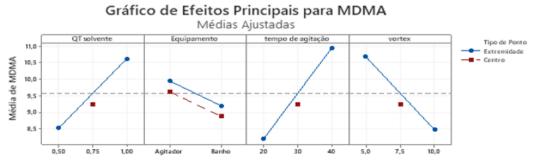


Todos os termos exibidos estão no modelo.

Figura 10 - Gráfico de eventos principais, obtidos pelo Minitab, de metanfetamina (Meta) e MDMA.



Todos os termos exibidos estão no modelo.



Todos os termos exibidos estão no modelo.

Figura 11 - Gráfico de eventos principais, obtidos pelo Minitab, de anfetamina e femproporex (FEM).



5,0

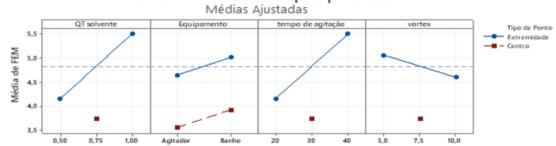
10,0

0.75 Todos os termos exibidos estão no modelo.

1,00

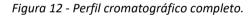
Agitador

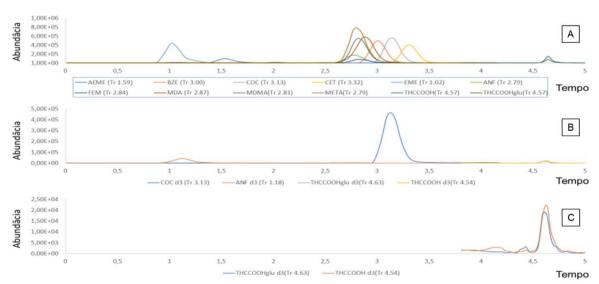
Gráfico de Efeitos Principais para FEM



Todos os termos exibidos estão no modelo.

O cromatograma completo após a otimização pode ser visto na Figura 12.





Legenda: A - Anidro ecgonina metil éster (AEME), Benzoilecgonina (BZE), cocaína (COC), cocaetileno (CET), ecgonina metil éster (EME), anfetamina (ANF), femproporex (FEM), metanfetamina (META). B - Deuterados, C – Deuterados em maior escala.

Após o processo de extração escolhido, seletividade e limite de detecção foram conduzidos para identificar a efetividade do método cromatográfico. Em relação a seletividade, não houve picos presentes nos tempos de retenção. Quanto aos limites, EME, THCCOOH e THCCOOH-glu não apresentaram sinal analítico em concentrações inferiores a 100 ng/ml, sendo um limite muito alto para condução da validação, além da EME não interagia com a coluna cromatográfica depois de extraída, saindo no tempo morto da coluna. Assim, EME, THCCOOH e THCCOOH-glu foram retirados do plano de validação atual.

Como os analitos de menor recuperação foram retirados, o tempo de corrida foi reduzido. Como os analitos restantes tinham tempo de retenção até 4 min, o tempo total de corrida foi reduzido para 5.0 min, deixando 1.5 min de passagem do gradiente para limpeza da coluna.

As amostras autênticas coletadas não foram utilizadas no presente estudo. As amostras foram armazenadas em potes de fundo reto e colocadas no *freezer*. Por conta do fechamento dos espaços não essenciais, o laboratório também foi fechado, reduzindo o tempo total disponível para a continuidade do estudo e análises destas amostras após validação dos parâmetros necessários.

4.3 Validação

4.3.1 *Seletividade*

O parâmetro de seletividade foi conduzido utilizando os analitos presentes na tabela 7, todos na concentração de 5000 ng/ml. Foram utilizados para o estudo substâncias lícitas ou ilícitas, com padrões disponíveis no laboratório de análises clínicas e de grande conhecimento de utilização pela população brasileira. Como demonstrado na Tabela 7, não foram detectados interferentes endógenos, utilizando 10 fontes de amostras negativas diferentes, ou exógenos nos tempos de retenção dos padrões e padrões internos. Também é possível ver que não há interferência no sinal analítico entre o sinal do padrão interno na

concentração de 300 ng e os analitos, tão pouco interferência dos padrões à 2000ng, no sinal dos padrões internos.

Tabela 7 - Substâncias exógenas utilizadas na seletividade do método.

Classe de substâncias:	Substâncias				
Estimulantes comuns	Cafeína, nicotina.				
Narcóticos	Morfina, codeína, metadona				
Alucinógenos	Lsd, dimetil-triptamina (dmt).				
Barbitúricos	Senobarbital, secobarbital, pentobarbital,				
Antidepressivos	Paroxetina, fluoxetina, norfluxetina, sertralina,				
	amitriptilina, nortriptilina, imipramina, desimipramina				
Benzodiazepínicos	Midazolam, nitrazolam, nordiazepam, alparazolam,				
	aminoclonazepam, clonazepam, diazepam.				
Otc e uso veterinário.	Timolol, salbutamol, triancinolona, fenazona,				
	betametazona, pseudoefedrina, dibucaína, ácido				
	niflúmico, teobromina, terbutalina, amiodarona, ácido				
	salicílico, ácido tranexâmico, bupivacaína, benzocaína,				
	metil- predinisolona, flunixina, cortisona, diclofenaco de				
	sódio, clembuterol, tolmetina, fenil propanolona,				
	cetoprofeno, hidroclorotiazida, cimetidina, diltiazem,				
	escopolamina, predinisolona, enalapril, haloperidol,				
	dipirona, atenolol, paracetamol, cimetidina, cetamina e				
	enalapril.				

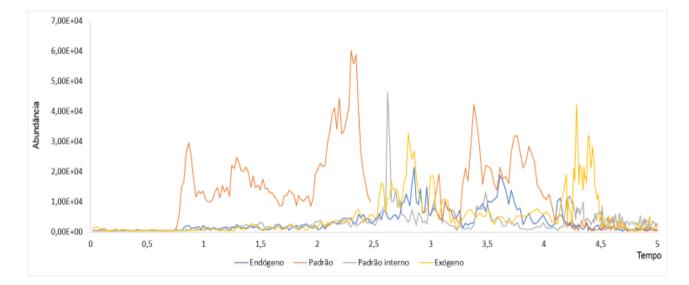


Figura 13 - Cromatograma das substâncias utilizadas na seletividade.

4.3.2 Linearidade

Seguindo o guia de validação, uma ampla faixa de linearidade preparada, variando de 10 ng/ml (LoQ) a 1000 ng/ml. Para o estudo proposto, esta faixa atende as concentrações encontradas nas amostras de estudo. O modelo mostrou-se linear na faixa escolhida, como mostrado na Tabela 8.

Como já indicado em artigos anteriores (JAIN et al., 2017; LEE; LAI; SADRZADEH, 2013; MICHELY; MEYER; MAURER, 2017), e nos guias de validação, curvas com amplitudes abrangendo casas decimais e milesimais possuem perfil heterocedástico. Para comprovar, o teste F foi conduzido para todos os analitos de estudo, onde os valores obtidos foram maiores que os valores tabelados, o que comprova o modelo, sendo necessário o emprego dos mínimos quadrados ponderados. O melhor modelo para cada analito foi avaliado e apresentado na Tabela 8.

Tabela 8 - equações das curvas de calibração da linearidade, valor de ponderação e correlação da reta.

Analito	Ponderação	Equação da curva	R ²
Anfetamina	1/x	Y = 0,0005x + 0,0044	0.9968
Femproporex	1/x ²	Y = 0.0021x + 0.0022	0.9909
MDMA	1/x ²	Y = 0.0039x + 0.0050	0.9904

MDA	1/x ²	Y = 0,0009x + 0,0013	0.9913
Metanfetamina	1/x ²	Y = 0.0017x + 0.0052	0.9916
AEME	1/x	Y = 0.0001x + 0.0008	0.9920
Benzoilecgonina	1/x ²	Y = 0.0026x + 0.0159	0.9919
Cocaína	1/x ²	Y = 0.0038x + 0.0264	0.9949
Cocaetileno	1/y ²	Y = 0,0027x + 0,0033	0.9904

Legenda: Fator de correlação (R2).

4.3.3 Carryover

O estudo de *carryover* foi conduzido ao longo de todo o processo de validação, em especial, nos pontos mais altos da curva. Não foram observados picos nos tempos de retenção dos analitos, mesmo após concentrações de 1000 ng/ml e 1500 ng/ml, seguidas de injeções de fase móvel.

4.3.4 Limite de detecção e quantificação

O limite de quantificação (LoQ) foi escolhido pela diluição até a menor concentração que pudesse ser detectada, respeitando o coeficiente de variação (CV) <20% e precisão de ±20% utilizando amostras negativas de 3 diferentes fontes em triplicata, dopadas.

Para os fins deste estudo, o limite de detecção foi firmado em 10 ng/mL assim como o LOQ, visto que não há necessidade de detecção de concentrações menores que o controle baixo do método (30 ng/mL), visto é esta será a menor concentração quantificada para condução da estabilidade dos analitos.

A exatidão, quantificação e a variação entre as replicatas do LoQ são demonstradas na Tabela 9.

Tabela 9 - Concentração de amostras no LOQ do método quantificados.

Analitos	Concentração (ng/ml)	bias	CV (n= 9)
Anfetamina	10.1	3.7	8.6
Femproporex	9.9	-0.1	12.0
MDMA	10.2	2.7	18.9
MDA	10.7	7.2	15.9
Metanfetamina	10.3	3.7	8.6

AEME	9.7	-2.1	12.6
BZE	9.9	-0.8	9.4
COC	10.4	4.2	2.7
CET	9.6	-3.7	4.8

Legenda: CV: coeficiente de variação.

4.3.5 Precisão e exatidão

Os valores de precisão e exatidão demostrados na tabela 10 demonstram os resultados obtidos do método. Os valores de cada analito obedecem aos critérios de aceitação estipulados pelo guia de validação, aceitando variação de até 20% para os controles baixo, médio e alto na precisão inter e intra-ensaio.

Todos os analitos utilizados para validação (anfetaminas, COC, BZE, AEME, CET) se encontram dentro dos critérios de aceitação nos controles baixo, médio, alto.

Na exatidão, a razão entre a concentração experimental/concentração teórica, multiplicado por 100. Para critério de aceitação, a variação entre os valores obtidos deve estar em um intervalo de ±20%.

Nos 3 níveis de concentração, a variação não ultrapassou o valor de aceitação, sendo exibidos na tabela 10 os valores de maior variação dentre as 5 curvas utilizadas para calcular a precisão do método.

Tabela 10 - Precisão e exatidão do método cromatográfico.

	Precisão			
Analito	Concentração	Inter ensaio	Intra ensaio	Exatidão
	(ng/mL)	(RSD%, n = 3,	(RSD%, n =5)	(%, n = 3)
		dias = 5)		
Anfetamina	30	10,9	5,3	-2,9
	400	4,4	7,8	-16,2
	800	14,5	8,2	8,6
Femproporex	30	6,8	8,9	-14,1
	400	10,6	7,1	-10,4
	800	13,9	8,8	14,6
MDMA	30	16,1	10,5	-19,7
	400	10,2	8,0	-18,3

	800	14,4	10,2	3,6
	30	10,7	9,2	11,5
MDA	400	6,7	8,7	-17,5
	800	10,2	9,3	11,7
Metanfetamina	30	12,2	7,9	-2,5
Metametamma	400	13,8	10,5	-13,1
	800	5,9	5,0	8,0
AEME	30	12,0	9,6	13,2
ALIVIL	400	9,8	8,6	-11,9
	800	8,1	7,0	6,5
Benzoilecgonina	30	11,6	7,3	-13,8
	400	5,4	5,9	-4,2
	800	5,2	8,3	14,3
Cocaína	30	7,6	5,4	-18,7
	400	2,5	8,6	-16,7
	800	5,5	7,3	14,1
Cocaetileno	30	7,9	5,3	-19,7
	400	2,0	7,6	-13,4
	800	8,0	7,5	13,4

4.3.6 Efeito matriz e recuperação

Para validação deste parâmetro, foi utilizado o artigo de MATUSZEWSKI; CONSTANZER; CHAVEZ-ENG, 2003, uma vez que utilizando 2 concentrações (CB 30 ng/mL e CA 800 ng/mL) à comparação entre 3 grupos, A, B e C, onde A consiste na injeção dos analitos e PI em fase móvel, sem passar por extração; B consiste no extrato final da matriz branca e posterior inserção dos analitos no extrato e; C consiste na extração da amostra com analitos adicionados antes da extração. Assim temos que a comparação dos grupos "B/A x 100" nos mostra o efeito matriz, enquanto a comparação dos grupos "C/B x 100" denota a recuperação no processo de extração, todos em porcentagens. Os resultados estão demostrados na Tabela 11.

A anfetamina obteve o maior valor de efeito matriz entre os valores de CB. Esse valor alto indica uma superexpressão de compostos contidos na matriz no sinal analítico obtido. Esta

interferência de sinal é encontrada também no MDMA e metanfetamina, diferentemente do que ocorre com femproporex e MDA, onde os interferentes da matriz suprimiram o sinal analítico. Dentro os derivados de COC, o sinal tende a ser suprimido, em principal no sinal da AEME e BZE.

O efeito matriz visto no controle alto foi menos impactante para as anfetaminas, sendo maior na metanfetamina. O mesmo não acontece com os derivados de COC, onde a supressão da AEME é maior. COC e BZE são menos afetadas pela matriz no CA e o cocaetileno tem seu sinal potencializado da mesma forma que o controle baixo.

A recuperação não possui uma variação aceitável, desde que o valor recuperado atenda os parâmetros de precisão e exatidão. Todos os analitos possuem uma recuperação menor que 90%, exceto pelo MDA onde, no CB, há uma super recuperação, provavelmente um enriquecimento do sinal analítico no momento da validação, uma vez que sua recuperação em seu CA foi menor que 25%.

De modo geral, a recuperação no controle baixo foi maior que a recuperação vista em CA. Uma possibilidade para isso pode ser a interferência da matriz ser muito mais perceptível em concentrações baixas.

Os valores de recuperação foram próximos dos valores obtidos no trabalho de LEE; LAI; SADRZADEH, 2013, utilizado para detecção de múltiplos analitos, conforme apresentado na Tabela 11.

Tabela 11 - Valores de recuperação e efeito matriz obtidos com análise de dried urine spots dos controles baixo e alto.

Analitos	Efeito Matriz		Recuperação	
-	СВ	CA	СВ	CA
Anfetamina	229,5	73,5	44,4	14,8
Femproporex	64,3	85,7	77,7	16,4
MDMA	135,8	121,5	47,4	15,1
MDA	56,9	61,6	147,2	21,0
Metanfetamina	137,9	158,2	50,1	12,7
AEME	68,6	48,5	36,6	8,7
BZE	59,5	62,2	35,5	7,93

COC	101,2	95,8	36,1	8,4
Cocaetileno	124,9	138,8	47,3	9,4

Legenda: CB (Controle baixo – 30ng/mL) e CA (Controle alto – 800 ng/mL).

4.3.7 Estabilidade

A estabilidade das amostras foi avaliada em quatro condições de armazenamento, sendo 40°C, simulando um transporte por empresas de envios; temperatura ambiente, por volta de 24°C; armazenamento em geladeira a 4°C e; armazenado à -20°C, em freezer. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata por 32 dias (0, 1, 3, 5, 6, 7, 10, 12, 32), sendo comparadas com o a leitura das amostras no tempo "0" e controles novos, utilizando o percentil e avaliados pelo software Minitab ver. 19.

Como critério de aceitação, segundo o guia de validação, as amostras são consideráveis estáveis quando a variação da concentração encontrada comparada com o tempo "0" estão dentro do percentual de ±20% (linhas tracejadas no gráfico). Quanto maior o número de pontos disponíveis para a análise ao longo do tempo, melhor é ajustado o modelo gráfico da estabilidade, ou seja, a angulação da reta gerada para predizer a estabilidade é corrigida, conforme os pontos das análises são adicionados. As linhas azuis e vermelhas no gráfico (lotes) indicam o CB e o CA e como seus perfiz de degradação se comportam. Quando os dois lotes possuem o mesmo ponto de partida e perfil de degradação, ambas as linhas são substituídas por uma única linha preta.

Pensando na facilidade de transporte e armazenamento de uma amostra biológica em um papel absorvente seco, a estabilidade foi estudada visando em principal, a temperatura em que estas amostras normalmente são submetidas desde sua coleta, até sua análise (MUKAI et al., 2019).

Em suma, todos os analitos se mostraram estáveis dentro dos 32 dias do estudo. As anfetaminas tiveram o perfil de degradação mais consistente entre os dois níveis estudados. Os derivados de COC demonstraram melhor estabilidade no CA, e no CB uma interferência maior das condições submetidas.

Conforme Figura 14, a anfetamina possui uma estabilidade muito mais consistente em alta temperatura, refrigerada e baixa temperatura, onde as concentrações avaliadas não apresentaram uma angulação de reta perceptível, o que leva a acreditar que nestas condições, a anfetamina se mantém estável por tempo maior que o tempo estudado. Em

temperatura ambiente, as duas concentrações apresentam um aumento de concentração. Possivelmente por conta da extração de outros compostos que aumentam o sinal analítico.

O femproporex apresenta um perfil de queda, indicando degradação ou extração de interferentes supressores de sinal, em temperaturas extremas (40°C e -20°C). Já nas temperaturas intermediárias do estudo (ambiente e refrigeração), o sinal analítico apresenta um leve enriquecimento, como mostrado na Figura 15.

O sinal analítico proveniente da MDMA demonstrado na Figura 16, apresenta uma tendência de elevação em temperaturas mais elevadas, que pode ser em decorrência da extração de componentes da matriz que enriquecem o sinal analítico. Temperaturas mais baixas mantem melhor a concentração esperada, visto que quanto menor temperatura, menor é a inclinação da degradação da MDMA.

A MDA não possui uma clara tendência de degradação ou enriquecimento entre as temperaturas do estudo, como apresentado na Figura 17. Entretanto, é possível ver a probabilidade de aparecerem pontos fora do esperado (*outlier*), é maior em temperaturas mais elevadas como 40°C.

Com a metanfetamina apresentada na Figura 18, os perfis encontrados nas quanto temperaturas foi muito semelhante, apresentando uma leve elevação na linha de ajuste, exceto no CB das amostras em temperatura ambiente. Devido a influência da matriz neste analito, a ação de supressão de sinal no decorrer das análises cromatográficas foi mais impactante nestas amostras.

Comparadas a amostras reais de urina, CLAUWAERT et. al., 2001, constatou que amostras de MDA e MDMA em urina são estáveis em temperatura ambiente por aproximadamente 13 semanas, podendo chegar a 21 semanas em baixas temperaturas. A anfetamina tende a ser estável em urina por 6 meses em ambientes refrigerados, não sendo estável por mais de 7 dias em temperaturas mais elevadas (JIMENEZ et al., 2006).

Em DUS, poucos trabalhos avaliaram a estabilidade em longo período de armazenamento. No trabalho de LEE; LAI; SADRZADEH, 2013, foi conduzido um estudo com anfetamina, MDA, MDMA, MDEA e metanfetamina na concentração de 100 ng/mL, ao longo de 30 dias, em temperatura ambiente. Nestas condições, não foram encontradas variações na concentração superior a ±15%, demonstrando estabilidade de transporte e armazenamento, mas não avaliando concentrações menores ou condições adversas.

As amostras de AEME (Figura 19) se mostraram estáveis no decorrer das análises. As amostras submetidas a temperaturas mais altas apresentaram menores variações entre as medições. A angulação da linha de ajuste das temperaturas mais altas também possui uma inclinação mais suave. Em temperaturas mais baixas, o ângulo das retas é maior, sendo que a refrigeração apresenta condições que elevam o sinal analítico. No *freezer*, é possível identificar a tendência à degradação do analito.

A BZE (Figura 20) apresentou seu pior resultado em temperas maiores, onde a queda da concentração foi mais evidente e, na temperatura ambiente, o CB utilizado já era detectado abaixo da concentração inicial. Nas temperaturas mais baixas, a variação entre as medições ficou menos evidente e uma linha ajustada menos angulada, apesar nas amostras de CB refrigerado possuírem uma queda extremamente acentuada.

As concentrações de COC (Figura 21) foram estáveis no período de estudo, o pior cenário obtido foi da concentração baixa em temperatura elevada, por volta de 40°C. Nas concentrações mais baixas e ambiente, as angulações da linha de ajuste são mais suaves e as medições possuem uma variação menor entre os dias.

O cocaetileno foi a substância que apresentou a maior estabilidade dentre todos os compostos (Figura 22), nas quatro temperaturas analisadas. Devido aos *outliers* presentes nas medições, as angulações encontradas são diferentes. Mesmo assim, as retas permanecem dentro dos limites inferior e superior de ±20%, sendo necessárias mais medições para tem uma ideia clara da degradação do analito.

Os derivados de COC são largamente relatados na literatura por sua instabilidade em amostras biológicas aquosas. Na urina, valores de pH elevados (acima de 7) favorecem a hidrólise dos grupamentos ésteres da molécula de COC. Temperaturas elevadas favorecem reações de hidrólise, o que faz crucial a manutenção de amostras de urina sob refrigeração constante (MOODY et al., 1999).

Alguns trabalhos como o de SADLER SIMÕES; CASTAÑERA AJENJO; DIAS, 2018, destacam que assim que as amostras são colocadas em DBS, o período de estabilidade de COC e BZE é elevado em temperatura ambiente, refrigeração e congelamento, entretanto, não impede que a conversão de COC em BZE seja menor que 15% após 45 dias. As amostras de DUS denotam um melhor ambiente de acondicionamento. Outras substâncias como AEME e CET não foram vistas em trabalhos utilizados até o momento desde estudo.

As amostras de THCCOOH e THCCOOH-glu não foram analisadas neste estudo. Foi visto que no decorrer da otimização do método, os valores recuperados eram muito pequenos e, em concentrações menores que 100 ng/mL, o sinal analítico era suprimido ou não detectável. Esta condição era agravada conforme passado o tempo de secagem de amostra, como demonstrado também no trabalho de GAUGLER et al., 2019, onde o sinal do THOCOOH não foi detectado após 3h, mesmo em amostras na concentração de 2000 ng/mL.

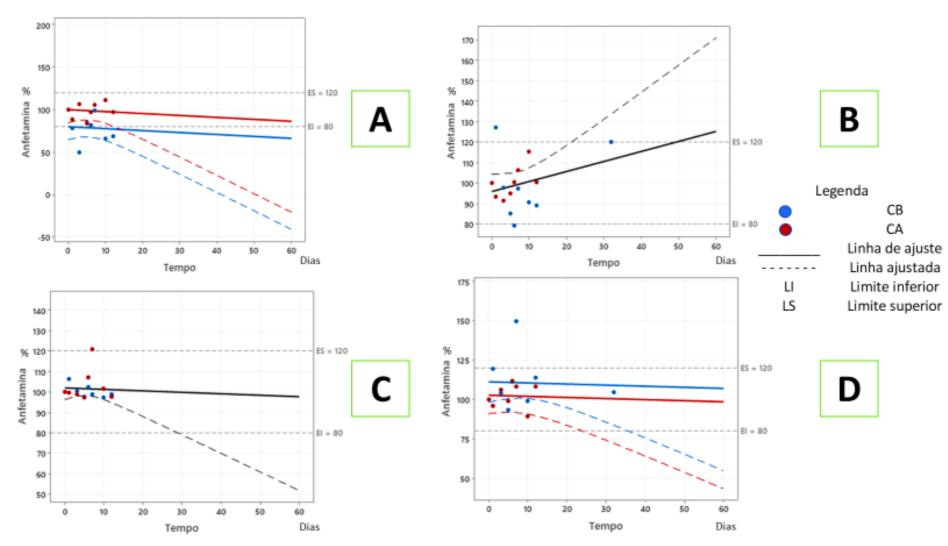


Figura 14 - Gráfico 4 em 1 das condições de estabilidade da anfetamina.

Legenda: A - 40°C. B - Temperatura ambiente. C - Geladeira. D - Freezer.

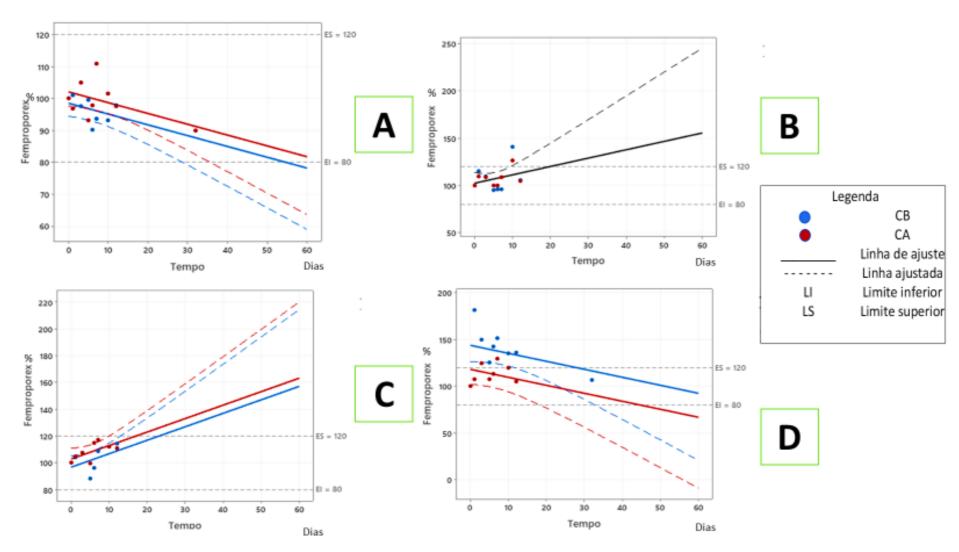


Figura 15 - Gráfico 4 em 1 das condições de estabilidade de femproporex.

Legenda: A - 40°C. B - Temperatura ambiente. C - Geladeira. D - Freezer.

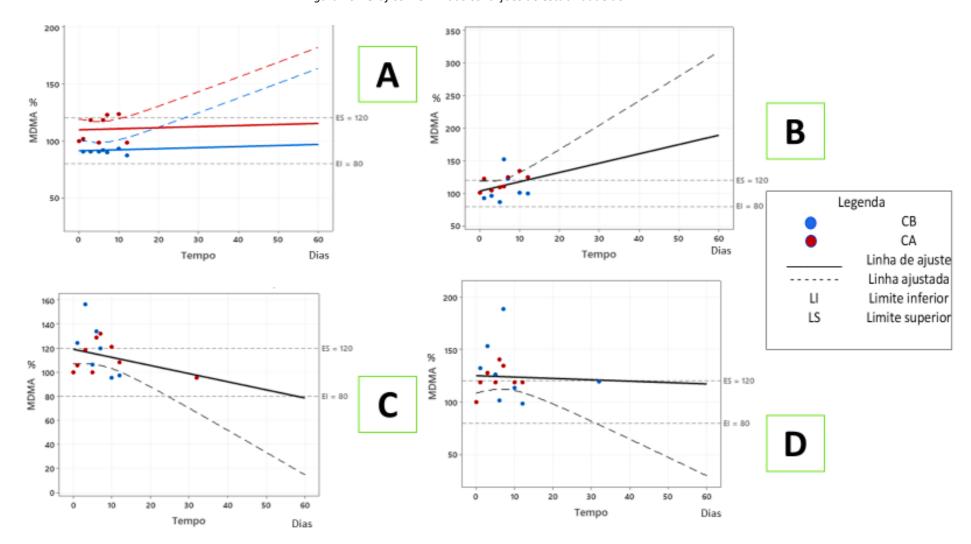


Figura 16 - Gráfico 4 em 1 das condições de estabilidade do MDMA.

Legenda: A - 40°C. B - Temperatura ambiente. C - Geladeira. D - Freezer.

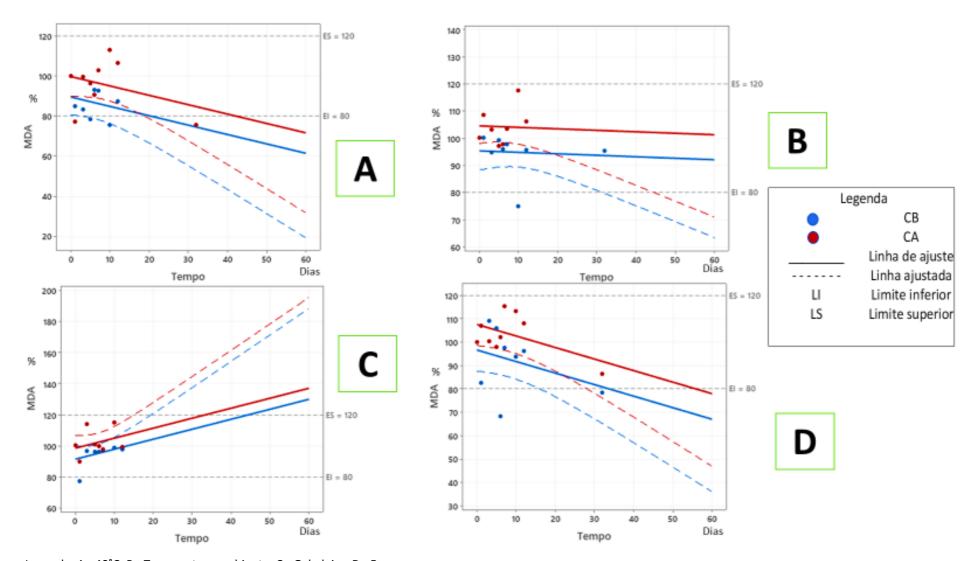


Figura 17 - Gráfico 4 em 1 das condições de estabilidade do MDA.

Legenda: A - 40°C. B - Temperatura ambiente. C - Geladeira. D - Freezer.

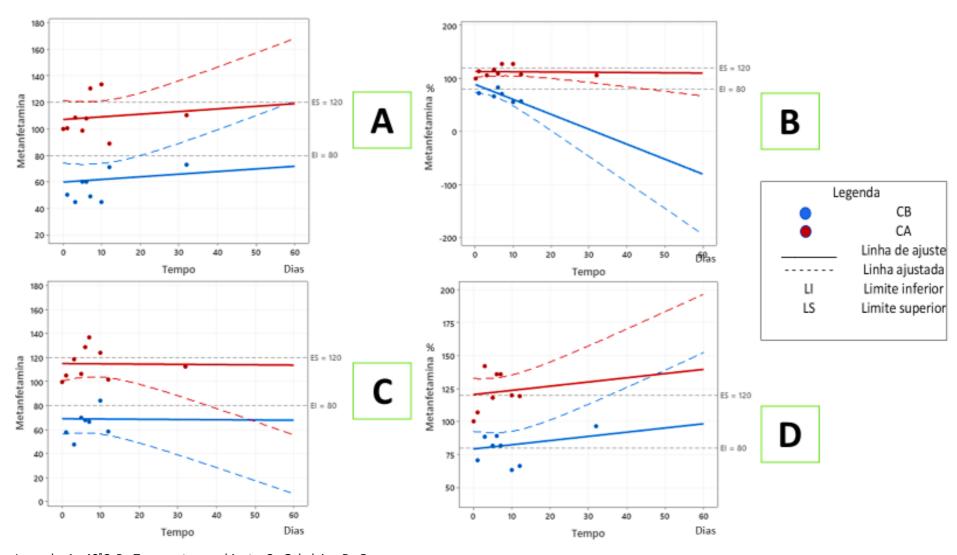


Figura 18 - Gráfico 4 em 1 das condições de estabilidade da metanfetamina.

Legenda: A - 40°C. B - Temperatura ambiente. C - Geladeira. D - Freezer.

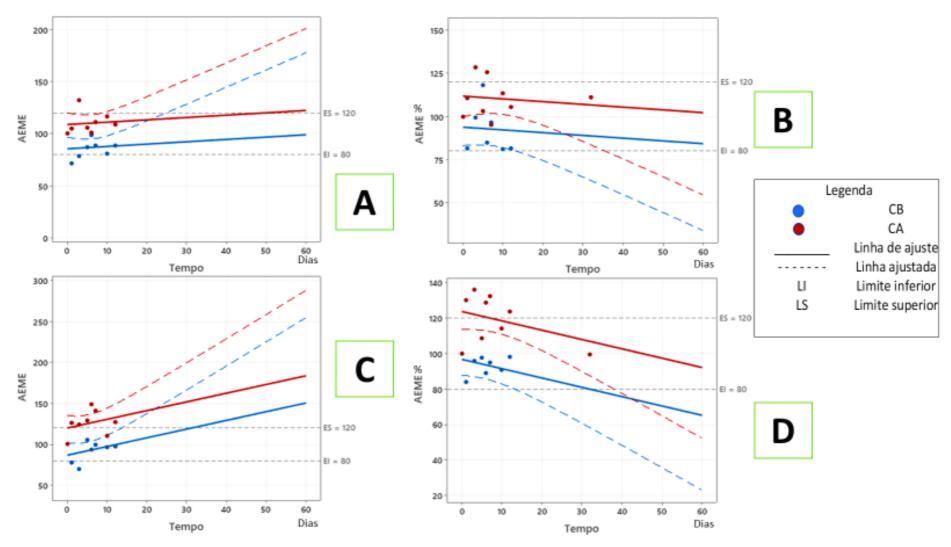


Figura 19 - Gráfico 4 em 1 das condições de estabilidade da AEME.

Legenda: A - 40°C. B - Temperatura ambiente. C - Geladeira. D - Freezer. Anidro ecgonina metil éster (AEME).

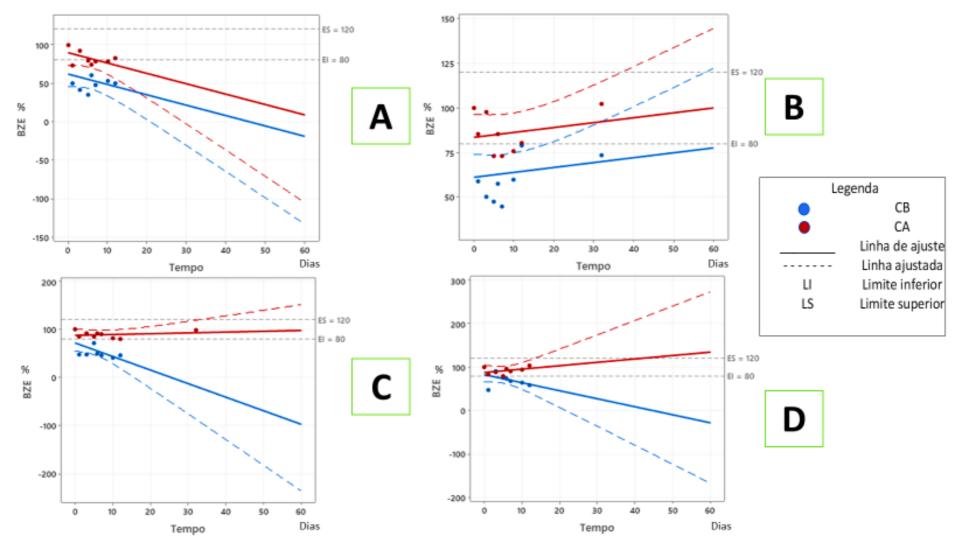


Figura 20 - Gráfico 4 em 1 das condições de estabilidade da benzoilecgonina.

Legenda: A - 40°C. B - Temperatura ambiente. C - Geladeira. D - Freezer. Benzoilecgonina (BZE).

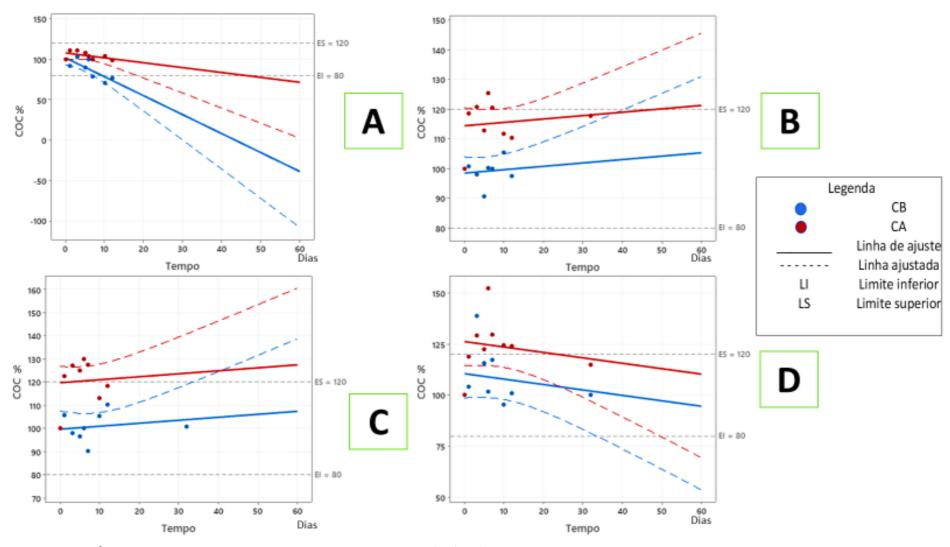


Figura 21 - Gráfico 4 em 1 das condições de estabilidade da cocaína.

Legenda: A - 40°C. B - Temperatura ambiente. C - Geladeira. D - Freezer. Cocaína (COC).

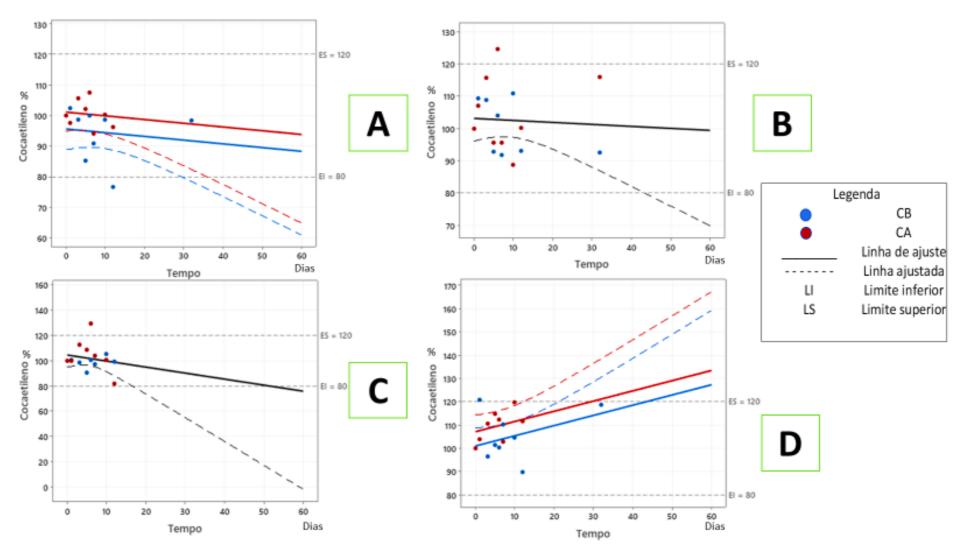


Figura 22 - Gráfico 4 em 1 das condições de estabilidade do cocaetileno.

Legenda: A - 40°C. B - Temperatura ambiente. C - Geladeira. D - Freezer.

5 Conclusão

O aumento do consumo de substâncias psicoativas no mundo e a crescente demanda de análises toxicológicas, levam à necessidade de novas formas de coletar, transportar, armazenar e analisar as diversas amostras com o menor tempo e custos. A utilização de DUS possibilita uma coleta fácil e rápida, além de aumentar a estabilidade dos compostos contidos nele. O método desenvolvido utiliza pouco solvente, atendeu às especificações de validação e manteve a estabilidade das anfetaminas, COC, BZE, AEME e CET, mesmo em temperaturas altas, por pelo menos 32 dias. O THCCOOH e THCCOOH-glu são moléculas não muito compatíveis com a técnica, uma vez que estas substâncias tendem a ficar agregadas no papel. A utilização do DUS é uma ótima alternativa para o transporte de e armazenamento de amostras toxicológicas, sendo barata, prática e econômica para os passos das análises.

6 Referências bibliográficas

ADACHI, J., KUMAR, C., ZHANG, Y., OLSEN, J. V., & MANN, M. The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins. **Genome biology**, 7(9), 1-16. 2006.

ADAMS, I. B., & MARTIN, B. R. Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans. **Addiction**, 91(11), 1585-1614. 1996.

ANGOA-PÉREZ, M., ANNEKEN, J. H., & KUHN, D. M. Neurotoxicology of synthetic cathinone analogs. **Neuropharmacology of New Psychoactive Substances (NPS)**, 209-230. 2016.

AYRE, A. P., CHAUDHARI, P. S., SHAIKH, J., JAGDALE, S., & AGRAWAL, O. Dried matrix spoting-an innovative sample preparation tool in bioanalysis. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, 9(9), 3597-3607. 2018.

BASTOS, F. I. P. M., VASCONCELLOS, M. T. L. D., DE BONI, R. B., REIS, N. B. D., & COUTINHO, C. F. D. S. III Levantamento Nacional sobre o uso de drogas pela população brasileira. 2017.

BORDIN, D., MONEDEIRO, F. F. S. S., CAMPOS, E., ALVES, M., BUENO, L., & MARTINIS, B. Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. **Sci Chromatogr**, 7(2), 125-43. 2015.

BRASIL. Portaria n. 344, de 12 de maio de 1998. Ministério da Saúde, [S. I.], 1998.

BUTZBACH, D. M. The influence of putrefaction and sample storage on post-mortem toxicology results. Forensic science, medicine, and pathology, 6(1), 35-45. 2010.

CARRERA, M. R. A., MEIJLER, M. M., & JANDA, K. D. Cocaine pharmacology and current pharmacotherapies for its abuse. **Bioorganic & medicinal chemistry**, 12(19), 5019-5030. 2004.

CLAUWAERT, K. M., VAN BOCXLAER, J. F., & DE LEENHEER, A. P. Stability study of the designer drugs "MDA, MDMA and MDEA" in water, serum, whole blood, and urine under various storage temperatures. **Forensic science international**, 124(1), 36-42. 2001.

COHEN, P. A. Imported fenproporex-based diet pills from Brazil: a report of two cases. **Journal of general internal medicine**, 24(3), 430. 2009.

CORTESE, S., ADAMO, N., DEL GIOVANE, C., MOHR-JENSEN, C., HAYES, A. J., CARUCCI, S., CIPRIANI, A. Comparative efficacy and tolerability of medications for attention-deficit hyperactivity disorder in children, adolescents, and adults: a systematic review and network meta-analysis. **The Lancet Psychiatry**, 5(9), 727-738. 2018.

CUYPERS, E., & FLANAGAN, R. J. The interpretation of hair analysis for drugs and drug metabolites. **Clinical Toxicology**, 56(2), 90-100. 2018.

DELABY, C., GABELLE, A., MEYNIER, P., LOUBIERE, V., VIALARET, J., TIERS, L., ... & LEHMANN, S. Development and validation of dried matrix spot sampling for the quantitative determination of amyloid β peptides in cerebrospinal fluid. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, 52(5), 649-655. 2014.

DINIS-OLIVEIRA, R. J., CARVALHO, F., DUARTE, J. A., REMIÃO, F., MARQUES, A., SANTOS, A., & MAGALHÃES, T. Collection of biological samples in forensic toxicology. **Toxicology Mechanisms and Methods**, 20(7), 363-414. 2010.

DINIS-OLIVEIRA, R. J., VIEIRA, D. N., & MAGALHÃES, T. Guidelines for collection of biological samples for clinical and forensic toxicological analysis. **Forensic sciences research**, 1(1), 42-51. 2016.

DZEJA, P., BOUATRA, S., AZIAT, F., MANDAL, R., GUO, A. C., & WILSON, M. R. The Human Urine Metabolome. **PloS one**, 8(9). 2013.

FENN, J. B., MANN, M., MENG, C. K., WONG, S. F., & WHITEHOUSE, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, 246(4926), 64-71. 1989.

FERNANDEZ, M. D. M. R., DE BOECK, G., WOOD, M., LOPEZ-RIVADULLA, M., & SAMYN, N. Simultaneous analysis of THC and its metabolites in blood using liquid chromatography—tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, 875(2), 465-470. 2008.

FERREIRA, P. E. M., & MARTINI, R. K. Cocaína: lendas, história e abuso. **Brazilian Journal** of Psychiatry, 23(2), 96-99. 2001.

FISCHER, D. C. Fundamentos de cromatografia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 42(2), 308-308. 2006.

FOSTER, B. C., ABRAMOVICI, H., & HARRIS, C. S. Cannabis and cannabinoids: kinetics and interactions. **The American journal of medicine**, 132(11), 1266-1270. 2019.

GAUGLER, S., AL-MAZROUA, M. K., ISSA, S. Y., RYKL, J., GRILL, M., QANAIR, A., & CEBOLLA, V. L. Fully automated forensic routine dried blood spot screening for workplace testing. **Journal of analytical toxicology**, 43(3), 212-220. 2019.

GOLDSTEIN, R. A., DESLAURIERS, C., BURDA, A., & JOHNSON-ARBOR, K. Cocaine: history, social implications, and toxicity: a review. **In Seminars in diagnostic pathology** (Vol. 26, No. 1, pp. 10-17). 2009.

GRÜNER, N., STAMBOULI, O., & ROSS, R. S. Dried blood spots-preparing and processing for use in immunoassays and in molecular techniques. Journal of visualized experiments: **JoVE**, (97). 2015.

HEAL, D. J., SMITH, S. L., GOSDEN, J., & NUTT, D. J. Amphetamine, past and present—a pharmacological and clinical perspective. **Journal of psychopharmacology**, 27(6), 479-496. 2013.

HÖGBERG, J., HANBERG, A., BERGLUND, M., SKERFVING, S., REMBERGER, M., CALAFAT, A. M., ... & HÅKANSSON, H. Phthalate diesters and their metabolites in human breast milk, blood or serum, and urine as biomarkers of exposure in vulnerable populations. **Environmental health perspectives**, 116(3), 334-339. 2008.

JAIN, R., QURAISHI, R., AMBEKAR, A., VERMA, A., & GUPTA, P. Dried urine spots for detection of benzodiazepines. **Indian journal of pharmacology**, 49(6), 465. 2017.

JAMWAL, R., TOPLETZ, A. R., RAMRATNAM, B., & AKHLAGHI, F. Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass-spectrometry for simple and simultaneous quantification of cannabinoids. **Journal of Chromatography B**, 1048, 10-18. 2017.

JIMENEZ, C., DE LA TORRE, R., VENTURA, M., SEGURA, J., & VENTURA, R. Stability studies of amphetamine and ephedrine derivatives in urine. **Journal of Chromatography B**, 843(1), 84-93. 2006.

KARCH, S. B. Cocaine: history, use, abuse. **Journal of the royal society of medicine**, 92(8), 393-397. 1999.

KERRIGAN, S. Sampling, storage and stability. Negrusz A, Cooper G editors. Clarke's Analytical Forensic Toxicology. London: **The Pharmaceutical Press**;, 346-54. 2013.

KIM, V. J., OKANO, C. K., OSBORNE, C. R., FRANK, D. M., MEANA, C. T., & CASTANETO, M. S. Can synthetic urine replace authentic urine to "beat" workplace drug testing?. **Drug testing and analysis**, 11(2), 331-335. 2019.

KOSTER, R. A., ALFFENAAR, J. W. C., GREIJDANUS, B., VANDERNAGEL, J. E., & UGES, D. R. Application of sweat patch screening for 16 drugs and metabolites using a fast and highly selective LC-MS/MS method. **Therapeutic drug monitoring**, 36(1), 35-45. 2014.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente "compatíveis". **Scientia chromatographica**, 1(2), 35-61. 2009.

LEE, Y., LAI, K. K., & SADRZADEH, S. H. Simultaneous detection of 19 drugs of abuse on dried urine spot by liquid chromatography—tandem mass spectrometry. **Clinical biochemistry**, 46(12), 1118-1124. 2013.

LIZOT, L. D. L. F., DA SILVA, A. C. C., BASTIANI, M. F., HAHN, R. Z., BULCÃO, R., PERASSOLO, M. S., ... & LINDEN, R. Simultaneous determination of cocaine, ecgonine methyl ester, benzoylecgonine, cocaethylene and norcocaine in dried blood spots by ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Forensic science international**, 298, 408-416. 2019.

MAQUILLE, A., GUILLARME, D., RUDAZ, S., & VEUTHEY, J. L. High-throughput screening of drugs of abuse in urine by supported liquid–liquid extraction and UHPLC coupled to tandem MS. **Chromatographia**, 70(9), 1373-1380. 2009.

MATA, D. C. Stability of 26 sedative hypnotics in six toxicological matrices at different storage conditions. **Journal of analytical toxicology**, 40(8), 663-668. 2016.

MATUSZEWSKI, B. K., CONSTANZER, M. L., & CHAVEZ-ENG, C. M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC–MS/MS. **Analytical chemistry**, 75(13), 3019-3030. 2003.

MEIER, U., DUSSY, F., SCHEURER, E., MERCER-CHALMERS-BENDER, K., & HANGARTNER, S. Cannabinoid concentrations in blood and urine after smoking cannabidiol joints. **Forensic science international**, 291, 62-67. 2018.

MICHELY, J. A., MEYER, M. R., & MAURER, H. H. Dried urine spots-A novel sampling technique for comprehensive LC-MSn drug screening. **Analytica chimica acta**, 982, 112-121. 2017.

MITCHELL, J. M., BOGENSCHUTZ, M., LILIENSTEIN, A., HARRISON, C., KLEIMAN, S., PARKER-GUILBERT, K., ... & DOBLIN, R. MDMA-assisted therapy for severe PTSD: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. Nature Medicine, 1-9. 2021.

MOFFAT, A. C., OSSELTON, M. D., WIDDOP, B., & WATTS, J. Clarke's analysis of drugs and poisons (Vol. 3). London: **Pharmaceutical press**. 2011

MOODY, D. E., MONTI, K. M., SPANBAUER, A. C., & HSU, J. P. Long-term stability of abused drugs and antiabuse chemotherapeutical agents stored at – 20° C. **Journal of analytical toxicology**, 23(6), 535-540. 1999.

MUKAI, Y., MINAMI, R., DOKI, K., INOTSUME, N., & TODA, T. Interior Temperature and Relative Humidity of an Envelope During Mail Transport by the Japan Post in the Summer: Preliminary Study for a Stability Test of Dried Blood Spot Samples Sent as Regular Mail. **Therapeutic drug monitoring**, 41(5), 628-633. 2019.

NAPPO, S. A. Consumption of anorexigenic amphetamine-like drugs (diethylpropion, fenproporex and mazindol) and of d, 1-fenfluramine in Brazil during the years of 1988 and 1989. **Pharmacoepidemiology and Drug Safety**, 5(1), 19-25. 1996.

OTERO-FERNÁNDEZ, M., COCHO, J. Á., TABERNERO, M. J., BERMEJO, A. M., BERMEJO-BARRERA, P., & MOREDA-PIÑEIRO, A. Direct tandem mass spectrometry for the simultaneous assay of opioids, cocaine and metabolites in dried urine spots. **Analytica chimica acta**, 784, 25-32. 2013.

PALMER, E. A., COOPER, H. J., & DUNN, W. B. Investigation of the 12-month stability of dried blood and urine spots applying untargeted UHPLC-MS metabolomic assays. **Analytical chemistry**, 91(22), 14306-14313. 2019.

PAMPLONA, F. A., & TAKAHASHI, R. N. Psychopharmacology of the endocannabinoids: far beyond anandamide. **Journal of Psychopharmacology**, 26(1), 7-22. 2012.

PAUMGARTTEN, F. J. R., PEREIRA, S. S. T. C., & DE OLIVEIRA, A. C. A. X. Segurança e eficácia do fenproporex para tratamento da obesidade: revisão sistemática. **Revista de Saúde Pública**, 50, 25-25. 2016.

PÉLISSIER-ALICOT, A. L., PIERCECCHI-MARTI, M. D., BARTOLI, C., KUHLMANN, E., COIFFAIT, P. E., SANVOISIN, A., ... & LÉONETTI, G. Abusive prescription of psychostimulants: a study of two cases. **Journal of forensic sciences**, 51(2), 407-410. 2006.

PELLEGRINI, M., GRAZIANO, S., MASTROBATTISTA, L., MINUTILLO, A., BUSARDO, F. P., & SCARSELLA, G. Stability of drugs of abuse in urine samples at room temperature by use of a salts mixture. **Current pharmaceutical biotechnology**, 18(10), 815-820. 2017.

PEREZ, E. R., KNAPP, J. A., HORN, C. K., STILLMAN, S. L., EVANS, J. E., & ARFSTEN, D. P. Comparison of LC–MS-MS and GC–MS analysis of benzodiazepine compounds included in the drug demand reduction urinalysis program. **Journal of analytical toxicology**, 40(3), 201-207. 2016.

PETERS, F. T. Stability of analytes in biosamples—an important issue in clinical and forensic toxicology?. **Analytical and bioanalytical chemistry**, 388(7), 1505-1519. 2007.

RUSSO, E. B. Beyond cannabis: Plants and the endocannabinoid system. **Trends in Pharmacological Sciences**, 37(7), 594-605. 2016.

SADONES, N., CAPIAU, S., DE KESEL, P. M., LAMBERT, W. E., & STOVE, C. P. Spot them in the spot: analysis of abused substances using dried blood spots. **Bioanalysis**, 6(17), 2211-2227. 2014.

SILVA, C. G. A. D., & COLLINS, C. H. Applications of high performance liquid chromatography for the study of emerging organic pollutants. **Química Nova**, 34(4), 665-676. 2011.

SIMÕES, S. S., AJENJO, A. C., & DIAS, M. J. Dried blood spots combined to an UPLC–MS/MS method for the simultaneous determination of drugs of abuse in forensic toxicology. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, 147, 634-644. 2018.

SKOPP, G., & PÖTSCH, L. An investigation of the stability of free and glucuronidated 11-nor-Δ9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in authentic urine samples. **Journal of analytical toxicology**, 28(1), 35-40. 2004.

TAKITANE, J., OLIVEIRA, L. G. D., ENDO, L. G., OLIVEIRA, K. C. B. G. D., MUÑOZ, D. R., YONAMINE, M., & LEYTON, V. Uso de anfetaminas por motoristas de caminhão em rodovias do Estado de São Paulo: um risco à ocorrência de acidentes de trânsito?. **Ciência & Saúde Coletiva**, 18(5), 1247-1254. 2013.

THOMAS, A., GEYER, H., SCHÄNZER, W., CRONE, C., KELLMANN, M., MOEHRING, T., & THEVIS, M. Sensitive determination of prohibited drugs in dried blood spots (DBS) for doping controls by means of a benchtop quadrupole/Orbitrap mass spectrometer. **Analytical and bioanalytical chemistry**, 403(5), 1279-1289. 2012.

TSANACLIS, L., & WICKS, J. F. Differentiation between drug use and environmental contamination when testing for drugs in hair. **Forensic science international**, 176(1), 19-22. 2008.

United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). World Drug Report 2019 (**United Nations publication**, Sales No. E. 19. XI. 8).

WOŹNIAK, M. K., WIERGOWSKI, M., ASZYK, J., KUBICA, P., NAMIEŚNIK, J., & BIZIUK, M. Application of gas chromatography—tandem mass spectrometry for the determination of amphetamine-type stimulants in blood and urine. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, 148, 58-64. 2018.

XAVIER, C. A. C., LOBO, P. L. D., DE FRANCA FONTELES, M. M., DE VASCONCELOS, S. M. M., DE BARROS VIANA, G. S., & DE SOUSA, F. C. F. Ecstasy (MDMA): pharmacological and toxic effects, mechanism of action and clinical management/Extase (MDMA): efeitos farmacologicos e toxicos, mecanismo de acao e abordagem clinica. **Revista de Psiquiatría Clínica**, 35(3), 96-104. 2008.

ZUARDI, A. W. History of cannabis as a medicine: a review. **Brazilian Journal of Psychiatry**, 28(2), 153-157. 2006

ANEXO I

Termos de Consentimento Livre e Esclarecido.



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

Nome:						
Documento de Identidade (tipo):		Nº.:	Sexo:()M()F			
Local de Nascimento:			Data de Nascimento: / /			
Endereço:			Nº.:			
Complementos:		Bairro:				
Cidade:			Estado:			
CEP:	Telefones:					
2. Informações do l Nome:		-				
Documento de Ident	idade (tipo):	Nº.:	Sexo:()M()F			
Local de Nascimento:			Data de Nascimento: /			
Endereço:			Nº.:			
Endereço:						
Endereço: Complementos:		Bairro:				
Complementos: Cidade:		Bairro:	Estado:			
Complementos:	Telefones:	Bairro:	Estado:			
Complementos: Cidade: CEP: 3. Título do Projeto Estudo de estabil	de Pesquisa	ninas e produtos	de biotransformação de cocaína e			
Complementos: Cidade: CEP: 3. Título do Projeto	de Pesquisa	ninas e produtos	de biotransformação de cocaína e			
Complementos: Cidade: CEP: 3. Título do Projeto Estudo de estabil	de Pesquisa lidade de anfetam em amostras de uri	ninas e produtos	de biotransformação de cocaína e			

5. Nome do Pesquisador Responsável

Prof. Dr. Maurício Yonamine

6. Instituição/Instituições

Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP: Análises Clínicas e Toxicológicas

Meu nome é Mauricio Yonamine e junto com o aluno de mestrado da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Felipe de Almeida Mendes, convido você a participar do nosso projeto de pesquisa intitulado "Estudo de estabilidade de anfetaminas e produtos de biotransformação de cocaína e tetraidrocanabinol em amostras de urina seca em papel (dried urine spots)".

O objetivo de nosso trabalho é identificar quanto tempo as substâncias psicoativas podem ser detectadas na urina, após ela secar no papel, visto que atualmente, é necessária uma grande quantidade de urina na coleta, muito espaço para guardar e refrigeração para manter as amostras, o que encarece a análise. Este estudo pode minimizar os custos agregados nas análises, já que utilizando uma gota de urina já é possível efetuar a análise e, como a amostra está seca em papel, pode ocupar menor espaço e dispensar refrigeração.

Portanto, estamos solicitando a sua permissão para coletar cerca de 20 mL de urina. A coleta será realizada pelo próprio participante da pesquisa. Serão utilizados frascos identificados



Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

por números e, portanto, a identidade do participante não será conhecida. Ao final da pesquisa as amostras serão descartadas. As amostras serão necessárias para que se comprove a eficiência do novo teste desenvolvido para determinação das substâncias presentes na urina. O risco da pesquisa é mínimo, pois a coleta de urina não é invasiva. Não haverá benefícios diretos aos participantes doadores de amostra, mas os novos testes laboratoriais desenvolvidos poderão auxiliar no desenvolvimento de uma nova forma de armazenamento de amostras que facilitará o transporte até o laboratório.

É garantido ao participante da pesquisa, a qualquer tempo, receber informações sobre procedimentos, eventuais riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para eliminar alguma dúvida que possa surgir. O participante também possui a opção de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa. Também está segurada sua confidencialidade ao participar do estudo, além de sigilo e privacidade, uma vez que as amostras serão identificadas por código numérico e seu nome não constará nas publicações e teses resultantes do estudo. Eventuais despesas decorrentes da sua participação na pesquisa serão restituídas pelo pesquisador responsável. Diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa, os participantes serão ressarcidos.

Em caso de dúvidas, entrar em contato com: Felipe de Almeida Mendes (fone 3091-2194) e e-mail: mendesfal@usp.br; com o Prof. Dr. Mauricio Yonamine (fone 3091-2194) e e-mail: yonamine@usp.br

Duas vias do termo de consentimento livre e esclarecido serão assinadas pelo pesquisador responsável e o participante, sendo que uma via ficará com o participante e a outra via ficará com o pesquisador responsável desta pesquisa.

Consentimento Pós-Esclarecido

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, de	de
Assinatura do Participante de Pesquisa ou do Responsável Legal	Prof. Dr. Mauricio Yonamine

Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos relativos a este protocolo de pesquisa, favor entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A, Butantã, São Paulo, CEP 05508-000, Telefones 3091-3622 e 3091-3677, e-mail: cepfcf@usp.br.

ANEXO II

Parecer emitido pelo comitê de ética



USP - FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - FCF/USP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo de estabilidade de anfetaminas e produtos de biotransformação de cocaína e

tetraidrocanabinol em amostras de urina seca em papel (dried urine spots).

Pesquisador: Mauricio Yonamine

Área Temática: Versão: 2

CAAE: 19941319.1.0000.0067

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Patrocinador Principal: FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.807.208

Apresentação do Projeto:

Um crescente número de pessoas utilizando drogas ilícitas de forma recreativa vem chamando a atenção de estudiosos em todo o mundo. Com isso, a demanda de exames toxicológicos sendo exigidos para trabalhadores, vítimas de crimes e esportistas também tem crescido. A amostra biológica mais utilizada para testes toxicológicos continua sendo a urina, visto que sua obtenção é menos invasiva, há possibilidade de colher grandes volumes de amostra e possibilita detecção de substâncias até dias após ter ocorrido a exposição. Entretanto, as amostras necessitam de um grande volume físico para serem armazenadas e transportadas até o laboratório, além de temperatura baixa e controlada para conservação, sem contar no grande número de problemas quanto a quantidade de amostra insuficientemente coletada, ou extravasamento do conteúdo, contaminando outras amostras. Uma alternativa recente para tais problemas está em utilizar a técnica chamada de "dried urine spot" (DUS), onde a amostra de urina, no volume de microlitros é colocada em um papel absorvente e posteriormente seca, preservando no papel os componentes presentes na urina. Desta forma, o presente trabalho tem por finalidade objetivo, avaliar a estabilidade de anfetaminas e produtos de biotransformação de cocaína e tetraidrocanabinol em amostras dried urine spot. Para tanto, métodos analíticos serão desenvolvidos e validados segundo guias internacionais, utilizando a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) para detecção dos compostos de interesse nesta nova matriz.

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112

Bairro: Butantă CEP: 05.508-000

UF: SP Município: SAO PAULO



USP - FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - FCF/USP



Continuação do Parecer: 3.807.208

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste projeto é testar a estabilidade de cocaína, benzoilecgonina, ecgonina metil éster, cocaetileno; anfetamina, metanfetamina, femproporex, MDMA e MDA, e ácido-11-nor-THC carboxílico, em dried urine spot. Para atingir esse objetivo, um método será desenvolvido utilizando a cromatografia em fase líquida, associada à espectrometria de massa (LC-MS) para detecção das substâncias de interesse. Para o preparo da amostras, serão avaliadas técnicas de secagem, ressuspensão e extração em fase líquida. Para obtenção deste objetivo, o seguinte plano de trabalho será seguido:

- -Realização de pesquisa bibliográfica referente às técnicas de estabilidade, extração e identificação utilizadas para detecção das substâncias psicoativas de interesse em amostras de urina em dried urine spots.
- Otimização dos parâmetros que influenciam a precisão, recuperação dos procedimentos analíticos.
- -Validação do método, avaliando-se parâmetros como limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), linearidade, precisão intra e interensaio e recuperação.
- -Aplicação dos métodos desenvolvidos em amostras de urina, para verificar a presença destes compostos ao longo de 12 meses.

Avaliação dos Riscos e Beneficios:

Riscos mínimos referentes à coleta de urina dos pacientes.

Benefícios: não há benefícios diretos aos pacientes, mas a longo prazo, na aplicação dos resultados em futuros procedimentos diagnósticos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está muito bem apresentado, claro e com temática pertinente.

Todas as alterações solicitadas foram realizadas, como a inclusão de um novo TCLE para a coleta de amostras negativas.

O projeto foi readequado de acordo com as recomendações.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos necessários foram apresentados.

Recomendações:

sem recomendações.

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112

Bairro: Butantă CEP: 05.508-000

UF: SP Município: SAO PAULO



USP - FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - FCF/USP



Continuação do Parecer: 3.807.208

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

sem pendências e inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO 1409602.pdf	04/11/2019 16:12:49		Aceito
Outros	Carta_resposta.pdf	04/11/2019 16:12:09	Mauricio Yonamine	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_mestrado_amostra_negativa.doc	04/11/2019 16:11:21	Mauricio Yonamine	Aceito
Brochura Pesquisa	Projeto_de_pesquisa_corrigido.docx	04/11/2019 16:10:39	Mauricio Yonamine	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CO_participacao_Felipe.pdf	23/08/2019 14:54:07	Mauricio Yonamine	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CO_anuencia_depto.pdf	23/08/2019 14:53:10	Mauricio Yonamine	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_mestrado.doc	23/08/2019 14:38:19	Mauricio Yonamine	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_pesquisa.docx	12/08/2019 15:35:26	Mauricio Yonamine	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CO_anuencia_clinica.pdf	12/08/2019 15:24:28	Mauricio Yonamine	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CO_participacao_Mauricio.pdf	12/08/2019 15:22:07	Mauricio Yonamine	Aceito
Folha de Rosto	CE_folha_de_rosto.pdf	12/08/2019 15:02:47	Mauricio Yonamine	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112

Bairro: Butantă CEP: 05.508-000

UF: SP Município: SAO PAULO



USP - FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - FCF/USP



Continuação do Parecer: 3.807.208

SAO PAULO, 23 de Janeiro de 2020

Assinado por: Neuza Mariko Aymoto Hassimotto (Coordenador(a))

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112

Bairro: Butantă CEP: 05.508-000

UF: SP Município: SAO PAULO

ANEXO III

Ficha do Aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas FICHA DO ALUNO

9143 - 11098654/1 - Felipe de Almeida Mendes

Email: mendesfal@usp.br Data de Nascimento: 14/12/1991

Cédula de Identidade: RG = 48.071.661-4 = SP Local de Nascimento: Estado de São Paulo

Nacionalidade: Brasileira

Graduação: Bacharel em Farmácia e Bioquímica - Universidade Nove de Julho - São Paulo - Brasil

- 2018

Curso: Mestrado

Programa: Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)

 Área:
 Toxicologia

 Data de Matrícula:
 14/01/2019

 Inicio da Contagem de Prazo:
 14/01/2019

 Data Limite para o Depósito:
 14/07/2021

Orientador: Prof(a). Dr(a). Mauricio Yonamine - 14/01/2019 até o presente. Email:

yonamine@usp.br

Proficiência em Linguas: Inglês, 14/01/2019

Data de Aprovação no Exame de

Qualificação:

Aprovado em 16/03/2020

Data do Depósito do Trabalho:

Titulo do Trabalho:

Data Máxima para Aprovação da

Banca

Data de Aprovação da Banca: Data Máxima para Defesa:

Data da Defesa: Resultado da Defesa:

Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 14/01/2019

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 15/03/2021

Impresso em: 21/05/2021 13:14:14

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas FICHA DO ALUNO

9143 - 11098654/1 - Felipe de Almeida Mendes

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5793- 14/2	Tópicos em Fisiopatología e Toxicología I	12/03/2019	24/06/2019	15	1	100	Α	N	Concluída
FBC5958- 1/1	Sinalização por GPCRs e descoberta de novos fármacos	18/03/2019	24/03/2019	30	2	100	A	N	Concluida
FBC5729- 8/2	Fundamentos Básicos da Avaliação do Risco Oferecido por Substâncias Químicas	08/04/2019	05/05/2019	60	4	100	A	N	Concluida
FBC5954- 1/2	Redação de Trabalhos Científicos	11/04/2019	17/04/2019	15	0			N	Turma cancelada
FBC5747- 3/1	Toxicologia Forense	06/05/2019	09/06/2019	60	0			N	Turma cancelada
FBC5752- 4/2	Danos em Biomoléculas e o seu Papel no Monitoramento da Exposição a Agentes Tóxicos	31/05/2019	05/07/2019	45	3	100	A	N	Concluida
FBC5757- 8/3	Tópicos em Fisiopatología e Toxicología II	06/08/2019	18/11/2019	15	1	100	В	N	Concluida
FBF5805- 2/7	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	20/08/2019	28/10/2019	90	6	100	A	N	Concluida
MPT6008- 2/1	Metais de Transição em Sistema Biológicos (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	07/10/2019	01/12/2019	120	0			N	Matrícula cancelada
BIE5779- 3/2	Redação de Textos Científicos (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	14/10/2019	27/10/2019	60	4	100	Α	N	Concluida
FBC5747- 3/2	Toxicologia Forense	05/03/2020	08/04/2020	60	4	100	A	N	Concluida
FBA5728- 4/9	Aprimoramento Pedagógico	17/03/2020	13/04/2020	60	0			N	Turma cancelada
FBC5818- 3/4	Neurotoxicidade Provocada por Xenobióticos e sua Relação com Doenças Neurodegenerativas	11/05/2020	14/06/2020	45	0			N	Turma cancelada
FBF5779- 3/6	Preparo de Artigos Científicos na Área de Farmácia	07/08/2020	08/10/2020	90	6	100	A	N	Concluida
MPT6005- 2/2	Técnicas de Separação: Fundamentos e Aplicações (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	14/09/2020	08/11/2020	120	8	100	Α	N	Concluida

	Créditos mír	Créditos mínimos exigidos		
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação		
Disciplinas:	0	25	39	
Estágios:				
Total:	0	25	39	

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 15/03/2021

ANEXO IV

Currículo Lattes: http://lattes.cnpq.br/0248530538174440



Felipe de Almeida Mendes

or este CV: http://lattes.cnpq.br/0248530538174440

Última atualização do currículo em 21/10/2019

Resumo informado pelo autor

Possui graduação em Farmácia e Bioquímica pela Universidade Nove de Julho (2017) e graduação em Educação Física pela Universidade de Santo Amaro (2012). Atualmente é mestrando da Universidade de São Paulo. Tem experiência na área de Farmácia, com ênfase em Farmácia clínica, análises toxicológicas, assistência e atenção farmacêuticas

(Texto informado pelo autor)

Nome civil

Nome Felipe de Almeida Mendes

Dados pessoais

Nascimento 14/12/1991 - Embu- Guscu/SP - Brasil

CRE 407 005 788-07

Formação acadêmica/titulação

2019 Mestrado em Farmácia (Fisiopatologia e Tosicologia).
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Titulo: Estudo de estabilidade de antetaminas e produtos de biotransformação de cocaina e tetradocarabindo em amoutras de urina seca em papel (dried urine apots)
Crientador: Mauricio Yoramine
Bolaista do(s): Conselho Nacional de Deservolvimento Científico e Tecnológico

2018 Especialização em Farmacologia Clínica. Faculdades Oswaldo Cruz, FOC, Sao Paulo, Brasil

2014 - 2017 Graduação em Farmácia e Bioquímica.
Universidade Nove de Julho, UNNOVE, Sao Paulo, Brasil
Titulo: UBlização da macorha por portadorea de dor ordinica
Orientador: Prof. Me. VANESSA PEROSINO; Prof. Me. ADRIANO SE

2010 - 2012 Graduação em Educação Física. Universidade de Santo Amer., UNISA, Sao Paulo, Brasil Tituro: Bulging ras excedas e formas de intervenção Orientador: Profr. MS. Solange O.F. Borragine Bolastat doja: Universidade Para Todos

2007 - 2009 Ensino Médio (2o grau) .
Excola Estadual Alexandre Rodrigues Nogueira, E.E.%20APN, Brasil, Ano de obtenção: 2009

Formação complementar

2019 - 2019 Curso de curta duração em Capacitação no uso e manejo de animais de laboratório. (Carga horária: 60h).
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

2018 - 2019

Curso de curta duração em Prática Profissionalizante: Análises Toxicológicas de Fármacos / Drogas de.

(Carga horária: 300h).

Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

2019 - Atual Vinculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Mestrando , Carga horária: 40, Regime: Integral

2. Governo do Estado de São Paulo - GOVERNO/SP

Vinculo

2013 - 2019 Vinculo: Servidor público , Enquadramento funcional: Professor , Carga horária: 20, Regime: Parcial

3. Prefeitura Municipal de Embu Guacu - PMEG

2015 - 2016 Vinculo: Celetista , Enquadramento funcional: Voluntario , Carga horária: 30, Regime: Parcial

4. Pharma Formulas Manipulação - PF

Vinculo institucional

2017 - 2017
Vinculo: Estaglio estra curricular , Enquadramento funcional: Estagliário , Carga hosiria: 30, Ragime: Paccial
Outras informações:
Manipulação de ablidos, semi-ablidos e homeopatias.

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 14/02/2020 às 23:41:32.

ANEXO V

Participação de cursos de treinamento em cromatografia.

- CENTRO DE EXCELÊNCIA: AGILENT TECHNOLOGIES BARUERI-SP 6 Horas.
- Treinamento Waters em LC-MS

18 horas

Shimadzu – Excellence in Science: Fundamentos de LCMS - Módulo I
 1h30min

• Agilent Technologies: Forense Experience Brasil

7,5 Horas

• ILSI Brasil : Cannabis: Propriedades e implicações do uso como medicamento e em alimentos

1,5 Horas

• 2020 TIAFT Education Symposium - Day 1-4

6 Horas.

ANEXO VI

Citação em artigo científico.

Received: 3 August 2019 Revised: 9 December 2019 Accepted: 31 January 2020



DOI: 10.1002/ptr.6639

RESEARCH ARTICLE

WILEY

Quality of Life, Mental Health, Personality and Patterns of Use in Self-Medicated Cannabis Users with Chronic Diseases: A 12-Month Longitudinal Study

José C. Bouso ¹ Daniel Jiménez-Garrido ¹ Genís Ona ^{1,2} Damian Woźnica ¹	
Rafael G. dos Santos ^{1,3,4} Jaime E.C. Hallak ^{3,4} Beatriz A. P. B. Paranhos ⁵	
Felipe de Almeida Mendes ⁵ Mauricio Yonamine ⁵ Miguel Á. Alcázar-Córcoles ⁶	
Magí Farré ^{7,8}	

¹ICEERS—International Center for Ethnobotanical Education, Research and Service, Barcelona, Spain

²Department of Anthropology, Philosophy and Social Work, Universitat Rovira i Virgili. Medical Anthropology Research Center, Tarragona, Spain

²Department of Neurosciences and Behavior. University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

⁴National Institute for Translational Medicine (INCT-TM), CNPq, Ribeirão Preto, São Paulo,

⁵Faculty of Pharmaceutical Sciences, Department of Clinical and Toxicological Analyses, Sao Paulo University, Sao Paulo,

Department of Biological and Health Psychology, School of Psychology, Madrid Autonomous University, Madrid, Spain

⁷Department of Clinical Pharmacology, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

[®]Department of Pharmacology, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallés, Spain

Correspondence

José C. Bouso, C/Sepúlveda, 65 Bajos 2, 08015, Barcelona, Spain. Email: jcbouso@iceers.org

Funding information

Fundació Alchimia Solidària; Fundación Canna

Abstract

The number of patients using cannabis for therapeutic purposes is growing worldwide. While research regarding the treatment of certain diseases/disorders with cannabis and cannabinoids is also expanding, only a few longitudinal studies have assessed the mid-term impacts of medical cannabis use on psychological variables and quality of life (QoL). The aim of the study was to assess the psychological safety and QoL of patients with chronic diseases who self-medicate with cannabis over time. We recruited patients with various chronic diseases who use cannabis and collected data regarding patterns of cannabis use as well as mental health, personality and QoL. Participants were followed-up at baseline, 4, 8 and 12 months. Hair analysis was conducted to confirm the presence of cannabinoids. Personality assessment showed a consistent decrease in self-transcendence and self-directedness scores. Neither cognitive nor psychopathological deterioration was found. There were also no variations in QoL. Mid-term use of medical cannabis seems to show adequate tolerability regarding cognitive and psychopathological abilities, and it may help patients with chronic diseases to maintain an acceptable QoL.

KEYWORDS

cannabis, chronic disease, medical cannabis, mental health, quality of life