

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento de método analítico para análise de drogas de abuso utilizando a técnica de *dried spot* para fluido oral

ANA LAURA BEMVENUTI JACQUES

PORTO ALEGRE, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento de método analítico para análise de drogas de abuso utilizando a técnica de *dried spot* para fluido oral

Tese apresentada por Ana Laura Bemvenuti Jacques para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa Dr. Renata Pereira Limberger

PORTO ALEGRE, 2017

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 30.11.2017, pela Banca Examinadora constituída por:

Dr. Juliana Nichterwitz Scherer
Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Dr. Kristiane de Cassia Mariotti
Polícia Federal

Prof. Dr. Pedro Eduardo Froehlich
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Jacques, Ana Laura Bemvenuti
Desenvolvimento de método analítico para análise de drogas de abuso utilizando a técnica de dried spot para fluido oral / Ana Laura Bemvenuti Jacques. -- 2017.
90 f.
Orientadora: Renata Pereira Limberger.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Toxicologia analítica. 2. Dried matrix spots. 3. Fluido oral. 4. Drogas de abuso. I. Limberger, Renata Pereira, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Renata Pereira Limberger, que ao longo de todos estes anos me ofereceu seu tempo, conhecimento, orientação e apoio, sempre acreditando nos seus alunos.

A toda minha família, mas principalmente, à mãe, vó e mano Felipe, que sempre me apoiaram incondicionalmente.

A todos da equipe do LABTOXICO, àqueles que já foram e aos que recém chegaram, mas principalmente àquelas que me acompanharam de perto e tanto me ajudaram: Maíra, Nina, Jo e Ju.

A toda equipe do LAPPS, especialmente ao prof. Pedro, à Inélia e à Pamela.

A todos os colegas do LFDA/RS que me acompanharam nestes anos, especialmente àqueles que estavam diariamente compartilhando esta jornada.

Ao Guilherme, que de perto assistiu, auxiliou e compreendeu este momento.

Ao PPFCF e à UFRGS, que segue oferecendo ensino público de excelência aos seus alunos, entregando trabalho de inestimável valor à sociedade.

A todos aqueles que, embora aqui não nominalmente citados, auxiliaram na construção deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“Digo: o real não está na saída nem na chegada:
ele se dispõe para a gente é no meio da travessia”

Guimarães Rosa – Grande Sertão: Veredas

RESUMO

A técnica de *dried matrix spots* (DMS) consiste em um procedimento de coleta de matrizes biológicas diretamente em papel filtro com especificações padronizadas para posterior análise das substâncias de interesse. Diante das vantagens descritas para esta técnica, novas metodologias vêm sendo desenvolvidas para aplicação em diversas áreas, dentre elas na toxicologia. Neste contexto, é de interesse o desenvolvimento de uma metodologia que utilize o fluido oral (FO) como matriz biológica, investigando a viabilidade da técnica de *dried oral fluid spots* (DOFS) na análise de drogas de abuso. O objetivo deste trabalho consistiu em validar método analítico quantitativo por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM) para análise simultânea de cocaína, 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), anfetamina, benzoilecgonina (BZE) e cocaetilo utilizando DOFS. O FO foi aplicado em papel filtro Whatman® 903 e o tempo necessário para completa secagem foi estudado. Os solventes utilizados no processo de extração foram definidos através de abordagem quimiométrica, utilizando desenho simplex centroide para otimização. A curva de calibração foi definida cobrindo o intervalo linear de 40-500 ng/mL. Os parâmetros de validação avaliados foram: linearidade, precisão, exatidão, seletividade, efeito residual, efeitos de matriz e estabilidade. Além disso, foram investigadas a homogeneidade e a influência do volume de amostra aplicado no *spot*. O tempo de secagem ideal foi definido em 2,5 horas. O desenho quimiométrico permitiu a otimização da escolha dos solventes para a extração líquida, sendo definido o uso de acetonitrila:acetato de amônio:metanol (55:35:10 v/v) para a extração. A homocedasticidade da curva foi confirmada pelo teste de Cochran e o modelo linear proposto foi considerado adequado. Não foram observados interferentes na avaliação de seletividade e efeito residual. A avaliação da homogeneidade do *spot* apresentou menos de 15% de desvio do valor nominal de concentração e o volume de amostra aplicado de até 100 µL não prejudicou a exatidão, confirmando a homogênea difusão da amostra no papel. A realização deste trabalho abre precedentes ao demonstrar a viabilidade da aplicação de DOFS para a quantificação de drogas de abuso e oportuniza o surgimento de novos estudos que ampliem a utilização desta técnica em outras matrizes biológicas e novos contextos de aplicação.

Palavras-chave: *Dried matrix spots*; manchas secas; fluido oral; drogas de abuso.

ABSTRACT

Dried matrix spots (DMS) consist of a sampling technique which comprises the collection of a small volume of a biological fluid onto a specific filter paper for further analysis. Due to the several advantages of the technique, DMS started to be employed for different purposes, with an increase of applications in toxicology in the last decade. In this context, it is of interest the development of a methodology using oral fluid (OF) to investigate the feasibility of dried oral fluid spots (DOFS) in drugs of abuse analysis. The aim of this work was to validate a liquid chromatography–mass spectrometry method using DOFS for the simultaneous quantification of cocaine, benzoylecgonine, cocaethylene, amphetamine, and 3,4-methylenedioxymethamphetamine. The oral fluid was applied to a Whatman® 903 grade paper and complete drying time was studied. The extraction procedure was optimized by chemometric approach using simplex centroid design. Calibration curves covered a linear concentration range of 40–500 ng/mL. Validation parameters of linearity, precision, accuracy, selectivity, carryover, matrix effects, and stability were evaluated. Besides, spot homogeneity and the influence of spot volume were also studied. The ideal drying time was set at 2.5 hours. The chemometric design allowed the optimization of liquid extraction, being defined a mixture of acetonitrile:ammonium acetate:methanol (55:35:10 v/v) as the solvent extraction. Homoscedasticity of the calibration curve was confirmed by Cochran's test and the proposed linear model was considered adequate. No interferences were observed in the evaluation of carryover and selectivity. Spot homogeneity was considered satisfactory, with less than 15% of deviation from nominal concentration. Spot volume did not influence accuracy when less than 100 μ L of the sample was applied onto the spot, confirming the homogeneous diffusion of the sample on the paper. The validation of the proposed method demonstrates the feasibility of DOFS application and set precedents for new studies that expand the use of this technique in other biological matrices and new application contexts.

Keywords: Dried matrix spots; oral fluid; drugs of abuse.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BZE - Benzoilecgonina

CG - Cromatografia gasosa

CLAE-EM - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

CLAE-EM/EM - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial

CQA - Controle de qualidade alto

CQB - Controle de qualidade baixo

DBS - *Dried blood spots*

DMS - *Dried matrix spots*

DOFS - *Dried oral fluid spots*

EBF - *European Bioanalysis Forum*

FDA - *Food and Drug Administration*

FO - Fluido oral

HHMA - 3,4-diidroxi-metanfetamina

HMA - 4-hidroxi-3-metoxi-anfetamina

HMMA - 4-hidroxi-3-metoxi-metanfetamina

MDA - 3,4-metilenodioxianfetamina

MDMA - 3,4-metilenodioximetanfetamina

SNC - Sistema nervoso central

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 GERAIS.....	17
2.2 ESPECÍFICOS	17
3 REVISÃO DO TEMA	19
3.1 DERIVADOS ANFETAMÍNICOS.....	19
3.1.1 Anfetamina	20
3.1.2 MDMA	21
3.2 COCAÍNA.....	24
3.3 FLUIDO ORAL	25
3.4 TÉCNICA DE <i>DRIED MATRIX SPOTS</i>	26
3.4.1 Vantagens, desvantagens e limitações	29
4 MANUSCRITO I	31
5 MANUSCRITO II	57
6 DISCUSSÃO GERAL	79
7 CONCLUSÃO	85
REFERÊNCIAS	87

1 INTRODUÇÃO

Aproximadamente 275 milhões de pessoas fizeram o uso de drogas de abuso pelo menos uma vez em 2019, sendo que somente na América Latina esse número é estimado em 17 milhões. Pelo menos 0,7 por cento da população adulta mundial sofre de transtornos pelo uso de substâncias psicoativas e, considerando a projeção de crescimento populacional, há um potencial aumento de 25 milhões de usuários destas substâncias até 2030 (UNODC, 2021).

A cocaína e os estimulantes do tipo anfetamínicos se destacam no mercado de substâncias psicoativas, apresentando padrões globais de oferta e demanda interligados e complexos. Os dados sugerem que o mercado de estimulantes anfetamínicos continuou a aumentar globalmente, atingindo quantidade recorde de apreensões em 2019, com aumento de 64 por cento em comparação ao ano anterior. Igualmente para a cocaína, a produção mundial dobrou entre 2014 e 2019, atingindo o maior índice já registrado (UNODC, 2021). A maior quantidade de apreensão de cocaína ocorreu no continente americano, concentrando 83 por cento das apreensões. Somente no Brasil, foram identificadas 1,5 milhão de pessoas usuárias dessa substância em 2016, compreendendo um grave problema de saúde pública (UNODC, 2021).

O crescimento do uso acompanhou a transição socioeconômica de países em desenvolvimento como o Brasil e, em países emergentes, o impacto desse crescimento é observado com maior intensidade. No Brasil, a abordagem de consumo de substâncias psicoativas é ainda mais preocupante considerando o contexto social e a limitação de acesso a serviços que proporcionem diagnósticos e tratamentos adequados aos usuários. Ainda existe uma grande dificuldade na educação para prevenção do uso de drogas, bem como no tratamento, que inspira cuidados e apoio ao usuário.

Considerando o impacto social do crescente uso de substâncias psicoativas, é de grande importância que métodos analíticos estejam disponíveis para análise de fluidos biológicos com fins de diagnóstico e acompanhamento de usuários. A viabilidade de um bom diagnóstico que permita a detecção precoce do abuso destas substâncias, principalmente em adolescentes e adultos jovens, pode possibilitar o manejo adequado e em tempo dos usuários nos estágios iniciais da dependência química. Entretanto, a realidade brasileira impõe dificuldades na implantação destes

monitoramentos, associadas a disponibilidade de reduzidos parques tecnológicos, concentração de laboratórios oficiais em capitais ou grandes cidades e dificuldades no transporte e manejo de fluidos biológicos por longas distâncias e em temperatura adequada.

Neste contexto, a técnica de DMS se destaca como uma técnica de amostragem de grande interesse por aliar vantagens como a simples coleta, o fácil armazenamento e transporte e a utilização de baixas quantidades de matrizes biológicas para a sua realização. Amplamente estudada e aplicada utilizando a matriz sangue, o uso de DMS aplicado a matriz FO é escassamente relatado na literatura. Entretanto, a sua utilização viria ao encontro dos requisitos desejáveis de uma metodologia analítica na área da toxicologia, permitindo aliar as vantagens da técnica de DMS com as da utilização da matriz FO.

A investigação da viabilidade da técnica de DMS aplicada ao FO, ou DOFS, para detecção e quantificação de drogas de abuso pode ter grande validade e aplicabilidade ao contornar fatores que dificultam a coleta e viabilizar amostragens no próprio local de abordagem, como no trânsito brasileiro, em clínicas para acompanhamento de dependentes e no monitoramento de uso de substâncias psicoativas. Além disso, o desenvolvimento da metodologia utilizando CLAE-EM pode permitir a sua difusão e ampla disponibilidade ao empregar instrumental disponível a nível nacional, aliado a especificidade fornecida pelo detector de massas. Ao aliar rapidez, robustez e confiabilidade, a técnica atende aos preceitos das análises toxicológicas, primando pelos princípios de economicidade e podendo ser viável na aplicação de análises de provas e contraprovas.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAIS

Desenvolver e validar método por CLAE-EM para quantificação de MDMA, anfetamina, BZE, cocaína e cocaetileno, verificando a viabilidade da aplicação da técnica de DMS para o FO.

2.2 ESPECÍFICOS

- Desenvolver procedimento de DMS para FO através da definição de protocolo de secagem e punção do papel.
- Desenvolver o método analítico definindo protocolo de extração e condições analíticas ideais.
- Validar método de quantificação para cocaína, BZE, cocaetileno, MDMA e anfetamina por CLAE-EM.
- Avaliar condições de homogeneidade e volume de aplicação de FO para a técnica desenvolvida.

3 REVISÃO DO TEMA

3.1 DERIVADOS ANFETAMÍNICOS

Os compostos anfetamínicos são considerados substâncias psicoativas estimulantes do sistema nervoso central (SNC) e sua utilização está associada à busca pela melhora no desempenho físico e mental. Quimicamente, os derivados anfetamínicos apresentam a estrutura básica da β -feniletilamina, que permite substituições no anel aromático e nos carbonos alfa, beta e no grupo amino terminal originando uma grande variedade de derivados. A substituição no anel aromático, como no caso do MDMA, está relacionada a uma conhecida e importante atividade alucinógena e a partir dessa substituição, análogos como os metilenodioximetilamfetaminas são produzidos. Estes derivados caracterizam-se por não possuírem aplicações terapêuticas, sendo reconhecidamente substâncias controladas veiculadas no mercado ilícito como drogas de abuso (PASSAGLI; RODRIGUES, 2013).

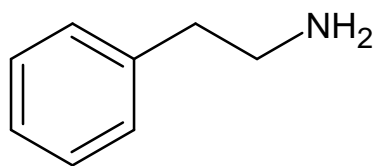


Figura 1. Estrutura básica dos compostos anfetamínicos: β -feniletilamina.

Estes poderosos estimulantes do SNC são utilizados desde o início dos anos 1900. Ao longo dos anos diversas modificações foram realizadas na estrutura básica para fins de diminuição de efeitos colaterais e alterações das atividades farmacológicas (PASSAGLI; RODRIGUES, 2013).

Os anfetamínicos ocupam, há alguns anos, um lugar proeminente no mercado de drogas de abuso da Europa Ocidental e Central. Entretanto, as maiores apreensões foram registradas na América do Norte e no leste e sudeste asiático entre os anos de 2015 e 2019 (UNODC, 2021). O tipo de substância utilizada e a forma como é administrada varia consideravelmente entre as regiões do mundo. Em alguns locais, a qualidade das informações sobre aspectos do mercado destes compostos permanece limitada, como no caribe, que não dispõe de informações recentes sobre a extensão do uso de anfetaminas entre adultos (UNODC, 2021).

O alto custo de revenda fomenta o tráfico destas drogas, já disseminadas em países como o Brasil. É comum a presença de produtos paralelos de síntese, como resíduos de solventes e reagentes, além de adulterações, com a adição de substâncias como catinonas, femproporex, anfepramona (dietilpropiona), cafeína e efedrina a fim de mimetizar os efeitos estimulantes (CAZENAVE; COSTA, 2008; PASSAGLI; RODRIGUES, 2013).

Além dos riscos cardiovasculares associados ao abuso destas substâncias, o uso de derivados anfetamínicos reflete ainda um aumento significativo no risco de acidentes de trânsito, uma vez que podem induzir a perda de concentração e atenção. Ainda, a dilatação das pupilas (midríase) aumenta a sensibilidade à cegueira pela luz e a euforia pode diminuir a percepção do risco no trânsito (CONCHEIRO *et al.*, 2006).

3.1.1 Anfetamina

A anfetamina é o composto original dessa classe de substâncias, sintetizada pela primeira vez com fins de utilização em tratamentos farmacológicos. Com a descoberta de seu efeito estimulante, esta foi comercializada na segunda guerra mundial para combater a fadiga dos soldados e, posteriormente no Japão para aumentar a capacidade no trabalho (CAPELA; CARVALHO, 2015). Pela sua ação estimulante, a anfetamina é capaz de despertar estado de alerta no indivíduo, bem como causar efeitos de euforia, melhora de humor e insônia (CAPELA; CARVALHO, 2015).

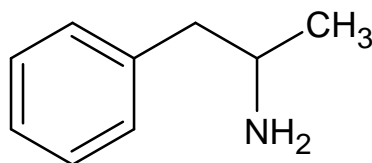


Figura 2. Estrutura química da anfetamina.

O uso da anfetamina é realizado normalmente por via oral, podendo ser consumida também por via inalatória ou injetável. A substância é metabolizada principalmente a nível hepático, através da ação das enzimas do citocromo P450. O metabolismo ocorre principalmente através de N-deaminação e oxidação no correspondente ácido benzoico que é posteriormente conjugado com glicina e excretado como o correspondente ácido hipúrico. Também é biotransformada

através da hidroxilação na posição quatro do anel aromático, gerando a 4-hidroxianfetamina, seguida por conjugação com sulfatos no grupamento fenólico (KRAEMER; MAURER, 2002). A excreção ocorre fundamentalmente pela via urinária e é altamente dependente do pH da urina, já que, por serem bases fracas, sua excreção aumenta com a acidificação da urina e diminui com a alcalinização (KRAEMER; MAURER, 2002). Quanto ao FO, a anfetamina aparece rapidamente nesta matriz após a administração por via oral. A presença da anfetamina no FO deve ser interpretada como resultado positivo para o uso recente dessa substância ou de derivados que são metabolizados a ela (CONE; HUESTIS, 2007).

Os efeitos atribuídos à anfetamina, assim como seus derivados, provêm da liberação de neurotransmissores monoaminérgicos que esta substância é capaz de promover, principalmente noradrenalina, dopamina e serotonina (CARVALHO *et al.*, 2012). Embora todas as anfetaminas possuam capacidade de atuar sobre transportadores monoaminérgicos, a afinidade e, portanto, a maior ou menor atuação sobre determinado neurotransmissor irá depender de sua estrutura química. A anfetamina possui maior afinidade pelo transportador da dopamina, enquanto o MDMA possui maior afinidade pelo transportador da serotonina (CAPELA *et al.*, 2009).

3.1.2 MDMA

Êxtase ou *ecstasy* é um termo que tradicionalmente é utilizado para descrever comprimidos contendo MDMA. A estrutura química do MDMA difere da anfetamina através de uma importante modificação estrutural nas posições 3 e 4 do anel aromático, com a inserção de um grupamento metilenodioxí. A substituição no anel aromático leva a efeitos farmacológicos que compreendem uma mistura da ação estimulante da anfetamina e alucinógeno da mescalina (KALANT, 2001). Rotas sintéticas de produção ilícitas de MDMA geram normalmente uma mistura racêmica de isômeros. O isômero S(+) do MDMA é considerado o responsável pelos efeitos psicoestimulantes e empáticos e o R(-) pelas alucinógenas (LA TORRE *et al.*, 2004). Usuários de MDMA reportam efeitos como mudança nas emoções e sentimentos, melhora na comunicação, empatia, alterações na cognição e percepção, alucinações, euforia, estímulo sexual, aumento da autoestima e de energia. Esses efeitos fazem com que o MDMA seja classificado como substância entactógena.

Como estimulante, apresenta efeitos simpatomiméticos, que incluem vasoconstrição periférica, broncodilatação, estimulação cardiorrespiratória, dilatação das pupilas e supressão de apetite (LA TORRE *et al.*, 2004; LOGAN; COUPER, 2003). Diversos sistemas de neurotransmissores são afetados pelo MDMA, entre eles os da norepinefrina, serotonina, dopamina e ácido gama-aminobutírico. O MDMA promove a liberação de serotonina, levando ao aumento da mesma na fenda sináptica (LA TORRE *et al.*, 2004; LOGAN; COUPER, 2003).

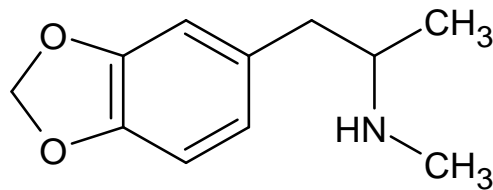


Figura 3. Estrutura química do MDMA.

O MDMA é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal e atinge o pico de concentração plasmática aproximadamente 2 horas após a administração oral (LA TORRE *et al.*, 2004). A droga é biotransformada principalmente no fígado e majoritariamente pela enzima CYP2D6 (KALANT, 2001). Múltiplas são as vias responsáveis pela biotransformação do MDMA. Primariamente o processo envolve a *N*-demetilação e *O*-demetilação. A *N*-demetilação leva à formação da 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA), produto ativo que exhibe atividades farmacológicas bastante semelhantes ao MDMA. A *O*-demetilação do MDMA e MDA produz a 3,4-dihidroximetanfetamina e a 3,4-dihidroxianfetamina, respectivamente. Outros produtos também podem ser formados através da *O*-metilação da 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina e 4-hidroxi-metoxianfetamina, deaminação e conjugação (LA TORRE *et al.*, 2004). A demetilação relevante do ponto de vista toxicológico é catalisada pela enzima polimórfica CYP2D1 e pela enzima não polimórfica CYP3A, assim como por mecanismos CYP independentes. Assim, efeitos hepatotóxicos e neurotóxicos decorrentes da desmetilação podem ser independentes do polimorfismo genético (KRAEMER; MAURER, 2002). Aproximadamente 15% da dose de MDMA administrada é excretada de forma intacta na urina em 24 horas, 1,5% são excretados como MDA, 17,7% como 3,4-diidroxi-metanfetamina (HHMA), 22,7% com 4-hidroxi-3-metoxi-metanfetamina (HMMA) e 1,3% como 4-hidroxi-3-metoxi-anfetamina (HMA) (LA TORRE *et al.*, 2004).

Quanto à cinética do MDMA no FO, a relação entre as concentrações nesta matriz e no sangue já demonstraram estar altamente correlacionadas. A concentração é ligeiramente superior no FO devido ao alto pKa do MDMA e da baixa ligação com as proteínas plasmáticas (CONE; HUESTIS, 2007). A administração de doses de 75 a 100 mg de MDMA, que são doses recreacionais usuais, apresentou uma cinética de concentrações variadas ao longo do tempo, compreendendo valores de 42 a 6500 ng/mL, com pico de concentração 1,5 horas após a ingestão (LALOUP *et al.*, 2005; NAVARRO *et al.*, 2001; WOOD *et al.*, 2005). Como base fraca, o MDMA sofre efeito de *ion trapping* no FO, levando a concentrações maiores que as plasmáticas e janelas de detecção mais amplas (BOSKER; HUESTIS, 2009).

Na última década, o mercado ilícito dessa substância sofreu grandes mudanças e cresceu em complexidade. Os comprimidos comercializados com este nome atendem a uma diversidade de composição, podendo conter a substância pura, pouco ou até nada de MDMA. Indicadores como o número de laboratórios identificados, a quantidade de apreensões e as tendências de tráfico mostraram clara tendência de alta da oferta desta substância entre 2011 e 2019 (UNODC, 2021). O padrão de uso do MDMA permanece basicamente relacionado à *raves* e casas noturnas desde a sua entrada no Brasil (ALMEIDA; SILVA, 2003). Embora possua a reputação equivocada de seguro, o êxtase preenche o critério de droga causadora de dependência definida pela Associação Americana de Psiquiatria e sua utilização está associada à hipertermia, complicações cardiovasculares, falência renal e hepática, podendo evoluir à morte (CAZENAVE; COSTA, 2008).

O MDMA é ilicitamente vendido na forma de comprimidos, que apresentam uma grande variedade de cores e símbolos (ALVES *et al.*, 2013). As doses encontradas para o MDMA podem variar de 0 a 200 mg em comprimidos apreendidos (PARROTT, 2004). Em estudo conduzido no Rio de Janeiro, Alves e col. (2013) demonstraram que embora outras substâncias psicoativas possam ser encontradas nos comprimidos de *ecstasy*, o MDMA ainda é o principal constituinte (ALVES *et al.*, 2013). Dentre as outras substâncias comumente adicionadas destaca-se o uso de cafeína, difenidramina e teofilina (ALVES *et al.*, 2013) e outros derivados anfetamínicos estimulantes, como o metilfenidato e metanfetamina (LOGAN; COUPER, 2003). Dos comprimidos analisados por Alves e col. (2013), aproximadamente 53% continham cafeína, utilizada possivelmente com a tentativa de mimetizar o efeito estimulante buscado pelo usuário (ALVES *et al.*, 2013).

Em estudo conduzido por Wu e col. (2009), 41% dos usuários de MDMA apresentaram problemas paralelos relacionados ao abuso de álcool, 30% ao de maconha, 10% ao de cocaína, 8% de medicamentos para dor/opioides e 3% de tranquilizantes (WU *et al.*, 2009). O estudo mostrou que aqueles que utilizaram recentemente MDMA apresentaram duas vezes maior chance de utilizar maconha e analgésicos opioides, estabelecendo uma possível relação entre o usuário de MDMA e o desenvolvimento de desordens relativas ao abuso de outras substâncias (WU *et al.*, 2009).

3.2 COCAÍNA

A cocaína é um alcaloide natural presente nas folhas de *Erythroxylum coca*, popularmente conhecida como coca, sendo um arbusto nativo da região andina e da América do Sul (MANTOVANI; PEGO; YONAMINE, 2015). Apresenta efeitos psicoestimulantes semelhantes aos dos compostos anfetamínicos, sendo administrada comumente por inalação e via intravenosa e de maneira mais rara através da ingestão. A cocaína representa atualmente um problema de saúde pública mundial. O número de usuários é hoje estimado em 20 milhões de pessoas, o que representa 0,4% da população mundial adulta com idades entre 15 e 64 anos. Em 2019, a estimativa de produção global dobrou comparada à 2014, atingindo o maior nível já relatado (UNODC, 2021).

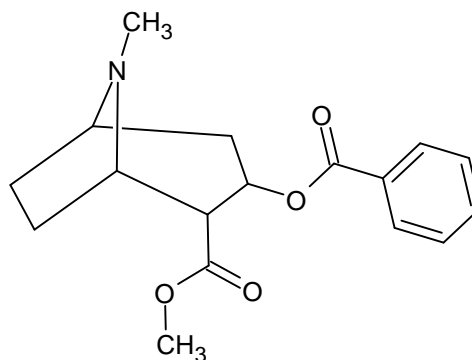


Figura 4. Estrutura química da cocaína.

No SNC, a cocaína tem seu efeito relacionado à atuação nos neurotransmissores dopamina, norepinefrina e serotonina. O efeito estimulante é atribuído em parte à ligação com os receptores dopaminérgicos D1 e D2 pós-sinápticos (PASSAGLI; CARVALHO, 2013). Administrada por via intranasal, a

cocaína apresenta absorção rápida e tempo de meia vida relativamente curto, de aproximadamente 60 minutos (PASSAGLI; CARVALHO, 2013). A distribuição também ocorre rapidamente, sendo distribuída em maiores concentrações no cérebro, baço, rins, pulmões, sangue, coração e músculo (MANTOVANI; PEGO; YONAMINE, 2015). A eliminação é realizada majoritariamente pela biotransformação hidrolítica em dois produtos, o éster metilecgonina, resultante da hidrólise do benzoato da cocaína pelas colinesterases hepáticas e plasmáticas, e o principal produto, a BZE, obtida por reação hidrolítica espontânea em pH fisiológico e por ação das carboxilesterases (MANTOVANI; PEGO; YONAMINE, 2015; PASSAGLI; CARVALHO, 2013). A cocaína e seus metabólitos aparecem rapidamente no FO após todas as rotas de administração. As altas concentrações de cocaína e BZE no FO são observadas logo após a administração intranasal e fumada. As concentrações de cocaína diminuem rapidamente em aproximadamente 1 h; a partir do qual tendem diminuir em paralelo com o sangue (CONE; HUESTIS, 2007). Um importante marcador do uso simultâneo de cocaína e etanol é o produto da transesterificação hepática da cocaína em cocaetilenol (PASSAGLI; CARVALHO, 2013).

3.3 FLUIDO ORAL

O FO pode ser definido como a mistura da saliva e outros materiais encontrados na cavidade bucal. Difere da saliva principalmente por esta segunda consistir somente no material expelido pelas glândulas salivares e o FO consistir em toda matriz expelida pela cavidade bucal, podendo conter bactérias, células epiteliais, eritrócitos, leucócitos e resíduos provenientes da alimentação. O FO contém eletrólitos comuns aos do plasma como potássio, sódio, cloretos e bicarbonatos, além de enzimas, imunoglobulinas e DNA (CROUCH, 2005). Entretanto, a maior parte do FO é água. A concentração iônica desta matriz é variável e dependente do ritmo circadiano e, se comparada ao plasma, é hipotônica. A concentração iônica é diretamente influenciada pela salivação, que por sua vez é estimulada pelo olfato, paladar, dor, alterações hormonais e medicamentos simpatomiméticos (APS; MARTENS, 2005).

A grande maioria das substâncias é transferida para o FO através de difusão passiva simples, caracterizada pela transferência do composto em função do

gradiente de concentração, a área de superfície na qual a transferência ocorre, a espessura da membrana e as propriedades de cada molécula (APS; MARTENS, 2005). Devido ao efeito de *ion trapping*, bases fracas são detectadas em concentrações e tempos maiores no FO do que no plasma. Este efeito depende do pKa e da lipofilicidade da molécula e ocorre devido a diferença de pH entre o sangue, que possui pH em torno de 7,4 e o FO que pode variar o pH de 4 a 6. Assim, substâncias livres não ionizadas estão em equilíbrio sangue/FO, mas em pH menores, as bases fracas ionizadas diminuem a passagem através das membranas e o retorno para o sangue, aumentando a concentração no FO (BOSKER; HUESTIS, 2009).

Embora o potencial do FO de refletir a concentração sanguínea da substância tenha levado a um aumento significativo do seu uso, algumas considerações devem ser feitas. Além do já citado efeito de *ion trapping* para bases fracas, deve-se considerar também a contaminação da cavidade bucal ocorrida quando a droga é fumada ou administrada oralmente. Nesse caso, a concentração encontrada pode não refletir necessariamente a concentração plasmática, podendo interferir na quantificação da substância, mas aumentando sua possibilidade de detecção (CROUCH, 2005).

Entre as principais vantagens do uso do FO como matriz biológica alternativa destaca-se a boa correlação com o estado clínico do indivíduo e a facilidade de coleta, sendo essa não invasiva, podendo ser realizada no momento da abordagem de forma assistida, eliminando a necessidade de instalações especiais e riscos de contaminação (FREDERICK, 2012). Os avanços tecnológicos que permitiram o desenvolvimento de metodologias mais sensíveis levaram ao reconhecimento desta matriz como recomendação internacional por guias oficiais que normatizam análises toxicológicas em abordagens de trânsito, como o *Substance Abuse and Mental Health Services Administration* e o *Driving under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines project* (BOSKER; HUESTIS, 2009; CONE; HUESTIS, 2007; WALSH *et al.*, 2008).

3.4 TÉCNICA DE *DRIED MATRIX SPOTS*

A técnica de DMS consiste na aplicação e difusão de pequena quantidade da matriz biológica de interesse sobre um papel filtro com especificação própria para

este fim e posterior análise. Embora recentemente venha ganhando espaço dentro da toxicologia, esta técnica é conhecida e aplicada para fins diagnósticos utilizando sangue na detecção neonatal da fenilcetonúria (GUTHRIE; SUSI, 1963) e outras desordens metabólicas, no conhecido “teste do pezinho”.

Dentre as matrizes mais populares, certamente destaca-se o sangue como a mais utilizada, na técnica conhecida como *dried blood spots* (DBS). Relatos históricos evidenciam o uso do papel filtro para coleta de fluidos biológicos há mais de um século e a linha histórica de utilização e aperfeiçoamento destas técnicas denotam a sua evolução (HANNON; THERRELL, 2014). Entretanto, muitos consideram como a primeira utilização e, de fato, a que gerou notória popularidade, a realizada em 1961 por Guthrie, que utilizou o papel filtro (Whatman nº 3) para a coleta de sangue e dosagem de fenilalanina, assim diagnosticando a fenilcetonúria (GUTHRIE, 1961). Em 1963, o uso da técnica foi relatado na triagem neonatal desta doença, sendo rapidamente difundido como medida de saúde pública, permanecendo até hoje como tal (GUTHRIE; SUSI, 1963). Ainda nestes estudos, a padronização do papel filtro foi discutida, ressaltando a influência de algumas especificações na qualidade da técnica, como a utilização do papel com grau 903 e a padronização do diâmetro da mancha para detecção.

A partir de sua primeira implementação, a técnica ganhou popularidade e seu uso foi ampliado para a detecção de outros analitos. Entretanto, durante alguns anos, a sua efetiva utilização foi barrada pela falta de métodos analíticos sensíveis, que tornassem possíveis a detecção qualitativa e quantitativa de baixas quantidades e com alta especificidade. Com a introdução de detectores mais sensíveis como os detectores de massas, tornou-se possível a amplificação desta ferramenta para o uso em triagens neonatais, no diagnóstico de doenças e, mais recentemente, no monitoramento terapêutico (HANNON; THERRELL, 2014).

Atualmente, dois procedimentos de coleta utilizando papéis filtros são usualmente realizados. O primeiro consiste na punção venosa (no caso do DBS) ou coleta de outra matriz diretamente no cartão, sem volume predefinido de aplicação. Neste caso, a quantidade de amostra a ser analisada dependerá do diâmetro da punção realizada no papel. No segundo procedimento, uma quantidade predefinida de amostra é aplicada no papel utilizando pipeta ou outro instrumento volumétrico para auxiliar. Esta segunda aplicação é principalmente utilizada no caso de matrizes alternativas, como urina, suor e FO, nas quais não realiza punção capilar venosa e,

portanto, a coleta é normalmente feita externamente. Embora diferentes, os dois procedimentos objetivam e devem garantir a constante quantidade de material a ser analisada, garantido a repetibilidade e reprodutibilidade da técnica. Após a coleta, a análise segue com a posterior secagem, punção do *spot* e extração dos analitos de interesse da matriz seca, procedimento que pode ser realizado através de extração líquida ou através de métodos mais complexos e onerosos como extração em fase sólida ou dessorção direta (CRAWFORD *et al.*, 2011; WISEMAN *et al.*, 2010).

O papel filtro utilizado para coleta nesta técnica deve apresentar especificações bem estabelecidas e ser desenvolvido para absorver um volume específico de amostra em determinada área do material (JESÚS; CHACE, 2012), a fim de garantir a reprodutibilidade na aplicação da técnica. Antes da utilização do papel filtro como ferramenta de triagem neonatal, nenhum controle sobre a qualidade dos mesmos era realizado. Com a crescente inconsistência na homogeneidade surgiu a necessidade de monitorar a qualidade do papel filtro produzido. Atualmente os papéis utilizados na coleta de sangue devem apresentar homogeneidade e consistência entre os lotes que atendam ao especificado no padrão aprovado NBS-01-A7 do *Clinical and Laboratory Standards Institute*, atualmente em sua sétima edição (CLSI, 2021). Uma vez que a punção realizada no papel determina a retirada de um volume de amostra para análises quantitativa, é imperativo que este material apresente um grau de uniformidade tal que a diferença entre lotes não influencie na performance das análises realizadas. O *Centers for Disease Control and Prevention's Newborn Screening Quality Assurance Program* (NSQAP) avalia a qualidade de diferentes papéis grau 903 por mais de 30 anos nos Estados Unidos (JESÚS; CHACE, 2012). Dentre os testes que avaliam a qualidade do papel filtro estão: o volume de soro contido em um disco esférico de diâmetro de 3,2 mm retirado de um DBS preparado com volume padrão de sangue com valor de hematócrito conhecido; o tempo requerido para absorver um volume padrão de sangue; a aparência do DBS; e o tamanho da mancha criada através da aplicação de um volume padrão de amostra (HANNON; THERRELL, 2014).

A punção é realizada na parte central da mancha aplicada sobre o papel para após ser encaminhada ao processo de extração. Existem muitas ferramentas de punção manuais de baixo custo e disponíveis no mercado, que normalmente compreendem diâmetros de 0,35 a 12,0 mm. Embora o efeito residual do processo de punção não seja relatado, sugere-se que o procedimento seja feito em ordem

crescente de concentração ou com a presença de amostras brancas entre as punções a fim de evitar possíveis contaminações (WONG; JAMES, 2014).

Estudos que utilizam matrizes alternativas vêm sendo relatados, embora ainda sejam incomuns. Entre as matrizes já utilizadas estão o líquido cefalorraquidiano (RAGO *et al.*, 2011), fluido sinovial (CHRISTIANSON *et al.*, 2010) e FO (ZHENG *et al.*, 2016), este último utilizado para fins de estudos farmacocinéticos e monitoramento terapêutico.

3.4.1 Vantagens, desvantagens e limitações

O aumento da utilização desta técnica ao longo dos anos ocorreu principalmente devido às diversas vantagens que são oferecidas e amplamente relatadas na literatura. Entre elas, destaca-se o relativo baixo custo, a técnica de coleta simples e pouco invasiva, dispensando a necessidade de treinamento para realizá-la; a diminuição do risco de contaminação e o simples transporte e armazenamento, sendo que em grande parte dos estudos realizados as amostras são estáveis por longos períodos de tempo (HANNON; THERRELL, 2014). Além disso, a utilização de pequenos volumes da matriz simplifica os procedimentos de coleta e torna mais viável a realização de estudos pré-clínicos com humanos e animais, gerando conseqüentemente menores custos para a realização destes estudos (CHEN *et al.*, 2012).

A constituição dos papéis filtros utilizados nas metodologias devem ser cuidadosamente observados, pois podem determinar muitas vezes efeitos analíticos indesejáveis através de possíveis interações entre os constituintes do cartão e o analito (CHEN *et al.*, 2012). A estabilidade e extração dos analitos são altamente dependentes da escolha do papel, podendo o composto interagir com os diferentes tipos de papéis hoje disponíveis no mercado, incluindo os de superfícies quimicamente tratadas e não tratadas. Os papéis quimicamente tratados não são necessariamente inertes (BOWEN; EVANS, 2014) e estudos já demonstraram alterações cromatográficas devido à interação entre moléculas que possuem grupamento amino com papéis de superfícies tratadas utilizando fase móvel ácida. Efeitos como alterações no tempo de retenção e a piora na resolução através da deformação dos picos evidenciam o cuidado na escolha do papel a ser utilizado (CHEN *et al.*, 2012).

Para o caso de DBS, é de substancial importância a consideração do hematócrito no desenvolvimento da metodologia. O hematócrito altera a viscosidade do sangue e influencia no procedimento de coleta, alterando o volume sérico depositado sobre o papel e a capacidade de difusão da amostra, podendo levar a importantes alterações analíticas (HANNON; THERRELL, 2014). Quanto maiores os valores de hematócrito observados, maior a viscosidade do sangue e, portanto, menor a espalhabilidade no papel, diminuindo o tamanho da mancha para um mesmo volume de sangue com hematócrito menor. Portanto, a variabilidade nos valores do hematócrito influencia diretamente na exatidão da determinação de concentração do analito na DBS. Uma das maneiras de contornar esta limitação da técnica aplicada ao sangue é deixar de utilizar a técnica de punção e fazer a extração de toda a mancha de sangue aplicada no papel. Desta forma, não há o viés no volume retirado dependente do hematócrito (WONG; JAMES, 2014).

4 MANUSCRITO I

A seguir encontra-se disposto o artigo intitulado “Dried matrix spots: an evolving trend in the toxicological field”, submetido à publicação na revista Forensic Science, Medicine and Pathology. No texto completo da tese defendida, o artigo ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 32 – 56. Este artigo apresenta a revisão dos principais métodos analíticos que aplicaram a técnica de DMS para o monitoramento de drogas de abuso publicados a partir de 2010.

5 MANUSCRITO II

O manuscrito é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 58 – 78.

JACQUES, Ana Laura Bemvenuti; SANTOS, Maíra Kerpel dos; LIMBERGER, Renata Pereira. Development and Validation of a Method Using Dried Oral Fluid Spot to Determine Drugs of Abuse. *Journal of Forensic Sciences*, v. 64, n. 6, p. 1906–1912, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1556-4029.14112>.

O artigo aborda o desenvolvimento e validação de metodologia analítica aplicando DOFS para análise de cocaína, cocaetileno, BZE, MDMA e anfetamina por LC-MS. Os procedimentos de extração, punção e secagem foram otimizados, bem como a homogeneidade do *spot* foi estudada. O método foi satisfatoriamente validado, apresentando limite de detecção de 40 ng/mL e demonstrando a viabilidade da aplicação do FO a técnica de DMS para o monitoramento de drogas de abuso.

6 DISCUSSÃO GERAL

Embora considerado padrão ouro para análises toxicológicas, o uso de cromatografia gasosa (CG) possui suas limitações devido a sua natureza metodológica, limitando-se à análise de compostos não polares, suficientemente voláteis e termoestáveis, condições que não são atendidas pelas substâncias aqui estudadas. Para moléculas polares ou termicamente instáveis, o procedimento de derivatização é recomendado a fim de converter os analitos a produtos voláteis, bem como buscando melhorar o perfil cromatográfico e o espectro de massas da substância em questão. Entretanto, a adoção desses procedimentos na rotina é dispendiosa por consumir excessivo tempo de preparo de amostras e elevar o custo da análise. Dessa forma, para estas substâncias pode ser mais vantajoso o desenvolvimento da metodologia por cromatografia líquida, que hoje tem seu uso reconhecido nas ciências forenses, principalmente quando associado à espectrometria de massas, que alia sensibilidade à alta confiabilidade de identificação (RIVIER, 2003; WOOD *et al.*, 2006). Pelos motivos acima citados, optou-se por realizar o desenvolvimento do método por CLAE-EM. Embora idealmente outras técnicas de maior sensibilidade como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM) pudessem agregar maior sensibilidade e, com isso, a obtenção de um menor limite de detecção, a indisponibilidade destes equipamentos não inviabilizou o desenvolvimento deste método analítico com limites de quantificação satisfatórios.

O Fórum Europeu de Bioanálises (*European Bioanalysis Forum – EBF*) discute em detalhes as recomendações específicas relacionadas à validação de métodos para a técnica de DBS (TIMMERMAN *et al.*, 2011, 2013). Embora as recomendações sejam direcionadas a utilização da matriz sangue, as matrizes alternativas aplicadas à técnica de DMS podem seguir o preconizado, aplicando-se as devidas modificações inerentes às especificidades de cada matriz (TIMMERMAN *et al.*, 2011, 2013). Portanto, observações com relação a amostras biológicas hemolíticas, ao hematócrito e ao uso de anticoagulantes não foram consideradas na validação da metodologia aplicada ao FO, embora seja importante ressaltar que se a utilização de FO coletado com o uso de tampão for realizada, adequada avaliação da influência dessa substância deve ser feita no processo de validação, já que este efeito não foi mensurado uma vez que a matriz utilizada para a validação consistiu

no FO coletado sem adição de qualquer substância. Entretanto, fatores de elevada importância durante o estudo de métodos de DMS citados por guias da EBF para a matriz sangue, como a homogeneidade da mancha aplicada no papel, volume de matriz depositado e o tempo de secagem ideal, foram igualmente investigados a fim de estabelecer como estes se manifestam quando aplicados para o FO.

A EBF baseia suas sugestões relativas à validação no guia de validação bioanalítico da *Food and Drug Administration* (FDA) (FDA, 2018), realizando as devidas adaptações dos critérios preconizados nesta guia para a validação bioanalítica de DBS, levantando questões como quais os critérios que devem ser necessariamente mantidos ou acrescentados no protocolo e quais os que não mais se aplicam para este fim (TIMMERMAN *et al.*, 2011). Uma das considerações importantes consiste na ausência da necessidade de realização do estudo de estabilidade de ciclos de congelamento e descongelamento, característicos para amostras líquidas, bem como os de longa e curta duração em geladeira ou freezer. As técnicas de resfriamento citadas não são usualmente aplicáveis às técnicas de *dried spot*, já que não representam a prática comum para este fim (TIMMERMAN *et al.*, 2011, 2013).

Na técnica de DBS, a influência do hematócrito é significativa principalmente para a homogeneidade do *spot* formado, resultando em diferentes capacidades de difusão da matriz biológica no papel (TIMMERMAN *et al.*, 2011). O hematócrito é o problema mais desafiador quanto ao desenvolvimento de um método de quantificação por DBS (ENDERLE; FOERSTER; BURHENNE, 2016). Para o FO, esperava-se que esta influência na espalhabilidade não fosse significativa, já que a composição do fluido é majoritariamente aquosa e com baixo teor de proteínas, levando a uma menor probabilidade de influência sobre a difusão. Entretanto, considerando o muco presente nesta matriz e a possibilidade de que desta forma a homogeneidade fosse afetada pela dificuldade de difusão da matriz sobre o papel, estudou-se este processo também para esta matriz. A verificação deste parâmetro é de suma importância principalmente quando a amostra é obtida através do método de punção. Portanto, o estudo de homogeneidade foi realizado visando avaliar a representatividade da amostra coletada através da metodologia proposta de punção de diâmetro de 10 mm do papel. A homogeneidade não apresenta, normalmente, viés significativo que possa interferir nas análises, já que teoricamente o papel deve apresentar padronização suficiente para que a amostra biológica difunda de maneira

equivalente ao longo do *spot* formado. Entretanto, há relatos que descrevem diferenças significativas entre punções realizadas no centro e na periferia do *spot* (JAGER *et al.*, 2014). Recomenda-se que, a fim de evitar possíveis variações, a punção seja realizada a partir de um tamanho suficientemente grande, de aproximadamente 3 mm de diâmetro para 15 μ L adicionados (TIMMERMAN *et al.*, 2011). Neste contexto, a punção de 10 mm realizada para a validação do DOFS está em concordância com o disposto pelos autores. De fato, os dados obtidos após a realização da avaliação da homogeneidade da área a ser puncionada corroboram com a boa homogeneidade, já que a punção em diferentes regiões periféricas e centrais do papel para os controles de qualidade alto (CQA) e baixo (CQB) do método desenvolvido demonstraram satisfatória exatidão. A homogeneidade observada diverge das literaturas que relatam a impossibilidade de utilizarem-se matrizes incolores para a técnica de DMS, principalmente pela dificuldade de identificação do exato local a ser realizada a punção. Uma alternativa apresentada por estes trabalhos reside na aplicação de corantes indicadores que não estão facilmente disponíveis para aquisição e necessitam ser completamente estudados antes de utilizados, a fim de não interferirem na metodologia e serem completamente compatíveis com a matriz estudada (NEEDHAM, 2014). Entretanto, verificou-se que, embora ocorra uma dificuldade na identificação do *spot* após a secagem, se a amostra é aplicada em uma região bem delimitada do papel, o que de fato acontece para a maioria dos métodos desenvolvidos por DMS, a visualização da matriz não é estritamente necessária e não inviabiliza o uso da técnica de punção do papel.

O tamanho da gota de matriz biológica aplicada sobre o papel gera uma importante influência sobre os resultados obtidos. Na literatura, duas principais metodologias de aplicação da amostra são realizadas: a primeira consiste no uso de quantidades pré-fixadas de amostra biológica, utilizando-se pipeta volumétrica para isto; ou através da aplicação de volumes não controlados, seja através do uso de pipeta *Pasteur* ou capilares (EDELBOEK; HEIJDEN; STOLK, 2009). A escolha irá depender da técnica realizada e da aplicação que se pretende dar ao método. Assim, se a técnica não utilizar a punção de um diâmetro definido de papel, necessariamente uma quantidade controlada de volume de amostra deverá ser pipetada. Entretanto, nesse caso deve-se assumir a necessidade de se utilizar volumes controlados, o que pode ser um fator complicador ao aplicar o método em locais não laboratoriais, inviabilizando muitas das aplicações *in loco* passíveis de

serem realizadas por esta técnica. Já os métodos que utilizam a punção do papel como escolha, como o DBS, vêm demonstrando que não há necessidade da realização de aplicação de volumes fixos de amostra por não influenciarem nas determinações quantitativas (ENDERLE; FOERSTER; BURHENNE, 2016), já que os resultados se mantêm exatos em diferentes volumes aplicados. Por estes motivos, optou-se por realizar o desenvolvimento deste método através do método de punção. Entretanto, durante a validação do método não é recomendada a utilização de volumes aleatórios de matriz biológica, já que podem influenciar negativamente na formação da mancha no papel, bem como no tempo de secagem que ainda está em processo de desenvolvimento (TIMMERMAN *et al.*, 2011). Desta forma, a validação do método foi realizada através da utilização de pipeta com volume definido de 50 μL . Após a validação, o estudo da influência do volume de amostra aplicado foi realizado a fim de definir a necessidade de utilização de volumes de coleta fixos. Os resultados obtidos demonstram a robustez do método na aplicação de diferentes volumes de amostra até o volume de 100 μL . A deposição de uma gota sem qualquer controle de volume demonstrou resultados satisfatórios de exatidão ($\pm 15\%$ de variação nominal), demonstrando a homogeneidade de difusão da amostra no papel. Entretanto, a aplicação de volume de 100 μL de amostra apresentou desvio de exatidão um pouco maior que 15%, sugerindo a saturação do papel pela aplicação de volume excessivo de amostra. A aplicação de um volume pré-definido e controlado em um papel previamente cortado em dimensões pré-estabelecidas pode ser interessante quando forem verificados problemas relativos à homogeneidade da matriz no papel e no processo de punção.

As folhas ou cartões de coleta de amostra no papel filtro podem apresentar uma variabilidade entre si, natural do processo de fabricação, mesmo sendo de iguais fabricantes e lotes. Portanto, recomenda-se avaliar essa possibilidade de variação durante a validação, principalmente se os critérios de precisão e exatidão não forem atendidos (TIMMERMAN *et al.*, 2011). A previsão desta variabilidade foi considerada no desenvolvimento do método, na qual os estudos de precisão e exatidão foram realizados em diferentes folhas de papel Whatman® grau 903 disponíveis para o desenvolvimento deste método. Os resultados satisfatórios de exatidão e precisão confirmam que a intervariabilidade entre diferentes folhas, apesar de existirem não influenciam os resultados de maneira significativa. Entretanto, é importante ressaltar que uma vez modificado o fabricante ou a

especificação do papel, recomenda-se que uma validação parcial da metodologia seja realizada (TIMMERMAN *et al.*, 2011).

O procedimento de extração da matriz influencia criticamente a sensibilidade do método que é de substancial importância no monitoramento de drogas de abuso. Isto porque a fim de alcançar baixos limites de detecção e quantificação a maioria dos artigos disponíveis realiza a extração líquida com o solvente escolhido e, após, procede à secagem do material e reconstituição com baixos volumes de solventes. O objetivo é claramente impedir a diluição da amostra no processo de extração e assim permitir que baixas concentrações sejam detectadas, melhorando o limite de detecção (WONG; JAMES, 2014). Entretanto, a adição de etapas de secagem e reconstituição são fatores que podem influenciar na reprodutibilidade da técnica, bem como oneram em tempo e em custo. Idealmente, o solvente extrator deverá ser o mesmo para a injeção no sistema analítico, eliminando a etapa de secagem e reconstituição. A metodologia aqui proposta apresenta esta vantagem por descartar a necessidade de concentração das amostras através de secagem, que ao demandar mais uma etapa no processo analítico, poderia aumentar a variabilidade, custo e tempo de execução das análises.

A utilização do padrão interno como meio de compensar as flutuações existentes nos processos de extração pode não ter sua finalidade completa no caso do desenvolvimento deste método, considerando que o padrão interno foi adicionado na etapa de extração com o solvente extrator e não previamente na própria matriz biológica, o que seria esperado em típicas preparações líquidas. Entretanto, diversas possibilidades do uso de padrão interno para DBS já foram descritas a fim de verificar a que melhor descreveria a análise acompanhando as variações inerentes ao processo (VAN BAAR *et al.*, 2013). Nenhuma abordagem apresentou resultados que pudessem gerar padrões definitivos do melhor processo a ser escolhido e que pudessem ser aplicados a todas as substâncias. Todavia, a utilização do padrão interno diretamente no solvente extrator mostrou resultados satisfatórios, juntamente com a aplicação por *spray* diretamente no papel antes da extração (VAN BAAR *et al.*, 2013). Dessa forma, a aplicação direta do padrão interno no solvente extrator ainda é mais vantajosa, considerando que a utilização do *spray* dificulta e onera o processo.

Embora o método desenvolvido seja uma metodologia simples de ser aplicada, deve-se garantir o adequado treinamento do coletador nas boas práticas

do procedimento, a fim de garantir a reprodutibilidade do processo. A contaminação através do toque do manipulador deve ser evitada, bem como se deve atentar ao procedimento de aplicação na qual a sobreposição de gotas de amostra não deve ocorrer. A punção não deve ser realizada antes do término do tempo de secagem, assim como no armazenamento deve ser evitada a exposição dos papéis ao calor, luz e umidade excessiva, bem como evitar a sobreposição dos papéis a fim de evitar contaminação cruzada.

Com relação à utilização da técnica de DBS para detecção e quantificação de MDMA, Jantos e col., (2011) estimaram a relação sangue total/DBS e reportaram uma relação de 0,99 entre eles (JANTOS *et al.*, 2011). A boa correlação evidencia que as técnicas podem ser comparáveis entre si e representa um bom indicador de aplicabilidade de DMS. Entretanto, estudos como esses são escassos e necessitam ser ampliados e realizados para outras matrizes como o FO, a fim de respaldar o uso da técnica de DMS de forma definitiva.

A técnica discutida e aplicada neste trabalho apresenta diversas vantagens que permitem sua aplicação em uma variedade de matrizes biológicas, bem como em um espectro amplo de detecção de analitos para aplicações diagnósticas, farmacológicas e toxicológicas. O baixo volume de amostra, o processo de extração simples, a capacidade de quantificação com reprodutibilidade, bem como a eliminação da necessidade do uso de conservantes na coleta, são algumas das vantagens possíveis de serem identificadas. Devido às reconhecidas vantagens, diferentes objetivos vêm sendo dados à aplicação destas técnicas e sabe-se que a gama de possibilidades envolvendo a coleta, armazenamento, transporte e análise são ilimitadas (HANNON; THERRELL, 2014). A viabilidade da técnica de DOFS abre precedentes para um maior desenvolvimento de DMS utilizando matrizes alternativas.

7 CONCLUSÃO

O novo método foi desenvolvido propondo-se aplicar a técnica de DOFS para o monitoramento de drogas de abuso. Através de abordagem quimiométrica, a extração dos analitos foi otimizada, bem como foi determinado o tempo de secagem ideal do *spot*. Os parâmetros de validação determinados foram satisfatórios e o estudo complementar de homogeneidade do *spot* permitiu inferir a adequada difusão da matriz no *spot*, dentro dos limites de volume avaliados. A validação bem-sucedida abre precedentes que viabilizam a aplicação do FO em técnicas de DMS. A vantagem do desenvolvimento do método reside na possibilidade de sua aplicação *in loco*, ou seja, que este possa ser implementado em estudos de monitoramento do trânsito ou em clínicas com uma coleta simples, assistida e não invasiva.

É imperiosa a aplicação do método em amostras reais, preferencialmente de usuários de drogas de abuso, para que se possa traçar um paralelo entre os resultados do método desenvolvido e de outro já consolidado para as mesmas drogas de abuso. Além disso, é importante ressaltar que os métodos de DMS, embora extensivamente estudados por diversos pesquisadores, estão em constante evolução na área bioanalítica, principalmente se aplicados a novas matrizes biológicas. Portanto, ao expandir este método para novas matrizes, ressalta-se a importância de analisar criticamente os resultados, verificando fragilidades que possam ser identificadas em outras aplicações.

Neste contexto, a realização deste trabalho abre precedentes ao demonstrar a viabilidade do desenvolvimento de DOFS para o monitoramento de drogas de abuso, oportunizando o surgimento de novos estudos que evidenciem a sua aplicabilidade ou que ampliem a técnica através da aplicação em novas matrizes biológicas, além do FO.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, Stella Pereira de; SILVA, Maria Teresa Araujo. Ecstasy (MDMA): Effects and patterns of use reported by users in São Paulo. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, n. 1, p. 11–17, 2003.
- ALVES, Emanuele Amorim *et al.* Chemical Profile and Toxicological Features of Ecstasy Tablets Seized in Rio De Janeiro, Brazil. **Journal of Forensic Toxicology and Pharmacology**, v. 02, n. 02, p. 3–7, 2013.
- APS, Johan K.M.; MARTENS, Luc C. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. **Forensic Science International**, v. 150, n. 2–3, p. 119–131, 2005.
- BOSKER, Wendy M.; HUESTIS, Marilyn A. Oral fluid testing for drugs of abuse. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 11, p. 1910–1931, 2009.
- BOWEN, Chester L.; EVANS, Christopher A. Challenges and Experiences with Dried Blood Spot Technology for Method Development and Validation. *In*: LI, Wenkui; LEE, Mike S. (org.). **Dried Blood Spots: Applications and Techniques**. 1. ed. Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2014. p. 179–187.
- CAPELA, João Paulo *et al.* Molecular and Cellular Mechanisms of Ecstasy-Induced Neurotoxicity: An Overview. **Molecular Neurobiology**, v. 39, n. 3, p. 210–271, 2009.
- CAPELA, João Paulo; CARVALHO, Félix Dias. Anfetaminas e derivados. *In*: DINIS-OLIVEIRA, Ricardo Jorge; CARVALHO, Félix Dias; BASTOS, Maria de Lourdes (org.). **Toxicologia Forense**. 1. ed. Lisboa: Pactor, 2015. p. 203–214.
- CARVALHO, Márcia *et al.* Toxicity of amphetamines: An update. **Archives of Toxicology**, v. 86, n. 8, p. 1167–1231, 2012.
- CAZENAVE, Sílvia de Oliveira Santos; COSTA, Jose Luiz da. Alucinógenos. *In*: OGA, Seizi; CAMARGO, Marcia Maria de A.; BATISTUZZ, José Antonio de O. (org.). **Fundamentos De Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 447–464.
- CHEN, Xiaohui *et al.* Investigation of dried blood spot card-induced interferences in liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 61, p. 30–37, 2012.
- CHRISTIANSON, Chad *et al.* Dried Blood Spot Analysis – Utilizing the Technique to Develop Assays in Rare or Limited Matrices. *In*: , 2010, Salt Lake City. **ASMS Conference**. Salt Lake City: [s. n.], 2010.
- CLSI. **Dried Blood Spot Specimen Collection for Newborn Screening**. [S. l.]: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2021.
- CONCHEIRO, Marta *et al.* Determination of drugs of abuse and their metabolites in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry: An application to 156

road fatalities. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 832, n. 1, p. 81–89, 2006.

CONE, E. J; HUESTIS, M. A. Interpretation of Oral Fluid Tests for Drugs of Abuse. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1098, n. 1, p. 51–103, 2007.

CRAWFORD, Elizabeth *et al.* Direct analysis in real time coupled with dried spot sampling for bioanalysis in a drug-discovery setting. **Bioanalysis**, v. 3, n. 11, p. 1217–1226, 2011.

CROUCH, Dennis J. Oral fluid collection: The neglected variable in oral fluid testing. **Forensic Science International**, v. 150, n. 2–3, p. 165–173, 2005.

EDELBROEK, Peter M.; HEIJDEN, J. V D; STOLK, L. M L. Dried blood spot methods in therapeutic drug monitoring: Methods, assays, and pitfalls. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 31, n. 3, p. 327–336, 2009.

ENDERLE, Yeliz; FOERSTER, Kathrin; BURHENNE, Jurgen. Clinical feasibility of dried blood spots: Analytics, validation, and applications. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 130, p. 231–243, 2016.

FDA. **Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation**. [S. l.]: Food and Drug Administration, 2018.

FREDERICK, Donald L. Toxicology testing in alternative specimen matrices. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 32, n. 3, p. 467–492, 2012.

GUTHRIE, Robert. Blood Screening for Phenylketonuria. **Jama**, v. 178, n. 8, p. 863–863, 1961.

GUTHRIE, Robert; SUSI, Ada. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. **Pediatrics**, v. 32, p. 338–343, 1963.

HANNON, W. Harry; THERRELL, Bradford L. Overview of the History and Applications of Dried Blood Samples. *In*: LI, Wenkui; LEE, Mike S. (org.). **Dried Blood Spots: Applications and Techniques**. 1. ed. Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2014. p. 1–15.

JAGER, Nynke G.L. *et al.* Procedures and practices for the validation of bioanalytical methods using dried blood spots: A review. **Bioanalysis**, v. 6, n. 18, p. 2481–2514, 2014.

JANTOS, Ricarda *et al.* Analysis of 3,4-methylenedioxymetamphetamine: Whole blood versus dried blood spots. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 35, n. 5, p. 269–273, 2011.

JESÚS, Víctor R de; CHACE, Donald H. Letter to the Editor: Commentary on the history and quantitative nature of filter paper used in blood collection devices. **Bioanalysis**, v. 4, n. 6, p. 645–647, 2012.

KALANT, Harold. The pharmacology and toxicology of “ecstasy” (MDMA) and related drugs. **Canadian Medical Association Journal**, v. 165, n. 7, p. 917–928, 2001.

KRAEMER, Thomas; MAURER, Hans H. Toxicokinetics of Amphetamines: Metabolism and Toxicokinetic Data of Designer Drugs, Amphetamine, Methamphetamine, and Their N-Alkyl Derivatives. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 24, n. 2, p. 277–289, 2002.

LA TORRE, Rafael de *et al.* Human Pharmacology of MDMA. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 26, n. 2, p. 137–144, 2004.

LALOUP, Marleen *et al.* Validation of an ELISA-based screening assay for the detection of amphetamine, MDMA and MDA in blood and oral fluid. **Forensic Science International**, v. 153, n. 1, p. 29–37, 2005.

LOGAN, B. K.; COUPER, F. J. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine — Effects on Human Performance and Behavior. **Forensic science review**, v. 15, n. 11, p. 12–28, 2003.

MANTOVANI, Cíntia de Carvalho; PEGO, Ana Miguel Fonseca; YONAMINE, Mauricio. Cocaína. *In*: DINIS-OLIVEIRA, Ricardo Jorge; CARVALHO, Félix Dias; BASTOS, Maria Lourdes (org.). **Toxicologia Forense**. 1. ed. Lisboa: Pactor, 2015. p. 217–228.

NAVARRO, M. *et al.* Usefulness of saliva for measurement of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and its metabolites: Correlation with plasma drug concentrations and effect of salivary pH. **Clinical Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 1788–1795, 2001.

NEEDHAM, Shane R. Beyond Dried Blood Spots-Application of Dried Matrix Spots. *In*: LI, Wenkui; LEE, Mike S. (org.). **Dried Blood Spots: Applications and Techniques**. 1. ed. Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2014. p. 235–241.

PARROTT, A. C. Is ecstasy MDMA? A review of the proportion of ecstasy tablets containing MDMA, their dosage levels, and the changing perceptions of purity. **Psychopharmacology**, v. 173, n. 3–4, p. 234–241, 2004.

PASSAGLI, Marcos; CARVALHO, Patricia Domingues. Drogas estimulantes do sistema nervoso central: êxtase. *In*: PASSAGLI, Marcos (org.). **Toxicologia Forense: teoria e prática**. 4. ed. Campinas: Millenium, 2013. p. 150–157.

PASSAGLI, Marcos; RODRIGUES, Roberta de Faria. Drogas estimulantes do sistema nervoso central: anfetaminas. *In*: PASSAGLI, Marcos (org.). **Toxicologia Forense: teoria e prática**. 4. ed. Campinas: Millenium, 2013. p. 133–150.

RAGO, Brian *et al.* Application of the dried spot sampling technique for rat cerebrospinal fluid sample collection and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 5, p. 1201–1207, 2011.

RIVIER, Laurent. Criteria for the identification of compounds by liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-multiple mass spectrometry in forensic toxicology and doping analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 492, n. 1–2, p. 69–82, 2003.

TIMMERMAN, Philip *et al.* EBF recommendation on the validation of bioanalytical methods for dried blood spots. **Bioanalysis**, v. 3, n. 14, p. 1567–1575, 2011.

TIMMERMAN, Philip *et al.* Update of the EBF recommendation for the use of DBS in regulated bioanalysis integrating the conclusions from the EBF DBS-microsampling consortium. **Bioanalysis**, v. 5, n. 17, p. 2129–2136, 2013.

UNODC. **World Drug Report 2021**. [S. l.]: United Nations publication, 2021.

VAN BAAR, Ben L.M. *et al.* IS addition in bioanalysis of DBS: Results from the EBF DBS-microsampling consortium. **Bioanalysis**, v. 5, n. 17, p. 2137–2145, 2013.

WALSH, J. Michael *et al.* Guidelines for research on drugged driving. **Addiction**, v. 103, n. 8, p. 1258–1268, 2008.

WISEMAN, Justin M. *et al.* Direct analysis of dried blood spots utilizing desorption electrospray ionization (DESI) mass spectrometry. **The Analyst**, v. 135, n. 4, p. 720, 2010.

WONG, Philip; JAMES, Christopher A. Punching and Extraction Techniques for Dried Blood Spot Sample Analysis. *In*: LI, Wenkui; LEE, Mike S. (org.). **Dried Blood Spots: Applications and Techniques**. 1. ed. Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2014. v. 9781118054, p. 160–167.

WOOD, Michelle *et al.* Quantitative analysis of multiple illicit drugs in preserved oral fluid by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Forensic Science International**, v. 150, n. 2–3, p. 227–238, 2005.

WOOD, Michelle *et al.* Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry in forensic science. **Journal of Chromatography A**, v. 1130, n. 1 SPEC. ISS., p. 3–15, 2006.

WU, Li Tzy *et al.* The high prevalence of substance use disorders among recent MDMA users compared with other drug users: Implications for intervention. **Addictive Behaviors**, v. 34, n. 8, p. 654–661, 2009.

ZHENG, Naiyu *et al.* Bioanalysis of dried saliva spot (DSS) samples using detergent-assisted sample extraction with UHPLC-MS/MS detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 934, p. 170–179, 2016.