

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

**Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas confirmatórias para  
análise de substâncias psicoativas em trânsito**

**TAÍS REGINA FIORENTIN**

**PORTO ALEGRE, 2017**



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

**Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas confirmatórias para  
análise de substâncias psicoativas em trânsito**

Tese apresentada por **Taís Regina  
Fiorentin** para obtenção do TÍTULO DE  
DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dr. Renata Pereira Limberger  
Co-Orientadora: Dr. Tanara Rosângela Vieira Sousa

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 26.06.2017, pela banca examinadora constituída por:

*Dr. Kristiane de Cássia Mariotti*

Polícia Federal

*Prof. Dr. Pedro Eduardo Froehlich*

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

*Dr. Rafael Scorsatto Ortiz*

Polícia Federal

#### CIP - Catalogação na Publicação

Fiorentin, Tais Regina  
Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas confirmatórias para a análise de substâncias psicoativas em trânsito / Tais Regina Fiorentin. -- 2017.  
187 f.

Orientador: Renata Pereira Limberger.  
Coorientador: Tanara Rosângela Vieira Sousa.

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. Cocaína. 2. Validação bioanalítica. 3. Métodos confirmatórios. 4. Trânsito. I. Limberger, Renata Pereira, orient. II. Sousa, Tanara Rosângela Vieira, coorient. III. Título.

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

Agradecimentos à CAPES, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho, ao Laboratório de Toxicologia (LABTOXICO) e The Center for Forensic Science Research & Education (CFSRE) que disponibilizaram equipamentos e material necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração da presente tese.



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha orientadora Renata Pereira Limberguer e co-orientadora Tanara Rosângela Vieira Sousa pela confiança na realização deste trabalho.

À todos os professores envolvidos nesses anos de caminhada, pelos conhecimentos adquiridos e pela curiosidade despertada.

À minha família que sempre foi meu alicerce. Aos meus pais, Nelsira e Eloar por serem sempre meu exemplo de bondade e humildade. À minha irmã Cristiane por ser o mais perfeito ponto de referência e exemplo a ser seguido e ao meu cunhado Wagner por ter entrado e contribuído tanto nessa família. Vocês são as melhores pessoas do meu mundo!

À minha querida Vó Alma, que um dia eu consiga ser apenas uma fração da mulher que você é, e já serei feliz.

À todos os meus tios, tias, primos e primas dessa grande família que me ensinam todo dia das mais diversas formas.

Aos meus amigos das mais diferentes fases da minha vida: Carla, Ane, Chana, Rafa, Lucas, Re, Fran e Bruna, vocês permanecem por um motivo.

Aos meus amigos do intercâmbio que em tão pouco tempo se tornaram minha família mais próxima e me ajudaram a vencer essa etapa final.

Aos colegas de todos os laboratórios envolvidos na realização deste trabalho.

À Polícia Federal, ao CPAD e ao The Center for Forensic Science Research & Education pela parceria na realização desse trabalho.





*“If you want to go fast, go alone. If you want to go far, go together”*

*(African proverb)*

*“Se você quer ir rápido, vá sozinho. Se quer ir longe, vá em grupo”*

*(Provérbio Africano)*



## RESUMO

A cocaína (COC) é um alcaloide presente nas folhas de espécies do gênero *Erythroxylum novagranatense* e *Erythroxylum coca*. Possui grande efeito estimulante sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) e por isso é utilizada como droga de abuso. Dentre os principais metabólitos estão a benzoilecgonina (BZE), éster metil anidroecgonina (EMA) e anidroecgonina (AEC), sendo que os dois últimos são provenientes de pirólise (consumo do crack através do fumo ou inalação). Ainda, o cocaetileno (CE) é biotransformado após a ingestão conjunta de COC e etanol. O consumo de substâncias psicoativas (SPA), dentre elas a COC e seus derivados, traz diversos prejuízos à saúde dos usuários, principalmente quando se considera a interação causada pelos compostos adulterantes, adicionados à droga para aumentar lucros e mimetizar os efeitos desejados. Ainda, o uso associado ao trânsito, é uma preocupação crescente em toda a sociedade, pois eleva em números consideráveis a chance da ocorrência de acidentes de trânsito. A detecção de SPA pode ser feita em uma variedade de matrizes biológicas, sendo que cada uma possui suas particularidades, incluindo diferentes janelas de detecção. Análises realizadas em fluido oral (FO), urina e sangue são recomendadas por guias nacionais e internacionais para a detecção de SPA e se complementam pois identificam as drogas intactas e seus produtos de biotransformação em diferentes concentrações e períodos de tempo. A correlação de concentração entre essas matrizes não é bem estabelecida, sendo que diversos estudos reportados na literatura trazem resultados controversos. A validação de métodos analíticos ou bioanalíticos é etapa crucial para a realização de análises seguras e que não deixem margem de dúvida na interpretação dos resultados, caracterizando-se como de extrema importância em todas as áreas da toxicologia. Nesse sentido, foram desenvolvidos e validados métodos para a detecção simultânea de COC, BZE, CE, EMA e AEC em FO, urina e plasma, utilizando cromatografia líquida acoplada a detector de massas (CL-EM), além de três métodos para análise de COC e compostos adulterantes em amostras de apreensão, sendo dois deles qualitativos, utilizando cromatografia gasosa acoplada a detector de massas (CG-EM) e cromatografia gasosa portátil acoplada a detector de massas íon trap (CG-EM-IT) e

um quantitativo utilizando cromatografia líquida acoplada à detector de massas sequencial (CL-EM/EM). Ainda, um estudo de correlação foi aplicado a fim de avaliar a concentração dos metabólitos entre as matrizes biológicas coletadas simultaneamente. As etapas de preparação das amostras nos métodos bioanalíticos compreenderam precipitação de proteínas com acetonitrila, seguida de filtração para urina e plasma e diluição em tampão seguida de filtração para FO. As curvas de calibração foram lineares entre 4,25 e 544,00 ng/mL para FO, e entre 5,00 e 320,00 ng/mL para urina e plasma. Os limites inferiores de quantificação foram iguais à menor concentração das curvas de calibração. Os limites de precisão e exatidão intra e inter-dias mantiveram-se dentro dos limites de  $\pm 20\%$  para o limite de quantificação e  $\pm 15\%$  para os demais controles preconizados pelas guias regulatórias. Os métodos desenvolvidos foram aplicados satisfatoriamente em 110, 116 e 113 amostras de FO, urina e plasma, respectivamente, coletadas de usuários de múltiplas drogas. Os resultados mostraram alta prevalência destes analitos nesta população, especialmente COC e BZE, presentes em 75,8 e 75,0% dos casos, respectivamente. Em relação ao método analítico quantitativo, este se mostrou preciso, exato e linear na faixa de 50 – 2000 ng/mL, todos os demais parâmetros se mantiveram dentro dos limites preconizados. Levamisol (LEV), fenacetina (FEN), cafeína (CAF), hidroxizina (HDZ) e benzocaína (BZC) foram os adulterantes mais encontrados dentre as 166 amostras de apreensão analisadas. O método qualitativo por CG-EM foi efetivo para ser utilizado como método de *screening* para todos os compostos, equanto que o método por CG-EM-IT apresentou restrições de aplicação para alguns compostos. Os capítulos apresentados nesse trabalho abrangem de uma maneira geral a análise de COC e seus derivados em amostras biológicas e material apreendido, assim como trazem uma abordagem em relação aos problemas relacionados ao uso e tráfico de drogas em diferentes cenários. Os métodos desenvolvidos neste trabalho podem ser aplicados, além da área de trânsito e controle de materias apreendidos, em diferentes áreas de conhecimento como laboratórios de toxicologia clínica, forense e no próprio meio científico.

**Palavras-chave:** cocaína, trânsito, drogas de apreensão, validação analítica, cromatografia líquida – espectrometria de massas, cromatografia gasosa – espectrometria de massas.

## ABSTRACT

Cocaine (COC) is an alkaloid which is found in the leaves of *Erythroxylum novagranaense* and *Erythroxylum coca*. COC has a strong stimulant effect on central nervous system (CNS) and this is the reason for its classification as drug of abuse. Benzoylecgonine (BZE), anhydroecgonine methyl ester (AEME) and anhydroecgonine (AEC) are among its main metabolites. AEME and AEC are pyrolysis products that forms as a result of crack-cocaine consumption through smoking or inhalation. Additionally, cocaethylene (CE) is biotransformed after the ingestion of cocaine and alcohol. The use of psychoactive substances (SP), including cocaine and its derivatives, can cause several issues to the health of its users specially when the interactions caused by cutting agents added to the drugs to increase the profits and mimic the effects are taken into consideration. Furthermore, the use of SP combined with driving is an emerging problem since it increases the chances of traffic accidents. The detection of SP can be done in a variety of biological matrices that each has their own particularities such as different windows of detection. The guidelines recommend analysis in oral fluid (OF), urine, and blood for the detection of SP. These three matrices complement each other because it is possible to identify drugs and the products of biotransformation in varying concentrations and periods of time. The coefficient of correlation between those three matrices is not very well established since many studies report conflicting results. The validation of analytical or bioanalytical methods is an important step to ensure accurate results and it is considered essential in every area of toxicology. Therefore, methods for the detection of COC, BZE, AEME, AEC and CE in OF, urine and plasma were developed and validated using liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS). Likewise, three methods (two qualitative and one quantitative) for the detection of COC and known cutting agents in seized drugs were developed using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), portable gas chromatography toroidal ion trap mass spectrometry (GC-TMS), and liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). A correlation study was done to evaluate the drug concentrations in the three matrices collected simultaneously. OF was diluted in buffer while urine and plasma were precipitated

using acetonitrile. Calibration curve ranges were prepared at 4.25 – 544 ng/mL for oral fluid, and 5 – 320 ng/mL for urine and plasma. The lowest concentration of the calibration curves were designated as the lower limit of quantification. The calculated precision and accuracy values were within the limits stipulated by the guidelines ( $\pm 20\%$  for the limit of quantification and  $\pm 15\%$  for the rest of the quality controls). The methods were fully validated and proved to be suitable for analysis of 110, 116, and 113 samples of OF, urine, and plasma, respectively, that were collected from drug users. The results showed high prevalence of SP drugs in this population. Particularly of note, COC and BZE were found in 75.8 and 75.0% of the cases, respectively. The analytical quantitative method proved to be precise, accurate, and linear in the range of 50 – 2000 ng/mL; all the other parameters were within the limits stipulated. Levamisole (LEV), phenacetin (PHN), caffeine (CAF), hydroxyzine (HYDZ), and benzocaine (BZC) were the adulterants most prevalent in the 166 samples analyzed. The analytical qualitative method by GC-MS was shown to be effective as screening method for all the compounds, while the analytical method by GC-TMS was limited due to its incompatibility with certain target compounds. The chapters presented in this work comprise the analysis of cocaine and its derivatives in biological matrices and seized material, as well as an approach relating to the analysis of samples from impaired driving and similar scenarios. The methods developed in this work can be further applied to other areas of science and research including clinical toxicology, general laboratories and forensic laboratories.

**Key-words:** cocaine, traffic, seized drugs, analytical validation, liquid chromatography – mass spectrometry, gas chromatography – mass spectrometry.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Relação entre a faixa de massa molecular e polaridade das substâncias que podem ser analisadas por CG-EM e diversas técnicas de ionização em CL-EM. ....	50
<b>Figura 2.</b> Cocaína e principais produtos de biotransformação.....	56
<b>Figura 3.</b> Estrutura química dos principais compostos adulterantes. (A) Levamisol, (B) Fenacetina, (C) Hidroxizina, (D) Lidocaína, (E) Cafeína, (F) Glucose, (G) Diltiazem, (H) Lactose e (I) Manitol. ....	58
<b>Figura 4.</b> Número de mortes (miles) em acidentes de trânsito no Brasil (1980 – 2011). ....	142





## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Acidentes e vítimas nas rodovias federais no ano de 2014. ....	32
<b>Tabela 2.</b> Custos estimados dos acidentes de trânsito nas rodovias do Brasil (2014). .....	32
<b>Tabela 3.</b> Comparativo das matrizes plasma, FO e urina para drogas de abuso em geral. ....	42
<b>Tabela 4.</b> Guias de validação bionalítica: parâmetros avaliados e critérios de aceitação. ....	46
<b>Tabela 5.</b> Metodologias desenvolvidas para análise de drogas de abuso em CL-EM nos últimos 10 anos. ....	51
<b>Tabela 6.</b> Principais parâmetros dos métodos validados para análise de drogas de apreensão. ....	151



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEC	Anidroecgonina
ACT	Acetaminofeno
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATR-FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com modo de reflectância total atenuada
Bias	Exatidão
BZC	Benzocaína
BZE	Benzoilecgonina
CAF	Cafeína
CE	Cocaetileno
CE-D3	Cocaetileno deuterado
CG-DIC	Cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chamas
CG-EM	Cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de massas
CG-EM/EM	Cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de massas sequencial
CG-EM-IT	Cromatografia em fase gasosa portátil acoplada a detector de massas-íon trap
CG-NDP	Cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de nitrogênio/fósforo
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos
CL-EM	Cromatografia líquida acoplada a detector de massas
CL-EM/EM	Cromatografia líquida acoplada a detector de massas sequencial
COC	Cocaína
CQA	Controle de qualidade alto
CQB	Controle de qualidade baixo
CQD	Controle de qualidade de diluição
CQM	Controle de qualidade médio
CV%	Coefficiente de variação
Da	Dalton

DTZ	Diltiazem
EMA	Éster metil anidroecgonina
EPR	Erro padrão relativo
FEN	Fenacetina
FMN	Fator de matriz normalizado
FO	Fluido oral
HDZ	Hidroxizina
LEV	Levamisol
LIQ	Limite inferior de quantificação
LSQ	Limite superior de quantificação
MDMA	Metilenedioximetanfetamina
MSTFA	<i>N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide</i>
PI	Padrão interno
SNC	Sistema nervoso central
SPA	Substâncias psicoativas
TFL	Teofilina
$\Delta$ 9-THC	Delta-9-tetrahydrocannabinol

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	23
2 OBJETIVOS .....	25
2.1 Objetivo Geral .....	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	29
3.1 Substâncias psicoativas e o trânsito.....	31
3.2 Matrizes biológicas.....	38
3.2.1 Sangue .....	38
3.2.2 Urina.....	39
3.2.3 Fluido oral.....	40
3.3 Análises confirmatórias em trânsito.....	43
3.4 Validação de métodos analíticos .....	44
3.5 Cromatografia líquida acoplada à detector de massas (CL-EM) .....	49
3.6 Cocaína.....	52
3.6.1 Adulteração de cocaína.....	57
4 CAPÍTULO 1 – DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE COCAÍNA E METABOLITOS EM FLUIDO ORAL, URINA E PLASMA POR CL-EM E APLICAÇÃO EM USUÁRIOS DE DROGAS.....	61
4.1 Manuscrito I.....	63
5 CAPÍTULO 2 – ANÁLISE DE CORRELAÇÃO DE COCAÍNA E METABÓLITOS EM AMOSTRAS DE FLUIDO ORAL, URINA E PLASMA COLETADAS SIMULTÂNEAMENTE .....	89
5.1 Manuscrito II.....	91
6 CAPÍTULO 3 – ANÁLISE DE ADULTERANTES EM AMOSTRAS APREENDIDAS DE COCAÍNA UTILIZANDO CG-EM, CG-EM-IT E CL-EM/EM.....	111
6.1 Manuscrito III.....	113
7 DISCUSSÃO GERAL .....	139
8 CONCLUSÕES .....	157

9 REFERÊNCIAS ..... 161

10 ANEXOS..... 177

    Anexo 1. .... 179

    Anexo 2. .... 181

    Anexo 3. .... 183

## **1. INTRODUÇÃO**





Aproximadamente 1,2 milhões de pessoas morrem todos os anos nas rodovias ao redor do mundo e outras 20 a 50 milhões sofrem lesões não fatais como resultado dos acidentes de trânsito. Essas lesões e mortes causam um impacto imensurável nas vítimas e suas famílias, cujas vidas pessoais e profissionais são afetadas por essas tragédias.

Os acidentes de trânsito são a oitava maior causa de morte a nível mundial, esses números possuem impacto similar ao de doenças transmissíveis como a malária, por exemplo (MURRAY et al., 2012). Famílias economicamente menos favorecidas são as mais prejudicadas pelos custos médicos diretos e os custos indiretos, como a perda de salários por resultados de lesões. Os acidentes de trânsito resultam em um prejuízo econômico considerável, especialmente para as economias em desenvolvimento e são estimados em 1-2% do produto interno bruto (PIB), o que totaliza em média US\$ 100 bilhões (de dólares) por ano (JACOBS et al., 2000).

Em dados sintetizados pelo Mapa da Violência - Acidentes de trânsito e motocicletas (WASELFISZ, 2013), em comparação com outros 181 países do mundo, o Brasil ocupa a 33ª posição de índice de mortes por 100 mil habitantes, inserindo-se no grupo de 20% dos países do mundo com as maiores taxas de fatalidades no trânsito.

Sangue e urina são as matrizes mais utilizadas usualmente para a análise de drogas, sendo que o FO vem ganhando muito espaço nos últimos anos devido às vantagens em relação às outras matrizes, principalmente na facilidade de coleta *in loco* (CONE, 1993; VESTRAETE, 2004; GJERDE et al., 2011). Outras matrizes biológicas podem ser utilizadas para análise, dependendo do objetivo proposto. O sangue reflete o uso recente e pode ser utilizado para avaliar o uso no momento da abordagem. Já a urina reflete o uso dos últimos dias e em alguns casos, chega a detectar o uso de drogas em meses, por isso não é indicado para a avaliar a dose utilizada e a frequência de uso (DOLAN et al., 2004; VESTRAETE, 2004; BARROSO et al., 2011; GJERDE et al., 2011; LANGEL et al., 2013). O FO já teve uma boa correlação com o sangue estabelecida para algumas drogas (LANGEL et al., 2013) e, conseqüentemente, indica também o uso recente. Porém, deve-se ter sempre em mente que as concentrações em FO não podem afirmar com precisão a concentração sanguínea, visto que a difusão da droga da corrente sanguínea para o

FO depende de muitos fatores como: pH das matrizes, pKa da substância, grau de ionização e ligação proteica, peso molecular e solubilidade lipídica (CONE, 1993; HAECKEL, 1993; CROUCH, 2005; DRUMMER, 2005; SCHEIDWEILER et al., 2010; GJERDE et al., 2011; GJERDE et al., 2015). Diversos estudos realizados apresentam uma ampla variabilidade nos resultados (THOMPSON et al., 1987; CONE et al., 1994; CONE et al., 1997; JUFER et al., 2000; SAMYN e VAN HAEREN, 2000; SCHEPERS et al., 2003; HUESTIS e CONE, 2004; TOENNES et al., 2005; WILLE et al., 2009; GJERDE et al., 2010; SCHEIDWEILER et al., 2010; VINDENES et al., 2012; LANGEL et al., 2013; ELLEFSEN et al., 2016).

O consumo de drogas é um problema crescente em nível mundial. Estas substâncias, sejam elas lícitas (álcool, tabaco) ou ilícitas (COC, anfetamínicos, canábis), quando associadas ao trânsito, agravam o risco de acidentes consideravelmente, pois agem diretamente sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) (WONG e TSE, 2005; UNODC, 2013).

A COC está entre as drogas mais consumidas mundialmente, principalmente na América Latina, onde segundo dados recentes, grande parcela da população se encontra em ou necessita de tratamento. O Brasil consome grande fatia da COC produzida pelos três maiores produtores mundiais (Colômbia, Peru e Bolívia) e ainda possui papel central na distribuição da droga, já que está localizado em posição estratégica, fazendo divisa à oeste com os três principais produtores, além de possuir extensa costa a leste para o Oceano Atlântico, facilitando a passagem para países europeus e África (UNODC, 2015).

O tráfico de drogas está diretamente relacionado com os índices de violência no país. Uma das estratégias utilizadas para auxiliar no combate ao tráfico é a identificação dos compostos adulterantes adicionados às drogas de abuso e, através disso, a identificação das rotas de tráfico. As substâncias mais comumente utilizadas para a adulteração de COC são: CAF, FEN, DTZ, HDZ, LEV, BZC, ACT, lidocaína, procaína, aminopirina, prilocaína, diclofenaco, efedrina, atropina, tetracaína, bicarbonato, amido e açúcares (BERNANRDO et al., 2003; BRUNT et al., 2009; MAIETTI et al., 2009; COLE, 2010; EVRARD et al., 2010; SCHNEIDER e MEYS, 2011; MAGALHÃES et al., 2013; BOTELHO et al., 2014; FLORIANI et al., 2014; FUKUSHIMA et al., 2014; ZACCA et al., 2014; GROBÉRIO et al., 2015; LAPACHINSKE et al., 2015; MALDANER et al., 2015; MARCELO et al., 2015;

PENIDO et al., 2015; BROSEUS et al., 2016; SOUZA et al., 2016). A identificação dessas substâncias, além de auxiliar no mapeamento das rotas de tráfico, ajuda a caracterizar os efeitos adversos causados pela interação das mesmas, gerando informações que podem vir a ser úteis em unidades de emergência para tratamento de overdoses e intoxicações agudas.

A confiabilidade de um resultado analítico está diretamente relacionada com a validação de um método. Em toxicologia forense, por uma questão de princípios éticos, científicos e legais, todo e qualquer resultado precisa ser inequívoco e altamente confiável, sendo a aplicação de métodos confirmatórios, nesse caso, imprescindível. A validação de um método analítico e bioanalítico caracteriza-se como a comprovação de que o mesmo produz resultados com um nível mínimo de incerteza, e é uma das medidas universalmente reconhecidas como parte necessária de um sistema completo de garantia de qualidade em química analítica (THOMPSON, 2002). As guias nacionais e internacionais (RDC nº. 27/2012 – ANVISA, *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation - FDA, Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology – SWGTOX, Recommendations from the Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs – SWGDRUG and Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens – UNODC*) fornecem padrões para parâmetros de validação fundamentais, entre os quais estão incluídos: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, efeito de matriz, limites de método (detecção e quantificação) e estabilidade (WILLE, 2011).

A detecção de COC e derivados por técnicas hífenadas é reportada na literatura, tanto por cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de massas e suas variações (CG-EM, CG-EM/EM) (WANG et al., 1994; JAGER e ANDREWS, 2001; JAGER e ANDREWS, 2002; PAUL et al., 2005; COGNARD et al., 2006; CARVALHO et al., 2008; STOUT et al., 2009; PEREZ et al., 2016) quanto por cromatografia líquida acoplada à detector de massas e suas variações (CL-EM, CL-EM/EM) (JOHANSEN e BHATIA, 2007; STOUT et al., 2009; LIU et al., 2014; MONTESANO et al., 2015; PEREZ et al., 2016). O aperfeiçoamento dessas técnicas é uma tendência crescente devido ao surgimento de drogas cada vez mais

potentes e a necessidade dos laboratórios possuírem métodos analíticos capazes de abranger o maior número de substâncias. Especificamente na classe da COC, poucos métodos são reportados na literatura capazes de detectar COC e produtos de biotransformação provenientes de pirólise (EMA e AEC), analitos importantes para a avaliação do uso do crack, especialmente no Brasil onde estes índices são elevados e crescem exponencialmente a cada ano, sendo que todos os métodos reportados utilizam CL-EM/EM (DAMS et al., 2003b; LANGMAN et al., 2009; CONCHEIRO et al., 2010; JEPPESEN et al., 2015).

Neste contexto, este estudo teve como objetivo o desenvolvimento e validação de métodos analíticos e bioanalíticos para a detecção de COC, seus derivados e compostos adulterantes por CL-EM, CL-EM/EM, CG-EM e CG-EM-IT em matrizes biológicas (FO, urina e plasma) e drogas de apreensão. Adicionalmente, realizou-se um estudo de correlação entre FO:plasma e FO:urina para COC e alguns metabólitos a fim de verificar a possibilidade de utilização do FO para estimar a concentração dos analitos nas demais matrizes biológicas.

## **2. OBJETIVOS**



## **2.1 Objetivo Geral**

Desenvolver e validar metodologias analíticas por CL-EM, CL-EM/EM, CG-EM e CG-EM-IT que atendam aos critérios estabelecidos pelas guias nacionais e internacionais e que possam ser aplicadas à análise de matrizes biológicas (FO, urina e plasma) provenientes do trânsito e amostras brutas provenientes de apreensões.

## **2.2 Objetivos específicos**

- Desenvolver e validar método para análise confirmatória da presença de COC, BZE, CE, EMA e AEC em FO por CL-EM;
- Desenvolver e validar método para análise confirmatória da presença de COC, BZE, CE, EMA e AEC em urina por CL-EM;
- Desenvolver e validar método para análise confirmatória da presença de COC, BZE, CE, EMA e AEC em plasma por CL-EM;
- Aplicar os métodos desenvolvidos e validados em amostras de FO, urina e plasma coletadas de usuários de drogas em hospitais e clínicas psiquiátricas na cidade de Porto Alegre;
- Verificar se existe correlação para COC, BZE e AEC entre as amostras de plasma, urina e FO coletadas em hospitais e clínicas psiquiátricas na cidade de Porto Alegre;
- Desenvolver e validar método para análise quantitativa de adulterantes em amostras de COC apreendidas nos Estados Unidos por CL-EM/EM;
- Aplicar método desenvolvido e validado em CL-EM/EM em amostras de COC apreendidas nos Estados Unidos;
- Desenvolver métodos qualitativos para análise de adulterantes em amostras de COC apreendidas nos Estados Unidos por CG-EM e CG-EM-IT;
- Aplicar métodos qualitativos desenvolvidos por CG-EM e CG-EM-IT em amostras de COC apreendidas nos Estados Unidos e compará-los com o método quantitativo por CL-EM/EM.





### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**



### 3.1 Substâncias psicoativas e o trânsito

Atualmente o abuso de substâncias psicoativas (SPA) é um problema global, sendo agravado quando associado ao trânsito, que atinge tanto países desenvolvidos como em desenvolvimento, nas mais diversas esferas sociais. Segundo dados recentes do *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC), os acidentes de trânsito são a segunda maior causa mundial de mortes de pessoas com idade entre 5 e 29 anos, sendo que, 90% dessas mortes ocorrem em países de baixa renda. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, anualmente, 1,2 milhões de pessoas perdem a vida em acidentes de trânsito e prevê que, em 2030, os acidentes de trânsito serão a quinta maior causa de mortes. Dirigir sob a influência de SPA é um grave fator de risco, especialmente quando em associação com o álcool (UNODC, 2013).

O Brasil destaca-se no cenário mundial pelo número de acidentes de trânsito em rodovias. Foram cerca de 169 mil acidentes de trânsito somente nas rodovias federais em 2014, conforme mostra a **Tabela 1**. Cerca de 22,8% da população brasileira já fez uso na vida de qualquer tipo de substância psicoativa, excluindo o tabaco e o álcool (etanol) (CARLINI et al., 2006). Segundo dados do Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA), os acidentes de trânsito no Brasil matam cerca de 45 mil pessoas por ano e deixam mais de 160 mil feridas gravemente. No ano de 2014, somente em rodovias federais foram mais de 8 mil mortes e 26 mil ferimentos graves que geraram um custo de R\$ 12,3 bilhões (IPEA, 2015). Além disso, nos últimos 12 anos, o Brasil passou por uma forte expansão na frota de veículos, o que contribui diretamente para a deterioração das condições de trânsito, quanto maior o tráfego de veículos, maiores os conflitos existentes. Considerando que, entre os anos de 2010 e 2014, observou-se uma queda nos índices de mortos e feridos em acidentes (diminuição de 40 e 30%, respectivamente) (IPEA, 2015), a meta estabelecida na década pela segurança no trânsito da OMS que estima redução de 50% do volume de mortes em acidentes de trânsito no planeta até 2020 ainda está longe de ser alcançada.

**Tabela 1.** Acidentes e vítimas nas rodovias federais no ano de 2014.

<b>Categoria</b>	<b>Acidentes</b>	<b>Veículos envolvidos</b>	<b>Feridos</b>	<b>Mortos</b>
Com vítimas fatais	6.742	11.954	7.141	8.227
Com vítimas feridas	62.458	105.122	93.669	0
Sem vítimas	99.963	184.275	0	0
<b>Total</b>	<b>169.163</b>	<b>301.351</b>	<b>100.810</b>	<b>8.227</b>

Fonte: IPEA (2015)

O impacto negativo do uso abusivo de drogas ilícitas para a sociedade é imensurável e as consequências na saúde dos usuários são muitas vezes irreparáveis, principalmente quando associados ao ato de dirigir e ao controle de veículos automotores cada vez mais potentes. O uso de drogas acarreta, ainda, um pesado encargo financeiro para a sociedade. Em termos de custos associados às vias de tráfego, estima-se que, considerando toda a malha rodoviária brasileira, os custos chegariam a R\$ 40 bilhões por ano (**Tabela 2**) (IPEA, 2015). Além disso, não se pode calcular ou mesmo estimar os danos psíquicos e estresses traumáticos que a perda de uma vida representa em eventos dessa natureza.

**Tabela 2.** Custos estimados dos acidentes de trânsito nas rodovias do Brasil (2014).

Localização dos acidentes	<b>Custo (R\$)</b>	
	Estimativa mínima	Estimativa máxima
Rodovias federais	12.298.320.541	12.298.320.541
Rodovias estaduais e municipais	24.823.233.088	30.545.771.514
<b>Total</b>	<b>37.121.553.629</b>	<b>42.844.092.055</b>

Fonte: IPEA (2015)

Em termos monetários, seriam necessários cerca de 200-250 bilhões de dólares (0,3-0,4% do PIB mundial) para cobrir os custos relacionados ao tratamento da dependência a drogas em todo o mundo. Na prática, os valores gastos poderiam ser muito maiores, visto que menos de 1 a cada 5 usuários recebem o tratamento adequado. Em termos de produtividade, o impacto é ainda maior, estudos realizados nos Estados Unidos sugerem que as perdas de produtividade equivalem a 0,9% do

PIB. Além disso, os custos relacionados com a criminalidade (fraude, roubo, extorsão e furto) associada ao tráfico de drogas também são substanciais, chegando a 1,6% do PIB (UNODC, 2013).

Cerca de 30% de todas as vítimas são menores de 25 anos e 70% são do sexo masculino. Destaca-se ainda nos países em desenvolvimento que 70% das vítimas fatais de acidentes de trânsito são os chamados “usuários vulneráveis das vias”: pedestres, ciclistas e motociclistas (TOROYAN e PENDEN, 2007). O consumo de álcool e de outras SPA é, sem dúvida, um dos principais fatores para envolvimento em acidentes de trânsito, e potencializador para a maior gravidade das lesões, principalmente por propiciar comportamentos como excesso de velocidade e não uso de dispositivos de segurança.

Dirigir é uma tarefa complexa em que o condutor constantemente recebe a informação, analisa, e reage à ela. Substâncias que possuem influência sobre as funções cerebrais ou processos mentais envolvidos com a condução certamente irão afetar a performance do condutor. Drogas estimulantes como a COC aumentam o comportamento de risco, o indivíduo torna-se nervoso, irritado e menos concentrado, que são características incompatíveis com uma condução segura (WONG e TSE, 2005).

Apesar de insipiente no Brasil, em diversos países europeus, Estados Unidos e Austrália, o monitoramento de SPA em condutores já é uma realidade. Na Austrália, um estudo com 853 amostras de FO de condutores mostrou uma incidência de 14% para opióides (codeína em 9,1%, morfina em 7,7% e 6-acetilmorfina em 4,8%) e 8,0% para cocaína/metabólitos. As principais combinações de drogas encontradas foram metanfetamina/cocaína (7,9%), metanfetamina/codeína (7,6%),  $\Delta$ 9-THC/codeína (3,6%) e *d,l*-3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA)/cocaína (3,5%) (CHU et al., 2012).

Na Europa, em uma amostra aleatória de 50.000 condutores testados em 13 países, aproximadamente 1,9% destes apresentaram resultados positivos para drogas ilícitas. Canábis (THC) foi detectado em 1,3% dos condutores, COC em 0,4%, anfetamínicos em 0,08% e opióides ilícitos em 0,07% (DUID, 2012). Na Noruega, cerca de 80% dos condutores são testados aleatoriamente ao ano.

O projeto ROSITA II (*Roadside Testing Assessment*) aconteceu entre 2003 – 2005 em diversos países europeus (Bélgica, Finlândia, França, Alemanha, Noruega

e Espanha) com cooperação dos Estados Unidos e teve como principal objetivo avaliar a confiabilidade e facilidade de uso dos dispositivos usados para análise de *screening* no trânsito desses países. Ao todo, 2.065 amostras (positivas e negativas) foram analisadas em nove dispositivos de *screening* diferentes, os resultados foram confirmados através de técnicas cromatográficas acopladas a detectores de massas e 20% das amostras foram positivas para anfetaminas (incluindo metanfetamina, ecstasy e análogos), 32% para benzodiazepínicos, 36% para canabinóides, 19% para COC e 8% para opióides (VERSTRAETE e RAES, 2006).

O programa conhecido como IMMORTAL – *Impaired Motorists, Methods of Roadside Testing and Assessment for Licensing*, realizado no ano de 2005, constatou que para a maioria dos medicamentos, como os ansiolíticos, antidepressivos, codeína, morfina e barbitúricos, os níveis terapêuticos em geral podem ser adequados como linhas limites legais, já para a combinação da maioria de medicamentos com álcool, o limite de tolerância zero é o mais apropriado. O projeto CERTIFIED estabeleceu uma relação causal entre o risco inerente ao uso de psicoativos e o perigo que isso representa ao tráfego em rodovias, considerando efeitos prejudiciais, prevalência na população e associação com acidentes. As substâncias foram classificadas segundo o risco que representam, sendo eles: alto risco (álcool, benzodiazepínicos, cannabis com álcool), moderado-alto risco (COC), moderado (cannabis, estimulantes tipo anfetamínicos), baixo-moderado risco (opióides, anti-histamínicos) e baixo risco (antidepressivos) (BROOKHUIS e WARD, 2001).

O projeto denominado DUID “*Driving under the influence of drugs, alcohol and medicines*” foi o maior projeto realizado na Europa, abrangendo 18 países. Foi criado em 2006 com o objetivo de pesquisar o impacto de substâncias psicoativas na segurança rodoviária. O estudo durou 5 anos e mostrou que alguns medicamentos psicoativos selecionados (benzodiazepínicos, opiáceos e opióides) são menos prevalentes na população condutora de veículos (1,40%), comparados ao álcool (3,48%) e drogas ilícitas (1,90%) (DUID, 2012). Uma análise feita somente na Finlândia, entre os anos de 1997 e 2007, registrou 31.963 condutores abordados com resultados positivos para drogas lícitas ou ilícitas. As substâncias mais encontradas foram: benzodiazepínicos, em 75,7% das amostras, anfetaminas em

46%, canabinóides em 27,7% e opióides em 13,8% das amostras de urina e sangue coletadas para análise (OJANIEMI et al., 2009).

Strano-Rossi et al. avaliaram a presença de drogas em FO de condutores na Itália em 2011. Das 446 amostras coletadas por policiais, 74 foram positivas para COC e metabólitos, 49 para THC, 11 para MDMA, 4 para cetamina e 2 para opióides. Um ano mais tarde, os mesmos autores avaliaram a presença de drogas em um total de 1.025 amostras de FO de condutores coletadas entre 2010 e 2011, e detectaram que entre os condutores, 11,6% haviam feito uso de COC, 11,1% foram positivos para THC, e 8,3% utilizaram anfetaminas e outras *designer drugs*.

Um estudo realizado na Austrália no primeiro ano após alterações na lei que permitiram à polícia australiana testar aleatoriamente drogas, e não somente álcool em condutores, dos 13.176 condutores testados, 313 foram positivos (269 para metanfetamina, 188 para MDMA e 87 para THC) (DRUMMER et al., 2007).

Na Bélgica, a avaliação do “dirigir sob o efeito de drogas” consiste em 3 etapas: observação de sinais externos de consumo de drogas pelo policiais, teste de *screening* em urina para 4 classes de drogas e coleta de sangue para análise confirmatória. De 450 amostras analisadas entre maio de 2000 e fevereiro de 2005, a canábis foi a droga de maior prevalência (73,5%), seguida de MDMA (20,4%), anfetamínicos (19,8%), BZE (17,9%), COC (6,9%) e morfina (2,7%) (RAES e VERSTRAETE, 2005).

Nos anos de 2013 e 2014, dois estudos sobre o tema foram realizados nos Estados Unidos. Em 2013, dos 5.912 condutores testados em ar exalado, FO ou sangue, 10,5% não alcoolizados haviam feito uso de drogas, e 26 a 36% dos condutores alcoolizados usaram alguma droga ilícita concomitante ao álcool (VOAS et al., 2013). Já em 2014, apenas 92 condutores foram testados e, destes, 41% tiveram resultado positivo para uma ou mais drogas em FO. As drogas detectadas com maior frequência foram canábis (30%), benzodiazepínicos (11%) e COC (10%) (LOGAN et al., 2014).

Um estudo realizado por SENNA et al. (2010) em 4794 amostras de sangue de condutores na Suíça revelou que uma ou mais de uma SPA estava presente em 89% dos casos, entre elas, as mais prevalentes foram canabinóides (48%), COC (25%), opiáceos (10%), anfetamínicos (7%), benzodiazepínicos (6%) e metadona (5%). Na África do Sul, dos 261 condutores testados em ar exalado e FO, 28%

encontravam-se sob influência de álcool e 14% sob influência de outras SPA's, principalmente anfetamina, metanfetamina e COC (MATZOPOULOS et al., 2013).

No Brasil não há um programa oficial, mas alguns projetos independentes vêm sendo desenvolvidos e grandes mudanças foram observadas na legislação nos últimos anos. O Código de Trânsito Brasileiro (CTB), alterado pela Lei nº 12.760/12 (BRASIL, 2012b), tipifica como crime na Seção II (Dos crimes em Espécie), artigo 306 a conduta de “Conduzir veículo automotor com capacidade psicomotora alterada em razão da influência de álcool ou de outra substância psicoativa que determine dependência” e prevê como pena “detenção, de seis meses a três anos, multa e suspensão ou proibição de se obter a permissão ou a habilitação para dirigir veículo automotor”. O artigo 165 do CTB ainda estabelece que “dirigir sob influência de álcool ou de qualquer substância psicoativa que determine dependência é infração de natureza gravíssima”.

Apesar disso, diversos estudos nacionais têm evidenciado grande prevalência no consumo de SPA no trânsito, notadamente de estimulantes como COC e compostos anfetamínicos, que são utilizados principalmente por motoristas (condutores profissionais) para aumentar o estado de alerta físico e mental durante as longas jornadas de trabalho (LEYTON et al., 2002; SOUZA et al., 2005; LEYTON et al., 2012; ZANCANARO et al., 2012).

Entre os anos de 2002 e 2008, Yonamine et al. avaliaram a presença de álcool e drogas ilícitas em caminhoneiros nas rodovias estaduais de São Paulo. No total, 1.250 amostras de FO foram coletadas e analisadas por CG-DIC e CG-EM. Foram encontradas substâncias alvo em 3,1% das amostras (1,44% para álcool, 0,64% para anfetaminas, 0,56% para COC, e 0,40% para THC) (YONAMINE et al., 2013).

Silva et al. em 2003 analisaram 728 amostras de urina de motoristas de caminhão das regiões Nordeste, Sudeste e Sul do país e evidenciaram a presença de anfetamina ou COC em 5,4% das amostras. Em 2004, Yonamine analisou amostras de urina (n=558) e saliva (n=559) coletadas aleatoriamente de motoristas de caminhões nas rodovias de São Paulo, tendo encontrado positividade para anfetamina ou BZE em 2,5% das amostras de urina e em 1,2% das amostras de FO.

Em outro estudo pioneiro nacional, conduzido com o apoio do nosso grupo de pesquisa, avaliou-se a prevalência de uso de álcool e outras 20 SPA por condutores



abordados em rodovias federais dos 27 estados e Distrito Federal entre os anos de 2008 e 2009, totalizando uma amostra de 3.398 condutores. Do total de condutores avaliados, 4,2% estavam sob influência de álcool no momento da abordagem, detectado por teste de etilômetro, enquanto aproximadamente 10% apresentaram resultados toxicológicos positivos, determinados por análises de FO por imunoenensaio tipo ELISA e confirmação por CL-EM/EM, sendo COC (47,5%), canabinóides (32%) e compostos anfetamínicos (25,4%) as substâncias mais prevalentes (ZANCANARO et al., 2012). Cerca de 25% dos condutores entrevistados informaram ter consumido cinco ou mais doses de bebidas alcoólicas (“*binge drinking*”) entre duas e oito vezes no último mês; e condutores com resultados positivos para álcool ou outras drogas apresentaram maior frequência para transtornos psiquiátricos (depressão, mania ou hipomania, transtorno de estresse pós-traumático, transtorno de personalidade antissocial e dependência/abuso de álcool ou outras substâncias) quando comparados àqueles que apresentavam resultados negativos (FALLER et al., 2012).

Estes estudos apontam uma grande prevalência de consumo não apenas de álcool no trânsito brasileiro, mas também de substâncias ilícitas. Sendo o Brasil um país continental, fronteiro a dez dos treze países formadores da América do Sul, cada Estado de nossa nação diferencia-se por suas particularidades e pelas influências de suas fronteiras. Considerando os aspectos territoriais e culturais, destaca-se a necessidade do conhecimento pontual do perfil do trânsito de cada Estado para que se possam traçar as tendências de uso de SPA no tráfego local e assim buscar a efetiva prevenção (MARIOTTI, 2013).

Estudos realizados em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, investigando a prevalência de fatores relacionados com álcool ou drogas de abuso e acidentes de trânsito em 609 vítimas atendidas em duas emergências da capital, demonstraram que entre os motoristas, 7,8% apresentaram resultados positivos para a presença de álcool no sangue e 13,3% apresentaram resultados positivos para o consumo de canábis (DE BONI et al., 2011). Outro estudo do mesmo grupo de pesquisadores avaliou o uso de substância entre motociclistas envolvidos em acidentes de trânsito admitidos em salas de emergência em Porto Alegre. Os resultados toxicológicos revelaram prevalência de: 5,3% para o uso de canábis; 9,2% para uso de COC, 3,2% para uso de benzodiazepínicos e 7% para o uso de álcool (BREITENBACH et

al., 2011). A associação entre locais dos acidentes de trânsito em Porto Alegre e a localização geográfica dos pontos de venda de bebidas alcoólicas foi analisada também, permitindo verificar que um número maior dos acidentes ocorre próximo às áreas com altas concentrações de bares e dos 1070 condutores entrevistados em bares da cidade que haviam ingerido bebida alcoólica no local, 51,8% responderam que iriam beber na hora seguinte (DE BONI et al., 2012).

Os estudos disponíveis evidenciam a necessidade de um maior levantamento das estatísticas do trânsito e dos dados toxicológicos dos condutores brasileiros, buscando viabilizar o desenvolvimento de políticas públicas preventivas, orientadas quanto ao perfil do público alvo e quanto aos danos provocados pelas substâncias encontradas nos resultados toxicológicos.

## 3.2 Matrizes biológicas

### 3.2.1 *Sangue*

O sangue é a matriz considerada padrão-ouro de análise devido à sua excelente correlação entre a concentração sanguínea e o efeito farmacológico da substância (LANGEL et al., 2013). Nos últimos anos as análises de drogas em sangue têm adquirido maior valor por conta do avanço no preparo de amostra, técnicas cromatográficas e detectores cada vez mais sensíveis (FERNANDEZ e BANKS, 2011).

O sangue é constituído de plasma e células (glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas). O volume de sangue em um adulto sadio é de aproximadamente 5 litros, destes, 55% é plasma e 45% são células. O soro é definido como o plasma onde as proteínas envolvidas no processo de coagulação sanguínea foram removidas (GEISLER e POWERS, 2017).

A concentração de droga no cérebro somente pode ser refletida no sangue (incluindo soro e plasma) e no fluido cérebro espinhal (líquido cefalorraquidiano). Por este motivo, a análise desta matriz biológica é fortemente indicada para avaliar o

comprometimento do indivíduo no momento da coleta, em casos de crimes de trânsito, por exemplo (GJERDE et al., 2011).

Entre as principais desvantagens dessa matriz biológica estão a dificuldade de coleta, processamento e obtenção de amostras por parte dos voluntários. A coleta é invasiva e requer profissional capacitado para o procedimento, além de infraestrutura adequada (GJERDE et al., 2011).

### *3.2.2 Urina*

A urina é a matriz biológica melhor estabelecida e comumente utilizada para testar drogas de abuso, principalmente porque possui uma janela de detecção longa, fornecendo informações de uso pregresso, além de ser mais fácil de coletar e analisar quando comparado ao sangue (DOLAN et al., 2004; BARROSO et al., 2011; GJERDE et al., 2011). Ainda, a concentração das drogas na urina é usualmente maior do que em outras matrizes, facilitando a identificação (BARROSO et al., 2011).

É geralmente coletada sob observação para reduzir a possibilidade de adulteração, e isso constitui-se em uma limitação de infraestrutura, pois torna-se necessário um ambiente apropriado. Além disso, nem sempre a amostra é fornecida pelo indivíduo quando solicitada, em alguns casos a coleta somente acontece após horas, o que pode impossibilitar o indivíduo de participar da pesquisa quando o protocolo exigir diferentes matrizes coletadas simultaneamente, por exemplo (GJERDE et al., 2011). O procedimento de coleta é uma etapa importante no processo de análise, e alguns cuidados precisam ser tomados para assegurar a integridade da amostra e reduzir as chances de adulteração, por isso, além da supervisão no momento da coleta, a amostra precisa ser armazenada em um recipiente inviolável (CODY, 1990) e seguir todos os passos da cadeia de custódia.

A excreção da droga inalterada e dos produtos de biotransformação inicia na urina quase que instantaneamente após a mesma ser absorvida. A absorção ocorre mais lentamente se a via de administração for oral. Nesses casos a eliminação também é mais lenta. De uma maneira geral, a máxima concentração da droga inalterada e produtos de biotransformação é alcançada na urina cerca de 6 horas

após a administração, e como a maioria das drogas de abuso, a COC é excretada pela urina durante 48 horas, sendo que doses múltiplas e exposição prolongada podem causar acúmulo, resultando em tempos de detecção estendidos, variando de 1,5 a 4 dias (DOLAN et al., 2004, VERSTRAETE, 2004). Em usuários crônicos, por exemplo, o uso de COC pode ser detectado na urina em até uma semana, em casos extremos pode chegar a um período maior (VERSTRAETE, 2004).

### *3.2.3 Fluido oral*

O FO é uma mistura composta por saliva, fluídos gengivais, mucosa bucal, transudatos, bactérias, restos celulares e resíduos de produtos ingeridos (CONE e HUESTIS, 2007). É originário de três glândulas majoritárias (parótida, submandibular e sublingual), um grande número de glândulas minoritárias, mucosa oral e sulcos gengivais (SAMYN et al., 2007).

Em condições saudáveis, um indivíduo adulto é capaz de produzir aproximadamente 500 a 1.500 mL de FO por dia, ou 0 a 6 mL/min. O volume e a composição podem variar durante o dia e a hora, por isso, torna-se importante enfatizar que a coleta do FO irá depender da cooperação do indivíduo, status psicológico (nervoso ou assustado), higiene oral, medicações utilizadas e métodos de coleta (incluindo tempo e tipo de estímulo), como consequência, a composição varia constantemente, tanto quantitativa como qualitativamente (APS e MARTENS, 2005).

Nos últimos anos, o interesse pelo uso do FO como matriz biológica para a detecção de drogas tem aumentado significativamente, por apresentar uma série de vantagens sobre as matrizes tradicionais (urina e sangue). Dentre as principais vantagens se destacam a coleta fácil e de forma não invasiva, podendo ser realizada no próprio local de abordagem, sob vigilância e sem maiores constrangimentos, fornecendo informações sobre o consumo recente de drogas e relacionando a condução sob influência de SPA. Também, no FO por causa da maior acidez, drogas básicas como COC e anfetamínicos são frequentemente encontradas em concentrações maiores do que no plasma (CONE, 1993; YONAMINE, 2004). As

desvantagens encontradas na coleta e utilização, como a baixa concentração do analito e o pequeno volume disponível podem ser contornados pela utilização de técnicas analíticas de alta sensibilidade (LIMBERGER et al., 2010). Outras desvantagens incluem a variabilidade natural do pH do FO, a influência dos dispositivos de coleta na concentração das drogas, e a possibilidade de contaminação com resíduos de drogas na cavidade oral e nasal (CONE et al., 1997).

Os métodos usualmente utilizados para a coleta de FO são: captação espontânea, sucção e coleta através de dispositivos absorventes vendidos comercialmente. A captação espontânea pode ser feita em indivíduos normais sem maiores problemas, e consiste em deixar o FO fluir diretamente da boca para um recipiente apropriado, porém, dependendo do fluxo de salivagem do indivíduo, a coleta torna-se demorada e a quantidade coletada muitas vezes pode ser insuficiente para a análise. O fluxo de salivagem pode ser estimulado mecanicamente (através de gomas de mascar) ou quimicamente (ácido cítrico) (SAMYN et al., 2007). Embora a estimulação permita realizar a coleta em menos tempo, mudanças no pH do FO podem afetar a concentração das drogas e seus metabólitos, além de afetar a proporção FO/plasma. A estimulação com ácido cítrico, por exemplo, resulta em um decréscimo de 5 vezes da concentração de COC, BZE e éster metil ecgonina em FO, e pode causar interferências em alguns imunoenaios (CHOO e HUESTIS, 2004).

Em relação ao processo de transporte das drogas da circulação sanguínea para o FO, uma fina camada de células epiteliais separa os ductos salivares da circulação sistêmica, sendo que a membrana lipídica dessas células determina quais as moléculas serão transferidas. As substâncias são comumente transportadas por difusão passiva, porém existem outros processos envolvidos como transporte ativo e difusão através de poros na membrana (KIDWELL et al., 1998). A difusão passiva é dependente de vários fatores como propriedades químicas da droga, pH do FO, concentração da droga não ionizada (somente a droga livre é transportada), ligação droga-proteína, tamanho molecular (moléculas com peso molecular menor do que 500 Da são mais facilmente transportadas) e lipofilicidade (CONE, 1993; CROUCH 2005; DRUMMER 2005). Geralmente, o FO contém predominantemente a droga intacta (não biotransformada) por causa da alta solubilidade lipídica e,

consequentemente, maior potencial para difusão passiva (CROUCH, 2005; DRUMMER, 2005).

A concentração das drogas em FO depende da última dose administrada, da via de administração, do pH do FO, propriedades físico-químicas da droga e o nível de ligação das proteínas plasmáticas (LILLSUNDE, 2008). A concentração em FO de COC, por exemplo, supera em mais de 5 vezes a concentração no sangue, e seus produtos de biotransformação BZE e éster metil ecgonina também podem ser encontrados no FO em concentrações variáveis (MOFFAT et al., 2004). Testes em FO são úteis em detecção recente, geralmente drogas e produtos de biotransformação podem ser detectados por um período de horas a dias após a exposição (VERSTRAETE, 2004).

Devido ao fato de que existe uma grande recusa no fornecimento de amostras de sangue e urina pelos voluntários, o FO torna-se uma excelente alternativa para monitorar o uso de SPA em diversos ambientes. Estudos realizados nos Estados Unidos apontam um índice de recusa em participar de pesquisas através de doação de sangue em 50-60% dos voluntários convidados, o mesmo ocorre para a urina, que teve um percentual de recusa de 24%, mesmo quando o estudo oferece uma certa quantia em dinheiro para incentivar a participação. No caso do FO, a recusa foi de 8-11% (GJERDE et al., 2011).

A **Tabela 3** demonstra um comparativo entre as principais características, vantagens e desvantagens das três matrizes abordadas nesta revisão.

**Tabela 3.** Comparativo das matrizes plasma, FO e urina para drogas de abuso em geral.

	<b>Plasma</b>	<b>Urina</b>	<b>FO</b>
<b>Coleta</b>	Invasiva Necessita infraestrutura Necessita profissional capacitado	Invasão de privacidade Necessita infraestrutura	Não invasiva
<b>Quantidade de amostra</b>	1 – 5 mL	>50 mL	1 – 5 mL
<b>Tempo de coleta</b>	Minutos	Minutos	Minutos
<b>Concentração da droga</b>	Moderada a alta	Moderada a alta	Baixa
<b>Janela de detecção</b>	Curta (1-2 dias)	Moderada (2-4 dias)*	Curta (1-2 dias)

<b>Potencial de adulteração</b>	Nenhum	Alto	Baixo
<b>Taxa de recusa</b>	Alta	Média	Baixa

\*Janela de detecção maior em canábis.

**Fonte:** Adaptada de Cone, 1993; Kidwell et al., 1998; Gjerde; Oiestad e Christophersen, 2011; Fernandez e Banks, 2011.

De acordo com as guias internacionais de análises forenses (SOFT; AAFS, 2006) e de avaliação do uso de SPA o trânsito (WALSH et al., 2008), o emprego dessas três matrizes é fortemente recomendado para o objetivo proposto, de desenvolvimento de métodos aplicáveis à amostras de trânsito, visto que as matrizes em questão se complementam por possuírem diferentes janelas analíticas. Segundo as guias, sempre que possível, um resultado de uma análise deve ser repetido em um segundo exemplar da mesma matriz biológica, ou em uma matriz diferente, de modo a respaldar os resultados analíticos, gerando resultados mais confiáveis do ponto de vista forense.

### 3.3 Análises confirmatórias em trânsito

A escolha de um método em toxicologia analítica depende do problema a ser resolvido. A estratégia analítica geralmente inclui análises de *screening* e análises confirmatórias, sendo que, a matriz biológica é um fator decisivo para a interpretação de resultados, pois cada uma delas apresenta diferentes janelas analíticas de detecção.

Em relação à recomendação para análises toxicológicas forenses, a Guia “*Forensic Toxicology Guidelines*” desenvolvida pela SOFT (Society of Forensic Toxicologists) e AAFS (American Academy of Forensic Sciences), com a última versão publicada em 2006 é o documento oficial a ser seguido (SOFT; AAFS, 2006). Nesta, constam todos os princípios recomendados para a parte analítica.

Por uma questão de princípios científicos e forenses, a detecção ou identificação de drogas (análise de *screening*) deve ser confirmada por uma segunda técnica, utilizando um princípio químico diferente do utilizado na testagem inicial. Além disso, as análises confirmatórias devem ser mais específicas que as de *screening*, e por isso, sempre que possível devem ser conduzidas por espectrometria de massas (SOFT; AAFS, 2006).

Em trânsito, a guia analítica internacional em vigência foi escrita por Walsh *et al.*, no ano de 2008, e é intitulada “Guidelines for Research on Drugged Driving” (WALSH *et al.*, 2008). A guia começou a ser elaborada quando os maiores especialistas mundiais na área de trânsito começaram a relatar as dificuldades de acesso aos reais impactos na saúde pública do planeta causados pelo trânsito, e esta dificuldade estava associada principalmente com a grande quantidade de variáveis entre os então escassos estudos realizados. Os parâmetros básicos avaliados, as técnicas analíticas e as drogas testadas não podiam ser comparadas devido à falta de padronização, limitando severamente a interpretação dos estudos realizados nessa área. Em setembro de 2006, um encontro foi realizado na França e contou com a participação de diversas organizações internacionais, com o intuito de desenvolver uma guia para pesquisa do efeito das drogas no trânsito, estabelecendo diretrizes, normas, variáveis de dados e outros parâmetros. Como resultado, a guia foi dividida em três seções majoritárias: “comportamento”, “epidemiologia” e “toxicologia”, cada uma contendo recomendações específicas.

Na área de toxicologia, a guia recomenda as matrizes biológicas a serem utilizadas, tempo entre a intervenção policial e a coleta, quantidade de amostra coletada, *cut-off* de cada substância e classes mínimas de drogas a serem avaliadas. Esses parâmetros foram estabelecidos para aumentar significativamente a qualidade das pesquisas na área e facilitar futuras comparações nacionais e internacionais.

### 3.4 Validação de métodos analíticos



Para a monitorização do consumo de SPA no trânsito, que é parte essencial no desenvolvimento de políticas públicas e preventivas, faz-se necessário o emprego de métodos analíticos bem caracterizados e totalmente validados (SHAH et al., 2000) para as matrizes biológicas de interesse para cada droga, garantindo assim satisfatória determinação, quantificação e interpretação dos resultados toxicológicos. Um método analítico bem validado é pré-requisito para correta interpretação dos resultados, sendo que resultados não confiáveis podem levar a conclusões erráticas em qualquer cenário, seja na pesquisa científica, em análises de rotina em laboratórios clínicos e forenses e, principalmente, em laudos criminais.

É importante ressaltar que a qualidade de um método analítico depende também do seu desenvolvimento, entretanto, somente a validação pode mostrar com objetividade a qualidade de um método pelo cumprimento de critérios mínimos de aceitação e, portanto, assegurar a aplicabilidade para determinado fim (PETERS et al., 2007).

Devido à importância da validação em toda a área analítica, diversas guias são emitidas a partir de órgãos internacionais e conferências, todas são muito úteis para validações de métodos, entretanto, duas delas possuem grande relevância internacional na área de toxicologia forense: a *Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation*, desenvolvida pelo FDA (Food and Drug Administration) em 2001 (FDA, 2001), e a guia do SWGTOX (Scientific Working Group for Forensic Toxicology) intitulada *Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology*, lançada em 2013 (SWGTOX, 2013). No Brasil, temos como referência a RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 que dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos (BRASIL, 2012a). Todas as guias incluem os critérios de seletividade, linearidade, efeito matriz, precisão, exatidão, limite de quantificação e estabilidade. O critério de recuperação é exigido somente pela Guia do FDA. O limite de detecção é exigido somente pela Guia SWGTOX. O critério de efeito residual é exigido somente pela Guia SWGTOX e Resolução da ANVISA. A **Tabela 4** traz uma comparação entre os critérios de aceitação das três guias.

**Tabela 4.** Guias de validação bionáltica: parâmetros avaliados e critérios de aceitação.

Parâmetro	Critério de aceitação		
	FDA (2001)	SWGTOX (2013)	Anvisa (2012)
<b>Seletividade</b>	-	-	Resposta $\leq 20\%$ LIQ para todos os analitos Resposta do PI $\leq 5\%$
<b>Exigência experimental</b>	Análise de $\geq 6$ fontes distintas	Análise de $\geq 10$ fontes distintas + amostras com possíveis interferentes	Análise de $\geq 6$ fontes distintas
<b>Efeito matriz</b>	-	CV% $\leq 15\%$	CV% do FMN $\leq 15\%$
<b>Exigência experimental</b>	Análise de $\geq 10$ fontes distintas, 3 opções de procedimento	2 opções de procedimento	Amostras de $\geq 6$ fontes distintas, processadas, posteriormente adicionadas de analito e PI, nas concentrações de CQA e CQB
<b>Efeito Residual</b>	-	Resposta $\leq 10\%$ LIQ	Resposta $\leq 20\%$ LIQ para todos os analitos Resposta do PI $\leq 5\%$
<b>Exigência experimental</b>	-	Injeção de amostra branco imediatamente após amostras $> 1000\text{ng/mL}$	$\geq 3$ injeções de amostras branco após ponto mais alto da curva
<b>Limite de quantificação</b>	Resposta $\geq 5x$ o branco Precisão $\leq 20\%$ e exatidão 80-120%	Precisão e exatidão $\leq 20\%$ (n=3)	Precisão e exatidão $\leq 20\%$ (n=5)
<b>Exigência experimental</b>	-	Análise de $\geq 3$ fontes distintas 3 opções de procedimento	Determinado intracorrída (mesmo dia) e intercorrída (3 dias $\neq$ ) em quintuplicata
<b>Limite de Detecção</b>	-	Dependente do procedimento utilizado	-
<b>Exigência experimental</b>	-	Análise de $\geq 3$ fontes distintas 7 opções de procedimento	-
<b>Linearidade</b>	Desvio $\leq 20\%$ para LIQ Desvio $\leq 15\%$ para	Análise de homoscedasticidade	Desvio $\leq 20\%$ para LIQ Desvio $\leq 15\%$ para demais pontos Mín 75% dos pontos aprovados (incluindo LIQ e

	demais pontos Mín 75% dos pontos aprovados (incluindo LIQ)		LSQ)
<b>Exigência experimental</b>	Amostra branco+ Amostra zero+ 6-8 pontos de calibração	≥6 pontos de calibração (5 replicatas)	Amostra branco+ Amostra zero+ ≥6 pontos de calibração (3 replicatas)
<b>Precisão</b>	CV ≤20% para LIQ CV ≤15% para demais pontos	CV ≤20% para todos os pontos	CV ≤20% para LIQ CV ≤15% para demais pontos
<b>Exigência experimental</b>	Determinada intracorrída (mesmo dia) e intercorrída (3 dias diferentes), Quintuplicata de LIQ, CQM e CQA	Determinada intracorrída (mesmo dia) e intercorrída (3 dias ≠), Triplicata de LIQ, CQM e CQA	Determinada intracorrída (mesmo dia) e intercorrída (3 dias ≠), quintuplicata de LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD
<b>Exatidão</b>	EPR ≤20% para LIQ EPR ≤15% para demais pontos	Bias ± 20% para todos os pontos	EPR ≤20% para LIQ EPR ≤15% para demais pontos
<b>Exigência experimental</b>	Quintuplicata de LIQ, CQM e CQA	Determinada intracorrída (mesmo dia) e intercorrída (3 dias ≠), Triplicata de LIQ, CQM e CQA	Determinado intracorrída (mesmo dia) e intercorrída (3 dias ≠), quintuplicata de LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD
<b>Recuperação</b>	Consistente, precisa e reprodutível	-	-
<b>Exigência experimental</b>	Amostras extraídas em CQB, CQM e CQA	-	-

	versus solução padrão.		
<b>Estabilidade</b>	CV ≤15%	Bias ± 20%	CV ≤10% para analito e PI em solução CV ≤15% para demais
<b>Exigência experimental</b>	Triplicata de CQB e CQA Congelamento e descongelamento, curta duração, longa duração, pós processamento, analito e PI em solução	Triplicata de CQB e CQA Estabilidade de congelamento e descongelamento, pós processamento	Triplicata de CQB e CQA Estabilidade de congelamento e descongelamento, curta duração, longa duração, pós processamento, analito e PI em solução

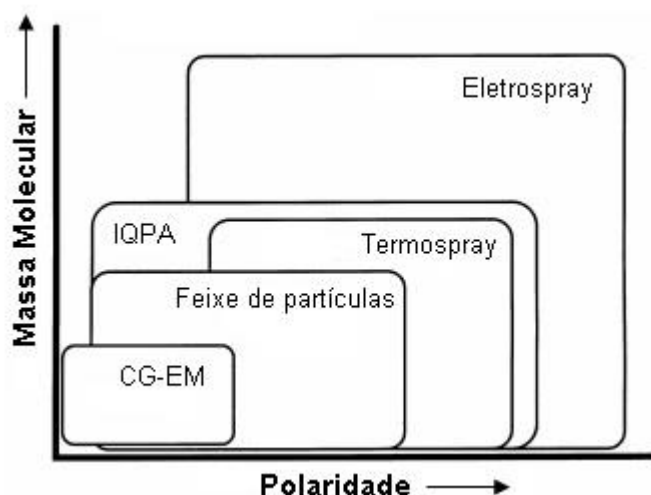
**FDA:** *Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation*, Food and Drug Administration, **SGWTOX:** *Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology*, Scientific Working Group for Forensic Toxicology, **ANVISA:** RDC n°. 27/2012, **LIQ:** limite inferior de quantificação, **CQB:** controle de qualidade baixo, **CQM:** controle de qualidade médio, **CQA:** controle de qualidade alto, **CQD:** controle de qualidade de diluição, **PI:** padrão interno, **CV%:** coeficiente de variação, **FMN:** fator de matriz normalizado, **EPR:** erro padrão relativo, **Bias:** exatidão.

### 3.5 Cromatografia líquida acoplada à detector de massas (CL-EM)

Em análises forenses os métodos analíticos precisam ter alta confiabilidade e precisão. A combinação de espectrometria de massas com cromatografia adequada é considerada uma das técnicas de escolha, pois juntas são capazes de produzir resultados sensíveis, precisos e específicos em um curto espaço de tempo.

O uso de CL-EM em detecção de drogas data dos anos oitenta (MARQUET e LACHÂTRE, 1999) e vem se aperfeiçoando ano após ano. Por muito tempo, a cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de massas (CG-EM) foi soberana na área de drogas de abuso, apesar de não ser aplicável à substâncias polares, termolábeis e não voláteis, que são passíveis de análise por cromatografia líquida. A CL-EM é vantajosa principalmente por causa da pouca exigência no pré-tratamento de amostra, sem etapas complicadas de extração e derivatização que prolongam o tempo de análise. Além disso, um volume menor de amostra é necessário para análise em cromatografia líquida, já que, em geral, estas não precisam passar pelo processo de extração e derivatização (LILLSUNDE, 2008; GALLARDO et al., 2009). O procedimento de preparação e amostra mais relatado é a deproteinização, os demais variam de acordo com a necessidade de reduzir e/ou evitar a supressão iônica (MAURER, 2005).

O método de ionização mais utilizado em CL-EM é a ionização por eletrospray (ESI, do inglês *ElectroSpray Ionization*) (LILLSUNDE, 2008). Desde a década de 1970 diferentes interfaces foram desenvolvidas no intuito de retirar a fase móvel e ionizar o analito de forma a viabilizar as análises. A **Figura 1** traz os diferentes métodos de ionização e a relação com a massa molecular e polaridade dos analitos, mostrando que a CL-EM com ionização por eletrospray é a mais abrangente.



**Figura 1.** Relação entre a faixa de massa molecular e polaridade das substâncias que podem ser analisadas por CG-EM e diversas técnicas de ionização em CL-EM.

**Fonte:** Adaptado de Maurer, 1998.

Uma limitação associada à esta técnica é o efeito matriz ou supressão iônica, que é comumente relatada em CL-EM com ionização por eletrospray (ANNESLEY, 2003; DAMS e HUESTIS, 2003a; MALLET et al., 2004; PETERS e REMANE, 2012) e ocorre devido à presença de compostos interferentes, provenientes da própria matriz complexa ou do processo de extração, que acabam influenciando diretamente na capacidade de detecção dos analitos e reprodutibilidade da análise. É relatado que moléculas com massas altas irão suprimir o sinal de moléculas menores e os analitos mais polares são mais susceptíveis a sofrerem supressão iônica (BONFIGLIO et al., 1999; STERNER et al., 2000). Ainda, o efeito matriz é dependente da preparação de amostra e do tipo de matriz biológica (DAMS et al., 2003a).

Existem várias maneiras de reduzir a supressão iônica em análises por CL-EM. Uma delas é modificar as condições cromatográficas de modo que o composto de interesse elua onde a supressão não é observada, isso geralmente aumenta o tempo de análise, porém é eficiente. Modificar as condições cromatográficas para que o composto de interesse co-elua com o padrão interno é outra alternativa, assim a supressão será igual para ambos os picos, e conseqüentemente, corrigida (BEATO et al., 2000; ANNESLEY, 2003). Vale destacar que essa metodologia se

aplica apenas aos casos em que o padrão interno utilizado é um isótopo estável ou análogo estrutural. Ainda, o pré-tratamento da amostra pode ser decisivo para diminuir ou eliminar o efeito matriz (DAMS e HUESTIS et al., 2003a).

O acoplamento das técnicas de cromatografia líquida com a espectrometria de massas favoreceu novas possibilidades para a determinação de substâncias toxicologicamente relevantes, entretanto, a reprodutibilidade dos espectros de massa advindos dessa técnica não está ainda satisfatoriamente estabelecida (RIVIER, 2003). Enquanto que na CG-EM a energia de ionização é constante, os espectros de massa são uniformes e únicos para cada molécula, na CL-EM a fragmentação de cada molécula depende fortemente da configuração da interface do equipamento e das condições cromatográficas aplicadas, de modo que os espectros obtidos variam amplamente dependendo da natureza do eluente e das condições de EM. Não existe uma voltagem ideal de ionização, e, mesmo quando as energias aplicadas são as mesmas, os espectros obtidos são específicos para cada instrumento, dificultando a extrapolação de métodos e os ensaios inter laboratoriais (LIPS et al., 2001).

A CL-EM por muito tempo foi utilizada como alternativa de substituição à CG-EM em casos de analitos problemáticos, hoje evoluiu para uma ferramenta robusta e confiável, que também oferece versatilidade, especificidade e sensibilidade (WOOD et al., 2006), sendo largamente utilizada para análise das mais diversas classes de drogas (**Tabela 5**). Do ponto de vista forense, CL-EM e CG-EM são técnicas complementares e não competitivas, que quando usadas em associação proporcionam robustez aos achados analíticos.

**Tabela 5.** Metodologias desenvolvidas para análise de drogas de abuso em CL-EM nos últimos 10 anos.

<b>Matriz biológica</b>	<b>Analitos</b>	<b>Coluna</b>	<b>Fase móvel</b>	<b>Faixa de detecção</b>	<b>Referência</b>
Sangue e FO	Benzodiazepínicos Opióides	Waters XTerra Phenyl	Formiato de amônio 10mM e ACN	-	Gjerde et al., 2010
Colostro	COC e produtos	Phenomene	Acetato de	5 – 300	D'Avila et

	de biotransformação	x Kinetex HILIC	amônio 13mM, ACN e MeOH	ng/mL	al., 2015
Sangue e FO	Anfetamínicos, metanfetamina, COC, THC	-	-	-	Gjerde et al., 2015
FO, urina e sangue	$\Delta^9$ -THC e 11-nor- 9-carboxy $\Delta^9$ – THC	Symmetry C18	ACN acidificada (0,1% ácido fórmico)	2 – 2000 ng/mL	Teixeira et al., 2007
FO	$\Delta^9$ -THC	XTerra MS C18	ACN acidificada (0,1% ácido fórmico)	-	Concheiro et al., 2007
Urina	Estimulantes, designer drugs, alucinógenos, canabinoides sintéticos, opioides e benzodiazepínicos	TF Hypersil GOLD C18	-	-	Wissenbach et al., 2011
Placenta	Metadona e metabólito, COC e metabólito, morfina e metabólito e codeína	Synergi Polar RP	ACN acidificada (0,1% ácido fórmico)	10 – 2000 ng/g	Castro et al., 2009

### 3.6 Cocaína

A COC é um alcaloide presente nas folhas provenientes de espécies do gênero *Erythroxylum* (*E. novogranatense* e *E. coca*). Além de ser um anestésico local potente, atua como um poderoso agente simpatomimético, cujos efeitos são estimulantes do SNC. A COC possui o maior poder estimulante central dentre os agentes naturais, razão pela qual é utilizada como fármaco de abuso (CRITS-CHRISTOPH et al., 2008). O mecanismo de ação baseia-se no acúmulo de dopamina na região do núcleo accumbens, que ocorre através do bloqueio dos



transportadores desse neurotransmissor (CARBONI, 2001). Os efeitos clínicos dependem da dose, do uso concomitante com outras substâncias, da via de administração, do grau de tolerância e da susceptibilidade individual. Em doses baixas, ocorre intoxicação aguda provocando euforia e agitação. Doses maiores causam hipertermia, náusea, vômito, dor abdominal, dor no peito, taquicardia, arritmia ventricular, hipertensão, ansiedade extrema, agitação, alucinações e midríase. Estes podem ser seguidos por efeitos mais graves como respiração irregular, convulsões, coma, distúrbios cardíacos, colapso e morte. A intoxicação crônica produz euforia, agitação psicomotora, anorexia, alucinações e deterioração mental. Ainda, síndrome de abstinência com graves efeitos psiquiátricos podem ocorrer (INCHEM, 2012), além da síndrome do “delírio excitado”, que é uma condição médica potencialmente fatal caracterizada por agitação aguda e comportamento violento que por vezes resulta em morte súbita e inexplicável (PLUSH et al., 2015; SHIELDS et al., 2015).

O uso da COC é relatado desde 1507 devido ao hábito de mastigação das folhas pelos povos andinos para aumentar a produtividade. Pouco mais de 300 anos depois, Alberti Niemann isolou o extrato da COC, e diversos produtos começaram a ser lançados no mercado contendo essa substância, os exemplos mais famosos são o “Vin Mariani” (1863) e a Coca-cola (1886). Uma pessoa importante na disseminação do uso da COC na época foi Sigmund Freud, que em 1884 publicou o livro chamado “Uber Coca”, defendendo o uso terapêutico e indicando a substância para diversos males. Nesse mesmo ano, Karl Koller descobriu o efeito anestésico em oftalmologia, e após muitos relatos de dependência inclusive entre médicos colegas de trabalho, Freud publicou em 1892 a continuação de “Uber Coca”, assumindo os riscos altíssimos de dependência dessa substância. A estrutura química foi descoberta em 1898 e em 1902 Willstatt recebeu o Prêmio Nobel por produzir cloridrato de COC. Já no século XX, com o surgimento das leis e regulamentações dessa substância devido aos problemas de saúde pública e o aparecimento de outras drogas do tipo estimulantes como os anfetamínicos, mais baratos e com efeitos mais duradouros, houve uma diminuição do consumo global de COC. Nos últimos 30 anos, essa substância reapareceu de forma descontrolada com o uso recreativo, em grande parte pelo aumento da produção em países Sul

Americanos e pelo plano de distribuição eficaz dos traficantes destes países (FERREIRA e MARTINI, 2001).

As formas de apresentação da COC são variadas, e entre elas as mais importantes e usualmente apreendidas são: “cloridrato de COC”, “COC pasta base” e “crack”. A origem dos produtos é a mesma, todos são extraídos da planta, o que os diferencia é o processo de preparação e a via utilizada para o consumo. Especificamente, o cloridrato de COC pode ser aspirado ou injetado, enquanto que a COC pasta base e o crack são inalados através do ato de fumar. A COC pasta base é geralmente produzida pelo tratamento das folhas com querosene ou gasolina, substâncias alcalinas, permanganato de potássio e por último ácido sulfúrico, resultando em uma pasta lipossolúvel e volátil a altas temperaturas, contendo entre 40 a 85% do produto de interesse. O crack, por sua vez, é obtido por mudanças químicas do cloridrato de COC em diferentes estágios de purificação, provocadas pela adição de amônia, bicarbonato de sódio e água. O aquecimento é responsável por produzir esse produto, denominado “crack”, em referência ao ruído de crepitação formado quando a substância é aquecida ou fumada. A via pela qual a COC é utilizada tem um grande impacto na saúde dos usuários, assim como os diluentes e adulterantes que podem estar presentes no produto, devido ao modo pelo qual são preparados nos laboratórios clandestinos (CICAD, 2015).

A absorção e máxima concentração plasmática dependem da via pela qual a COC é administrada. Cone (1995) conduziu um estudo comparando a farmacocinética da COC por via intravenosa, intranasal e respiratória nos mesmos indivíduos e os resultados mostram que os picos plasmáticos foram atingidos em 5 minutos nas vias intravenosa e respiratória, e em 50 minutos na via intranasal. A distribuição ocorre de maneira muito rápida, atingindo primeiramente o cérebro, baço, rins e pulmão, seguido de coração e músculos (JENKINS e CONE, 1998). O tempo de meia-vida de eliminação é em torno de 4 a 5 horas (CONE, 1995).

A COC absorvida é rapidamente biotransformada a éster metil ecgonina, produto da hidrólise do grupo benzoato por ação de colinesterases plasmáticas e hepáticas, constituindo cerca de 32 a 49% da excreção urinária da substância; e a BZE, formada pela hidrólise espontânea ou por reações catalisadas por carboxilesterases, que constitui cerca de 29 a 45% da excreção urinária (CHASIN et

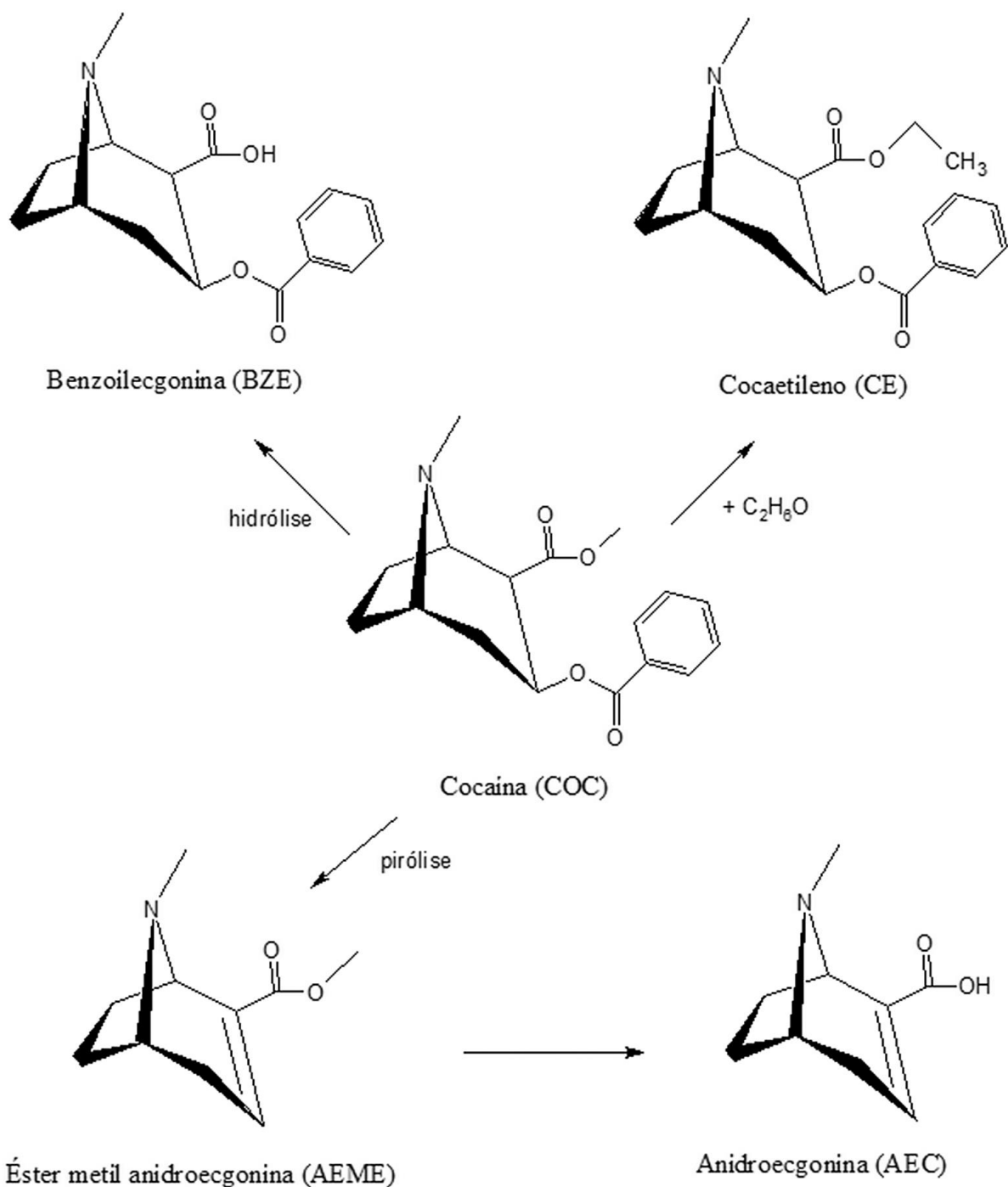
al., 2008). EMA é formada pela pirólise da COC base (consumo do crack através do fumo), esta por sua vez, é convertida a AEC pela atividade de butirilcolinesterases. Esses dois metabólitos são utilizados como biomarcadores para diferenciar a COC fumada (crack) de outras vias de administração (SCHEIDWEILER et al., 2003). Dentre os outros produtos resultantes da biotransformação da COC, está o cocaetileno (CE), produto da etil transesterificação, indicando o consumo concomitante de COC e etanol. Em média, menos de 10% da COC é excretada inalterada na urina, isso é justificado pela extensa biotransformação (CHASIN et al., 2008) (**Figura 2**).

O (ab)uso de COC e seus derivados, como o crack, consiste no maior problema de saúde pública associado ao abuso de drogas da atualidade. Segundo dados da UNODC (2015) 687 toneladas de COC foram apreendidas em 2013. Entre as drogas e substâncias psicotrópicas mais frequentemente abusadas no mundo todo, a COC é a única em que todos os processos ilícitos (cultivo, produção e processamento) estão concentrados em uma região específica, ou seja, a América do Sul. Em particular, o cultivo ilícito de COC está concentrado na Bolívia, Colômbia e Peru (INCB, 2015). Na América do Sul, a prevalência do uso de COC aumentou de 0,7% em 2010 (1,84 milhões de usuários) para 1,2% em 2012 (3,34 milhões de usuários), permanecendo assim em 2013, número três vezes maior que a média de consumo mundial (UNODC, 2015).

No Brasil, dados extrapolados de estudos anteriores estimam que a prevalência de uso de COC entre a população adulta seja de 1,75%. Por conta de sua posição geográfica, o Brasil possui um papel importante no tráfico devido às suas fronteiras com os países produtores e a longa costa para o Oceano Atlântico, facilitando o transporte para outros países, estima-se que as apreensões em 2013 passaram de 40 toneladas. De uma forma geral, a COC entra no país pelo ar (pequenos aviões), por terra (carros, caminhões e ônibus) e por água (através do Rio Amazonas e seus afluentes), e é transportada para o exterior, principalmente para a Europa e África através de containers e aeronaves (UNODC, 2015; INCB, 2015).

Apesar de a produção estar concentrada em três países sul-americanos (Bolívia, Colômbia e Peru), laboratórios clandestinos de processamento estão

espalhados por diversos países vizinhos. Em 2013, diversos laboratórios de processamento/refino de folhas foram descobertos na Argentina, Chile, Equador e Venezuela. Somente na Bolívia, o número de laboratórios destruídos aumentou em 81%, e na Colômbia as autoridades exterminaram 2,128 laboratórios no ano de 2013 (UNODC, 2015; INCB, 2015).



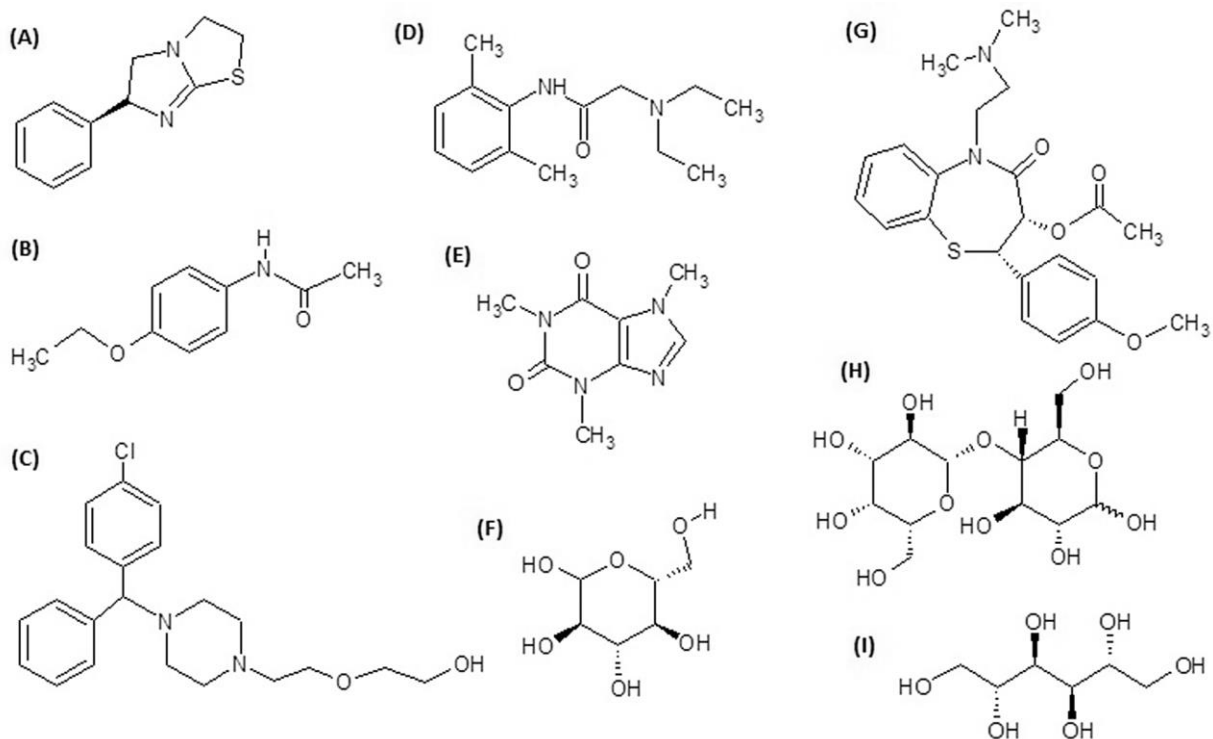
**Figura 2.** Cocaína e principais produtos de biotransformação.

### 3.6.1 Adulteração de cocaína

A COC é geralmente comercializada na forma de um pó branco e pode conter muitas outras substâncias, como produtos naturais da planta, contaminantes resultantes do processo de refino e, composto adulterantes. Os compostos adulterantes são conhecidos como diluentes (farmacologicamente inativos e de fácil venda no mercado) ou adulterantes (farmacologicamente ativos, menos disponíveis e mais caros que os diluentes). Esse tipo de substância é adicionada à droga por diversas razões, dentre elas aumentar lucros na venda do produto, mimetizar os efeitos de interesse da droga com outra substância de menor valor e, ainda, facilitar a administração (COLE et al., 2011; BROSEÚS et al., 2016). Por exemplo, alguns compostos como cafeína, procaína e estricnina são utilizados para vaporizar a heroína em menores temperaturas, facilitando o consumo dessa substância através do ato de fumar (ESKES e BROWN, 1975; HUIZER, 1987).

No Brasil, a COC é raramente comercializada com 100% de pureza, sendo que a maioria dos contaminantes encontrados são resultados do processo de refino (BERNARDO et al., 2003). Estudos anteriores mostram diferença de pureza encontrada em amostras apreendidas no Brasil, destacando que a maioria da droga que chega no país é adulterada antes de ser enviada ao próximo destino, geralmente Europa e África (MAGALHÃES et al., 2013; LAPACHINSKE et al., 2015).

Os registros de compostos adulterantes adicionados à COC começaram a surgir a partir dos anos 80 e, com o passar dos anos, mais e mais substâncias são adicionadas à lista. Lidocaína e açúcares foram as primeiras substâncias registradas, seguidas de cafeína, fenacetina, diltiazem, hidroxizina e levamisol, estas são as substâncias consideradas como principais agentes adulterantes até os dias atuais (COLE et al., 2010; BROSEÚS et al., 2016). As estruturas dessas substâncias estão ilustradas na **Figura 3**.



**Figura 3.** Estrutura química dos principais compostos adulterantes. (A) Levamisol, (B) Fenacetina, (C) Hidroxizina, (D) Lidocaína, (E) Cafeína, (F) Glucose, (G) Diltiazem, (H) Lactose e (I) Manitol.

No Brasil, além das substâncias já citadas, benzocaína, acetaminofeno, procaína, aminopirina, prilocaína, bicarbonato e amido são frequentemente encontrados (BERNARDO et al., 2003; MAGALHÃES et al., 2013; ZACCA et al., 2014; BOTELHO et al., 2014; FLORIANI et al., 2014; FUKUSHIMA et al., 2014; GROBÉRIO et al. 2015, LAPACHINSKE et al., 2015; MALDANER et al., 2015; MARCELO et al., 2015; MARCELO et al., 2016; PENIDO et al., 2015; SOUZA et al., 2016). Em outros países como Luxemburgo, Itália, França e Holanda outros compostos como diclofenaco, efedrina, atropina e tetracaína foram relatados (SCHNEIDER e MEYS, 2011; MAIETTI et al., 2009; EVRARD et al., 2010; BRUNT et al., 2009). A mudança frequente de compostos adicionados no processo de adulteração dificulta o rastreamento realizado pelas entidades responsáveis, exigindo técnicas analíticas preparadas para acompanhar a evolução do mercado.

O levamisol é um agente anti-helmíntico bastante utilizado na medicina veterinária, porém vêm sendo utilizado como adulterante de COC desde 2002. As

concentrações dessa substância encontradas em COC vêm aumentando gradativamente desde as primeiras identificações (LEE et al., 2012). Os efeitos adversos agudos incluem náusea, diarreia e tontura, enquanto que o uso crônico pode causar dor muscular, dor de cabeça, febre, insônia e convulsões (BRUNT, 2012). Complicações mais graves associadas ao uso de COC adulterada com levamisol incluem: neutropenia, agranulocitose (KNOWLES et al., 2009; CZUCHLEWSKI et al., 2010; GAERTNER e SWITLYK, 2014), altrargias, metaemoglobinemia (HUNTER et al., 2011; CHAKLADAR et al., 2009), púrpura retiforme, vasculite sistemática, trombose e necrose cutânea (COLE et al., 2010; GRAF et al., 2011; GROSS et al., 2011; MUIRHEAD e EIDE, 2011; PEARSON et al., 2012; AUFFENBERG et al., 2013; BELFONTE et al., 2013; GARG et al., 2015; VERONESE et al., 2016).

O uso crônico de fenacetina é associado à nefrotoxicidade causando incontinência e dor (BRUNT, 2012), também podendo causar nefropatia analgésica, anemia hemolítica, metaemoglobinemia e câncer nos rins e bexiga (COLE et al., 2010).

Os anestésicos locais lidocaína, BZC, prilocaína e procaína podem causar náusea, vômito, tontura, tremores e convulsões. Além disso, problemas cardiovasculares como depressão miocárdica, hipotensão, bradicardia e arritmias são relatados (BRUNT, 2012). Metaemoglobinemia está associado ao uso de altas doses de benzocaína e prilocaína (HUNTER et al., 2011; BRUNT, 2012).

Diltiazem é um fármaco pertencente à classe dos bloqueadores de canal de cálcio, comumente utilizado para o tratamento de pressão alta. Como adulterante, essa substância pode causar reações cardiovasculares severas, incluindo angina, bradicardia, hipotensão e arritmia, além de provocar desmaio, náusea, vômito e diarreia (BRUNT, 2012). A hidroxizina é um anti-histamínico, antiemético, sedativo e ansiolítico que pode causar tontura (BRUNT, 2012), sonolência, efeitos gastrointestinais e dor de cabeça (COLE et al., 2010).

A cafeína, quando utilizada cronicamente está associada com sintomas de abstinência como dor de cabeça, irritabilidade (BRUNT, 2012), alterações no humor, ansiedade e distúrbios do sono (COLE et al., 2010). O acetaminofeno é responsável

por danos no fígado, efeitos gastrointestinais e muitos outros efeitos adversos quando em associação com o álcool (COLE et al., 2010).

A aminopirina é utilizada como analgésico e antipirético, porém está proibida em alguns países devido aos riscos de agranulocitose relacionados ao uso (ARAUJO et al., 2015). Bicarbonato, açúcares e amido não estão associados a graves efeitos adversos, porém podem causar irritação nasal (COLE et al., 2010).

Compostos adulterantes são adicionados à COC durante a produção ou nos vários níveis da cadeia de distribuição (antes ou depois da droga chegar na região ou país de destino). Uma vez que a adulteração pode ocorrer em diferentes etapas do processo, a presença, tipo e proporção de compostos adulterantes podem ser um bom indicativo de origem da droga (COOMBER, 1997). Por exemplo, a fenacetina é comumente encontrada em apreensões realizadas perto das fronteiras com o Peru em Bolívia, enquanto que o levamisol é frequentemente encontrado próximo às fronteiras com a Colômbia (ZACCA et al., 2010).

Além do importante papel do ponto de vista criminal, já que essas informações podem vir a ser úteis para o mapeamento de traficantes e rotas de tráfico (CUNNINGHAM et al., 2010), a identificação dos compostos adulterantes auxilia na caracterização dos efeitos adversos provocados pela ingestão de COC associada à essas substâncias, que por si só já possuem efeitos tóxicos, o que pode vir a resultar em toxicidade aguda e reações fatais, consequentemente aumentando os riscos para a saúde dos usuários, uma vez que os mesmos estão expostos a uma série de substâncias desconhecidas. Além disso, informações acerca do conteúdo da droga vendida nas ruas contribui para o entendimento geral dos problemas de saúde pública associados ao uso de COC no país.



**4. CAPÍTULO 1 – DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE COCAÍNA E METABOLITOS EM FLUIDO ORAL, URINA E PLASMA POR CL-EM E APLICAÇÃO EM USUÁRIOS DE DROGAS**



## 4.1 Manuscrito I

A seguir encontra-se disposto o artigo intitulado “**Simultaneous determination of cocaine/crack and its metabolites in oral fluid, urine and plasma by simple LC-MS method and its application in drug users**” publicado no periódico *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. Este artigo apresenta a validação e aplicação de métodos bioanalíticos para análise simultânea de COC, BZE, CE, EMA e AEC em FO, urina e plasma através da técnica de CL-EM.

Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 86 (2017) 60–66



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmacological and Toxicological Methods

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jpharmtox](http://www.elsevier.com/locate/jpharmtox)



Research article

### Simultaneous determination of cocaine/crack and its metabolites in oral fluid, urine and plasma by liquid chromatography-mass spectrometry and its application in drug users



Taís Regina Fiorentin<sup>a,\*</sup>, Felipe Bianchini D'Avila<sup>a</sup>, Eloisa Comiran<sup>a</sup>, Amanda Zamboni<sup>a</sup>, Juliana Nichterwitz Scherer<sup>b</sup>, Flavio Pechansky<sup>b</sup>, Paulo Eduardo Mayorga Borges<sup>c</sup>, Pedro Eduardo Fröhlich<sup>a</sup>, Renata Pereira Limberger<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Center for Drug and Alcohol Research, Collaborating Center on Alcohol and Drugs – HCPA/SENAD, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Professor Álvaro Abrim, 400, 90420-020 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Pharmaceutical Laboratory of the State of Rio Grande do Sul, State Foundation for Production and Research in Health, Av. Ipiranga, 5400, 90610-000 Porto Alegre, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Keywords

Cocaine  
Crack-cocaine  
LC-MS  
Oral fluid  
Plasma  
Urine

#### ABSTRACT

**Introduction:** A single LC-MS equipment was used to validate three methods for simultaneously analyzing cocaine (COC), benzoylecgonine (BZE), cocaethylene (CE), anhydroecgonine methyl ester (AEME) and anhydroecgonine (AEC) in oral fluid (OF), urine and plasma.

**Methods:** The methods were carried out using a Kinetex HILIC column for polar compounds at 30 °C. Mobile phase with isocratic condition of acetonitrile: 13 mM ammonium acetate pH 6.0: methanol (55:35:10 v/v/v) at 0.8 mL/min flow rate was used.

**Results:** After buffer dilution (OF) and protein precipitation (urine and plasma), calibration curve ranges were 4.25–544 ng/mL for oral fluid and 5–320 ng/mL for urine and plasma with correlation coefficients ( $r$ ) between 0.9947 and 0.9992. The lowest concentration of the calibration curves were the lower limit of quantification. No major matrix effect could be noted, demonstrating the efficiency of the cleaning procedure.

**Discussion:** The methods were fully validated and proved to be suitable for analysis of 124 cocaine and/or crack cocaine users. Among the subjects, 56.5% reported daily use of cocaine in the previous three months. Results show a high prevalence of the analytes, with BZE as the most prevalent (94 cases), followed by COC (93 cases), AEC (70 cases), CE (33 cases) and AEME (13 cases). In addition, the concentration of BZE in urine was higher compared to OF and plasma found in the real samples, showing the facility of accumulation in chronic users in matrices with a large detection window.



**Simultaneous determination of cocaine/crack and its metabolites in oral fluid, urine and plasma by liquid chromatography-mass spectrometry and its application in drug users**

Taís Regina Fiorentin<sup>1</sup>, Felipe Bianchini D'Avila<sup>1</sup>, Eloisa Comiran<sup>1</sup>, Amanda Zamboni<sup>1</sup>, Juliana Nichterwitz Scherer<sup>2</sup>, Flavio Pechansky<sup>2</sup>, Paulo Eduardo Mayorga Borges<sup>3</sup>, Pedro Eduardo Fröhlich<sup>1</sup>, Renata Pereira Limberger<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup>Center for Drug and Alcohol Research, Collaborating Center on Alcohol and Drugs – HCPA/SENAD, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Professor Álvaro Alvim, 400, 90420-020, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>3</sup>Pharmaceutical Laboratory of the State of Rio Grande do Sul, State Foundation for Production and Research in Health, Av. Ipiranga, 5400, 90610-000, Porto Alegre, Brazil

Corresponding author. Phone/fax +555133085762

E-mail address: [taisfiorentin@gmail.com](mailto:taisfiorentin@gmail.com)

Adress: Avenida Ipiranga, 5762, laboratório 605A, Bairro Santana, 90610-000, Porto Alegre-RS, Brazil



## ABSTRACT

*Introduction:* A single LC-MS equipment was used to validate three methods for simultaneously analyzing cocaine (COC), benzoylecgonine (BZE), cocaethylene (CE), anhydroecgonine methyl ester (AEME) and anhydroecgonine (AEC) in oral fluid (OF), urine and plasma. *Methods:* The methods were carried out using a Kinetex HILIC column for polar compounds at 30 °C. Mobile phase with isocratic condition of acetonitrile: 13 mM ammonium acetate pH 6.0: methanol (55:35:10 v/v/v) at 0.8 mL/min flow rate was used. *Results:* After buffer dilution (OF) and protein precipitation (urine and plasma), calibration curve ranges were 4.25 – 544 ng/mL for oral fluid and 5 – 320 ng/mL for urine and plasma with correlation coefficients (r) between 0.9947 and 0.9992. The lowest concentration of the calibration curves were the lower limit of quantification. No major matrix effect could be noted, demonstrating the efficiency of the cleaning procedure. *Discussion:* The methods were fully validated and proved to be suitable for analysis of 124 cocaine and/or crack cocaine users. Among the subjects, 56.5% reported daily use of cocaine in the previous three months. Results show a high prevalence of the analytes, with BZE as the most prevalent (94 cases), followed by COC (93 cases), AEC (70 cases), CE (33 cases) and AEME (13 cases). In addition, the concentration of BZE in urine was higher compared to OF and plasma found in the real samples, showing the facility of accumulation in chronic users in matrices with a large detection window.

Key-words: cocaine, crack-cocaine, LC-MS, oral fluid, plasma, urine





## 1. INTRODUCTION

Drugs of abuse have extended to be a worldwide problem. According to the World Drug Report 2015 (UNODC, 2015), it is estimated that 5.2 % (range: 3.4-7.0 %) of the world's population used an illicit drug in 2013 - almost a quart of a billion people. In South America, cocaine is still one of the drugs of most concern, mainly because its consumption continues to increase as opposed to most other regions worldwide - where the consumption remains stable or decreases. The most important producers are Colombia, Peru and Bolivia. Brazil has the largest cocaine market in South America due to its large cocaine consumption and its geographical position, which makes it a convenient gateway to traffic cocaine to Europe.

The use of validated analytical methods to detect drugs in biological fluids is an important tool in the actual scenario. Several matrices, such as blood, urine, oral fluid, sweat, hair, nail and vitreous humor can be used for this purpose. Although there are several matrices to be used, the most common are blood components (whole blood, plasma, serum) and urine. Blood is considered the "gold-standard" for analysis due to a good correlation between blood drug concentrations and pharmacological effects (Langel et al., 2013), while urine is mainly used to monitor illicit drug use in drug treatment, criminal justice, and workplace drug-testing, since it provides a long detection window for drug abuse (Dams, Murphy, Lambert, & Huestis, 2003). The main disadvantages of blood and urine are the difficulty and risks to collect and the easy adulteration, respectively. Oral fluid has been highlighted recently because of its many advantages, such as: it is easy and non-invasive to collect by professionals and non-professionals, and has a good correlation with blood regarding several classes of drugs. Disadvantages include small volume of samples and low drug concentrations, which demands high method sensitivity (Chu et al., 2012; Concheiro, Gray, Shakleya, & Huestis, 2010; Martí-Álamo, Mancheño-Franch, Marzal-Gamarra, & Carlos-Fabuel, 2012; Montesano et al., 2015). Together, the three matrices are strongly recommended for screening and confirmatory analyses in forensic toxicology.

Currently, hyphenated chromatographic techniques are the most used to analyze cocaine in oral fluid, urine and plasma (Cardona, Chaturvedi, Soper, &

Canfield, 2006; Institóris, Angyal, Árok, Kereszty, & Varga, 2012; Johansen & Bathia, 2007; Liu et al., 2014; Montesano et al., 2015). Liquid chromatography coupled to mass detector (LC–MS) has some notable differences from gas chromatography coupled to mass detector (GC–MS) such as its capacity to analyze polar, non-volatile and thermally labile compounds (all characteristics of cocaine and derivatives). The same analysis by GC-MS would require a lengthy derivatization procedure and sample preparation (Couchman & Morgan, 2011; Perez et al., 2016; Stout, Bynum, Mitchell, Baylor, & Roper-Miller, 2009). There are many methods in literature that analyze anhydroecgonine methyl ester (AEME) and anhydroecgonine (AEC), the main pyrolysis products of cocaine (COC) in oral fluid, urine and plasma by gas chromatography (Carvalho, Chasin, & Carvalho, 2008; Cognard, Bouchonnet, & Staub, 2006; Jager & Andrews, 2001; Jager & Andrews, 2002; Paul, Lalani, Bosy, Jacobs, & Huestis, 2005; Wang, Darwin, & Cone, 1994). It has been demonstrated that COC thermally degrades during gas chromatography particularly at high gas chromatograph injector port temperatures (>210°C) (Bell & Nida, 2015; Cardona, Chaturvedi, Soper, & Canfield, 2006; De La Torre, Ortufio, & Segura, 1995; Gonzalez, Carnicero, Kraemer & Paul, 2007; Toennes, Fandino, Hesse, & Kauert, 2003) which does not occur when using liquid chromatography. Few studies have analyzed pyrolysis products in liquid chromatography tandem mass spectrometry (Concheiro, Gray, Shakleya, & Huestis, 2010; Dams, Murphy, Lambert, & Huestis, 2003; Jeppesen, Busch-Nielsen, Larsen, & Breindahl, 2015; Langman, Bjergum, Williamson, & Crow, 2009) and the majority of them performed extraction using SPE, however, there are no methods published in a single-stage LC-MS with no sample extraction to this purpose. Therefore, the aim of the present study was to validate and apply three methods to analyze cocaine/crack cocaine and its metabolites in biological samples by LC-MS prioritizing fastness, robustness, sensitivity and low-cost.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Chemicals and reagents**

Standards of cocaine hydrochloride (COC), benzoylecgonine (BZE), anhydroecgonine methyl ester (AEME) and anhydroecgonine (AEC) were donated by the Instituto Nacional de Criminalística (Brasília, DF, Brazil) through an official partnership. Cocaethylene (CE) and cocaethylene D-3 (CE-D3) standards were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Acetonitrile, methanol and ammonium acetate were obtained from Merck (Frankfurt, Germany), all with analytical grade. Ultrapure water was obtained using a Milli-Q Plus system of Millipore (Bedford, MA, USA). “Multi Drugs” devices to collect oral fluid were obtained from Alere Inc. (Massachusetts, USA). Oral fluid, urine and plasma drug-free samples were donated by volunteers.

## **2.2 Equipment**

Agilent 1260 infinity LC system equipped with G1311B quaternary pump , G1329B autosampler , G1314F UV/VIS detector and G1316A thermostatizer coupled to Agilent 6120B series mass detector was used (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Chemstation software (v. B.04.03) was used for data analysis. Eppendorf centrifuge, model 5430R (Hamburg, Germany) was used to prepare the samples.

## **2.3 Preparation of reference solutions**

Stock solutions of COC, BZE, CE and AEME were prepared at 1 mg/mL in acetonitrile and AEC was prepared at 1 mg/mL in methanol. Work solutions were prepared by dilution in a mixture of ultrapure water and acetonitrile (80:20). All solutions were kept at  $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Calibration curves were prepared daily by adding known concentrations of work solutions to 100  $\mu\text{L}$  (oral fluid) and 200  $\mu\text{L}$  (urine and plasma) drug-free matrices. Quality controls were prepared at 4.25 ng/mL (lower limit of quantification - LLOQ), 12.75 ng/mL (low quality control - LQC), 85.00 ng/mL (middle quality control - MQC), 442.00 ng/mL (high quality control - HQC) and 1,088.00 ng/mL diluted to 272.00 ng/mL (dilution quality control - DQC) in drug-free oral fluid. Urine and plasma quality controls were prepared at concentrations of 5.00

ng/mL (lower limit of quantification - LLOQ), 15.00 ng/mL (low quality control - LQC), 50.00 ng/mL (middle quality control - MQC), 260.00 ng/mL (high quality control - HQC) and 640.00 ng/mL diluted to 160.00 ng/mL (dilution quality control – DQC).

## 2.4 Sample preparation

### 2.4.1 Oral fluid

An aliquot of one hundred microliters of oral fluid (blank, calibrators, quality controls and real samples) were added to polypropylene conical tubes (1.5 mL) with 10  $\mu$ L of IS, 70  $\mu$ L of buffer and tubes were vortex for 20 seconds. Samples were centrifuged at 14.000 rpm at 4 °C for 20 minutes. An aliquot of 100  $\mu$ L of supernatant was transferred directly into a vial.

### 2.4.2 Urine

An aliquot of two hundred microliters of urine (blank, calibrators, quality controls and real samples) were added to polypropylene conical tubes (1.5 mL) with 10  $\mu$ L of IS, 100  $\mu$ L of acetonitrile and tubes were vortex for 20 seconds. Samples were centrifuged at 14.000 rpm at 4 °C for 30 minutes and the supernatant (100  $\mu$ L) filtered (PTFE 13 mm 0.22  $\mu$ m) directly into a vial.

### 2.4.3 Plasma

An aliquot of two hundred microliters of plasma (blank, calibrators, quality controls and real samples) were added to polypropylene conical tubes (1.5 mL) with 10  $\mu$ L of IS, 400  $\mu$ L of acetonitrile and tubes were vortex for 20 seconds. Samples were centrifuged at 14.000 rpm at 4 °C for 30 minutes and the supernatant (100  $\mu$ L) filtered (PTFE 13 mm 0.22  $\mu$ m) directly into a vial.

## 2.5 Ethics

This study was formally approved by the Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (14-0266). A verbal and signed consent was obtained from all volunteers after detailed explanation of the research process, and accepted for participation assuring that all the data were kept confidential and anonymous.

## 2.6 Liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS)

All parameters and specifications of the equipment and mobile phase were adopted from a previously validated method developed by our research group for another biological matrix (D'Avila et al., 2015). The column used in the analyses was a Phenomenex Kinetex HILIC (150 mm × 4.6 mm, particle size of 2.6 μm) (Torrence, CA, USA) maintained at 30 °C. The flow used was 0.8 mL/min, mobile phase consisting of acetonitrile: ammonium acetate 13mM pH 6.0: methanol (55:35:10). Injection volume for all the analyses was set at 10 μL. A single-stage mass spectrometer detector was operated with an electrospray ionization source in positive mode (ESI+) and following parameters were set to spray chamber: capillary voltage 1000 V, drying gas flow 7 L/min, nebulizer pressure 30 psig and drying gas temperature 350 °C. Gain value was kept at 1.

Parameters were set to optimize the quantification ion and analysis was performed in single ion monitoring (SIM) mode, in a time range monitoring four ions for each analyte (COC, BZE, CE, AEME and AEC) and three ions for the internal standard (CE-D3) with different fragmentor values for each one, as shown in **Table 1**.

## 2.7 Methods validation

Method validations were performed according to the Brazilian Health Surveillance Agency (ANVISA, 2012) and supported by the SWGTOX guide (SWGTOX, 2013) and the FDA bioanalytical method validation guideline (FDA, 2001) recommendations for bioanalytical methods, for the following parameters: linearity, selectivity,

carryover, matrix effect, precision, accuracy, limit of detection and quantification, recovery and stability.

### *2.7.1 Calibration curve*

Quantification of COC, BZE, CE, AEME and AEC was performed by the internal standard method (analyte area/internal standard area) through weighted least squares linear regression ( $1/x$  to plasma and  $1/x^2$  to oral fluid and urine) where  $x$  is the concentration ( $y = ax + b$ ). For linearity, calibration curves were prepared daily and blank samples were spiked with internal standard solution and corresponding calibration working solution mixtures to obtain concentrations of 4.25, 8.50, 17.00, 34.00, 68.00, 136.00, 272.00 and 544.00 ng/mL (oral fluid) and 5.00, 10.00, 20.00, 40.00, 80.00, 160.00 and 320.00 ng/mL (urine and plasma). Linearity was evaluated in three different days by correlation coefficients ( $r$ ) and CV% and bias% for each level (<20% for LLOQ and <15% for other concentrations).

### *2.7.2 Selectivity/specificity*

In order to evaluate selectivity, ten blank samples (oral fluid, urine and plasma) from different donators were analyzed. Peak area response at the retention time of all analytes was compared to the peak area response of the standard analytes at LLOQ. Additionally, blank samples were spiked with caffeine, cotinine, morphine and methadone at concentrations considered higher than the usually found in normal consumption and evaluated as interferences.

### *2.7.3 Carryover and Matrix Effect*

In order to evaluate carryover, blank samples were analyzed in duplicate after the highest analytical level and the results were compared with those of the samples processed at the LLOQ for all analytes (peak area response should be lower than 10%). Matrix effect was evaluated in ten samples from different donators at LQC and HQC prepared in biological samples (oral fluid, urine and plasma), processed and

subsequently spiked with COC, BZE, CE, AEME, AEC and IS. Samples prepared in distilled water at the same concentration were used for comparison. The results were evaluated by coefficient of variation (CV%) of the IS-Normalized Matrix Factor (MF), which must be below 15%. The formula to calculate MF is described below:

$$\text{MF} = \frac{\text{response of the analyte in matrix} / \text{response of the I.S. in matrix}}{\text{response of the analyte in solution} / \text{response of the I.S. in solution}}$$

#### 2.7.4 Precision and accuracy

Blank samples fortified with all analytes at LLOQ, LQC, MQC, HQC and DQC concentrations were prepared in quintuplicate. A coefficient of variation (CV%) was calculated for within-run and between-run, and %bias calculated for accuracy. Both parameters were accepted when results were  $\leq 20\%$  for LLOQ and  $\leq 15\%$  for other quality controls.

#### 2.7.5 Limit of detection (LOD) and lower limit of quantification (LLOQ)

LOD and LLOQ were determined experimentally by spiking blank samples from different donors in defined concentrations. LOD was defined as the lowest concentration providing a response at least three times the average of the baseline (S/N >3) determined by Chemstation Software. LLOQ was defined as the lowest concentration which can be quantitatively measured (CV% and accuracy lower than 20%).

#### 2.7.6 Recovery

Recovery was evaluated by response of processed samples at LQC, MQC and HQC (n=9) in oral fluid, urine and plasma compared with responses of samples prepared in solvent (ultra-pure water: acetonitrile 80:20) at the same concentrations, which represents 100%.

### 2.7.7 Stability

Stabilities of all analytes were evaluated in oral fluid, urine and plasma at LQC and HQC samples (n = 3). Long-term stability was accessed during 3 months with monthly analysis, and samples were kept at  $-20 \pm 2$  °C. Freeze-thaw stability was evaluated over three cycles: frozen samples were thawed at room temperature ( $25 \pm 2$  °C) and refrozen ( $-20 \pm 2$  °C) for about twelve hours. In post-processing stability, the samples were analyzed after being kept for ten hours at room temperature ( $25 \pm 2$  °C), the same occurring in the short-term stability when the samples were analyzed after two hours. Analyte stability in stock solutions was made during the validation period.

## 2.8 Collection of real samples

One hundred twenty four cocaine and/or crack cocaine users were recruited by convenience at inpatient and outpatient services specialized in drug addiction in the city of Porto Alegre, Brazil. Inclusion criterias were: being a cocaine user seeking treatment for drug addiction; being 18 years old or older; and having provided written informed consent. Subjects were excluded if they were considered clinically and intellectually unable to participate (e.g. psychosis, dementia and mental retardation) by best clinical judgment performed by trained interviewers. Data collection was obtained through interviews conducted within the first twenty-four hours after admission. Subjects were asked to donate samples of blood, urine and oral fluid. We lost 14 samples of oral fluid, 8 samples of urine and 11 samples of plasma mainly because of small quantity in oral fluid, difficulty of urination and difficulty to collect blood in patients with damaged access. All biological samples were collected at the same time range (mean interval of 1 hour  $\pm$  20min). Oral fluid samples were collected using Multi-Drugs Multi-Line – Twist Screen Test Device (Alere Inc., Massachusetts, USA). Blood was collected in 4 mL Vacutainer tubes containing 7.2 mg of EDTA (BD, Franklin Lakes NJ, USA). Urine samples were collected in 80 mL J. Prolab sterile tubes without additives (J.Prolab, PR, Brazil). The samples were stored at  $-80 \pm 2$  °C until analysis. Collectors were trained and supervised under the responsibility of the principal investigator.



### 3. RESULTS AND DISCUSSION

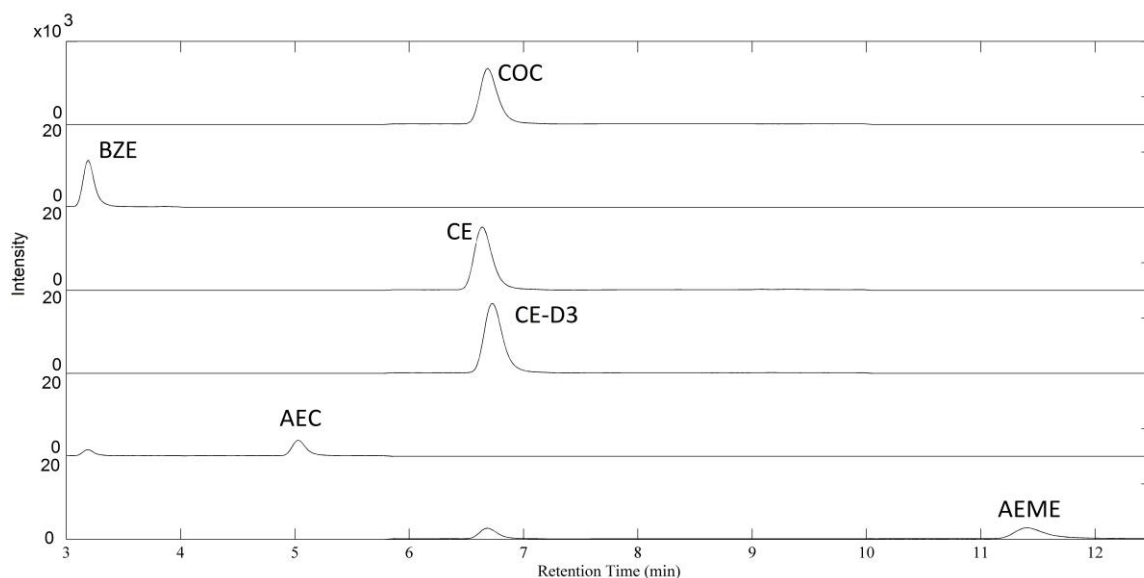
The retention times and fragmentor values of all analytes, as well as the quantification and confirmation ions used in single monitored (SIM) mode are reported in **Table 1**. Four ions were analyzed for the analytes COC, BZE, CE, AEME and AEC, and three ions for the IS (CE-D3). The extracted ion chromatograms of the five analytes are shown in **Fig. 1**. Only COC and CE eluted overlapping peaks which could be resolved when specific ions were monitored (**Table 1**). This could be seen in this class of substances using HILIC stationary phase due to the high similarity between the molecules (Giroud et al., 2004; Quintela et al., 2010). Cross-analyte interference was verified to certify the absence of interference between the analytes. Aliquots spiked at HCQ (442.00 ng/mL and 260.00 ng/mL) with COC and CE individually were analyzed and no significant peak at the retention time and/or mass transition was verified. Fragments of BZE and COC could be seen in the extracted ion chromatograms of AEC and AEME, respectively, as they are monitored as confirmation ions (**Fig. 1**).

**Table 1.** Retention time, quantification ion  $[M+H]^+$ , confirmation ions and fragmentor (V) values for all analytes.

Analytes	RT (min)			Quantification and confirmation ions (m/z) and fragmentor values
	Oral fluid	Urine	Plasma	
COC	6.3	6.6	6.6	<u>304</u> (150), 182 (175), 105 (200), 82 (200)
BZE	2.9	3.1	3.2	<u>290</u> (150), 168 (175), 105 (200), 82 (200)
CE	6.3	6.6	6.6	<u>318</u> (150), 196 (200), 122 (225), 94 (225)
CE-D3	6.3	6.6	6.6	<u>321</u> (150), 199 (200), 85 (225)
AEME	10.4	11.4	11.4	<u>182</u> (100), 122 (175), 91 (200), 65 (200)
AEC	4.6	4.9	5.1	<u>168</u> (150), 122 (175), 91 (175), 65 (200)

\*quantification ions are underlined

\* fragmentor values are in brackets



**Fig. 1.** Representative chromatogram (SIM mode) of the analytes cocaine (COC), benzoylecgonine (BZE), cocaethylene (CE), anhydroecgonine methyl ester (AEME) anhydroecgonine (AEC) and cocaethylene D-3 (CE-D3) as an internal standard in plasma at 50 ng/mL (MQC). Peaks 1 and 2 show the fragments of BZE and COC, respectively, monitored as confirmation ions.

### 3.1 Method validation

The methods present an eight point linear calibration curve (4.25 - 544 ng/mL) to oral fluid and a seven point linear calibration curve (5 - 320 ng/mL) to urine and plasma, covering the expected range with correlation coefficients above 0.99 and standardized residual plots within the limit ( $\pm 3$  standard deviations). LOD ranged between 1 to 3.4 ng/mL depending on the matrix and analyte, LLOQ was 4.25 ng/mL for all analytes in oral fluid and 5 ng/mL for all analytes in urine and plasma. These results are summarized in **Table 2**.

The within-day and between-day precision (CV%), as well as the accuracy (bias%) were satisfactory for all QCs samples tested (**Table 3**).

Under the chromatographic conditions used, the ten blank samples (oral fluid, urine and plasma) from different donators and also negative controls spiked with

possible interferences and exhibited no detectable COC, BZE, CE, AEME or AEC at or above the reported LLOQ.

The matrix effect values obtained by CV% of the samples ranged between 1.2 - 12.7% (oral fluid), 3.1 - 13.7% (urine) and 1.9 - 9.9% (plasma) and they were below the recommended values according to the guidelines for this parameter (ANVISA, 2012; FDA, 2001; SWGTOX, 2013). Needle wash between injections was carried out with methanol:water (20:80) and no analyte was detected in a blank sample injected immediately after the highest analytical level of the calibration curve (544 ng/mL to OF and 320ng/mL to urine and plasma), indicating no carryover at this concentration.

Recovery at LQC, MQC and HQC concentrations for cocaine ranged from 72.2 to 108.6%, benzoylecgonine from 65.1 to 79.1%, cocaethylene from 74.4 to 103.5%, cocaethylene-D3 from 82.5 to 89.08%, anhydroecgonine methyl ester from 80.4 to 88.03% and anhydroecgonine from 57.6 to 76.3%.

Stabilities were analyzed in four different ways at LQC and HQC concentrations, and the difference between intensity of signal was not significant, proving that all the analytes were stable after three freeze-thaw cycles, post-processing, short and long-term stability in oral fluid, urine and plasma. Stability was considered acceptable if QC samples were quantified within  $\pm 15\%$  of the target. The good long-term stability of cocaine and its derivatives in oral fluid, urine and plasma were already mentioned between 6 and 36 months, kept at  $-20 \pm 2$  °C (Montesano et al., 2015; Paul, Lalani, Bosy, Jacobs, & Huestis, 2005). It is important to mention that due to a protocol change the real samples were kept at  $-80$  °C instead  $-20$  °C as was originally planned. This change is not likely to have an important influence – in fact, it might influence the stability of the real samples in a positive manner in the stability of real samples, considering that the lowest temperature is more efficient in preserving of the analytes.

Three validated methods proved to be able to detect and quantify satisfactory cocaine in all types of utilization: salt form (COC and BZE biomarkers), alkaline form (AEME and AEC biomarkers) and concomitant use with ethanol (CE and AEC). AEC can indicate the use of crack and crack in combination with ethanol, since its a metabolite of anhydroecgonine methyl ester (AEME, marker following smoked

cocaine) and anhydroecgonine ethyl ester (AEE, marker for smoked cocaine + ethanol) (Langman, Bjergum, Williamson, & Crow, 2009). Some methods reported the analysis of all these analytes, however they were developed just only through GC-MS (Cardona, Chaturvedi, Soper, & Canfield, 2006; Lewis, Johnson, Angier, & Ritter, 2004; Paul, Lalani, Bosy, Jacobs, & Huestis, 2005) and CE-ESI-MS (Costa, Tonin, Zanolli, Chasin, & Tavares, 2009). All the techniques by GC-MS used protein precipitation followed by solid-phase extraction (SPE) and derivatization. Since LC-MS excludes these steps, the validated methods in this study have shown to be cheaper and less time-consuming when compared to GC-MS. Moreover, despite having a little more sensitivity, the methods by GC-MS used a large quantity of sample (3 mL) when compared to the present method (100 - 200  $\mu$ L) which becomes another advantage, considering the difficulty to collect samples from drug users.

Regarding LC-MS/MS, a number of studies evaluated cocaine and/or some of the metabolites in three different matrices. Langman, Bjergum, Williamson, & Crow, 2009 and Jeppesen, Busch-Nielsen, Larsen, & Breindahl, 2015 presented methods using SPE for urine extraction, the main purpose to use this form of extraction is to improve the sensibility, but the process request more sample volume and extend the analysis time. In those cases, 1000 and 500  $\mu$ L of urine were used, reaching a sensibility of 1 and 30 ng/mL, respectively. Dams, Murphy, Lambert, & Huestis, 2003 performed urine analysis using direct injection, without any sample preparation, only 10  $\mu$ L of urine was needed but this technique interfere directly in the LOQ (10, 25 and 100 ng/mL for BZE, COC and AEC, respectively) and also in the instrument lifetime. Oral fluid is considered a clean matrix in comparison with urine and blood, a LOQ of 0.5 ng/mL was presented by Concheiro, Gray, Shakleya, & Huestis, 2010 using SPE and 250  $\mu$ L of sample, while 8 ng/mL was reached by Johansen & Bathia, 2007 after acid precipitation, centrifugation and SPE in 200  $\mu$ L of blood. The new methods developed in this work present advantages regarding to easy sample preparation and low-cost of analysis (by using buffer dilution for OF and precipitation followed by centrifugation for urine and plasma) and less volume of sample required.

**Table 2.** Limits of detection (LOD), lower limit of quantification (LLOQ), correlation coefficient (r), regression equation and range of COC, BZE, CE, AEME and AEC in fluid oral, urine and plasma.

Analyte	Oral fluid				Urine				Plasma			
	LOD <sup>a</sup>	LLOQ <sup>a</sup>	Linearity (weight 1/x <sup>2</sup> )		LOD <sup>a</sup>	LLOQ <sup>a</sup>	Linearity (weight 1/x <sup>2</sup> )		LOD <sup>a</sup>	LLOQ <sup>a</sup>	Linearity (weight 1/x)	
			R	Range <sup>a</sup>			R	Range <sup>a</sup>			R	Range <sup>a</sup>
<b>COC</b>	1.7	4.25	0.9955	4.25-544	1	5	0.9965	5-320	1	5	0.9991	5-320
<b>BZE</b>	1.7		0.9992		2		0.9980		3		0.9965	
<b>CE</b>	1.7		0.9956		1		0.9947		1		0.9996	
<b>AEME</b>	3.4		0.9965		3		0.9974		2		0.9979	
<b>AEC</b>	3.4		0.9988		3		0.9962		3		0.9965	

<sup>a</sup> concentration in ng/mL

**Table 3.** Accuracy and precision (between-run) of COC, BZE, CE, AEME and AEC in oral fluid, urine and plasma. Results for lower limit of quantification (LLOQ), lower quality control (LQC), middle quality control (MQC), higher quality control (HQC) and dilution quality control (DQC) in quintuplicate.

<b>Oral fluid</b>										
Analyte	Accuracy (bias%)					Between-run (CV%)				
	LLOQ	LQC	MQC	HQC	DQC	LLOQ	LQC	MQC	HQC	DQC
COC	-	-8.32	-	9.00	5.64	0.96	4.37	1.27	1.15	1.47
BZE	12.19	1.15	10.76	-1.28	8.43	3.02	1.63	2.66	1.60	3.08
CE	-	8.55	-	14	13.6	1.60	3.76	2.18	1.84	1.62
AEME	10.34	-	10.97	12.10	13.73	4.39	3.42	2.22	3.42	4.02
AEC	12.43	11.54	-0.83	-4.86	0.78	2.41	3.14	2.28	2.04	1.83
<b>Urine</b>										
COC	10.56	-6.99	10.23	-1.77	4.56	1.66	1.16	5.79	2.11	3.99
BZE	0.79	4.28	11.89	-0.57	0.51	5.93	2.78	2.98	5.58	3.46
CE	7.87	-8.64	10.47	0.36	10.17	1.78	2.53	4.29	1.52	4.61
AEME	-7.97	-9.52	10.63	5.31	8.21	8.53	5.82	6.30	3.74	3.58
AEC	-	-	-6.41	-8.23	-	7.92	5.97	11.15	3.27	8.42
<b>Plasma</b>										
COC	3.61	2.88	3.75	11.41	13.17	3.98	0.62	2.38	2.87	2.39
BZE	-6.84	-3.19	-	5.90	8.28	8.85	12.37	3.43	7.71	11.22
CE	13.64	4.17	5.83	12.85	8.85	2.76	1.58	2.28	2.59	2.38
AEME	8.39	5.27	6.75	8.36	8.32	8.38	2.38	3.94	1.90	6.58
AEC	12.18	8.84	-7.61	8.19	9.76	3.75	9.51	11.16	2.24	13.53

### 3.2 Analysis of real samples

The sample comprised one hundred eighteen males and six females (mean age  $34 \pm 9$ , 47.6% caucasians, 56.5% unmarried). Subjects were mostly low- educated (62.9% with less than eight years of schooling) and unemployed (58%). Concerning substance abuse, the majority of the sample (56.5%) reported daily use of cocaine in the previous three months.

**Table 4** shows the high prevalence of analytes found in the samples. COC was detected in 93 subjects, BZE in 94, CE in 33, AEME in 13 and AEC in 70 subjects. In

37.6% of the cases where COC was detected, its use was confirmed in all three matrices. BZE was detected in three matrices in almost half of the total samples (45.7%). The prevalence decreases in crack metabolites (AEME and AEC) and CE, which could be detected more frequently only in urine.

The high prevalence of the parent drug (COC) in OF is explained by the high probability to occur passive diffusion from blood to OF (Crouch, 2005; Drummer, 2005). A representative chromatogram resulting from the analysis of one real case is shown in **Fig. 2**, it is possible to observe a predominant concentration of the parent drug (COC) in OF, and a predominant concentration a of metabolite (BZE) in urine and plasma.

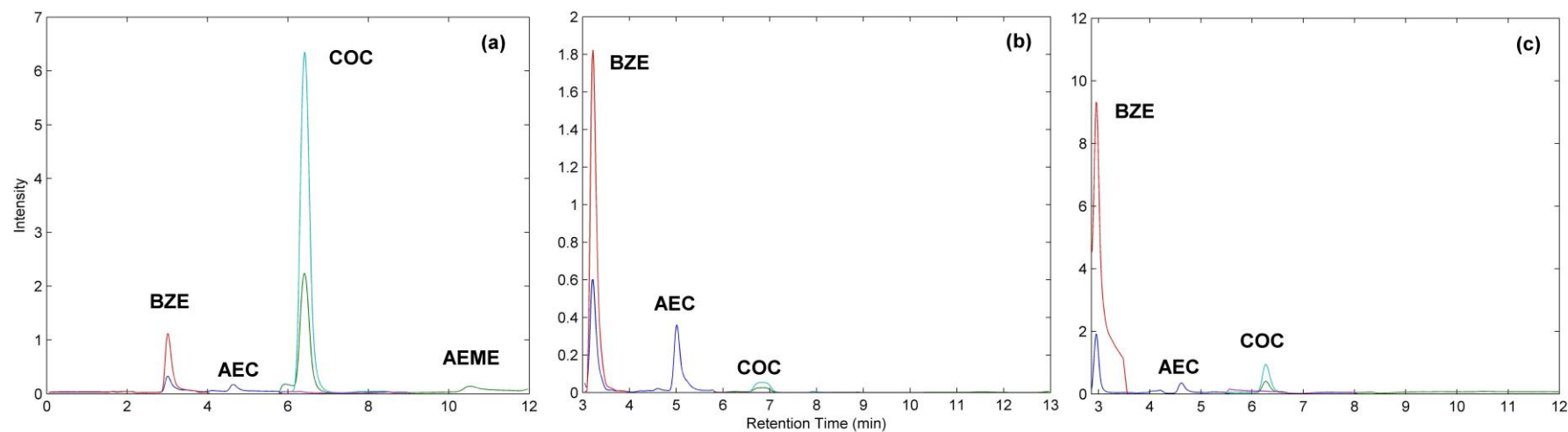
The average concentration in all matrices was 144.7 ng/mL for COC, 1,384.1 ng/mL for BZE, 109.9 ng/mL for CE, 201.1 ng/mL for AEME and 295.9 ng/mL for AEC (**Table 5**). The high benzoylecgonine concentration in samples clearly shows the accumulation of this substance mainly in urine, where we detected the largest average concentration, confirming the large detection window of this matrix which can be used preferably in the monitoring of clinical cases. In some analysis of BZE in urine, even when applying the dilution quality control (DQC), the concentrations were bigger than the highest analytical level. In these cases, the results were considered semi-quantitative. Also, the concentrations between the LOD and LLOQ were considered semi-quantitative.

**Table 4.** Number of individuals with cocaine (COC), benzoylecgonine (BZE), cocaethylene (CE), anhydroecgonine methyl ester (AEME) and anhydroecgonine (AEC) detected in oral fluid, urine and plasma.

	<i>Detected in oral fluid or urine or plasma</i>	<i>Detected in oral fluid</i>	<i>Detected in urine</i>	<i>Detected in plasma</i>	<i>Detected in oral fluid and urine and plasma</i>
<b>COC</b>	93	69	59	66	35
<b>BZE</b>	94	50	83	75	43
<b>CE</b>	33	2	19	15	0
<b>AEME</b>	13	3	12	0	0
<b>AEC</b>	70	12	62	36	8

**Table 5.** Average, standard deviation (SD) and amplitude for all analytes in different matrixes and totals found in all matrixes.

	Oral fluid			Urine			Plasma			All matrixes		
	Average	SD	Amplitude	Average	SD	Amplitude	Average	SD	Amplitude	Average	SD	Amplitude
<b>COC</b>	38.8	69.6	448.3	598.8	2750.08	19309.6	8.2	17.6	106.2	144.7	1497.4	19272.0
<b>BZE</b>	41.8	98.8	576.4	4079.7	6052.7	31924.1	181.7	313.2	1649.1	1384.1	3633.6	31505.7
<b>CE</b>	6.9	1.2	1.7	310.8	724.6	2738.6	4.76	3.1	9.0	109.9	754.4	2792.9
<b>AEME</b>	15.3	10.5	21.1	319.7	742.7	1439.4	0	0	0	201.1	1201.9	2403.8
<b>AEC</b>	12.1	9.8	32.0	606.5	1015.6	5741.04	27.4	51.07	284.7	295.9	774.09	5742.6



**Fig. 2.** LC-MS chromatogram (SIM mode) of a real case oral fluid (a) urine (b) and plasma (c). The figures show BZE (52.04 ng/mL), AEC (8.09 ng/mL), COC (450.1ng/mL) and AEME (7.93 ng/mL) in oral fluid, BZE (7338.73 ng/mL), AEC (1303.41ng/mL) and COC (244.2 ng/mL) in urine and BZE (259.7 ng/mL), AEC (30.08 ng/mL) and COC (29.7 ng/mL) in plasma.



#### 4. CONCLUSION

The present study described the validation of three methods for the assessment of cocaine/crack and its metabolites in oral fluid, urine and plasma by single LC-MS. The methods were successfully validated for selectivity, linearity, precision, accuracy, LOD, LOQ and stability. They proved to be rapid, robust and sensible for the identification and subsequent quantitation of COC, BZE, CE, AEME and AEC. Moreover, by applying this method it was possible to have an idea about the route of administration and concomitant use with ethanol. The methods have been successfully applied to analyze real samples.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Hospital Mãe de Deus and Clínica Pinel for the real samples. This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

#### REFERENCES

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. (2012). Resolução –RDC nº 27, de 17 de maio de 2012, Brasília, Brazil.
- Bell, S., Nida, C. (2015). Pyrolysis of drugs of abuse: a comprehensive Review. *Drug Testing and Analysis*, 7, 445–456.
- Cardona, P.S., Chaturvedi, A.K., Soper, J.W., Canfield, D.V. (2006). Simultaneous analyses of cocaine, cocaethylene, and their possible metabolic and pyrolytic products. *Forensic Science International*, 157, 46–56.
- Carvalho, V.M., Chasin, A.A.M., Carvalho, D.G. (2008). A study on the stability of anhydroecgonine methyl ester (crack biomarker), benzoylecgonine, and cocaine in human urine. *Revista de Psiquiatria Clínica*, 35, 17-20.

Chu, M., Gerostamoulos, D., Beyer, J., Rodda, L., Boorman, M., Drummer, O.H. (2012). The incidence of drugs of impairment in oral fluid from random roadside testing. *Forensic Science International*, 215, 28–31.

Cognard, E., Bouchonnet, T., Staub, C. (2006). Validation of a gas chromatography—ion trap tandem mass spectrometry for simultaneous analysis of cocaine and its metabolites in saliva. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 925–934.

Concheiro, M., Gray, T.R., Shakleya, D.M., Huestis, M.A. (2010). High-throughput simultaneous analysis of buprenorphine, methadone, cocaine, opiates, nicotine, and metabolites in oral fluid by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398, 915–924.

Costa, J.L., Tonin, F.G., Zanolli, L.A., Chasin, A.A.M., Tavares, M.F.M. (2009). Simple method for determination of cocaine and main metabolites in urine by CE coupled to MS. *Electrophoresis*, 30, 2238–2244.

Couchman, L., Morgan, P.E. (2011). LC-MS in analytical toxicology: some practical considerations. *Biomedical Chromatography*, 25, 100–123.

Crouch, J.D. (2005). Oral fluid collection: The neglected variable in oral fluid testing. *Forensic Science International*, 150, 165–173.

D'Avila, F.B., Pereira, A.G., Salazar, F.R., Ferreira, P.L., Salazar, C.R., Limberger, R.P., Fröhlich, P.E. (2015). Determination of cocaine/crack biomarkers in colostrum by LC–MS following protein precipitation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 103, 67–72.

Dams, R., Murphy, C.M., Lambert, W.E., Huestis, M.A. (2003). Urine drug testing for opioids, cocaine, and metabolites by direct injection liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17, 1665–1670.

Drummer, O.H. (2005). Review: Pharmacokinetics of illicit drugs in oral fluid. *Forensic Science International*, 150, 133–142.

Food and Drug Administration. (2001). FDA Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation US Department of Health and Human Services. Rockville, MD.

Giroud, C., Michaud, K., Sporkert, F., Eap, C., Augsburger, M., Cardinal, P., Mangin, P. (2004). A Fatal Overdose of Cocaine Associated with Coingestion of Marijuana, Buprenorphine, and Fluoxetine. Body Fluid and Tissue Distribution of Cocaine and Its Metabolites Determined by Hydrophilic Interaction Chromatography–Mass Spectrometry (HILIC-MS). *Journal of Analytical Toxicology*, 28, 464–474.

Gonzalez, M.L., Carnicero, M., De La Torre, R., Ortufio, J., Segura, J. (1995). Segura, Influence of the injection technique on the thermal degradation of cocaine and its metabolites in gas chromatography. *Journal of Chromatography B*, 664, 317–327.

Institóris, L., Angyal, V., Árok, Z., Kereszty, É., Varga, T. (2012). A simple quantitation method for benzoylecgonine from oral fluid, blood, and urine samples used for determining 22 illicit and licit drugs by GC–MS with liquid–liquid extraction. *Forensic Toxicology*, 30, 59–65.

Jager, L.S., Andrews, A.R.J. (2001). Development of a screening method for cocaine and cocaine metabolites in urine using solvent microextraction in conjunction with gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 911, 97–105.

Jager, L.S., Andrews, A.R.J. (2002). Development of a screening method for cocaine and cocaine metabolites in saliva using hollow fiber membrane solvent microextraction. *Analytica Chimica Acta*, 458, 311–320.

Jeppesen, H.H., Busch-Nielsen, M., Larsen, A.N., Breindahl, T. (2015). Analysis of Urinary Biomarkers for Smoking Crack Cocaine: Results of a Danish Laboratory Study. *Journal of Analytical Toxicology*, 39, 451–459.

Johansen, S.S., Bathia, H.M. (2007). Quantitative analysis of cocaine and its metabolites in whole blood and urine by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 852, 338–344.

Kraemer, T., Paul, L.D. (2007). Bioanalytical procedures for determination of drugs of abuse in blood. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388, 1415–1435.

Langel, K., Gjerde, H., Favretto, D., Lillsunde, P., Øiestad, E.L., Ferrara, S.D., Vestraete, A. (2013). Comparison of drug concentrations between whole blood and oral fluid. *Drug Testing and Analysis*, 5, 461-471.

Langman, L.J., Bjergum, M.W., Williamson, C.L., Crow, F.W. (2009). Sensitive Method For Detection Of Cocaine And Associated Analytes By Liquid Chromatography– Tandem Mass Spectrometry In Urine. *Journal of Analytical Toxicology*, 33, 447-455.

Lewis, J.R., Johnson, R.D., Angier, M.K., Ritter, R.M. (2004). Determination of cocaine, its metabolites, pyrolysis products, and ethanol adducts in postmortem fluids and tissues using Zymark automated solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 806, 141–150.

Liu, Y., Zheng, B., Strafford, S., Orugunty, R., Sullivan, M., Gusb, J., Heidbreder, C., Fudala, P.J., Nasser, A. (2014). Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of cocaine and its metabolite (-) ecgonine methyl ester in human acidified stabilized plasma samples. *Journal of Chromatography B*, 961, 77–85.

Martí-Álamo, S., Mancheño-Franch, A., Marzal-Gamarra, C., Carlos-Fabuel, L. (2012). Saliva as a diagnostic fluid. Literature review. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 4, 237-243.

Montesano, C., Simeoni, M.C., Curini, R., Sergi, M., Sterzo, C.L., Compagnone, D. (2015). Determination of illicit drugs and metabolites in oral fluid by microextraction on packed sorbent coupled with LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407, 3647–3658.

Paul, B.D., Lalani, S., Bosy, T., Jacobs, A.J., Huestis, M.A. (2005). Concentration profiles of cocaine, pyrolytic methyl ecgonidine and thirteen metabolites in human blood and urine: determination by gas chromatography–mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 19, 677–688.

Perez, E.R., Knapp, J.A., Horn, C.K., Stillman, S.L., Evans, J.E., Arfsten, D.P. (2016). 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, 1–7.

Quintela, O., Lendoiro, E., Cruz, A., Castro, A., Quevedo, A., Jurado, C., López-Rivadulla, M. (2010). Hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HILIC-MS/MS) determination of cocaine and its metabolites benzoylecgonine, ecgonine methyl ester, and cocaethylene in hair samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, 1703–1712.

Reichenheim, M.E., Souza, E.R., Moraes, C.L., Jorge, M.H.P.M., Silva, C.M.F.P., Minayo, M.C.S. (2011). Violence and injuries in Brazil: the effect, progress made, and challenges ahead. *The Lancet*, 377, 1962–1975.

Scientific Working Group for Forensic Toxicology – SWGTOX. (2013). Standard practices for method validation in forensic toxicology. *Journal of Analytical Toxicology*, 37, 452–474.

Stout, P.R., Bynum, N.D., Mitchell, J.M., Baylor, M.R., Roper-Miller, J.D. (2009). A Comparison of the Validity of Gas Chromatography–Mass Spectrometry and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Analysis of Urine Samples for Morphine, Codeine, 6-Acetylmorphine, and Benzoylecgonine. *Journal of Analytical Toxicology*, 33, 398–408.

Toennes, S.W., Fandino, A.S., Hesse, F.J., Kauert, G.F. (2003). Artifact production in the assay of anhydroecgonine methyl ester in serum using gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 792, 345–351.

United Nations Office of Drugs and Crimes - UNODC. (2015) World Drug Report. Nova York.

Wang, W.L., Darwin, W.D., Cone, E.J. (1994). Simultaneous assay of cocaine, heroin and metabolites in hair, plasma, saliva and urine by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 660, 279–290.

**5. CAPÍTULO 2 – ANÁLISE DE CORRELAÇÃO DE COCAÍNA E METABÓLITOS  
EM AMOSTRAS DE FLUIDO ORAL, URINA E PLASMA COLETADAS  
SIMULTÂNEAMENTE**



## 5.1 Manuscrito II

A seguir encontra-se disposto o artigo intitulado “**Comparison of Cocaine/Crack Biomarkers Concentrations in Oral Fluid, Urine and Plasma Simultaneously Collected from Drug Users**” submetido para publicação no periódico *Journal of Analytical Toxicology*. Este artigo apresenta a análise de correlação entre COC, BZE e AEC em amostras de FO, urina e plasma coletadas simultaneamente de usuários de drogas na cidade de Porto Alegre, RS, Brasil.





## Comparison of Cocaine/Crack Biomarkers Concentrations in Oral Fluid, Urine and Plasma Simultaneously Collected from Drug Users

Taís Regina Fiorentin BSc<sup>1,a,\*</sup>, Juliana Nichterwitz Scherer BSc<sup>2,a</sup>, Marcelo Caetano Alexandre Marcelo MSc<sup>3</sup>, Tanara Rosângela Vieira Sousa PhD<sup>2</sup>, Flavio Pechansky PhD<sup>2</sup>, Marco Flôres Ferrão PhD<sup>3</sup>, Renata Pereira Limberger PhD<sup>1</sup>

<sup>a</sup> Both authors have equal importance in the authorship.

<sup>1</sup>Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup>Center for Drug and Alcohol Research, Collaborating Center on Alcohol and Drugs – HCPA/SENAD, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Professor Álvaro Alvim, 400, 90420-020, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>3</sup>Graduate Program in Chemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, 90650-001, Porto Alegre, RS, Brazil

Correspondence to: Taís Regina Fiorentin, Avenida Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone +55 51 33085762. Email address: taisfiorentin@gmail.com

**Funding:** This work was supported by Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas (SENAD) and Fundo de Incentivo a Pesquisa – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA). TRF and JNS received scholarship funded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).



## ABSTRACT

*Background:* The use of oral fluid (OF) as an alternative specimen for drug analysis has become very popular in forensic toxicology. Many random and controlled clinical studies have evaluated the correlation coefficients for cocaine detection between OF and other matrices, but their results show high variability. In addition, there are no data available regarding the specific correlation between matrices in crack-cocaine biomarkers. In this study, the relationship between oral fluid, urine, and plasma concentrations of cocaine/crack-cocaine biomarkers is evaluated. *Methods:* Paired oral fluid, urine, and plasma samples were collected from 124 subjects seeking treatment at services specialized in substance use disorders in Southern Brazil. All samples were analyzed for the presence of cocaine (COC), benzoylecgonine (BZE), and anhydroecgonine (AEC) by a validated liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) method. The relationship between drug concentrations in oral fluid versus plasma (OF/P) and oral fluid versus urine (OF/U) was evaluated by their correlation coefficients. *Results:* The p-values were significant for COC and BZE in OF/P and OF/U. The mean coefficient of determination showed a good correlation for BZE in OF/P (0.73) and OF/U (0.45), but only a slight correlation for COC in OF/P (0.17) and OF/U (0.07) and a poor correlation for AEC in OF/P (0.09) and in OF/U (-0.14). *Conclusion:* There are many factors that contribute to the variability of studies of random drug use, including uncertainty about the time of last administration, route of administration, and dosage. Overall, the authors found significant correlation coefficients for COC and BZE in OF/P and OF/U, but not for AEC. Despite the good correlations found in some cases, especially for BZE, the large variation seen in this work suggests that oral fluid concentrations should not be used to estimate concentrations of COC, BZE and AEC in plasma and/or urine.

**Key-words:** oral fluid, plasma, urine, cocaine, correlation coefficient



## INTRODUCTION

Blood and its components (plasma and serum) are considered the best choices for drug analysis. Because of the good correlation between blood drug concentrations and drug pharmacological effects<sup>1</sup>, blood analysis is specifically recommended when information on acute exposure is necessary, such as in traffic enforcement situations. Nevertheless, urine is the most widely used matrix to monitor drugs of abuse and their metabolites in biological specimens. The advantages of using urine as a matrix of choice are many, including the large amount of specimen available for testing and retesting, the large window for drug detection, and the high drug concentrations that can be potentially found.<sup>2,3</sup> However, both these matrices have important disadvantages, such as the highly invasive process that requires qualified personnel to collect blood, and the need of an observer to collect urine in order to avoid sample adulteration. Also, there is a significant probability that an individual will refuse to provide a sample in both cases due to such disadvantages.<sup>3</sup>

Oral fluid (OF) has been studied as an alternative matrix for the analysis of drugs of abuse since the 1970s. Using OF as the matrix of choice has strong advantages, including a simple and non-invasive collection procedure, difficulty to adulterate the specimen, and ease to detect recent drug use.<sup>2</sup> On the other hand, its disadvantages include oral contamination by the use of certain routes of administration (e.g. oral, intranasal, smoking), small sample volume, short window for drug detection, and low drug concentrations, demanding highly sensitive analytical methods.<sup>4</sup> Controlled clinical studies<sup>5-12</sup> and studies on random drug users<sup>1,13-17</sup> have evaluated the correlation of drug concentrations in oral fluid and other conventional matrices for different psychoactive substances, showing high variability in their results.

There are several factors that can influence drug concentration in OF and because of that it is difficult to establish a standard correlation coefficient of OF in comparison with other matrices. Blood constituents can be transferred to saliva through either an intracellular (diffusion) or an extracellular (ultrafiltration) route. Most abused drugs use a diffusion mechanism, which can be affected by the pH of the two specimens, the pKa of the drug, the degree of ionization, the degree of protein binding, the molecular weight, and the lipid solubility of the drug.<sup>10,18</sup> Also, the route

of administration can affect oral fluid concentration during the first half-hour after initial intake.<sup>1</sup> According to a modified version of the Henderson Hasselbach equation, it is presumed that unbound weakly basic drugs, like cocaine, will concentrate in oral fluid, while the weakly acidic drugs will do the opposite.<sup>4</sup>

Cocaine and crack-cocaine are among the most widely abused psychoactive substances, especially in South America. Therefore, cocaine detection in biological matrices is still a need in forensic toxicology. It is known that the liver metabolizes cocaine into benzoylecgonine (BZE) and ecgonine methyl ester (EME), which are the two major metabolites. When smoked, cocaine is degraded to anhydroecgonine methyl ester (AEME), a pyrolysis product. Anhydroecgonine (AEC) is a metabolite of AEME and is formed via esterase activity. In this sense, the two pyrolysis compounds (AEME and AEC) can be used as biomarkers to differentiate smoking from other routes of drug administration.<sup>19</sup>

The use of alternative specimens for detection of drugs of abuse is one of the biggest challenges in forensic toxicology. Moreover, the therapeutic and forensic detection of cocaine and its metabolites in different specimens is a subject of utmost importance. Even with the high consumption of crack-cocaine, there are no previous studies evaluating oral fluid concentrations in comparison to other biological matrices for the AEC crack-cocaine metabolite. In this sense, the aim of this study was to investigate the oral fluid versus plasma (OF/P) and oral fluid versus urine (OF/U) drug concentration ratios for COC, BZE and AEC in a sample of cocaine and crack-cocaine users.

## **EXPERIMENTAL METHODS**

### **Sample recruitment and procedures**

Cocaine and/or crack-cocaine users at inpatient and outpatient services specialized in substance use disorders in the city of Porto Alegre – the southernmost state capital of Brazil - were recruited to participate in this study. The sample comprises a total of 124 cocaine users of 18 years of age or older who were seeking treatment for substance use disorders. Trained interviewers provided clinical judgment to exclude subjects that were considered clinically and intellectually unable

to participate. An interview was conducted to collect basic information (e.g. age, gender, last time of drug consumption, amount of drug used and route of administration). Samples of blood, urine, and oral fluid were concomitantly collected within the first twenty-four hours after treatment admission. Fourteen oral fluid samples, eight urine samples, and eleven plasma samples were lost due to small quantity collected and difficulties in collecting samples from patients with damaged access. Oral fluid samples were collected using Multi-Drugs Multi-Line – Twist Screen Test Devices (Alere Inc., Massachusetts, USA) which is a lateral flow chromatographic immunoassay that lays up the oral fluid after qualitative analysis. Blood was collected in 4 mL Vacutainer tubes containing 7.2 mg of EDTA (BD, Franklin Lakes NJ, USA). Urine samples were collected in 80 mL J. Prolab sterile tubes without additives (J. Prolab, PR, Brazil). The samples were stored at  $-80\pm 2^{\circ}\text{C}$  until further analysis was done.

## **Ethics**

The Institutional Review Boards of Hospital de Clínicas and Hospital Mãe de Deus, both located in Porto Alegre, approved this study. A written consent was obtained from all participants.

## **Sample analysis**

All samples were analyzed by a validated method in the LC-MS (paper submitted). An Agilent 1260 infinity LC system equipped with a G1311B quaternary pump, G1329B autosampler, G1314F UV/VIS detector, and G1316A thermostatizer coupled with an Agilent 6120B series mass detector was used for analysis (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Chromatography separation of substances were made by Phenomenex Kinetex HILIC column (Torrence, CA, USA). Parameters were set to optimize the quantification ion and analysis was performed in single ion monitoring (SIM) mode. The ions 304, 182, 105, 82 monitored COC, ions 290, 168, 105, 82 monitored BZE, and ions 168, 122, 91, and 65 monitored AEC. Analytical Cut-off values were 4.25 ng/mL for all substances in oral fluid, and 5.00 ng/mL for all substances in urine and plasma. An Eppendorf centrifuge, model 5430R (Hamburg,

Germany) was used to prepare the samples. Each analysis was performed using 100  $\mu\text{L}$  of oral fluid and 200  $\mu\text{L}$  of urine and plasma. The oral fluid samples were processed by buffer dilution followed by centrifugation and filtration (0.22 $\mu\text{m}$ ). Urine and plasma samples were processed by precipitation in acetonitrile followed by centrifugation and filtration (0.22 $\mu\text{m}$ ).

## Data analysis

Chemstation software (v. B.04.03) was used for quantification analysis. Matlab software with PLS\_toolbox and Origin 8.0 was used for data analysis. Box plot outlier samples were removed only when their ratios were above a mean plus of 3.3 times the standard deviation. Even with ratios outside the fences of the box-plot, the authors did not remove other outliers due to the high variability of the experiment. Due to different concentration levels, each analyte was autoscaled (subtracted by its mean and divided by its variance) for box plotting. In the box-plot, the median was used as the centerline and the interquartile range was used as a box.

## RESULTS

Of the 124 subjects that were included in the study, only 64 had concomitant positive samples in OF and plasma or in OF and urine. Altogether, 46 pairs of OF/P and OF/U were available for comparison of COC and BZE concentrations and 8 pairs were available for AEC concentrations. Socio-demographic information of subjects included in our research is shown in **Table 1**. The scatter plots with the coefficient of determination ( $R^2$ ) and regression equation of the relationship between OF/P and OF/U of the COC, BZE and AEC are shown in **Figure 1**. COC and BZE showed a better correlation in OF/P than OF/U, while AEC showed poor correlation in both cases. The average and standard deviation concentrations, slope of the regression, significance of correlation (p-value), and number of positive cases are shown in **Table 2**. Extreme outliers were removed before calculating the final OF/P (2 outliers for COC and 1 outlier for BZE) and OF/U (5 outliers for COC). By calculating the individual ratios and drawing the box plots, we evaluated which ratios could be characterized as outliers and be then removed. Only extreme cases outside of the



outer fences (ratios outside 3.3 standard deviations) were considered as outliers and were removed. We tried to remove the least possible amount of outliers based on extreme values. Final box plots of COC, BZE and AEC as a function of the number of standard deviations are shown in **Figure 2**. In most cases, urine drug concentrations were very high. This was probably due to the accumulation of metabolites in chronic drug users. The lack of information about the time and amount of drugs used could contribute for the discordant values. Overall, there was a poor correlation between the concentrations of AEC in OF/P and OF/U, a slight correlation between the concentrations of COC in OF/P and OF/U, and a good correlation between the concentrations of BZE in OF/P and OF/U as can be seen in **Table 2** and **Figure 3**.

## DISCUSSION

Oral fluid has become one of the most used matrices of choice for forensic toxicology purposes, specifically because some authors have shown that its concentration levels may correlate with pharmacodynamic effects.<sup>20-22</sup> Our results showed that the OF/P and OF/U correlation ratios were significant for COC and BZE, but there was no significant correlation for AEC in both cases. More than that, even with the high prevalence of crack-cocaine daily users, AEC was detected only in 8 concomitant pairs of OF/P and OF/U, which perhaps can be explained by the time of delay between drug administration and sample collection.

According to previous studies, the relationship between oral fluid and plasma concentrations is usually higher in controlled administration clinical studies. Back in 1987, Thompson and col.<sup>5</sup> related that S/P (saliva:plasma) COC concentrations varied from 2.96 to 0.5 over time following drug administration. Cone and col. 1994<sup>6</sup> found a concentration of COC three times higher in saliva than in plasma. Years later, in 1997, the same authors<sup>8</sup> related that S/P ratios of COC ranged from 1.3 to 10.1 and S/P ratios of BZE ranged from 0.1 to 63.7. Jufer and col. 2000<sup>7</sup> related a mean cocaine S/P ratio of 8.7 (range 3.8-13.2). More recently, Ellefsen and col. 2016<sup>9</sup> showed a median COC OF/P ratio of  $\geq 1$  (from 0.17 to 2h) and of 1 (from 3 to 12.5 h). In the same study, the OF/P ratios were  $\geq 1$  initially (from 0.17 to 1 h) and  $< 1$  until 21 h for BZE. Overall, it can be noted that mean OF/P ratios of COC and BZE are

higher than 1 in the first hours after cocaine administration in controlled studies, with exception of two studies that found coefficient determinants lower than 0.5.<sup>10,7</sup>

In studies of random drug users, correlation coefficients are generally lower. This can be attributed to the variability of the data. Langel and col. 2013<sup>1</sup> found a coefficient of determination of 0.474 for COC and of 0.407 for BZE. Wille and col. 2009<sup>14</sup> found an OF/B (oral fluid:blood) ratios of 1 (range 0.2-11) for BZE, but the results for COC were higher, 22 (range 4-119). Samyn and col. 2000<sup>13</sup> related an S/P ratio that varied between 15 and 36 for COC and from 0.6 to 1.3 for BZE while Vindenes and col. 2012<sup>17</sup> found a coefficient of determination of 0.005 for COC. All studies were performed on volunteers that were suspected of driving under the influence of drugs. The large difference in our results can be explained by the variability of the data in random drug users. The dose and time interval between use and sampling are usually different among cases, and there is no guarantee about the truthfulness of the information provided by the subjects. Also, the different qualities of drugs can interfere with the amount used stated by the subjects, as most street drugs are mixed with cutting agents to increase profits.

Toennes et al 2005<sup>15</sup> compared the results found in oral fluid, urine, and serum in 168 cases of suspects driving under the influence of drugs. These data demonstrate that urine is inferior to oral fluid when it comes to correlating it with serum analytical data for cocaine. On the other hand, Vindenes and col. 2012<sup>17</sup> found a good correlation for COC/BZE in 100 drivers between oral fluid and urine, suggesting the replacement of urine by oral fluid in cases concerning impaired driving. However, it is important to note that these studies did not do the coefficient correlation, but rather the comparison between positive and negative results. Here, the correlation between OF/P concentrations was better than OF/U concentrations for COC and BZE (COC: 0.17 and 0.07 and BZE: 0.73 and 0.45 respectively).

Concerning AEC, we found a poor correlation either in OF/P or in OF/U concentrations (0.09 and -0.14, respectively), perhaps due to the small number of subjects with concomitant presence of AEC in the paired samples. It is important to consider that most of our sample comprises regular and heavy cocaine/crack-cocaine users, which can lead to the accumulation of the its metabolites in urine and plasma. Considering that there are no controlled administration studies evaluating the pharmacokinetics and the pharmacodynamics of AEC, and that evidence

suggests a very short terminal life for AEME in oral fluid,<sup>8,23</sup> we believe that AEC has also a short window of detection. Therefore, even with the high prevalence of crack-cocaine users in our sample, we found a small prevalence of AEC concomitant positive matrices probably because of the time lag between drug administration and sample collection, disabling the correlation analysis in a larger number of samples for this analyte.

## **CONCLUSION**

According to Cone and Huestis,<sup>24</sup> there are several considerations that should be taken in drug test interpretation and, because of that, correlation studies bring several important informations that can guide forensic and health professionals. Until present, there was no data available in the literature regarding the correlation of AEC, a specific crack metabolite, in different biological matrices. The results found in this study showed poor regression lines and no significant p-values . This was probably due to the intrinsic biological variability and the low number of individuals in which AEC was detected in, suggesting the need for more studies that include a larger number of participants and controlled clinical studies. Overall, we found significant p-values for COC and BZE in OF/P and OF/U analysis, and the coefficient of determination was relatively high for the metabolite BZE even in random drug users. However, despite these encouraging results, there is not enough evidence to estimate with reliability the plasma or urine concentration from oral fluid concentration.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors want to thank Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Hospital Mãe de Deus and Clínica Pinel for their collaboration. We also acknowledge the Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas (SENAD) and the Fundo de Incentivo a Pesquisa – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) for provide funding to this research, and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for provide scholarships for authors TRF and JNS.

## REFERENCES

- (1) Langel, K.; Gjerde, H.; Favretto, D.; Lillsunde, P.; Øiestad, E.L.; Ferrara, S.D.; Verstraete, A.G. (2013) Comparison of drug concentrations between whole blood and oral fluid. *Drug Testing and Analysis*, **6**, 461-471.
- (2) Dolan, K.; Rouen, D.; Kimber, J. (2004) An overview of the use of urine, hair, sweat and saliva to detect drug use. *Drug and Alcohol Review*, **23**, 213-217.
- (3) Gjerde, H.; Øiestad, E.L.; Christophersen, A.S. (2011) Using biological samples in epidemiological research on drugs of abuse. *Norsk Epidemiologi*, **21**, 5-14.
- (4) Dams, R.; Choo, R.E.; Lambert, W.E.; Jones, H.; Huestis, M.A. (2007) Oral fluid as an alternative matrix to monitor opiate and cocaine use in substance-abuse treatment patients. *Drug and Alcohol Dependence*, **16**, 258-267.
- (5) Thompson, L.K.; Yousefnejad, D.; Kumor, K.; Sherer, M.; Cone, E.J. (1987) Confirmation of cocaine in human saliva after intravenous use. *Journal of Analytical Toxicology*, **11**, 36-38.
- (6) Cone, E.K.; Hillsgrove, M.; Darwin, W.D. (1994) Simultaneous measurement of cocaine, cocaethylene, their metabolites, and crack pyrolysis products by gas-chromatography mass-spectrometry. *Clinical Chemistry*, **40**, 1299-1305.
- (7) Jufer, R.A.; Wstadik, A.; Walsh, S.L.; Levine, B.S.; Cone, E.J. (2000) Elimination of cocaine and metabolites in plasma, saliva, and urine following repeated oral administration to human volunteers. *Journal of Analytical Toxicology*, **26**, 467-477.
- (8) Cone, E.J.; Oyler, J.; Darwin, W.D. (1997) Cocaine disposition in saliva following intravenous, intranasal and smoked administration. *Journal of Analytical Toxicology*, **21**, 465-475.
- (9) Ellefsen, K.N.; Concheiro, M.; Pirard S.; Gorelick, D.A.; Huestis, M.A. (2016) Pharmacodynamic effects and relationships to plasma and oral fluid pharmacokinetics after intravenous cocaine administration. *Drug and Alcohol Dependence*, **163**, 116-125.
- (10) Scheidweiler, K.B.; Spargo, E.A.K.; Kelly, T.L.; Cone, E.J.; Barnes, A.J.; Huestis, M.A. (2010) Pharmacokinetics of cocaine and metabolites in human oral fluid and correlation with plasma concentrations following controlled administration. *Therapeutic Drug Monitoring*, **32**, 628-637.
- (11) Schepers, R.J.F.; Oyler, J.M.; Joseph Jr, R.E.; Cone, E.J.; Moolchan, E.T.; Huestis, M.A. (2003) Methamphetamine and amphetamine pharmacokinetics in oral fluid and plasma after controlled oral methamphetamine administration to human volunteers. *Clinical Chemistry*, **49**, 121-132.

- (12) Huestis, M.A.; Cone, E.J. (2004) Relationship of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol concentrations in oral fluid and plasma after controlled administration of smoked cannabis. *Journal of Analytical Toxicology*, **28**, 394-399.
- (13) Samyn, N.; Van Haeren, C. (2000) On-site testings of saliva and sweat with Drugwipe and determination of concentrations of drugs of abuse in saliva, plasma and urine of suspected users. *International Journal of Legal Medicine*, **113**, 150-154.
- (14) Wille, S.M.R.; Raes, E.; Lillsunde, P.; Gunnar, T.; Laloup, M.; Samyn, N.; Christophersen, A.S.; Moeller, M.R.; Hammer, K.P.; Verstraete, A.G. (2009) Relationship between oral fluid and blood concentrations of drugs of abuse in drivers suspected of driving under the influence of drugs. *Therapeutic Drug Monitoring*, **31**, 511-519.
- (15) Toennes, S.W.; Kauert, G.F.; Steinmeyer, S.; Moeller, M.R. (2005) Driving under the influence of drugs – evaluation of analytical data of drugs in oral fluid, serum and urine, and correlation with impairment symptoms. *Forensic Science International*, **152**, 149-155.
- (16) Gjerde, H.; Mordal, J.; Christophersen, A.S.; Bramness, J.G.; Mørland, J. (2010) Comparison of drug concentrations in blood and oral fluid collected with the Intercept® sampling device. *Journal of Analytical Toxicology*, **34**, 204-209.
- (17) Vindenes, V.; Lund, H.M.F.; Andresen, W.; Gjerde, H.; Ikdahl, S.E.; Christophersen, A.S.; Øiestad, E.L. (2012) Detection of drugs of abuse in simultaneously collected oral fluid, urine and blood from Norwegian drug drivers. *Forensic Science International*, **219**, 165-171.
- (18) Haeckel, R. (1993) Factors influencing the saliva/plasma ratio of drugs. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **694**, 128-142.
- (19) Scheidweiler, K.B.; Plessinger, M.A.; Shojaie, J.; Wood, R.W.; Kwong, T.C. (2003) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methylecgonine, a crack cocaine pyrolyzate. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **307**, 1179-1187.
- (20) Bosker, W.M.; Huestis, M.A. (2009) Oral fluid testing for drugs of abuse. *Clinical Chemistry*, **55**, 1910-1931.
- (21) Cone, E.J.; Kumor, K.; Thompson, L.K.; Sherer, M. (1988) Correlation of saliva cocaine levels with plasma and with pharmacologic effects after intravenous cocaine administration in human subjects. *Journal of Analytical Toxicology*, **12**, 200-206.
- (22) Schwoppe, D.M.; Bosker, W.M.; Ramaekers, J.G.; Gorelik, D.A.; Huestis, M.A. (2012) Psychomotor performance, subjective and physiological affects and whole blood  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol concentrations in heavy, chronic cannabis smokers following acute smoked cannabis. *Journal of Analytical Toxicology*, **36**, 405-412.

(23) Jenkins, A.J.; Oyler, J.M.; Cone, E.J. (1995) Comparison of heroin and cocaine concentrations in saliva with concentrations in blood and plasma. *Journal of Analytical Toxicology*, **19**, 359-374.

(24) Cone, E.J.; Huestis, M.A. (2007) Interpretation of oral fluid tests for drugs of abuse. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1098**, 51-103.

## TABLES

**Table 1.** Sociodemographic Information of the Study Subjects.

<b>Variable</b>	<b>Number of subjects n = 64 (%)</b>
<b>Age<sup>a</sup></b>	32.8 ± 8.7
<b>Gender</b>	
...Male	61 (95.3)
...Female	3 (4.7)
<b>Race</b>	
...Caucasian	32 (50)
...Black	13 (20.3)
...Mixed races	19 (29.7)
<b>Education</b>	
...Elementary school	44 (68.8)
...High school	16 (25)
...Superior school	4 (6.3)
<b>Gross income<sup>b</sup></b>	
...Without income	15 (23.4)
...< 2 minimum wage	30 (46.9)
...2-5 minimum wage	19 (29.7)
<b>Marital status</b>	
...Single	50 (78.1)
...Married	14 (21.9)
<b>Frequency of cocaine use*</b>	
...Daily	42 (65.6)
...Weekly	16 (25)
...Monthly	6 (9.4)
<b>Cocaine administration</b>	
...Snorted	13 (20.3)
...Smoked	51 (79.7)

<sup>a</sup>Mean ± Standard derivation

<sup>b</sup>One minimum wage in Brazil (R\$: 880.00) is equivalent to 251.4 U.S. Dollars

\*In the last three months

**Table 2.** Results of Average and Standard Deviation by individual matrix, Coefficient of Determination, Slope of the Regression Line, p-Value, and Positive Cases in each matrix correlation.

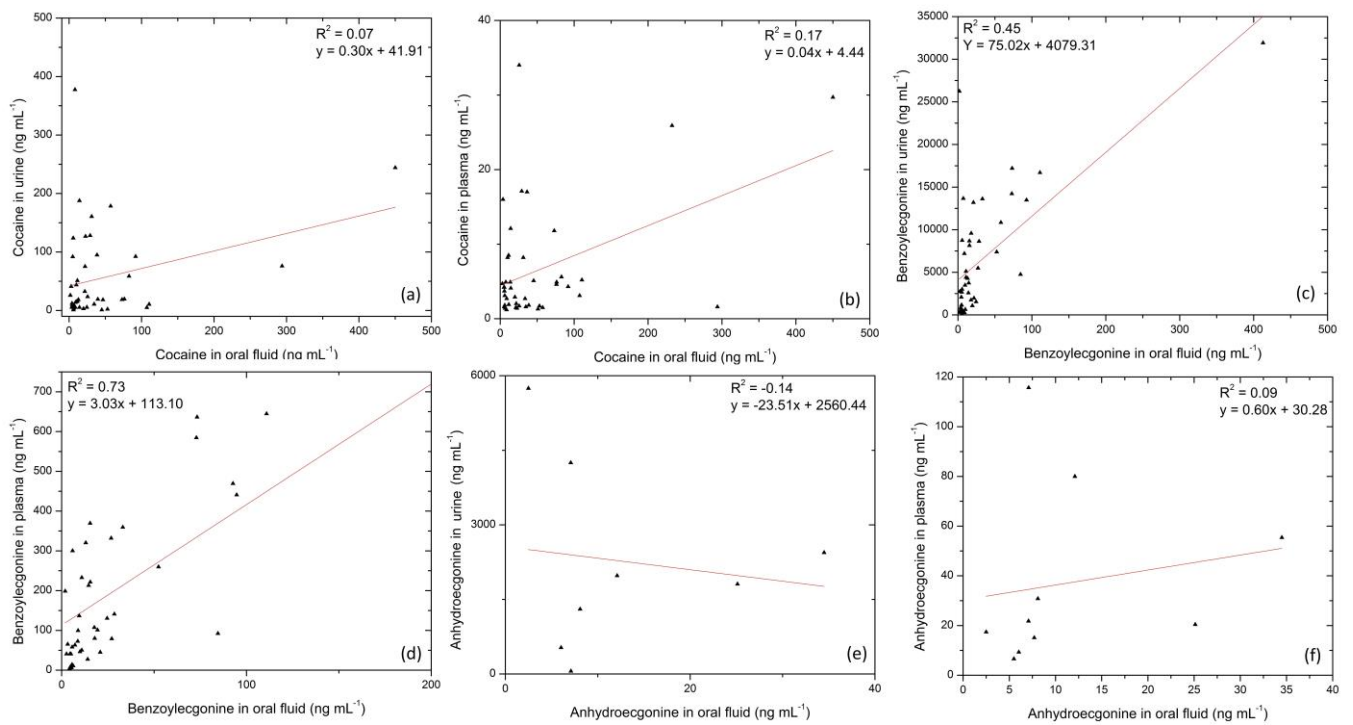
	OF		Plasma		Urine		OF/P				OF/U			
	<i>Average</i>	<i>SD<sup>1</sup></i>	<i>Average</i>	<i>SD<sup>1</sup></i>	<i>Average</i>	<i>SD<sup>1</sup></i>	<i>Coefficient of Determination (R<sup>2</sup>)</i>	<i>Slope of the Regression Line</i>	<i>Significance of Correlation p-value<sup>2</sup></i>	<i>N Positive Cases<sup>3</sup></i>	<i>Coefficient of Determination (R<sup>2</sup>)</i>	<i>Slope of the Regression Line</i>	<i>Significance of Correlation p-value<sup>2</sup></i>	<i>N Positive Cases<sup>3</sup></i>
<b>COC</b>	46.88	78.97	10.68	20.80	713.65	3009.81	0.17	0.04	<0.05	44	0.07	0.30	<0.05	41
<b>BZE</b>	43.60	102.04	248.55	362.85	6260.95	7011.09	0.73	3.03	<0.05	46	0.45	75.02	<0.05	45
<b>AEC</b>	12.12	10.28	37.25	35.71	2263.93	1896.78	0.09	0.60	>0.05	8	-0.14	-23.51	>0.05	8

<sup>1</sup> Standard Deviation

<sup>2</sup> Correlation statistically significant if p-value <0.05 (95% confidence level)

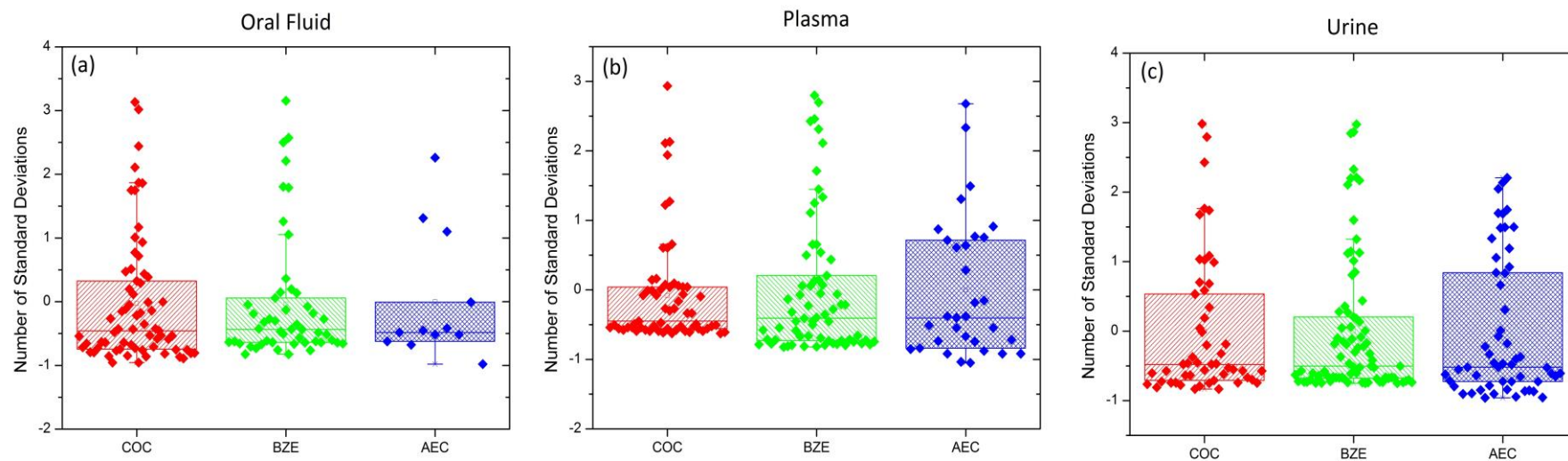
<sup>3</sup> Number of positive cases in both matrices. Outliers removed

## FIGURES

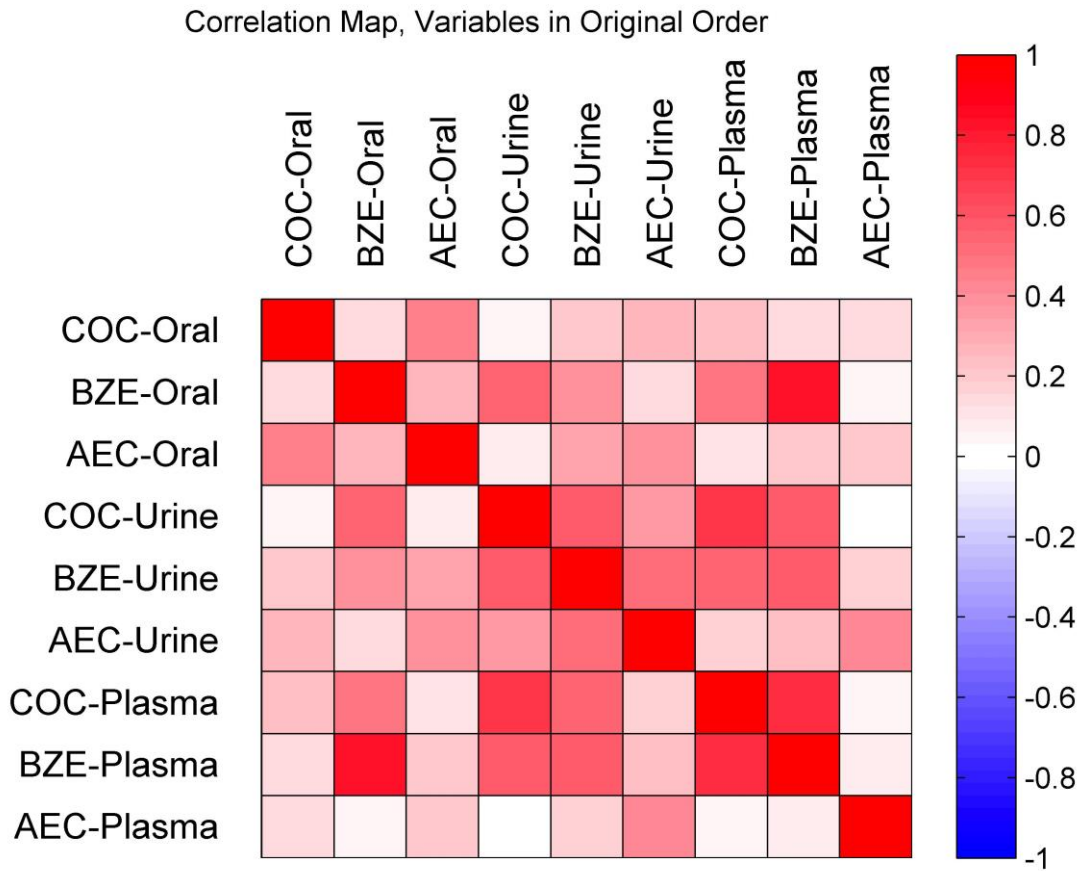


**Figure 1.** Scatter plots of oral fluid and urine concentrations (ng mL<sup>-1</sup>) and oral fluid and plasma concentrations (ng mL<sup>-1</sup>) of COC (A and B), BZE (C and D) and AEC (E and F), respectively. The coefficient of determination ( $R^2$ ) between concentrations is reported for each drug.





**Figure 2.** Box and whisker plots of autoscaled concentration of COC, BZE and AEC in oral fluid (A), plasma (B), and urine (C).



**Figure 3.** A visual presentation using a Heatmap where the matrices are correlated between columns and rows. The level of correlation is scaled from -1 to 1 according to the color key on the right. The red color suggests strong positive correlations while the blue color suggests strong negative correlations.

**6. CAPÍTULO 3 – ANÁLISE DE ADULTERANTES EM AMOSTRAS  
APREENDIDAS DE COCAÍNA UTILIZANDO CG-EM, CG-EM-IT E CL-EM/EM**



## 6.1 Manuscrito III

A seguir encontra-se disposto o artigo intitulado “**Determination of cutting agents in seized cocaine samples using GC-MS, GC-TMS and LC-MS/MS**” a ser submetido para publicação no periódico *Forensic Science International*. Este artigo apresenta o desenvolvimento de dois métodos qualitativos utilizando CG-EM e CG-EM-IT e o desenvolvimento e validação de um método quantitativo utilizando CL-EM/EM para a análise de LEV, BZC, FEN, HDZ, TFL, DTZ, ACT e CAF em amostras de COC apreendidas nos Estados Unidos da América.



**DETERMINATION OF CUTTING AGENTS IN SEIZED COCAINE SAMPLES USING  
GC-MS, GC-TMS AND LC-MS/MS**

Taís Regina Fiorentin<sup>1</sup>, Melissa Friscia<sup>2</sup>, Shana Marie Hogg<sup>2</sup>, David Busbzy<sup>2</sup>,  
Renata Pereira Limberger<sup>1</sup>, Barry Kerr Logan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup>The Center for Forensic Science Research and Education (CFSRE), 2300 Stratford Ave, Willow Grove, PA 19090, USA.

Correspondence to: Taís Regina Fiorentin, Avenida Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone +55 51 33085762. Email address: taisfiorentin@gmail.com





## ABSTRACT

Cocaine (COC) is usually sold as a white powder and can contain several adulterants and diluents, known as cutting agents. Cutting agents plays an important role in the identification of trafficking routes, and they can also modify or intensify signs and symptoms of the drug intoxication, increasing the risk to the users. The purpose of this work was to quantify cocaine and cutting agents in 116 illicit samples from NMS Labs between November 2016 and February 2017. Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and a portable gas chromatography toroidal ion trap mass spectrometry (GC-TMS) were used as screening methods. A LC-MS/MS method was developed and validated for the quantification of COC, levamisole (LEV), benzocaine (BZC), phenacetin (PHN), hydroxyzine (HYDZ), theophylline (TPH), diltiazem (DTZ), acetaminophen (ACT) and caffeine (CAF). Cocaine-d<sub>3</sub> (COC-d<sub>3</sub>) and caffeine-d<sub>3</sub> (CAF-d<sub>3</sub>) were used as internal standards. The method showed to be precise, accurate and linear over a range of 50 – 2000 ng/mL for all analytes. The purity of COC ranged from 22.7 to 100%. COC was the only detected compound in 16.3% (*n*=19) of the samples. Among the identified cutting agents, LEV was the most prevalent substance (79.31% of the total samples, concentration ranged from 0.29 to 74.35%), followed by PHN (18.96%, 0.38 - 30.25%), CAF (12.06%, 0.25 - 32.23%), HYDZ (8.62%, 0.70 - 13.86%) and BZC (5.17%, 0.40 - 58.37%). GC-TMS was considered suitable to be used as a tool in forensic analysis as a screening method just for COC, while GC-MS presented satisfactory results for screening analysis for COC, LEV, BZC, PHN, HYDZ and CAF.

**Keywords:** cocaine, cutting agents, GC-MS, GC-TMS, LC-MS/MS



## 1. Introduction

COC remains as a serious public health problem in many countries. According to World Drug Report (2015) United Nations Office on Drugs and Crime, COC is the second most problematic drug worldwide in terms of adverse consequences to users, with the most problematic being violence related to drug trafficking. According to the National Forensic Laboratory Information System (2016), 216,129 cases of COC were reported and identified in 2015 in U.S., representing about 19% of all drug cases in the country. The statistics on COC use in the hemisphere ranking U.S as one of three countries with the highest rates of use (1.6 % in general population) (CICAD, 2015).

“Street” COC is commonly sold with several other substances, either contaminants derived from refining or substances intentionally added to mimic the effects, to increase profits or even facilitate the drug delivery (COLE et al., 2010; SCHNEIDER and MEYS, 2011; BROSEÚS et al., 2016). Determination of COC content and adulterants in street samples has been useful in forensic purposes to trace the geographical origin of the drug (TERRETTAZ-ZUFFEREY et al., 2007; ZACCA et al., 2014;) and has a clinical value since the interactions between the compounds can seriously increase the damage to the user’s health(COLE et al., 2010).

The adulterants present in COC have changed over time, in the 1980’s the common adulterants included lidocaine and sugars, also in 1990’s these two continue to be the most common, and CAF began to be present. In the 2000’s besides lidocaine and CAF, PHN started to appear frequently. DTZ, HYDZ and LEV were reported in the United States and some European countries. These substances are considered the main adulterants of cocaine nowadays (FLORIANI et al., 2014; LAPACHINSKE et al., 2015; BROSEÚS et al., 2016). In addition to this compounds, BZC, ACT, procaine, aminopyrine, prilocaine, bicarbonate and starch were reported in Brazil (BERNARDO et al., 2003; MAGALHÃES et al., 2013; BOTELHO et al., 2014; FLORIANI et al., 2014; FUKUSHIMA et al., 2014; ZACCA et al., 2014; GROBÉRIO et al., 2015; LAPACHINSKE et al., 2015; MALDANER et al., 2015; MARCELO et al., 2015; PENIDO et al., 2015; SOUZA et al., 2016).

Adverse effects depend on the substance, proportion and number of cutting agents used. They can cause light adverse effects such as nausea, vomiting, diarrhea, dizziness, headache, gastro-intestinal effects and insomnia (COLE et al., 2010; BRUNT, 2012). Strongest adverse effects as cardiovascular problems, like myocardial depression, hypotension, bradycardia, arrhythmias and angina are related to lidocaine, procaine, BZC and DTZ (BRUNT, 2012). LEV is associated to potential complications including neutropenia, agranulocytosis (KNOWLES et al., 2009; CZUCHLEWSKI et al., 2010; GAERTNER and SWITLYK, 2014), methaemoglobinaemia (HUNTER et al., 2011), purpura retiform and skin necrosis (COLE et al., 2010; GARG et al., 2011; GROSS et al., 2011; MUIRHEAD and EIDE, 2011; PEARSON et al., 2012; AUFFENBERG et al., 2013; BELFONTE et al., 2013; GARG et al., 2015; VERONESE et al., 2016) while PHN is associated to haemolytic anaemia, methemoglobinemia and nephrotoxicity leading to incontinence, back and flank pain, nephropathy and kidney cancer (BRUNT, 2012; COLE et al., 2010).

The cutting agents are constantly changing making difficult to measure the risks associated with the interactions between the compounds. In this sense, becomes important the development of new methods to monitor the changes in frequency and proportions. In this work, GC-MS and GC-TMS were used in combination with a developed and validated LC-MS/MS method to quantify COC, LEV, BZC, PHN, HYDZ, TPH, DTZ, ACT and CAF in seized samples.

## **2. Material and Methods**

### *2.1 Chemicals and Reagents*

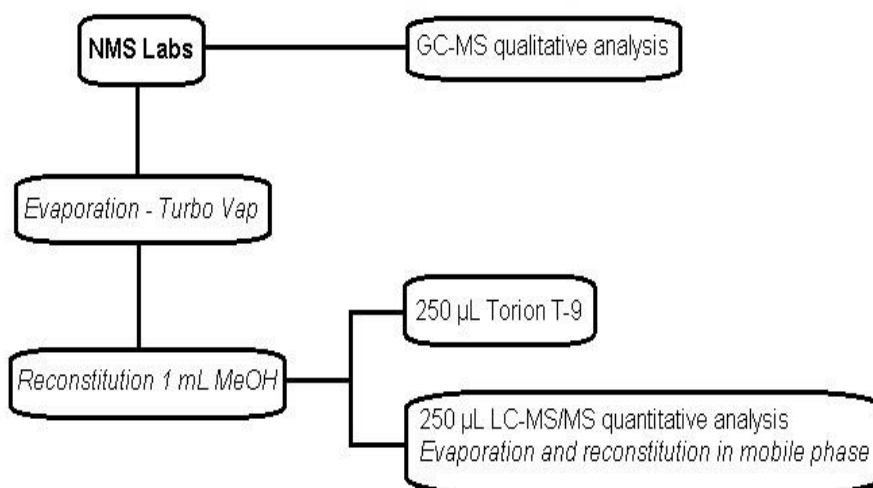
Cocaine hydrochloride, levamisole hydrochloride, hydroxyzine dihydrochloride, diltiazem hydrochloride, benzocaine, theophylline, phenacetin, acetaminophen, caffeine, cocaine-d3 and formic acid were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Caffeine-d3 was obtained from CDN Isotopes Inc. (Quebec, Canada). Dichlorometane was purchased from Honeywell International (Morris Plains, NJ).

Isopropyl alcohol, hydrochloric acid and ammonium hydroxide were obtained from VWR International Ltd. (Radnor, PA). Liquid Chromatography Mass Spectrometry grade water and methanol for liquid chromatography mobile phases were obtained from Honeywell (Muskegon, MI).

## 2.2 Real cases

To prove the applicability of the methods, 116 cases were obtained from NMS Labs between November, 2016 and February, 2017. Vials were received after acid-base extraction with 90:10 dichloromethane (DCM): isopropyl alcohol (IPA). Aliquots were separated and prepared in an appropriate solvent according to the instrument of application (Figure 1).

**Figure 1.** Fluxogram of real cases.



## 2.3 Analysis by GC-TMS

Screening analysis were performed using a Torion Tridion-9 GC-toroidal ion trap MS (Torion Technologies Inc. UT – Perkin Elmer Co). The original sample were

dried out using Turbo Vap evaporator and reconstituted in aliquots of 250  $\mu$ L of methanol. All samples were diluted (1:2 dilution) and directly injected in duplicate. In cases of no visible elution and/or identification of peaks by the instrument, the undiluted aliquot was injected. Coil was keep immersed in the sample for 10 seconds and the injection was done using splitless mode after 30 seconds keeping the coil at ambient temperature to dry out the sample. Restek RTX-5 (5 m X 0.10 mm X 0.40  $\mu$ m) column maintained at 50  $^{\circ}$ C was used for chromatographic separation. Helium was used as the carrier gas. The oven program temperature was: 50  $^{\circ}$ C initial hold for 10 sec, programmed at 2 $^{\circ}$ C/sec to 300  $^{\circ}$ C, end hold time of 175 sec, total run time of 310 seconds (5.16 minutes). Injector and transfer-line temperatures of 250 and 300  $^{\circ}$ C, respectively. The trap was operated in a scan mode in the ranges of 41- 500 m/z.

#### *2.4 Analysis by GC-MS*

GC-MS screening was conducted on all samples as a preliminary qualitative result. For the analysis, samples were extracted with 90:10 dichloromethane (DCM): isopropyl alcohol (IPA), using hydrochloric acid and concentrated ammonium hydroxide to adjust the pH, and N-Propylamphetamine and 10,11-Dihydrodibenz[*b,f*][1,4]oxazepin-11-one as internal standards. Gas chromatograph model 6890N, coupled with a mass selective detector model 5975B (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) was operated in the electron impact mode and full scan acquisition in the range of 40 – 550 m/z. Chromatographic separation using a DB-1 column (12.0 m x 22.0  $\mu$ m x 0.33  $\mu$ m). The chromatographic conditions were as follows: injection volume of 1  $\mu$ L, splitless mode, injection and detection temperature of 265 and 300  $^{\circ}$ C, respectively. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1.2 mL/min (constant flow). The oven program temperature was: 50  $^{\circ}$ C to 340  $^{\circ}$ C, heating rate of 30  $^{\circ}$ C/min, and hold at 340  $^{\circ}$ C for 2.33 minutes, resulting in a 12 minutes chromatographic run.

## 2.5 Analysis by LC-MS/MS

### 2.5.1 Standards, calibrators, controls and sample preparation

Stock solutions of COC, LEV, BZC, TPH, PHN, HYDZ, DTZ, ACT and CAF were prepared at a concentration of 1 mg/mL in methanol or water and stored at -20 °C. Internal standards stock solutions were purchased at concentrations of 1mg/mL. Stock solutions were diluted to a work solution concentration of 10000 ng/mL in 0.1% formic acid in water (MPA) and 0.1% formic acid in methanol (MPB) (80:20 MPA:MPB). Calibrators and controls were prepared by spiking working solutions, evaporation using Turbo Vap at 45 °C for 30 min and reconstitution in 100 µL in 80:20 MPA:MPB. Calibrators were prepared at concentrations of 50, 100, 200, 500, 1000 and 2000 ng/mL and controls at concentrations of 50 (LLOQ – low limit of quantification), 150 (LQC – low quality control), 1600 (HQC – high quality control) and 100 ng/mL (DQC – dilution quality control). For the real cases, 250 µL of each sample was dried out using Turbo Vap evaporator, reconstituted in 250 µL of mobile phase (80:20 MPA:MPB), internal standards (cocaine D3 and caffeine D3) were added in appropriate concentration and the samples were directly injected into the LC-MS/MS.

### 2.5.2 Instrumentation

A Waters Acquity UPLC® Micromass® Quattro micro™ API Tandem Quadrupole System (Waters Corp., ® Milford, MA, USA) was used to perform the analysis. The mass spectrometer functioned under ESI positive ionization mode with capillary voltage of 3.00 kV and MS operated in multiple reaction monitoring (MRM) mode (**Table 1**). Identification of precursor and product ion was established by direct infusion of 10 ng/µL solutions of single analytes in methanol or water. The source temperature was 100 °C with a desolvation temperature of 300 °C. Chromatographic separation was achieved on an Acquity UPLC® BEH C18 column (1.7 µm), temperature maintained at 50 °C with 0.1% formic acid in water (MPA) and 0.1% formic acid in methanol (MPB) at a flow rate of 0.2 mL/min. The gradient mobile

phase system started at 80 : 20 (MPA : MPB), adjusting to 10 : 90 (MPA : MPB) over 4 minutes and adjusting to 90 : 10 (MPA : MPB) in 4.1 minutes, keeping this condition until 5 minutes (total run time). The nine compounds presented in the method were divided in four panels, retention times are found in **Table 1**. Volume of injection of 10  $\mu$ L. Data analysis were performed using MassLynx v4.1.

**Table 1.** MS/MS parameters.

Panel	Analyte	Retention time (min)	Fragmentor (V)	Collision (eV)	Transitions
1	LEV	1.16	30	25	205.2>122.8 205.2>178.1
	BZC	2.68	20	15	166.2>119.9 166.2>138.0
2	PHN	2.62	25	20	180.1>109.7 180.1>137.9
	HYDZ	3.19	25	15	375.5>173.2 375.5>201.3
	COC	1.93	30	25	304.5>150.1 304.5>182.3
3	TPH	1.35	35	25	181.1>95.7 181.1>124.0
	DTZ	2.75	30	30	415.4>149.9 415.4>178.1
4	ACT	1.14	25	20	151.9>91.9 151.9>109.7
	CAF	1.62	30	20	195.2>109.9 195.2>137.9
All	COC-d3	1.93	30	25	307.5>153.2 307.5>185.3
	CAF-d3	1.60	30	20	198.3>110.0 198.3>137.9

### 2.5.3 Method validation

A fit-for-purpose method validation was performed based on the standard practices for method validation in drugs (SWGDRUG, 2013; UNODC, 2009). The method was validated for linearity, accuracy, precision, interferences, limit of detection (LOD), LLOQ, carryover and stability. Also, mock samples were evaluated as a part of the validation procedure.



Linearity was assessed by analyzing three separate calibration curves at six concentration levels. All calibrators were prepared freshly over three different days. Calibration curves were generated using weighted least squares linear regression (quadratic model  $1/x$ ) at MassLynx v4.1 software. Blank matrix with internal standard was run with each batch but not included in the calibration curve and the correlation of coefficient ( $R^2$ ) was calculated. The  $R^2$  values should be 0.99.

Accuracy (bias) was assessed by comparing the average calculated concentration to the target concentration analyzing three replicates of spiked controls at three different concentrations (LLOQ, LQC and HQC) over three days. Within-run precision was calculated from three replicates per quality control (LLOQ, LQC and HQC) over three days. Between-run precision was determined by calculating the %CV of the injections from the within-run precision. Acceptable precision and accuracy were  $\pm 20\%$  for LLOQ, LQC and HQC.

Interference assay was assessed by analyzing neat reference solutions of the potential interferences at high concentrations. Difference in retention time was used as the first criteria and the mass spectrum as the second criteria to estimate selectivity. Amphetamine, delta-9-THC, GHB, heroin, MDA, MDMA, methadone, methamphetamine, morphine, 25-I NBOMe, aminopyrine, procaine, metamizole, diclofenac, atropine, acetyl salicylic acid, piracetam, ibuprophen and creatinine were the substances tested at 1mg/mL.

Sensitivity was assessed by determining the LOD and LLOQ for each analyte. LOD was determined by analyzing decreasing concentrations in duplicate, considering the lowest concentration that gives a reproducible instrument response with signal-to-noise (S/N) ratio of 3:1. LLOQ was considered the lowest concentration that could be measured acceptable accuracy and precision ( $\pm 20\%$  CV) by analyzing duplicates.

Carryover was determined by injecting increasing concentrations after the highest concentration in the calibration curve followed by blank controls. The highest concentration at which no analyte carryover was observed in the blank control was determined to be the concentration at which the method was free from carryover.

Dilution integrity was made to ensure that a dilution of a sample with a concentration higher than the highest calibrator will be measured with accuracy.

Samples were diluted from 10000 ng/mL to 100 ng/mL and analyzed in triplicate over three days. Acceptable precision and accuracy for DQC was  $\pm 20\%$ .

Stability was assessed at LQC and HQC in triplicate. Processed sample stability was done analyzing the first set immediately after preparation to establish the time zero responses, the following sets were analyzed after 24 and 48 hours stored refrigerated on autosampler at 10 °C. The analytes were considered stable when the average signal (analyte area/internal standard area) compared to the time zero average signal did not exceed  $\pm 20\%$ .

Twenty five mock samples were prepared by an independent researcher at different concentrations and proportions of analyte of interest and were analyzed by the proposed method to simulate real street samples and evaluate the possible ion suppression caused by different compounds.

#### *2.5.4 Reliability analysis*

GC-MS and GC-TMS were evaluated comparing the qualitative results with the LC-MS/MS quantitative results. True positive (TP) samples were screened and confirmed positive; true negative (TN) samples were negative in both assays. False positive (FP) samples screened positive, but the target drug was not present at the confirmatory results; FN samples screened negative but confirmed positive for the target drug. Performance parameters were calculated as: sensitivity=  $100 \times (TP/TP + FN)$ ; specificity=  $100 \times (TN/TN + FP)$ ; accuracy=  $100 \times (TP + TN/Total\ results)$ ; PPV=  $TP/(TP + FP)$  and NPV=  $TN/(FN + TN)$ .

### **3. Results and Discussion**

#### *3.1 Validation results*

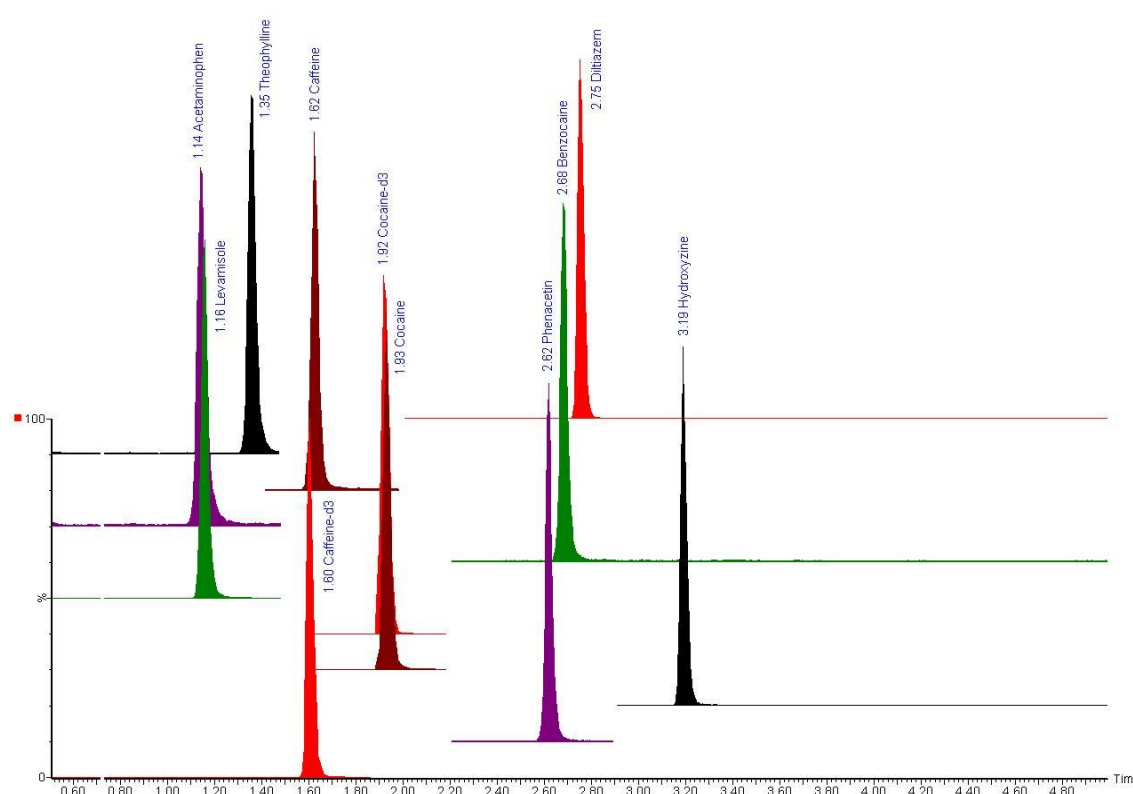
Calibration curves (50 – 2000 ng/mL) covered the expected range with correlation coefficients ( $R^2$ ) above 0.995. The within-day and between-day precision (%CV), as well as the accuracy (bias) were satisfactory for all quality controls tested

(**Table 2**). The within-day ranged from 0.5 to 19.9%, between-day ranged from 4.1 to 19.9% and accuracy had responses ranged from 0.8 to 19.8%, classifying the method as reproducible and accurate. LOD ranged from 0.1 to 0.3 and LLOQ was 50 ng/mL for all compounds (**Table 2**). A representative chromatogram obtained by LC-MS/MS is shown in **Figure 1**.

**Table 2.** Precision (within and between-run), accuracy, limits of detection (LOD) and lower limit of quantification (LLOQ) for COC, LEV, BZC, TPH, PHN, HYDZ, DTZ, ACT and CAF.

Compound	Quality control	Precision (%CV)		Accuracy (%)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
		<i>Within-run</i>	<i>Between-run</i>			
COC	LLOQ	5.6	5.0	5.4	0.1	50
	LQC	17.5	17.6	16.7		
	HQC	8.7	13.4	14.4		
LEV	LLOQ	14.7	6.2	12.0	0.1	50
	LQC	5.9	9.3	11.7		
	HQC	10.0	16.2	10.3		
BZC	LLOQ	13.3	18.1	18.9	0.1	50
	LQC	10.9	13.3	12.5		
	HQC	11.6	5.8	18.4		
TPH	LLOQ	13.6	13.5	15.8	0.3	50
	LQC	19.9	17.8	14.4		
	HQC	5.8	6.1	4.7		
PHN	LLOQ	13.7	18.5	18.7	0.3	50
	LQC	8.2	10.1	6.2		
	HQC	12.1	11.1	8.8		
HYDZ	LLOQ	3.3	8.1	13.0	0.1	50
	LQC	15.3	15.6	11.1		
	HQC	13.3	18.7	19.8		
DTZ	LLOQ	0.5	4.1	11.7	0.1	50
	LQC	18.1	19.9	19.1		
	HQC	0.8	4.2	0.8		
ACT	LLOQ	10.2	19.3	15.6	0.2	50
	LQC	16.7	15.0	10.7		
	HQC	11.2	10.0	9.6		
CAF	LLOQ	12.0	19.8	16.0	0.2	50
	LQC	12.6	12.2	9.7		
	HQC	3.7	5.0	2.7		

**Figure 1.** Representative chromatogram obtained by LC-MS/MS of the analytes ACT (1.14 min), LEV (1.16 min), TPH (1.35 min), CAF-d3 (1.60 min), CAF (1.60 min), COC-d3 (1.92 min), COC (1.92 min), PHN (2.62 min), BZC (2.68 min), DTZ (2.75 min), HYDZ (3.19 min) at 50 ng/mL.



Under the chromatographic conditions used, the possible interferents analyzed exhibited no interference for the analytes in this method at or above the reported LLOQ. No interferences were found considering retention time and mass spectrum as criteria.

Carryover started to be detected in 4000 ng/mL for some compounds. Although this is twice more the concentration of the highest analytical level of the calibration curve (2000 ng/mL), needle was washed between injections with methanol: water (20:80) to guarantee the absence of traces of analytes from the previous injections.

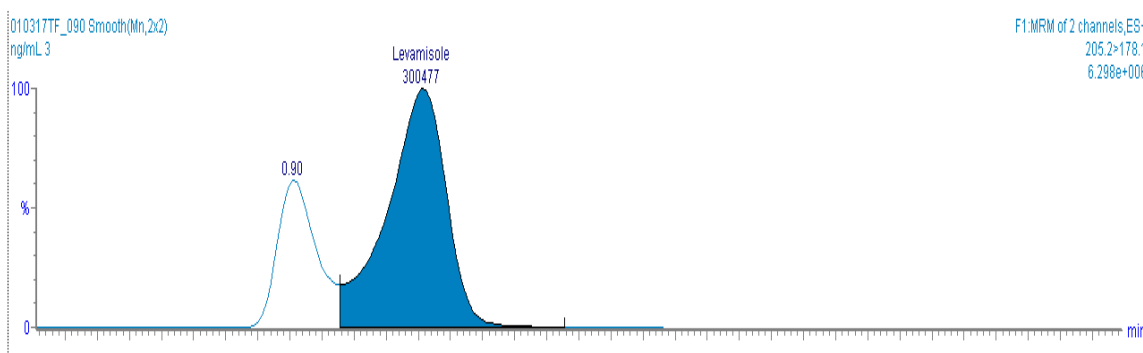
The analytes were considered stable for processed sample stability over 48h, QC samples (LQC and HQC) were quantified in triplicate within  $\pm 20\%$  (acceptable bias).

Blinded mock samples were quantified by the method proposed and the proportions of cutting agents matched with the proportions stipulated by an independent researcher. No ion suppression was noted to be caused by different compounds.

### 3.2 Real cases analysis

Real cases were quantified by the method proposed within the 50 – 2000 ng/mL calibration range, samples above the highest value were diluted using the same procedure used for DQC. Double peaks were observed in the majority of the samples containing LEV. Some conditions as incompatibility of solvent and column, sample decomposition, coelution of analytes and detector overload can cause double peaks in chromatography, but since any extra peak was observed during the validation assay running LEV hydrochloride analytical standard, a possible explanation could be the presence of the racemic mixture of LEV (tetramisole) in the samples. Therefore, in some samples LEV could not be properly quantified due to the bad resolution between the peaks (**Figure 2**), for those cases, the results were considered semi-quantitative.

**Figure 2.** Chromatogram of a real case positive for LEV (926.4 ng/mL, semi-quantitative result).



LEV was the most prevalent adulterant in the samples analyzed. It was found in 79.3% of the samples at concentrations ranging from 60.9 to 33,941.6 ng/mL. PHN,

CAF, HYDZ and BZC were found in 18.9 %, 12.0 %, 8.6 % and 5.1 % of the samples, respectively. TPH, DTZ and ACT were not found in the cases analyzed. Mean concentration, standard deviation, concentration range and percentage of occurrence are presented on **Table 3**. BZC and PHN, in addition to LEV, were found in high concentration representing more than 50% of the total concentration in some cases. The purity of COC in this data ranged from 22.7 to 100 %.

**Table 3.** Number of samples, percentage of occurrence, range of concentration, mean concentration and standard deviation of LEV, BZC, PHN, HYDZ and CAF.

Adulterants	<i>n</i>	% of occurrence	Concentration range (ng/mL)	Mean concentration (ng/mL)	$\Sigma$
LEV	92	79.3	60.9 – 33,941.6*	2,696.6*	6,308.5
BZC	6	5.1	56.6 – 32,000.0	5,103.2	11,068.9
PHN	22	18.9	94.6 – 3,798.2	1,223.8	788.9
HYDZ	10	8.6	83.9 – 2,088.2	554.6	632.6
CAF	14	12.0	50.8 – 313.6	128.3	73.3
TPH	0	-	-	-	-
DTZ	0	-	-	-	-
ACT	0	-	-	-	-

*n*= number of samples,  $\sigma$ = standard deviation

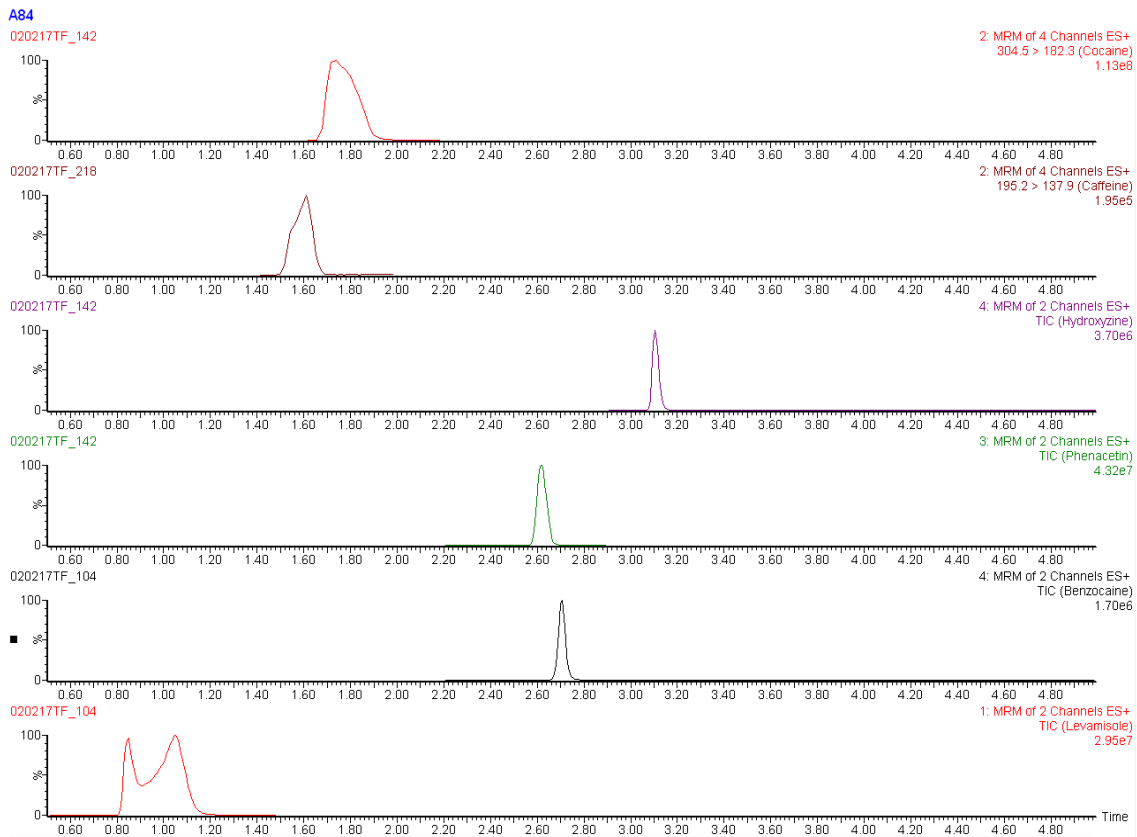
\*semi-quantitative results

**Table 4** shows the number of adulterants found in the same sample. The largest number of adulterants found was 1 (36.1 % of the cases). Five adulterants were found in a single one case represented in the **Figure 3**. In 19 samples (16.3 % of the cases), COC was the only compound detected in all of three instruments. The absence or the low number of adulterants found in some samples can not be correlated with high purity since the samples were processed using acid-base extraction, which could have removed compounds originally added to these samples. Other possibility would be the occurrence of seizure in the beginning of the distribution chain, unfortunately, the authors have no information regarding the origin of these drugs.

**Table 4.** Number of adulterants found in the same sample.

Number of adulterants	<i>n</i> of samples and %
0	19 (16.3 %)
1	60 (36.1 %)
2	30 (25.8 %)
3	5 (4.3 %)
4	1 (0.8 %)
5	1 (0.8%)

**Figure 3.** Sample #84 containing COC (9,883.0 ng/mL), LEV (24,573.6 ng/mL), BZC (1,742.4 ng/mL), PHN (1,714.6 ng/mL), HYDZ (271.0 ng/mL) and CAF (121.0 ng/mL).



The accuracy of a test refers to the amount of agreement between the screening test results and confirmatory test results. Sensitivity and specificity are measures to assess the accuracy of a test, as well as predictive positive value (PPV) and negative positive value (NPV). All this four different measures are indicative of

the accuracy of the test. The PPV indicates the probability of real positivity after a positive screening result, whereas the NPV is the probability of real negative results after a negative screening result (VAN STRALEN et al., 2009). Usually, sensitivity or specificity alone are not enough to make a test a good test, these two measures need to be balanced. Accuracy values close to 100% are ideal, but in some situations a higher sensitivity or specificity are preferable.

Sensitivity, specificity, PPV, NPV and accuracy, as well as the number of true positive (TP), true negative (TN), false positive (FP) and false negative (FN) samples of GC-TMS and GC-MS when compared with a LC-MS/MS are shown in **Table 5** for all compounds. Considering GC-TMS, the accuracy varied for different compounds. LEV showed accuracy of 20.6%, this result is directly associated to the high number of FN. Samples were injected at the real concentration and there is no information about the limits of detection for these compounds using Torion-T9 since there is no applicability of this instrument for drugs of abuse reported in the literature so far, the authors believe that one of the reasons for the high number of FN can be a non-sufficient concentration of this compound to be detected, or either a non-appropriate column. BZC, PHN, and CAF showed accuracy between 80 and 90% due to the presence of FP and/or FN in some cases. On the other hand, results for COC and HYDZ were satisfactory (>90%) even though specificity could not be calculated for COC as there was no TN or FP cases in this data. The same occurred for HYDZ where sensitivity could not be calculated regarding the absence of TP or FP samples. For GC-MS, the results of accuracy were higher than 90% for all compounds as expected, since this is a well established methodology which has been used for years to analyze different compounds, including cutting agents (SOUZA et al., 2016; SCHENIEDER and MEYS, 2011; MAGALHÃES et al., 2013; EVRARD et al., 2010).

**Table 5.** Results of the GC-TMS and GC-MS evaluation in comparison with LC-MS/MS for COC, LEV, BZC, PHN, HYDZ and CAF.

	GC-TMS X LC-MS/MS					
	COC	LEV	BZC	PHN	HYDZ	CAF
TP	114	0	1	11	0	1
TN	0	24	103	92	106	95
FP	0	0	7	2	0	7



FN	2	92	5	11	10	13
Sensitivity	98.2	-	16.6	50	-	7.1
Specificity	-	100	93.6	97.8	100	93.1
PPV	100	-	12.5	84.6	-	12.5
NPV	-	20.6	95.3	89.3	91.3	87.9
Accuracy	98.2	20.6	89.6	88.7	91.3	82.7
<b>GC-MS X LC-MS/MS</b>						
TP	116	84	2	22	8	13
TN	-	22	110	91	106	102
FP	-	1	0	3	0	0
FN	-	9	4	0	2	1
Sensitivity	100	90.3	33.3	100	80	92.8
Specificity	-	95.6	100	96.8	100	100
PPV	100	98.8	100	88	100	100
NPV	-	70.9	96.4	100	98.1	99
Accuracy	100	91.3	96.5	97.4	98.2	99.1

TP= true positive, TN= true negative, FP= false positive, FN=false negative, PPV= positive predictive value, NPV= negative predictive value

In general, the large variety of purity of COC found in this data (22.7 to 100%) is compatible with studies in other countries. In France, results presented by Dujourdy & Besacier (2008) ranged from 20 – 30% and Evrard et al., two years later found a median cocaine content of 22%. Another European countries like Italy (FUCCI et al., 2007) and Belgium (SCHNEIDER and MEYS, 2011) presented COC concentrations ranged from 80 – 90% and 0.2 – 99%, respectively. In Brazil, COC concentrations varied from 66 -74% (ZACCA et al., 2014), 6.4 – 97.8% (MAGALHÃES et al., 2013), 32 – 85.5% (SILVA et al., 2008), 16.5 – 91.4% (LAPACHINSKE et al., 2015) and 60 – 90% (GROBÉRIO et al., 2015).

#### 4.Conclusions

The LC-MS/MS method developed and validated was considered appropriate for quantification of COC, LEV, BZC, PHN, HYDZ, TPH, DTZ, ACT and CAF. The method was successfully applied for determining COC purity and concentrations of different adulterants in 116 samples seized in U.S. Purity ranged from 22.7 to 100% and LEV was the main adulterant in COC samples observed in the U.S, followed by

PHN, CAF, HYDZ and BZC. GC-MS was considered suitable for screening analysis for COC, LEV, BZE, PHN and HYDZ while GC-TMS was considered suitable just for COC screening analysis, with restrictions to be applied for other compounds, especially LEV due to the high number of FN and/or FP cases.

### **Acknowledgements**

The authors gratefully acknowledge the Center for Forensic Science Research and Education, Willow Grove, PA, USA for supporting our researching providing the materials and instrument time for the development and validation of the method, the assistance of the staff and NMS Labs, Willow Grove, PA, USA for providing the case samples used for the verification of this method.

### **Conflict of Interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

### **Funding**

This work was supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel [99999.008386/2015-03] and The Center for Forensic Science Research & Education.

### **References**

AUFFENBERG, C. et al. Levamisole: a common cocaine adulterant with life-threatening side effects. *Psychosomatics*, v. 54, p. 590 – 593, 2013.

BELFONTE, C. D. et al. Levamisole-induced occlusive necrotising vasculitis in cocaine abusers: an unusual cause of skin necrosis and neutropenia. *International Wound Journal*, v. 10, p. 590 – 596, 2013.

BERNARDO, N. P. et al. Caffeine and other adulterants in seizures of street cocaine in Brazil. *International Journal of Drug Policy*, v. 14, p. 331 – 334, 2003.

BOTELHO, E. D. et al. Chemical Profiling of cocaine seized by Brazilian Federal Police in 2009-2012: major components. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 25, p. 611 – 618, 2014.

BROSÉUS, J. et al. The cutting of cocaine and heroin: a critical review. *Forensic Science International*, v. 262, p. 73 – 83, 2016.

BRUNT, Tibor M. *Monitoring illicit psychostimulants and related health issues. 2012.* Tese – ACM-UvA.

COLE, C. CUT: a guide to adulterants, bulking agents and other contaminants found in illicit drugs. Liverpool: Centre for Public Health, 2010.

CZUCHLEWSKI, D. R. et al. Clinicopathologic features of agranulocytosis in the setting of levamisole-tainted cocaine. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 133, p. 466 – 472, 2010.

EVARD, I. et al. Composition, purity and perceived quality of street cocaine in France. *International Journal of Drug Policy*, v. 21, p. 399 – 406, 2010.

FLORIANI, G. et al. Development and validation of a HPLC-DAD method for simultaneous determination of cocaine, benzoic acid, benzoylecgonine and the main adulterants found in products based on cocaine. *Forensic Science International*, v. 235, p. 32 – 39, 2014.

FUCCI, N. Unusual adulterants in cocaine seizure on Italian clandestine market. *Forensic Science International*, v. 172, p. 2 -3, 2007.

FUKUSHIMA, A. R. et al. Purity and adulterant analysis of crack seizures in Brazil. *Forensic Science International*, v. 243, p. 95 – 98, 2014.

GARG, L. et al. Levamisole/cocaine induced systematic vasculitis and immune complex glomerulonephritis. *Case Reports in Nephrology*, p. 1 – 5, 2015.

GAERTNER, E. M.; SWITLYK, S. A. Dermatologic complications from levamisole-contaminated cocaine: a case report and review of the literature. *Cutis*, p. 102 – 106, 2014.

GRAF, J. et al. Purpura, cutaneous necrosis, and antineutrophil cytoplasmic antibodies associated with levamisole-adulterated cocaine. *Arthritis & Rheumatism*, v. 63, p. 3998 – 4001, 2011.

GROBÉRIO, T. S. et al. Discrimination and quantification of cocaine and adulterants in seized drug samples by infrared spectroscopy and PLSR. *Forensic Science International*, v. 257, p. 297 – 306, 2015.

GROSS, R. L. et al. A novel cutaneous vasculitis syndrome induced by levamisole-contaminated cocaine. *Clinical Rheumatology*, v. 30, p. 1385 – 1392, 2011.

INTER-AMERICAN OBSERVATORY ON DRUGS AND INTER-AMERICAN DRUG ABUSE CONTROL COMMISSION - CICAD. *Report on Drug Use in the Americas, 2015*. Washington, 2015.

DUJORDY, L.; BESACIER, F. Headspace profiling of cocaine samples for the intelligence purposes. *Forensic Science International*, v. 179, p. 111 – 122, 2008.

HUNTER, L. et al. Methaemoglobinaemia associated with the use of cocaine and volatile nitrites as recreational drugs. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 72, p. 18-26, 2011.

KNOWLES, L. et al. Levamisole tainted cocaine causing severe neutropenia in Alberta and British Columbia. *Harm Reduction Journal*, v. 6, 2010.

LAPACHINSKE, S. F. et al. Analysis of cocaine and its adulterants in drugs for international trafficking seized by the Brazilian federal police. *Forensic Science International*, v. 247, p. 48- 53, 2015.

MAGALHÃES, E. J. Evaluation of the composition of street cocaine seized in two regions of Brazil. *Science and Justice*, v. 53, p. 425 – 432, 2013.

MALDANER, A. et al. Brazilian federal district cocaine chemical profiling – mass balance approach and new adulterant routinely quantified (aminopyrine). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.26, p. 1227 – 1231, 2015.

MARCELO, M. C. A. M. Profiling cocaine by ATR-FTIR. *Forensic Science International*, v. 246, p. 65 – 71, 2015.

MUIRHEAD, T. T.; EIDE, M. J. Toxic effects of levamisole in a cocaine user. *New England Journal of Medicine*, v. 364, 2011.

PEARSON, T. et al. Vasculopathy related to cocaine adulterated with levamisole: a review of the literature. *Dermatology Online Journal*, v.18, 2012.

PENIDO, C. A. F. O. et al. Identification of different forms of cocaine and substances used in adulteration using near-infrared raman spectroscopy and infrared absorption spectroscopy. *Journal of Forensic Sciences*, v. 60, p. 171 – 178, 2015.

SCIENTIFIC WORKING GROUP FOR THE ANALYSIS OF SEIZED DRUGS (SWGDRUG) RECOMMENDATIONS SWGTOX. United States Department of Justice – Drug Enforcement Administration, 2013.

SCHNEIDER, S.; MEYS, F. Analysis of illicit cocaine and heroin samples seized in Luxembourg from 2005 – 2010. *Forensic Science International*, v. 212, p. 242 – 246, 2011.

SILVA, M. J. et al. Spectrophotometric cocaine determination in a biphasic medium employing flow-batch sequential injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, v. 629, p. 98 – 103, 2008.

SOUZA, L. M. et al. A survey of adulterants used to cut cocaine in samples seized in the Espírito Santo State by GC-MS allied to chemometric tools. *Science & Justice*, v. 56, p. 73- 74, 2016.

TERRETTAZ-ZUFFEREY, A. et al. Pattern detection in forensic case data using graph theory: application to heroin cutting agents. *Forensic Science International*, v. 167, p. 242 – 246, 2007.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME AND LABORATORY SCIENTIFIC SECTION (UNODC). *Guidance for the validation of analytical methodology and calibration of equipment used used for testing of illicit drugs in seized materials and biological specimens*. Nova York: United Nations, 2009.

U.S. DRUG ENFORCEMENT ADMINISTRATION OFFICE OF DIVERSION CONTROL. *National forensic laboratory information system: annual report 2015*. 2016.

VAN STRALEN, K. J. et al. Diagnostic methods I: sensitivity, specificity, and other measures of accuracy, v. 75, p. 1257 – 1263, 2009.

VERONESE, F. V. Cocaine/levamisole-induced systematic vasculitis with retiform purpura and pauci-immune glomerulonephritis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 49, 2016.

ZACCA, J. J. et al. Brazilian Federal Police drug chemical profiling – the PeQui project. *Science & Justice*, v. 54, p. 300 – 306, 2014.



## **7. DISCUSSÃO GERAL**





O avanço contínuo da produção, venda, distribuição e consumo de drogas cada vez mais potentes demandam evolução também na área analítica, de modo que se possa melhorar a detecção destas substâncias, tornando-a tarefa simples e aplicável à rotina nos laboratórios de análise.

O primeiro aspecto abordado nessa tese (Capítulo 1, Manuscrito I) é o desenvolvimento de métodos em três diferentes matrizes biológicas a serem utilizados para a aplicação na área de trânsito, dada a escassez de dados nessa área.

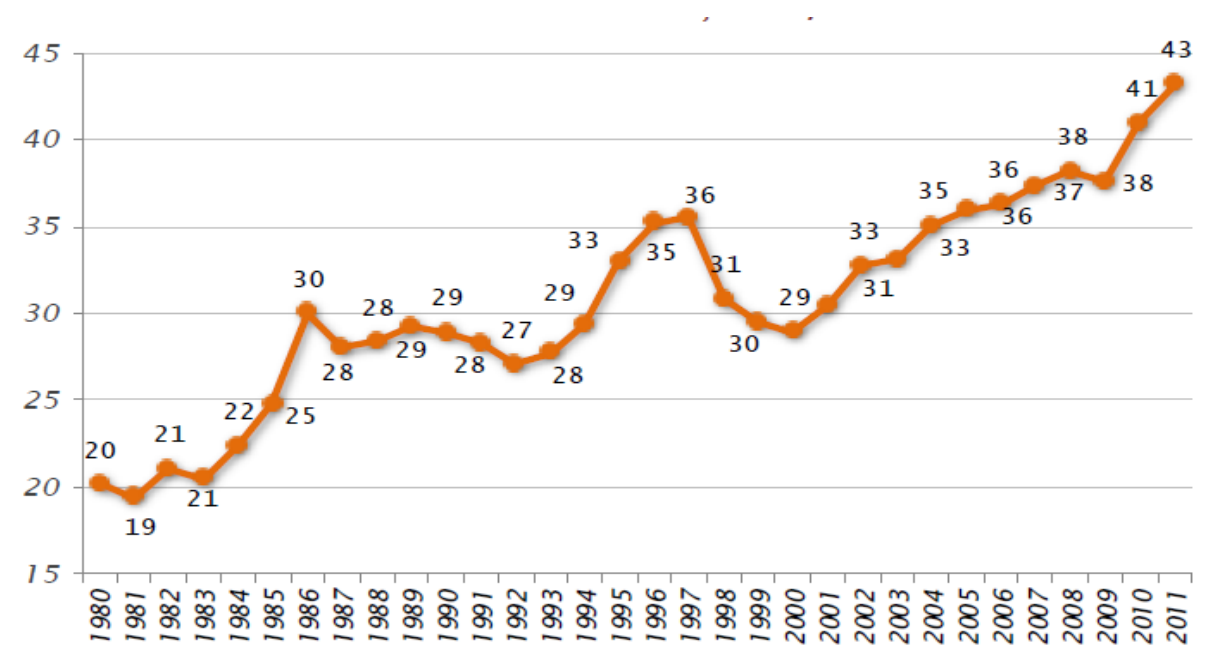
A pesquisa na área de trânsito possui relevância científica social e econômica, visto que mais de 1 milhão de pessoas perdem a vida anualmente em todo o mundo (UNODC, 2013). Esse é um problema mundial, que assola tanto os países desenvolvidos, quanto os em desenvolvimento.

Apesar dos enormes danos causados pelos acidentes, esta problemática social foi, por anos, negligenciada pelo poder público em geral e os recursos disponíveis para as intervenções nessa área nunca foram compatíveis com a real escala do problema, apesar do fato de os acidentes de trânsito serem, em sua maioria, evitáveis e a lista de intervenções eficazes aplicáveis ser extensa.

Em 2010, os governantes de diversos países entraram em acordo e lançaram a “Década de Ações pela Segurança no Trânsito” (2011-2020), desde então, alguns países tiveram consideráveis avanços na redução de danos. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, 88 países reduziram o número de mortes nas estradas entre 2007 e 2010, mostrando que melhorias são possíveis e que muitas outras vidas poderão ser salvas a partir das novas medidas tomadas. No entanto, outros 87 países registraram aumento no número de mortes no mesmo período, sendo que os índices mais altos de mortes estão concentrados em países de renda média, em particular a região da África. Desde 2008, 35 países criaram novas normas ou fizeram alterações nas já existentes, no intuito de abranger mais fatores de risco, entretanto, em muitos países, essas normas não funcionam e os governos necessitam fazer mais para divulgá-las e assegurar que elas sejam cumpridas (WHO, 2013).

O Brasil elaborou o “Plano Nacional de Redução de Acidentes e Segurança Viária para a Década 2011-2020” abrangendo um conjunto articulado de medidas intersetoriais, através das quais se estabelecem ações, metas e cronogramas de execução relacionadas à implementação de ações de fiscalização, educação, saúde, infraestrutura e segurança veicular, visando atingir as metas de redução de acidentes e mortes no trânsito indicadas pela ONU (Organizações das Nações Unidas). Porém, de uma maneira geral as ações se mostram pouco efetivas, sendo que as metas e prazos já estão sendo desrespeitados (CAMPOS et al., 2013).

Segundo o Mapa da Violência – Acidentes de Trânsito e Motocicletas, durante um breve período posterior à implantação do Código de Trânsito Brasileiro de 1997 –CTB houve uma diminuição de vítimas fatais em 22%, porém, a partir do ano de 2000 os acidentes voltaram a crescer, mesmo com a implementação da nova lei de trânsito (Lei nº 12.760/12) em 2012. Apesar dos esforços de municipalização da gestão do trânsito, expansão da fiscalização eletrônica, redução dos limites de velocidade, endurecimento das penalidades e da fiscalização da alcoolemia, entre outras medidas adotadas, os números continuam aumentando, conforme observado na **Figura 4** (WASELFISZ, 2013).



**Figura 4.** Número de mortes (x 1000) em acidentes de trânsito no Brasil (1980 – 2011).

**Fonte:** WASELFISZ, 2013.

Grande parte deste crescimento de números negativos no Brasil pode ser associada, além da ausência de responsabilidade do poder público, à resistência de mudança de hábitos por parte dos condutores. Um estudo realizado na Noruega em parceria com o nosso grupo de pesquisa comparou o uso de álcool e drogas ilícitas entre condutores brasileiros e noruegueses. A prevalência de condutores dirigindo sob a influência de álcool foi de 3% no Brasil e 0,2% na Noruega. Não houve diferença significativa na prevalência total de drogas, porém houve diferença nos tipos de drogas utilizadas. Estimulantes (anfetamina e COC) foram encontrados em 1,1% das amostras no Brasil e 0,3% na Noruega. Por outro lado, benzodiazepínicos e zopiclona tiveram incidência de 0,9% no Brasil e 1,7% na Noruega. Não houve diferença significativa no uso da cannabis entre os dois países (0,5% no Brasil e 0,8% na Noruega) (GJERDE et al., 2014). Esses resultados mostram que a fração de condutores com alcoolemia (concentração de álcool no sangue > 0,2g/L) é muito pequena no trânsito da Noruega em relação ao trânsito brasileiro, isto provavelmente está relacionado às diferenças de legislação, fiscalização, punição por embriaguez ao volante, além dos hábitos e atitudes diferentes dos condutores de cada país. Na Noruega, existe um plano de controle do uso de álcool e drogas muito bem estabelecido, foi o primeiro país do mundo a adotar limites legais para álcool em 1936 e desde 2012 toma medidas para outras drogas e medicamentos, sendo que cerca de 80% dos condutores são testados anualmente para álcool e drogas.

Com o objetivo de padronizar e parear os resultados de pesquisa em trânsito ao redor do mundo, a guia de Walsh et al. foi publicada em 2008 com diversas recomendações para os grupos de pesquisa.

Em relação às matrizes biológicas que devem ser utilizadas para esse tipo de pesquisa, a guia cita que o sangue é sempre a matriz de escolha para a interpretação dos efeitos potenciais da droga, embora seja compreensível que o alto custo de coleta desta matriz biológica e o pouco volume de amostra em alguns casos sejam fatores limitantes. FO e urina são matrizes alternativas de monitoramento. Quando uma droga está presente na corrente sanguínea, ela provavelmente estará presente no FO por conta do equilíbrio entre essas duas matrizes biológicas. Entretanto, a concentração encontrada muitas vezes pode estar abaixo do *cut-off* estabelecido, deste modo um resultado positivo nem sempre é

garantido (GJERDE et al., 2011). Por conta disso, as guias internacionais preconizam a coleta e análise de mais de uma matriz biológica do mesmo indivíduo para um resultado seguro, sendo que, pelo menos 10 mL de sangue, 30 mL de urina e 1 mL de FO devem ser coletados para a realização deste tipo de análise com uma margem de segurança (WALSH et al., 2008).

O desenvolvimento e validação dos métodos analíticos deste trabalho vêm de encontro às recomendações propostas nas guias (SOFT; AAFS, 2006; WALSH et al., 2008), as amostras FO, urina e sangue (plasma) foram trabalhadas para abranger ao máximo as possibilidades de análise, no caso de problema com alguma matriz biológica (impossibilidade de coleta, armazenamento inadequado, quantidade insuficiente), outras duas poderão ser analisadas por métodos validados e comprovadamente eficazes. Além disso, este trabalho contempla as substâncias da classe dos cocaínicos recomendadas a serem testadas nas três matrizes (COC e BZE) pela guia de Walsh, com a adição do CE, biomarcador da ingestão conjunta de COC e etanol, e os dois principais metabólitos do crack (AEME e AEC), produtos de biotransformação importantes a serem monitorados no Brasil, devido aos altos índices de consumo dessa droga de abuso.

Os índices máximos de cut-off recomendados pela guia (WALSH et al., 2008) são de 10 ng/mL para COC em FO e sangue, 10ng/mL e 50ng/mL para benzoliecgonina em FO e sangue, respectivamente. A recomendação para urina é de que os limites sejam tão baixos quanto possível analiticamente. Os três métodos desenvolvidos cumprem com o estipulado nesse quesito, tendo seus limites de detecção de 4,25 ng/mL para FO e 5,00 ng/mL para urina e plasma, em todos os analitos.

Para viabilização do monitoramento do uso de outras SPA no trânsito é necessário desenvolvimento de métodos analíticos efetivos e aplicáveis em rotina laboratorial, bem como qualificação de pessoal. A validação de métodos analíticos confirmatórios por CL-EM que garantam a veracidade dos resultados torna-se, portanto, totalmente justificável pelo seu valor contributivo ao meio científico, fornecendo novos métodos que possam ser utilizados por outros grupos de pesquisa e pelos laboratórios de perícias nacionais, além de mais embasamento e subsídios

que ajudem a promover a conscientização por parte da população quanto ao uso de SPA e seus prejuízos na direção.

A guia de Walsh (2008) recomenda que os critérios de validação analítica sigam os preconizados pela guia “*Forensic Toxicology Guidelines*” desenvolvida pela SOFT (Society of Forensic Toxicologists) e AAFS (American Academy of Forensic Sciences), publicada em 2006. Esta guia é específica para laboratórios forenses, e apesar de não descrever especificamente todos os critérios de validação como as outras guias consultadas para as validações dos métodos (RDC n°. 27/2012 Anvisa, FDA e SWGTOX), contém informações relevantes, peculiares das análises forenses, que foram seguidas.

De acordo com a *Forensic Toxicology Guidelines*, as análises confirmatórias precisam ser mais específicas que as análises de triagem e, preferencialmente, serem conduzidas por espectrometria de massas, como foi o caso, todas as análises foram avaliadas por CL-EM. Ainda, a utilização de pelo menos um íon quantificador e um íon qualificador para cada analito e para o padrão interno quando a análise for realizada no modo SIM (*selected ion monitoring*) é fortemente recomendada. Os métodos desenvolvidos neste trabalho utilizaram um íon quantificador e três qualificadores para cada substância, exceto para o padrão interno, onde utilizou-se um íon quantificador e dois qualificadores, atendendo aos requisitos da guia (Tabela 1, Capítulo 1). Como recomendações extras, a guia ainda traz a determinação do limite de detecção de forma experimental e uso do padrão interno no desenvolvimento do método, esses critérios são reportados, mas não exigido nas outras guias. Ainda, recomenda-se que a cada batelada de amostra, devem ser analisados controles de qualidade em uma quantidade de pelo menos 10% do total de amostras, esta informação também é encontrada na RDC n°. 27/2012 da Anvisa, porém esta última recomenda apenas 5% do número total de amostras. No presente trabalho, os controles de qualidade foram analisados na proporção de 5% do número total de amostras, o padrão interno foi utilizado no desenvolvimento e aplicação das validações, e todos os limites de detecção foram determinados de maneira experimental.

As guias utilizadas para as validações dos métodos são parecidas de uma maneira geral, em particular as guias da Anvisa e a do FDA, e diferem apenas em poucos aspectos. Enquanto que o critério de limite de detecção é exigido somente pela SWGTOX, o critério de recuperação é exigido somente pelo FDA. Efeito residual aparece como obrigatoriedade na SWGTOX e na Anvisa. Ademais, os parâmetros de linearidade, seletividade, efeito matriz, limite de quantificação, precisão, exatidão e estabilidade são reportados como exigência nas três guias. Visando a validação de uma forma mais abrangente possível, o presente trabalho utilizou as três guias como referência.

Em particular, a avaliação do efeito matriz mostrou-se dentro dos parâmetros aceitáveis, mesmo com a simplificada preparação de amostra dos métodos. O efeito de matriz é um fenômeno definido como a alteração da eficiência de ionização (supressão ou aumento) pela co-eluição de componentes que possam estar presentes na amostra biológica e, devido ao seu caráter imprevisível em análises quantitativas, torna-se uma séria preocupação, causando forte impacto sobre a escolha do tratamento de amostra, métodos e modos de ionização e inclusive na escolha da fase móvel mais adequada (XU et al., 2007). Ocorre principalmente devido à mudança nas propriedades das gotículas dos analitos causada pela presença de compostos menos voláteis ou não voláteis que alteram a eficiência de formação ou de evaporação dessas gotículas, o que conseqüentemente afeta a quantidade de íons em fase gasosa que alcançam o detector (EECKHAUT et al., 2009).

Um estudo realizado por Dams e Huestis (2003) sugere que a precipitação de proteínas em acetonitrila causa efeito matriz em urina, FO e plasma quando analisados tanto por CL-ESI-EM quanto por CL-ESI-EM/EM, com maiores áreas de supressão no início e no final da análise cromatográfica, por causa da limpeza mínima da amostra por esse procedimento. Entretanto, o mesmo estudo conclui que o pré-tratamento de amostra por SPE (extração em fase sólida) também causa efeito matriz justamente por concentrar não somente os analitos de interesse, mas também os interferentes. Ainda, a diluição de amostra (utilizada nesse estudo para FO) mostrou provocar pouco efeito matriz, embora esse procedimento seja

prejudicado em termos de perda de sensibilidade e aumento dos limites de detecção.

Peters e Remane (2012) também evidenciam que o efeito matriz não é eliminado e pode, por muitas vezes ser acentuado após preparos complexos de amostras, ou duas ou mais etapas de extração. Os valores obtidos para o ensaio de efeito matriz mostraram-se dentro dos valores estabelecidos pela legislação (RDC nº. 27/2012) vigente, o que pode ser atribuído ao simples e eficiente preparo de amostra desenvolvido, os quais resumiram-se à diluição em tampão para o FO e precipitação em acetonitrila para urina e plasma, etapas estas que ainda contribuíram para o baixo custo e reduzido tempo de preparação das amostras.

O uso da CL-EM vem ao encontro do objetivo proposto de desenvolvimento de método aplicável à análises de rotina, visto que é um equipamento mais simples, de menor valor em comparação aos equipamentos com detector de massas sequenciais (CL-EM/EM; CG-EM/EM) e ainda assim preciso, exato e sensível para a detecção dos analitos nas matrizes propostas.

Os métodos validados foram aplicados com êxito em 110 amostras de FO, 116 amostras de urina e 113 amostras de plasma de usuários de drogas. As análises em amostras de trânsito são parte de etapa futura a ser executada pelo grupo de pesquisa.

A questão das matrizes biológicas é abordada mais profundamente no Capítulo 2, Manuscrito II, onde realizou-se um trabalho de comparação da concentração dos analitos em FO, urina e sangue.

Conforme citado anteriormente, o sangue é considerado a matriz ideal por melhor correlacionar a concentração da droga e os efeitos farmacológicos causados pela substância, o que vem a ser útil para abordagens no trânsito, onde é necessário estar “sob efeito” da droga no momento da abordagem para ser enquadrado crime de trânsito. O objetivo dessa etapa do trabalho foi comparar as concentrações de COC, BZE e AEC nas três matrizes biológicas e avaliar uma possível utilização do FO para prever a concentração dos analitos nas demais matrizes, visto que este possui diversas vantagens de análise por ser uma matriz mais limpa e de fácil coleta.

A análise de coeficiente de correlação não pode ser realizada em todos os analitos inseridos no método validado por CL-EM já que não houveram casos positivos nas três matrizes de um mesmo indivíduo para CE e EMA, assim sendo, apenas os coeficientes de COC, BZE e AEC entre FO e plasma, FO e urina foram avaliados.

Os resultados apresentados foram significativos para COC e BZE, evidenciando correlação entre as matrizes avaliadas. A correlação entre FO e plasma mostrou melhores resultados, principalmente para BZE, onde o valor encontrado foi de 0.73. O coeficiente de correlação entre FO e urina foi de 0.45 para este analito. Para COC, os coeficientes de correlação foram 0.17 e 0.07, muito menores quando comparados aos resultados da BZE, porém ainda significativos. Por outro lado, os coeficientes de correlação da AEC não foram significativos nas amostras analisadas.

O baixo coeficiente de correlação encontrado para AEC pode ser explicado por dois fatores principais: 1. variabilidade da amostra: diversos estudos mostram coeficientes de correlação mais baixos em estudos realizados com usuários aleatórios (SAMYN et al., 2000; WILLE et al., 2009; LANGEL et al., 2013; VINDENES et al., 2012) em comparação com estudos clínicos (THOMPSON et al., 1987; CONE et al., 1994; CONE et al., 1997; JUFER et al., 2000; ELLEFSEN et al., 2016). 2. Baixo número de amostras: apenas 8 casos foram positivos para AEC nas três matrizes, apesar o elevado número de usuários de crack na população avaliada. Um dos fatores contribuintes é a suposta rápida metabolização desse analito, já que estudos indicam uma rápida metabolização de seu precursor EMA em FO (JENKINS et al., 1995; CONE et al., 1997), porém não existem estudos avaliando a farmacocinética e farmacodinâmica deste metabólito do crack em específico. O intervalo de tempo entre o consumo da droga e a coleta das matrizes pode ter contribuído para a baixa detecção simultânea nas três matrizes que possuem janelas de detecção diferenciadas.

De uma maneira geral, apesar da correlação significativa encontrada para BZE e COC, considerou-se não recomendada a utilização de resultados obtidos em FO para estimar a concentração em outras matrizes, principalmente em usuários de



drogas aleatórios como é o caso do trânsito, visto que o tempo entre a administração e a coleta de amostra é diferente para cada indivíduo, e não há nenhuma garantia de veracidade nas informações fornecidas pelos sujeitos estudados. Sendo assim, dada a elevada variabilidade da amostra, o sangue continua sendo a matriz preferencial para esse tipo de análise. Este trabalho foi pioneiro na avaliação do coeficiente de correlação entre matrizes para o metabólito do crack AEC, porém, devido ao baixo número de amostras obtido, faz-se necessária a realização de estudos, preferencialmente clínicos e controlados em um maior número de indivíduos.

Considerando a necessidade de aprimoramento das ferramentas analíticas utilizadas na análise não somente de matrizes biológicas mas também de materiais de apreensão, o terceiro capítulo desta tese, Manuscrito III, aborda o desenvolvimento e validação de um método confirmatório por CL-EM/EM, além do desenvolvimento de dois métodos qualitativos utilizando CG-EM e CG-EM-IT, este último pela primeira vez utilizado para aplicação em drogas de abuso. Esta etapa foi desenvolvida em parceria com o The Center for Forensic Science Research & Education, localizado em Willow Grove, Pennsylvania, Estados Unidos.

A COC é frequentemente adulterada e informações sobre as substâncias utilizadas podem ser de grande valia para ajudar na identificação de rota de tráfico e no tratamento de intoxicações em emergências a partir do conhecimento adquirido sobre as interações entre esses compostos e o agravante que essas interações trazem à saúde dos usuários.

Os adulterantes utilizados em COC já vem sendo estudados no Brasil há alguns anos. O principal programa a nível nacional é o chamado Projeto PeQui, teve seu início em 2006 através de uma iniciativa da Polícia Federal e busca combater e/ou diminuir o tráfico de drogas através da implementação de um banco de dados que relacione a origem da drogas de acordo com a concentração de substâncias majoritárias e minoritárias presentes na composição. Desta forma, o principal objetivo deste projeto é traçar o perfil químico das drogas apreendidas em todo o país. Como resultados esperados, pretende-se estabelecer com a ajuda de análises estatísticas a origem das drogas através de conexões entre quadrilhas e fornecedores e determinar os principais compostos adulterantes utilizados na

fabricação afim de manter atualizadas as listas de controle das autoridades. O projeto PeQui já vem mostrando seus resultados e representa uma valiosa ferramenta para o combate ao tráfico de drogas no país.

Diversos autores têm trabalhado de maneira independente em parceria com diferentes superintendências da polícia federal a fim de juntar informações sobre os agentes adulterantes em um número significativo de amostras em diversas regiões do país (BERNARDO et al., 2003; MAGALHÃES et al., 2013; ZACCA et al., 2014; BOTELHO et al., 2014; FLORIANI et al., 2014; FUKUSHIMA et al., 2014; GROBÉRIO et al., 2015; LAPACHINSKE et al., 2015; MALDANER et al., 2015; MARCELO et al., 2015; PENIDO et al., 2015; MALDANER et al., 2016; SOUZA et al., 2016). Os compostos adulterantes mais citados nesse conjunto de publicações são: LEV, FEN, HDZ, lidocaína, BZC, CAF, ACT, DTZ, procaína, aminopirina, açúcares, bicarbonado e amido. Países europeus reportam ainda diclofenaco, efedrina, atropina e tetracaína entre os mais utilizados (BRUNT et al., 2009; MAIETTI et al., 2009; EVRARD et al., 2010; SCHNEIDER e MEYS, 2011). Nos Estados Unidos da América, poucos estudos reportam os compostos adulterantes encontrados em COC, nestes, DTZ, HDZ, LEV, procaína, lidocaína e açúcares são citados (BROWN e MALONE, 1976; CUNNINGHAN et al., 1984; PETERS, 2004; VALENTINO e FUENTECILLA, 2005).

As análises de *screening* e confirmatórias realizadas pelos laboratórios da Polícia Federal atualmente variam de acordo com a localidade, já que não existe uma padronização nacional a ser seguida. Na unidade Porto Alegre, RS, por exemplo, as análises de *screening* são realizadas por teste colorimétrico e a confirmação é feita por CG-EM. Os testes colorimétricos (Teste de Scott, no caso da COC), são rápidos, baratos e de fácil execução e interpretação, porém apresentam como desvantagem a baixa especificidade, resultando em um grande número de amostras falso positivas. O aprimoramento das técnicas analíticas atualmente utilizadas é importante para o aumento da especificidade e diminuição do tempo de análise, visto que o quadro de funcionários na maioria dos laboratórios é limitado, e conseqüentemente melhora no processo de liberação de laudos, numa tentativa de diminuição da impunidade no tráfico de drogas nacional.

As metodologias analíticas desenvolvidas para esse fim nos últimos anos incluem CG-DIC (BERNARDO et al., 2003; FUKUSHIMA et al., 2014; MALDANER et al., 2015; MALDANER et al., 2016), CG-EM (EVRARD et al., 2010; ESSEIVA et al., 2011; MAGALHÃES et al., 2013; SOUZA et al., 2016), CG-NDP (LAPACHINSKE et al., 2015), ATR-FTIR (GROBÉRIO et al., 2015; MARCELO et al., 2015), CLAE-DAD (SCHNEIDER e MEYS, 2011; FLORIANI et al., 2014, MARCELO et al., 2016). Destas, apenas 5 foram validadas (ESSEIVA et al., 2011; FLORIANI et al., 2014; LAPACHINSKE et al., 2015; MALDANER et al., 2015; MARCELO et al., 2016), as principais informações acerca dos métodos estão descritas na **Tabela 6**. Não existe nenhum método reportado na literatura até o momento utilizando CL-EM/EM para a análise de materiais de apreensão.

Quando comparado com os métodos previamente reportados, o método proposto neste trabalho apresenta vantagens principalmente em relação à sensibilidade e preparo de amostra. Os métodos propostos por Maldaner et al. (2008), Lapachinske et al. (2012) e Floriani et al. (2014) envolvem dissolução em solvente orgânico e etapas simples de preparação como sonicação e centrifugação, porém, os limites de quantificação mínimos alcançados para cada método são 1700, 2000 e 2500 ng/mL, respectivamente, bem elevados quando comparados ao limite de quantificação proposto nesse trabalho (50 ng/mL) considerando o preparo de amostra similar. O método descrito por Esseiva et al. (2011) envolve derivatização, etapa que, de uma maneira geral, favorece os limites de quantificação, porém esses limites não são apresentados no trabalho. O tempo de análise é outro fator importante a ser considerado, visto que, de uma maneira geral, os laboratórios operam com grande demanda de análise, e ainda, tratando-se de cromatografia líquida ou gasosa, quanto mais rápida for uma análise, menores são os custos agregados à ela e maior é o rendimento de trabalho. O tempo de corrida cromatográfica (5 min) proposto nesse método é tido como excelente considerando a análise de 9 compostos (COC, LEV, BZC, FEN, HDZ, ACT, TFL, DTZ e CAF).

**Tabela 6.** Principais parâmetros dos métodos validados para análise de drogas de apreensão.

<b>Autores</b>	<b>Instru-</b>	<b>Preparo de</b>	<b>Sensibilidade</b>	<b>Volume</b>	<b>Tempo</b>	<b>Analitos</b>
----------------	----------------	-------------------	----------------------	---------------	--------------	-----------------

mento	amostra	(ng/mL)	de amostra	de análise		
Maldaner et al., 2016	CG-DIC	Amostras trituradas em presença de nitrogênio líquido e dissolvidas em cloroformio	12,25 mg	4,5 min	1700	COC
					2400	Trans-cinamoilcocaína
					2700	BZC
					3200	FEN
					8300	CAF
					8300	Lidocaína
					2600	Aminopirina
					6900	LEV
					2700	HDZ
					4000	DTZ
Lapachinski et al., 2012	CG-NDP	Dissolução em metanol, sonicação e centrifugação	5,0 mg	24,7 min	500	COC
					500	CAF
					500	4-Dimetilaminooantipirina
					500	LEV
					2000	Lidocaina
Floriani et al., 2014	CLAE-DAD	Dissolução em acetonitrila	-	17 min	5000	COC
					5000	BZE
					5000	Acido benzoico
					5000	CAF
					15000	Lidocaina
					2500	FEN
					2500	BZC
2500	DTZ					
Esseiva et al., 2011	CG-EM	Dissolução em clorofórmio, derivatização com MSTFA (1 h)	8 mg	30 min	-	COC
					-	FEN
					-	ACT
					-	Lidocaína
					-	BZC
					-	Cafeína
					-	TFL
					-	Açúcares
					-	LEV
					-	Procaína
-	Tetracaína					
-	Diazepam					
-	DTZ					
-	HDZ					

A validação analítica apresentada nesse capítulo do trabalho se basou nos parâmetros das guias UNODC (2009), SWGDRUG (2016), além do protocolo interno de validação analítica do The Center for Forensic Science Research & Education. Em uma validação analítica, os critérios de aceitação são diferentes dos exigidos em uma validação bioanalítica. De acordo com a UNODC, os parâmetros a serem executados são: seletividade, limite de detecção, precisão, linearidade, exatidão, recuperação, medida de incerteza e estabilidade. A SWGDRUG recomenda que sejam executados: seletividade, efeito matriz, precisão, exatidão, linearidade, limite de quantificação, recuperação, robustez e medida de incerteza. O preparo de amostra utilizado nessa validação envolveu apenas etapas evaporação da amostra e reconstituição em fase móvel, não havendo necessidade para o ensaio de recuperação, já que não foi executado nenhum processo de extração. Os parâmetros de robustez, efeito matriz e medida de incerteza não são práticas comuns nos ensaios de validação em materiais de apreensão no Centro de pesquisa onde esta pesquisa foi executada, e também não aparecem em nenhuma publicação anterior envolvendo esse tema, desta forma, não foram inseridos no protocolo de validação.

Os métodos qualitativos desenvolvidos para *screening* dos compostos adulterantes foram aplicados com êxito nas amostras analisadas. Considerando as análises de exatidão, o método de *screening* desenvolvido por CG-EM quando comparado ao método confirmatório por CL-EM/EM apresentou resultados bastante satisfatórios para sensibilidade, especificidade e exatidão (>90%). Estes resultados já eram esperados visto que a cromatografia gasosa acoplada a detector de massas figura como uma técnica muito bem estabelecida, que vem sendo aplicada há bastante tempo em análises qualitativas e quantitativas de diversos compostos, incluindo os adulterantes (EVRARD et al., 2010; SCHNEIDER e MEYS, 2011; MAGALHÃES et al., 2013; SOUZA et al., 2016). Por outro lado, o método qualitativo desenvolvido por CG-EM-IT mostrou-se pouco efetivo para a análise de *screening* da maioria dos compostos. COC e HDZ apresentaram exatidão acima de 90%, enquanto que BZC, FEN e CAF apresentaram exatidão na faixa de 80 a 90%. O LEV apresentou resultados de exatidão na faixa de 20%. A proposta de utilização de um cromatógrafo gasoso portátil acoplado a detector de massas íon trap para o

*screening* de drogas tem como principal vantagem a possibilidade de realizar análises mais específicas que os testes utilizados atualmente, no local de apreensão. Os resultados apresentados nesse trabalho podem ser atribuídos a diversos fatores. Primeiramente, a sensibilidade do equipamento para drogas de abuso ainda não é conhecida, visto que o instrumento foi desenvolvido para a detecção de compostos voláteis em uso militar. As amostras apreendidas foram diluídas em metanol (50:50) e injetadas em um primeiro momento, em situações onde o pico cromatográfico de nenhum adulterante foi identificado, as alíquotas originais foram injetadas. Considerando que nas amostras aplicadas, a pureza de COC encontrada foi maior do que 50% em 90% das amostras (109 de um total de 116), pode-se sugerir que, na maioria das amostras, os adulterantes não estavam presente em concentração necessária na amostra bruta para serem identificados pelo instrumento. Ainda, a coluna utilizada nesse instrumento (Restek RTX-5,5 m X 0.10 mm X 0.40 µm) vinha apresentando problemas indicados pelo fornecedor do instrumento, como alguns pontos com falhas de aquecimento, sugerindo que parte da amostra poderia estar ficando retida na coluna.

Devido à sensibilidade e seletividade das técnicas associadas à espectrometria de massas, o desenvolvimento de instrumentos portáteis que utilizem essa técnica podem vir a beneficiar diversas áreas de aplicação, incluindo detecção de ameaças (agentes químicos, biológicos e explosivos), investigações forenses, monitoramento ambiental e identificação de drogas ilícitas. O desenvolvimento de espectrômetros de massa portáteis exige a redução de tamanho, peso e consumo de energia, além da redução de utensílios de manutenção e custo. Também, componentes cruciais para o funcionamento desses instrumentos como o sistema de vácuo e bombas precisam ser diminuídos em tamanho sem perder a eficiência e robustez para funcionarem em modo portátil. Os detectores de massa íon trap, dentre todos os detectores, são ideais para serem desenvolvidos em modo portátil devido à simplicidade do sistema, pressão de operação relativamente alta e alinhamento de elementos ópticos iônicos menos rigoroso em comparação aos outros detectores de massas (LAMMERT et al., 2006; CONTRERAS et al., 2008)

O cromatógrafo gasoso acoplado a detector de massas portátil utilizado nesse trabalho, Torion-T9 da empresa Perkin Elmer (Massachusetts, EUA) pesa em torno

de 13 kg, opera no modo bateria (capacidade para até 2,5 horas) ou conectado e possui um dispositivo de hélio interno com capacidade para 150 amostras. Apesar de não exigir um computador externo para o sistema de operação e análise de dados, o instrumento oferece a possibilidade de ser conectado a um *laptop*. O tempo médio de análise é de 5 minutos por amostra e uma biblioteca NIST editável vem acoplada ao equipamento de modo a fazer a identificação baseada em tempo de retenção e espectro de massas de cada composto. O design robusto do instrumento permite que ele opere em condições adversas, porém uma avaliação de desempenho diária realizada através da análise de um mix de substâncias padrão precisa ser executada para garantir um desempenho reproduzível e confiável.

Esse estudo pioneiro na utilização desse instrumento para aplicação em drogas de abuso é de extrema importância para a melhoria do instrumento pelo fabricante para esse fim, visto que a área forense representa um grande mercado de aplicação para análises em campo. O instrumento é bastante promissor, e em comparação com outras técnicas utilizadas *in loco*, possui diversas vantagens (citadas anteriormente) e pode vir a se tornar uma importante ferramenta analítica na área.

A aplicação do método em amostras apreendidas nos Estados Unidos foi feita única e exclusivamente pela impossibilidade de transporte de amostras apreendidas pela Polícia Federal no Brasil para os Estados Unidos. Como trabalho futuro prevê-se um estudo de comparação entre os adulterantes encontrados em amostras apreendidas no Brasil e nos Estados Unidos.

Na América do Norte, especificamente Estados Unidos e Canadá, os números de apreensões têm registrado queda nos últimos anos. Dados mostram um aumento gradativo dos relatórios de apreensão entre 2001 e 2005, seguido de diminuição entre 2005 e 2015. Entre 2013 e 2014, o número de apreensões diminuiu significativamente (de 240810 para 213167 relatórios) (NFLIS, 2016). De acordo com o Programa para Determinação de Pureza e Origem de Cocaína do DEA (2015), mais de 90% da COC traficada para a América do Norte é originária da Colômbia. O encolhimento do mercado de COC nos últimos anos nessa região pode ser explicado por uma redução de disponibilidade da droga causada por uma queda

de produção na Colômbia e o aumento da violência ligada aos cartéis de drogas no México, o que elevou o preço e provocou um declínio no consumo. Ainda, considera-se a intensificação da fiscalização nas fronteiras com o México, investimento em campanhas publicitárias para redução do uso, mudanças na preferência do consumidor, levando em consideração o mercado emergente das novas substâncias psicoativas, ou até mesmo uma mudança de tática e rotas promovida pelas organizações criminosas em uma tentativa de evitar apreensões pelas autoridades (INCB, 2015; UNODC, 2015; UNODC, 2016).

A implementação de novas metodologias baseadas em tecnologias emergentes é etapa essencial no suporte à implementação de políticas públicas para que aconteça a redução do uso e tráfico de drogas na América do Sul, assim como vem ocorrendo na América do Norte. O desenvolvimento de métodos para a identificação de COC, seus metabólitos, produto de biotransformação e compostos adulterantes em matrizes biológicas e drogas apreendidas explanado ao longo dessa tese vem a contribuir nesse sentido.



## **8. CONCLUSÕES**



A COC representa hoje um problema econômico e social em diversos países. Os esforços contínuos do poder público, iniciativa privada e instituições de ensino e pesquisa são elementos cruciais para a diminuição do uso e abuso dessa substância, assim como da violência gerada pelo tráfico de drogas.

As metodologias analíticas desenvolvidas e/ou validadas neste trabalho possibilitaram a qualificação/quantificação de COC, seus metabólitos e produto de biotransformação, além de compostos adulterantes em três matrizes biológicas (FO, urina e sangue) e drogas apreendidas.

A atualização e aprimoramento de ferramentas analíticas que venham a contribuir para a agilidade do processo de apreensão e identificação de drogas nas mais diversas circunstâncias é parte dos esforços conjuntos que buscam, de forma integrada, reduzir os prejuízos causados pelas drogas na sociedade.



## **9. REFERÊNCIAS**



ANNESLEY, T. Ion Suppression in Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry*, v. 49, n. 7, p. 1041-1044, 2003.

ARAUJO, W. R. Development of an electroanalytical method for the quantification of aminopyrine in seized cocaine drugs. *Microchemical Journal*, v. 121, p. 213 – 218, 2015.

APS, J. K. M.; MARTENS, L. C. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Science International*, v. 150, n. 2-3, p. 119-131, 2005.

AUFFENBERG, C. et al. Levamisole: a common cocaine adulterant with life-threatening side effects. *Psychosomatics*, v. 54, p. 590 – 593, 2013.

BARROSO, M. et al. Bioanalytical procedures and recent developments in the determination of opiates/opioids in human biological samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 400, n. 6, p. 1665-1690, 2011.

BEATO, B. D. et al. Ramifications of pump-switching step gradients for bioanalytical LC/MS/MS assays. *Current Separations*, v. 19, p. 55-58, 2000.

BELFONTE, C. D. et al. Levamisole-induced occlusive necrotising vasculitis in cocaine abusers: an unusual cause of skin necrosis and neutropenia. *International Wound Journal*, v. 10, p. 590 – 596, 2013.

BERNARDO, N. P. et al. Caffeine and other adulterants in seizures of street cocaine in Brazil. *International Journal of Drug Police*, v. 14, p. 331 – 334, 2003.

BONFIGLIO, R. et al. The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 13, n. 12, p. 1175–85, 1999.

BOTELHO, E. D. et al. Chemical Profiling of cocaine seized by Brazilian Federal Police in 2009-2012: major components. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 25, p. 611 – 618, 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução – RDC nº 27, de 17 de maio de 2012* - Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Brasília, 2012a.

BRASIL. Presidência da República. *Lei nº 12.760, de 20 de dezembro de 2012* - Altera a lei nº 9.503, de 23 de setembro de 1997, que institui o código de trânsito brasileiro. Brasília, 2012b.

BREITENBACH, T. C. et al. High rates of injured motorcycle drivers in emergency rooms and the association with substance use in Porto Alegre, Brazil. *Emergency Medicine Journal*, v. 29, n.3, p.205-207, 2011.

BROOKHUIS, K.A.; WARD, N.J. *Recent European projects on driver impairment*. Proceedings of the first international driving symposium on human factors in driver assessment, training and vehicle design. Aspen, 2001.

BROSÉUS, J. et al. The cutting of cocaine and heroin: a critical review. *Forensic Science International*, v. 262, p. 73 – 83, 2016.

BROWN, J.K.; MALONE, M.H. Status of drug quality in the street-drug market – Na update. *Clinical Toxicology*, v. 9, n. 2, p. 145-168, 1976.

BRUNT, Tibor M. *Monitoring illicit psychostimulants and related health issues*. 2012. Tese – ACM-UvA.

BRUNT, T. M. et al. An analysis of cocaine powder in the Netherlands: content and health hazards due to adulterants. *Addiction*, v. 104, p. 798 – 805, 2009.

CAMPOS, C. I. et al. *O panorama do Brasil anterior à Década de Ação pela Segurança Viária 2011-2020*. 19º Congresso Brasileiro de Transporte e Trânsito. Brasília, 2013.

CARBONI, E. A. et al. Cocaine and amphetamine increase extracellular dopamine in the nucleus accumbens of mice lacking the dopamine transporter gene. *Journal of Neuroscience*, v. 21, n. 141, p. 1-4, 2001.

CARLINI, E. A. et al. *Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país – 2005*. São Paulo: Páginas & Letras, 2006. 472 p.

CARVALHO, V. M. et al. A study on the stability of anhydroecgonine methyl ester (crack biomarker), benzoylecgonine, and cocaine in human urine. *Revista de Psiquiatria Clínica*, v. 35, s. 1; p. 17-20, 2008.

CASTRO, A. et al. Simultaneous quantification of methadone, cocaine, opiates, and metabolites in human placenta by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 33, p. 243-252, 2009.

CHAKLADAR, A. et al. White powder, blue patient: methaemoglobinemia associated with benzocaine-adulterated cocaine. *Resuscitation*, v. 81, p. 138 – 139, 2010.

CHASIN, A. A. M. et al. Estimulantes do sistema nervoso central. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZO, J. A. O. (Org). *Fundamentos de Toxicologia*. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 353-374.

CHOO, R. E.; HUESTIS, M. A. Oral fluid as a diagnostic tool. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, v. 42, n. 11, p. 1273–1287, 2004.

CHU, M. et al. The incidence of drugs of impairment in oral fluid from random roadside testing. *Forensic Science International*, v. 215, n. 1-3, p.28-31, 2012.



CODY, J. T. Specimen adulteration in drug urinalysis. *Forensic Science Review*, v. 2, n. 1, p. 63-75, 1990.

COGNARD, E. et al. Validation of a gas chromatography—ion trap tandem mass spectrometry for simultaneous analysis of cocaine and its metabolites in saliva. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 41, n. 3, p. 925–934, 2006.

COLE, C. CUT: a guide to adulterants, bulking agents and other contaminants found in illicit drugs. Liverpool: Centre for Public Health, 2010.

COLE, C. et al. Adulterants in illicit drugs: a review of empirical evidence. *Drug Testing and Analysis*, v. 3, p. 89 – 96, 2011.

CONCHEIRO, M. et al. Confirmation by LC–MS of drugs in oral fluid obtained from roadside testing. *Forensic Science International*, v. 170, p. 156–162, 2007.

CONCHEIRO, M. et al. High-throughput simultaneous analysis of buprenorphine, methadone, cocaine, opiates, nicotine, and metabolites in oral fluid by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 398, n. 2, p. 915, 924, 2010.

CONE, E. J. Saliva Testing for Drugs of Abuse. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 694, p. 91-27, 1993.

CONE, E. K. et al. Simultaneous measurement of cocaine, cocaethylene, their metabolites, and crack pyrolysis products by gas-chromatography mass-spectrometry. *Clinical Chemistry*, v. 40, p. 1299-1305, 1994.

CONE, E.J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cocaine. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 19, p.459-478, 1995.

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

CONE, E. J.; OYLER, J.; DARWIN, W. D. Cocaine Disposition in Saliva Following Intravenous, Intranasal, and Smoked Administration. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 21, n. 6, p. 465-475, 1997.

CONTRERAS, J. A. et al. Handheld-portable gas chromatograph-toroidal ion trap mass spectrometer (GC-TMS) for detection of hazardous compounds. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, v. 19, p. 1425 – 1434, 2008.

COOMBER, R. How often does the adulteration/dilution of heroin actually occur? An analysis of 228 “street” heroin samples across the UK (1995-1996) and discussion of monitoring policy. *International Journal of Drug Policy*, v. 8, p. 178 – 186, 1997.

CRITS-CHRISTOPH, P. et al. Dopamine Transporter Levels in Cocaine Dependent Subjects. *Drug and Alcohol Dependence*, v. 98, n. 1-2, p. 70-76, 2008.

CROUCH, D. J. Oral fluid collection: The neglected variable in oral fluid testing. *Forensic Science International*, v. 150, p. 165-173, 2005.

CUNNINGHAM, J. K. et al. Proximity to the US-Mexico border: A key to explaining geographic variation in US methamphetamine, cocaine and heroin purity: drug purity and US-Mexico border proximity. *Addiction*, v. 105, p. 1785 – 1798, 2010.

CUNNINGHAM, E.E. et al. Adulterants in heroin/cocaine: implications concerning heroin-associated nephropathy. *Drug and Alcohol Dependence*, v.14, n.1, p.19-22, 1984.

CZUCHLEWSKI, D. R. et al. Clinicopathologic features of agranulocytosis in the setting of levamisole-tainted cocaine. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 133, p. 466 – 472, 2010.

D'AVILA, F. B. et al. Determination of cocaine/crack biomarkers in colostrum by LC–MS following protein precipitation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 103, p. 67–72, 2015.

DAMS, R. et al. Matrix Effect in Bio-Analysis of Illicit Drugs with LC-MS/MS: Influence of Ionization Type, sample Preparation, and Biofluid. *American Society for Mass Spectrometry*, v. 13, 1290-1294, 2003a.

DAMS, R. et al. Urine drug testing for opioids, cocaine, and metabolites by direct injection liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 17, n. 14, p. 1665–1670, 2003b.

DE BONI, R. et al. Factors associated with alcohol and drug use among traffic crash victims in southern Brazil. *Accident Analysis and Prevention*. v.43, n. 4, p. 1408-1413, 2011.

DE BONI, R. et al. Regional differences associated with drinking and driving in Brazil. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v.34, n. 3, p.306-313, 2012.

DOLAN, K. et al. An overview of the use of urine, hair, sweat and saliva to detect drug use. *Drug and Alcohol review*, v.23, p. 213-217, 2004.

DRIVING UNDER THE INFLUENCE OF DRUGS, ALCOHOL AND MEDICINES – DUID PROJECT. *Final report: work performed mains results and recommendation*. 2012.

DRUMMER, O. H. et al. Drugs in oral fluid in randomly selected drivers. *Forensic Science International*, v. 170, n. 2-3-, p. 105–110, 2007.

DRUMMER, O. H. Review: Pharmacokinetics of illicit drugs in oral fluid. *Forensic Science International*, v. 150, p. 133-142, 2005.

EECKHAUT, A. V. et al. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix effects. *Journal of Chromatography B*, v. 877, p. 2198-2207, 2009.

ELLEFSEN, K. N. et al. Pharmacodynamic affects and relationships to plasma and oral fluid pharmacokinetics after intravenous cocaine administration. *Drug and Alcohol Dependence*, v. 163, p. 116-125, 2016.

ESKES, D.; BROWN, J. K. Heroin-caffeine-strychnine mixtures – where and why?. *Bulletin on narcotics*, v. 27, p. 67 – 69, 1975.

ESSEIVA, P. et al. Illicit drug profiling, reflection on statistical comparisons. *Forensic Science International*, v. 207, p. 27-34, 2011.

EVARD, I. et al. Composition, purity and perceived quality of street cocaine in France. *International Journal of Drug Policy*, v. 21, p. 399 – 406, 2010.

FALLER, S. et al. Psychiatric disorders among individuals who drive under the influence of alcohol and drugs. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 34, n. 3, p. 314-320, 2012.

FERNANDEZ, C-L.; BANKS, C. E. An overview of quantifying and screening drugs of abuse in biological samples: Past and present. *Analytical Methods*, v. 3, p. 1227-1245, 2011.

FERREIRA, P.E.M.; MARTINI, R.K. Cocaína: lendas, histórias e abuso. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. v.23, p.96-99, 2001.

FLORIANI, G. et al. Development and validation of an HPLC-DAD method for simultaneous determination of cocaine, benzoic acid, benzoylecgonine and the main adulterants found in products based on cocaine. *Forensic Science International*, v. 235, p. 32 – 39, 2014.

FUKUSHIMA, A. R. et al. Purity and adulterant analysis of crack seizures in Brazil. *Forensic Science International*, v. 243, p. 95 – 98, 2014.

GAERTNER, E. M.; SWITLYK, S. A. Dermatologic complications from levamisole-contaminated cocaine: a case report and review of the literature. *Cutis*, p. 102 – 106, 2014.

GALLARDO, E. et al. LC-MS: a powerful tool in the workplace drug testing. *Drug Testing and Analysis*, v. 1, p. 109-115, 2009.

GARG, L. et al. Levamisole/cocaine induced systematic vasculitis and immune complex glomerulonephritis. *Case Reports in Nephrology*, p. 1 – 5, 2015.

GEISSLER, C; POWERS, H. *Human nutrition*. Oxford: Oxford University Press, 2017.

GJERDE, H. et al. Comparison of drug concentrations in blood and oral fluid collected with the Intercept® sampling device. *Journal of Analytical Toxicology*, v.34, p. 204-209, 2010.

GJERDE, H. et al. A comparison of alcohol and drug use by random motor vehicle drivers in Brazil and Norway. *International Journal of Drug Policy*, v.25, p. 393-400, 2014.

GJERDE, H. et al. Detection of illicit drugs in oral fluid from drivers as biomarker for drugs in blood. *Forensic Science International*, v. 256, p. 41-45, 2015.

GJERDE, H. et al. Comparison of drug concentrations in blood and oral fluid collected with the Intercept® Sampling Device. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 34, 2010.

GJERDE, H. et al. Using biological samples in epidemiological research on drugs of abuse. *Norsk Epidemiologi – Norwegian Journal of Epidemiology*, v. 21, n. 1, p. 5-14, 2011.

GRAF, J. et al. Purpura, cutaneous necrosis, and antineutrophil cytoplasmic antibodies associated with levamisole-adulterated cocaine. *Arthritis & Rheumatism*, v. 63, p. 3998 – 4001, 2011.

GROBÉRIO, T. S. et al. Discrimination and quantification of cocaine and adulterants in seized drug samples by infrared spectroscopy and PLSR. *Forensic Science International*, v. 257, p. 297 – 306, 2015.

GROSS, R. L. et al. A novel cutaneous vasculitis syndrome induced by levamisole-contaminated cocaine. *Clinical Rheumatology*, v. 30, p. 1385 – 1392, 2011.

HAECKEL, R. Factors influencing the saliva/plasma ratio of drugs. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 694, p. 128-142, 1993.

HUESTIS, M. A.; CONE, E. J. Relationship of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol concentrations in oral fluid and plasma after controlled administration of smoked cannabis. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 28, p. 394-399, 2004.

HUIZER, H. Analytical studies on illicit heroin v. efficacy of volatilization during heroin smoking. *Pharmaceutisch Weekblad*, p. 203 – 2011, 1987.

HUNTER, L. et al. Methaemoglobinaemia associated with the use of cocaine and volatile nitrites as recreational drugs. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 72, p. 18-26, 2011.

INCHEM - Chemical Safety Information from Intergovernmental Organizations. *Cocaine*. Disponível em: < <http://www.inchem.org/> >. Acesso em: 27 abril. 2017.

INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA – IPEA. *Acidentes de trânsito nas rodovias federais brasileiras: caracterização, tendências e custos para a sociedade* – relatório de pesquisa. Brasília, 2015.

INTER-AMERICAN DRUG ABUSE CONTROL COMMISSION - CICAD. *Report on Drug Use in the Americas, 2015*. Washington, 2015.

INTERNATIONAL NARCOTICS CONTROL BOARD - INCB. *Report of the International Narcotics Control Board for 2014*. Nova York, 2015.

JACOBS, G.; AERON-THOMAS, A.; ASTROP, A. *Estimating global road fatalities*. Crowthorne, 2000.

JAGER, L. S.; ANDREWS, A. R. J. Development of a screening method for cocaine and cocaine metabolites in urine using solvent microextraction in conjunction with gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 911, n. 1, p. 97–105, 2001.

JAGER, L.; ANDREWS, A. R. J. Development of a screening method for cocaine and cocaine metabolites in saliva using hollow fiber membrane solvent microextraction. *Analytica Chimica Acta*, v. 458, n. 2, p. 311–320, 2002.

JEPPESEN, H. H. et al. Analysis of Urinary Biomarkers for Smoking Crack Cocaine: Results of a Danish Laboratory Study. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 39, n. 6, p. 451–459, 2015.

JENKINS, A. J.; CONE, E. J. In: KARSH, S. B. *Drug Abuse Handbook*. Boca Raton: CRC press, 1998, p. 184 -187.

JENKINS, A. J. et al. Comparison of heroin and cocaine concentrations in saliva with concentrations in blood and plasma. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 19, p. 359 – 374, 1995.

JOHANSEN, S.S.; BHATIA, H.M. Quantitative analysis of cocaine and its metabolites in whole blood and urine by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v.852, p. 338-344, 2007.

JUFER, R.A. et al. Elimination of cocaine and metabolites in plasma, saliva, and urine following repeated oral administration to human volunteers. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 26, p. 467-477, 2000.

KIDWELL, D. A. et al. Testing for drugs of abuse in saliva and sweat. *Journal of Chromatography B*, v. 713, n. 1, p. 111–135, 1998.

KNOWLES, L. et al. Levamisole tainted cocaine causing severe neutropenia in Alberta and British Columbia. *Harm Reduction Journal*, v. 6, 2010.

LANGEL, K. et al. Comparison of drug concentrations between whole blood and oral fluid. *Drug Testing and Analysis*, v. 5, n. 5, p. 461-471, 2013.

LANGMAN, L. J. et al. Sensitive Method For Detection Of Cocaine And Associated Analytes By Liquid Chromatography– Tandem Mass Spectrometry In Urine. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 33, n. 8, p. 447-455, 2009.

LAMMERT, S. A. et al. Miniature toroidal radio frequency ion trap mass analyzer. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, v. 17, p. 916 – 922, 2006.

LAPACHINSKE, S. F. et al. Analysis of cocaine and its adulterants in drugs for international trafficking seized by the Brazilian federal police. *Forensic Science International*, v. 247, p. 48- 53, 2015.

LEE, K. C. et al. Complications associated with use of levamisole-contaminated cocaine: an emerging public health challenge. *Mayo Clinic Proceedings*, v. 87, pg. 581 – 586, 2012.

LEYTON, V. et al. Amphetamine, cocaine and cannabinoids use among truck drivers on the roads in the State of Sao Paulo, Brazil. *Forensic Science International*, v. 215, n. 1-3, p.25-27, 2012.

LEYTON, V. et al. Uso de anfetamínicos por motoristas profissionais. brasileiros: aspectos gerais. *Saúde, Ética & Justiça*, v. 5/7, n. 1-2, p.32-36, 2002.

LIBERATI, A. et al. The PRISMA Statement for Reporting Systematic Reviews and Meta-Analyses of Studies That Evaluate Health Care Interventions: Explanation and Elaboration. *Plos Medicine*, v.6, 2009.

LILLSUNDE, P. Analytical Techniques for Drug Detection in Oral Fluid. *Therapeutic Drug Monitoring*, v. 30, n. 2, p. 181-187, 2008.

LIMBERGER, R. P. et al. Testes toxicológicos para aferição de substâncias psicoativas em condutores. In. PECHANSKY, F.; ARRUDA, P. C. V.; DE BONI, R. B. (Org). *Uso de bebidas alcoólicas e outras drogas nas rodovias brasileiras e outros estudos*, Porto Alegre: Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas; 2010. 121 p.

LIPS, A. G. et al. Methodology for the development of a drug library based upon collision-induced fragmentation for the identification of toxicologically relevant drugs in plasma samples. *Journal of Chromatography B*, v. 759, n. 2, p. 191–207, 2001.

LIU, Y. et al. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of cocaine and its metabolite (-) ecgonine methyl ester in human acidified stabilized plasma samples. *Journal of Chromatography B*, v. 961, p. 77-85, 2014.

LOGAN, B. K. et al. Detection and Prevalence of Drug Use in Arrested Drivers Using the Dräger Drug Test 5000 and Affiniton DrugWipe Oral Fluid Drug Screening Devices. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 38, n. 7, p. 444–450, 2014.

MAGALHÃES, E. J. Evaluation of the composition of street cocaine seized in two regions of Brazil. *Science and Justice*, v. 53, p. 425 – 432, 2013.

MAIETTI, S. et al. Cocaine adulterants used as marker compounds. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 44, p. 1124 – 1126, 2009.

MALDANER, A. O. et al. Brazilian federal district cocaine chemical profiling – mass balance approach and new adulterant routinely quantified (aminopyrine). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.26, p. 1227 – 1231, 2015.

MALDANER, A. O. et al. Chemical profiling of street cocaine from different Brazilian regions. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 27, p. 719 – 726, 2016.

MALLET, C. R. et al. A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 18, p. 49-58, 2004.

MARCELO, C. A. M. et al. Profiling cocaine by ATR-FTIR. *Forensic Science International*, v. 246, p. 65 – 71, 2015.

MARCELO, C. A. M. et al. Determination of cocaine and its main adulterants in seized drugs from Rio Grande do Sul, Brazil, by a Doehlert optimized LC-DAD method. *Analytical Methods*, v. 8, p. 5212-5217.

MARIOTTI, Kristiane de Cássia. Estimulantes tipo anfetamínico: uma abordagem no trânsito, analítica e forense. 2013. 120 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MARQUET, P.; LACHÂTRE, G. Liquid chromatography-mass spectrometry: potential in forensic and clinical toxicology. *Journal of Chromatography B*, v. 733, p. 93-118, 1999.

MATZOPOULOS, R. et al. A field-test of substance use screening devices as part of routine drunk-driving spot detection operating procedures in South Africa. *Accident Analysis and Prevention*, v. 59, p. 118– 124, 2013.

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

MAURER, H. H.; Liquid chromatography–mass spectrometry in forensic and clinical toxicology. *Journal of Chromatography B*, v. 713, n. 1, p. 3–25, 1998.

MOFFAT, A.C.; OSSELTON, M.D.; WIDDOP, B. *Clarke's analysis of drug and poisons*. London: Pharmaceutical Press, 2004.

MONTESANO, C. et al. Determination of illicit drugs and metabolites in oral fluid by microextraction on packed sorbent coupled with LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. v.407, p.3647 – 3658, 2015.

MUIRHEAD, T. T.; EIDE, M. J. Toxic effects of levamisole in a cocaine user. *New England Journal of Medicine*, v. 364, 2011.

MURRAY, C.J.L et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the global burden of disease study 2010. *Lancet*. v.380, p.2095-2128, 2012.

NATIONAL FORENSIC LABORATORY INFORMATION SYSTEM – NFLIS. *Midyear report 2015*. U.S. Drug Enforcement Administration, Office of Diversion Control, 2016.

OJANIEMI, K. K. et al. Trends in driving under the influence of drugs: A register-based study of DUID suspects during 1977–2007. *Accident Analysis and Prevention*, v. 41, n. 1, p. 191–196, 2009.

PAUL, B. D. et al. Concentration profiles of cocaine, pyrolytic methyl ecgonidine and thirteen metabolites in human blood and urine: determination by gas chromatography–mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, v. 19, n. 9, p. 677–688, 2005.

PEARSON, T. et al. Vasculopathy related to cocaine adulterated with levamisole: a review of the literature. *Dermatology Online Journal*, v.18, 2012.

PENIDO, C. A. F. O. et al. Identification of different forms of cocaine and substances used in adulteration using near-infrared raman spectroscopy and infrared absorption spectroscopy. *Journal of Forensic Sciences*, v. 60, p. 171 – 178, 2015.

PEREZ, E.R. et al. Comparison of LC-MS-MS and GC-MS analysis of benzodiazepine compounds included in the drug demand reduction urinalysis program. *Journal of Analytical Toxicology*, p. 1-7, 2016.

PETERS, D.E. Diltiazem HCl: an analytical profile. *Microgram Journal*, v.2, n.1, 2004.

PETERS, F. T.; DRUMMER, O. H.; MUSSHOF, F. Validation of new methods. *Forensic Science International*, v. 165, p. 216-224, 2007.

PETERS, F. T.; REMANE, D. Aspects of matrix effects in applications of liquid chromatography-mass spectrometry to forensic and clinical toxicology-a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. v. 403, p. 2155-2172, 2012.

PLUSH, T. et al. Cocaine-induced agitated delirium: a case report review. *Journal of Intensive Care Medicine*. v. 30, p. 49-57, 2015.

RAES, E.; VERSTRAETE, A. G. Usefulness of Roadside Urine Drug Screening in Drivers Suspected of Driving Under the Influence of Drugs (DUID). *Journal of Analytical Toxicology*, v. 29, n. 7, p. 632-636, 2005.



RIVIER, L. 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, p. 69-82, 2003.

SAMYN, N.; LALOUP, M.; DE BOECK, G. Bioanalytical procedures for determination of drugs of abuse in oral fluid. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 388, n. 7, p. 1437–1453, 2007.

SAMYN, N.; VAN HAEREN, C. On-site testings of saliva and sweat with Drugwipe and determination of concentrations of drugs of abuse in saliva, plasma and urine of suspected users. *International Journal of Legal Medicine*, v. 113, p.150-154, 2000.

SCHEIDWEILER, K. B. et al. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Methylecgonidine, a Crack Cocaine Pyrolyzate. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 307, n. 3, p. 1179–1187, 2003.

SCHEIDWEILER, K. B. et al. Pharmacokinetics of cocaine and metabolites in human oral fluid and correlation with plasma concentrations following controlled administration. *Therapeutic Drug Monitoring*, v. 32, p. 628-637, 2010.

SCHEPERS, R. J. F. et al. Methamphetamine and amphetamine pharmacokinetics in oral fluid and plasma after controlled oral methamphetamine administration to human volunteers. *Clinical Chemistry*, v. 49, p. 121-123, 2003.

SCHNEIDER, S.; MEYS, F. Analysis of illicit cocaine and heroin samples seized in Luxembourg from 2005 – 2010. *Forensic Science International*, v. 212, p. 242 – 246, 2011.

SCIENTIFIC WORKING GROUP FOR FORENSIC TOXICOLOGY – SWGTOX. Standard practices for method validation in forensic toxicology. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 37, p. 452–474, 2013.

SCIENTIFIC WORKING GROUP FOR THE ANALYSIS OF SEIZED DRUGS (SWGDRUG) RECOMMENDATIONS SWGTOX. United States Department of Justice – Drug Enforcement Administration, 2013.

SENNA, M-C. et al. First nationwide study on driving under the influence of drugs in Switzerland. *Forensic Science International*, v. 198, n. 1-3, p. 11–16, 2010.

SHAH, V. P. et al. Bioanalytical Method Validation – A Revisit with a Decade of Progress. *Pharmaceutical Research*, v. 17, n. 12, p. 1551-1557, 2000.

SHIELDS, L. B. E. et al. Sudden death due to acute cocaine toxicity – excited delirium in a body packer. *Journal of Forensic Sciences*, v. 60, n.06, p.1647-1651, 2015.

SILVA, O. A. et al. Drug use by truck drivers in Brazil. *Drugs: Education, Prevention and Policy*, v.10, n.2, p.135-139, 2003.

SOCIETY OF FORENSIC TOXICOLOGISTS INC.; AMERICAN ACADEMY OF FORENSIC SCIENCES. *Forensic Laboratory Guidelines* – 2006.

SOUZA, J.C. et al. Sleep habits, sleepiness and accidents among truck drivers. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. v.63, n.4, p.925-930, 2005.

SOUZA, L. M. et al. A survey of adulterants used to cut cocaine in samples seized in the Espírito Santo State by GC-MS allied to chemometric tools. *Science & Justice*, v. 56, p. 73- 74, 2016.

STERNER, J. L. et al. Signal suppression in electrospray ionization fourier transform mass spectrometry of multi-component samples. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 35, n. 3, p. 385–391, 2000.

STOUT, P.R. et al. A comparison of the validity of gas chromatography – mass spectrometry and liquid chromatography – tandem mass spectrometry analysis of urine samples for morphine, codeine, 6-acetylmorphine and benzoylecgonine. *Journal of Analytical Toxicology*, v.33, 2009.

STRANO-ROSSI, S. et al. Evaluation of four oral fluid devices (DDS®, Drugtest 5000®, Drugwipe 5+® and RapidSTAT®) for on-site monitoring drugged driving in comparison with UHPLC–MS/MS analysis. *Forensic Science International*, v. 221, n. 1-3, p.70-76, 2012.

STRANO-ROSSI, S. et al. UHPLC-ESI-MS/MS method for direct analysis of drugs of abuse in oral fluid for DUID assessment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 401, n. 2, p.609-624, 2011.

TEIXEIRA, H. et al. Validated method for the simultaneous determination of  $\Delta^9$ -THC and  $\Delta^9$ -THC-COOH in oral fluid, urine and whole blood using solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry with electrospray ionization. *Forensic Science International*, v. 170, p. 148–155, 2007.

THOMPSON, L. K. et al. Confirmation of cocaine in human saliva after intravenous use. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 11, p. 38-38, 1987.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validations of methods of analysis. *Pure and Applied Chemistry*, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

TOENNES, S. W. et al. Driving under the influence of drugs – evaluation of analytical data of drugs in oral fluid, serum and urine, and correlation with impairment symptoms. *Forensic Science International*, v.152, p.149-155, 2005.

TOROYAN, T.; PEDEN, M. *Youth and road safety*. Geneva, 2007.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. *World Drug Report 2013*. Nova York, 2013.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. *World Drug Report 2015*. Nova York, 2015.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. *World Drug Report 2016*. Nova York, 2016.

UNITED STATES OF AMERICA. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. *Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation*. Rockville, 2001.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME AND LABORATORY SCIENTIFIC SECTION (UNODC). *Guidance for the validation of analytical methodology and calibration of equipment used used for testing of illicit drugs in seized materials and biological specimens*. Nova York: United Nations, 2009.

VALENTINO, A.M.M.; FUENTECILLA, K. Levamisole: na analytical profile. *Microgram Journal*, v. 3, n. 3, 2005.

VERONESE, F. V. Cocaine/levamisole-induced systematic vasculitis with retiform purpura and pauci-immune glomerulonephritis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 49, 2016.

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

VERSTRAETE, A. G.; RAES, E. *Rosita-2 project*. Final Report. Gent, 2006.

VINDENES, V. et al. Detection of drugs of abuse in simultaneously collected oral fluid, urine and blood from Norwegian drug drivers. *Forensic Science International*, v. 219, p. 165-171, 2012.

VOAS, R. B. et al. Drinking drivers and drug use on weekend nights in the United States. *Drug and Alcohol Dependence*, v. 130, n. 1-3, p. 215–221, 2013.

WAISELFISZ, J. J. *Mapa da violência 2013 – Acidentes de trânsito e motocicletas*. Centro Brasileiro de Estudos Latino-Americanos, CEBELA, Rio de Janeiro, 2013.

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

WANG, W-L. et al. Simultaneous assay of cocaine, heroin and metabolites in hair, plasma, saliva and urine by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v. 660, n. 2, p. 279-290, 1994.

WILLE, S. M. R. et al. Relationship between oral fluid and blood concentrations of drugs of abuse in drivers suspected of driving under the influence of drugs. *Therapeutic Drug Monitoring*, v.31, p.511-519, 2009.

WILLE, S. M. R. et al. Practical aspects concerning validation and quality control for forensic and clinical bioanalytical quantitative methods. *Accreditation and Quality Assurance*, v. 16, p. 279-292, 2011.

WISSENBACH, D. K. et al. Drugs of abuse screening in urine as part of a metabolite-based LC-MS<sup>n</sup> screening concept. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 400, p. 3481-3489, 2011.

WONG, R.C.; TSE, H.Y. *Drugs of abuse: Body Fluid Testing*. Totowa: Humana Press Inc, 2005.

WOOD, M. et al. Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry in forensic science. *Journal of Chromatography A*, v. 1130, p. 3-15, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. *Global Status Report on Road Safety 2013: Supporting a decade of action*. Geneva, 2013.

XU, R. N. et al. Recent advances in high-throughput quantitative bioanalysis by LC–MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 44, p. 342–355, 2007.

YONAMINE, M. *A saliva como espécime biológico para monitorar o uso de álcool, anfetamina, metanfetamina, cocaína e maconha por motoristas profissionais*. 2004. 126 p. Tese (Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

YONAMINE, M. et al. Detecting alcohol and illicit drugs in oral fluid samples collected from truck drivers in the State of São Paulo, Brazil. *Traffic Injury Prevention*. v.14, p.122-131, 2013.

ZACCA, J. J. et al. Brazilian Federal Police drug chemical profiling – the PeQui project. *Science & Justice*, v. 54, p. 300 – 306, 2014.

ZANCANARO, I. et al. Prescription and illicit psychoactive drugs in oral fluid – LC-MS/MS method development and analysis of samples from Brazilian drivers. *Forensic Science International*, v. 223, p. 208-216, 2012.





## Anexo 1.

Carta de aceite do artigo intitulado *Simultaneous determination of cocaine/crack and its metabolites in oral fluid, urine and plasma by liquid chromatography-mass spectrometry and its application in drug users* pela revista Journal of Pharmacological and Toxicological Methods.

Your manuscript JPM\_2016\_47\_R1 has been accepted

Entrada x



 Michael J. Curtis (Journal of Pharmacological and Toxicological Methods)

19:22 (Há 1 hora)



para mim ▾



inglês ▾



português ▾

[Traduzir mensagem](#)

[Desativar para: inglês](#) x

Ref: JPM\_2016\_47\_R1

Title: Simultaneous determination of cocaine/crack and its metabolites in oral fluid, urine and plasma by liquid chromatography-mass spectrometry and its application in drug users  
Journal: Journal of Pharmacological and Toxicological Methods

Dear Miss. Fiorentin,

I am pleased to inform you that your paper has been accepted for publication. My own comments as well as any reviewer comments are appended to the end of this letter. Now that your manuscript has been accepted for publication it will proceed to copy-editing and production.

Thank you for submitting your work to Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. We hope you consider us again for future submissions.

Kind regards,

Michael J. Curtis  
Editor-in-Chief  
Journal of Pharmacological and Toxicological Methods





## Anexo 2.

Carta de aceite do artigo intitulado *Oral fluid testing for cocaine: analytical evaluation of two point-of-collection drug screening devices* pela revista *Journal of Analytical Toxicology*.

O artigo em questão tem como autoras principais Juliana Nichterwitz Scherer e Taís Regina Fiorentin (autoria compartilhada) e foi encartado na Tese de Doutorado em Psiquiatria e Ciências do Comportamento da autora Juliana, defendida em 12 de abril de 2017.

From: **Journal of Analytical Toxicology** <[onbehalfof+bruce-goldberger@ufl.edu@manuscriptcentral.com](mailto:onbehalfof+bruce-goldberger@ufl.edu@manuscriptcentral.com)>  
Date: 2017-01-22 15:25 GMT-02:00  
Subject: Journal of Analytical Toxicology - Decision on Manuscript ID JAT-16-2243.R1  
To: [juliananscherer@gmail.com](mailto:juliananscherer@gmail.com)

22-Jan-2017

Dear Ms. Scherer:

It is a pleasure to accept your manuscript titled "Oral fluid testing for cocaine: analytical evaluation of two point-of-collection drug screening devices." in its current form for publication in the *Journal of Analytical Toxicology*.

Thank you for your contribution. On behalf of the Editors of the *Journal of Analytical Toxicology*, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Bruce A. Goldberger, Ph.D.  
Professor, University of Florida  
Editor-in-Chief, *Journal of Analytical Toxicology*

\*\*\*



### Anexo 3.

A seguir encontra-se disposto o artigo intitulado *Oral fluid testing for cocaine: analytical evaluation of two point-of-collection drug screening devices*. Este trabalho foi aceito para publicação pela revista *Journal of Analytical Toxicology* e o acesso integral encontra-se disponível no endereço eletrônico <https://academic.oup.com/jat>.

Este estudo avaliou dois dispositivos de screening para análise de COC em FO através de comparação com técnica confirmatória utilizando CL-EM/EM. Amostras de FO de 110 voluntários foram coletadas na cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. Os dispositivos foram avaliados segundo sensibilidade, especificidade e precisão utilizando os limites de detecção pré estabelecidos pelo fabricante. De acordo com os resultados, apenas um dispositivo alcançou os níveis recomendáveis de confiabilidade em todos os parâmetros. Este estudo evidencia a importância da confirmação de resultados de screening utilizando equipamentos mais específicos e métodos validados.

*Journal of Analytical Toxicology*, 2017, 1–7  
doi: 10.1093/jat/tkx018  
Article



Article

## Oral Fluid Testing for Cocaine: Analytical Evaluation of Two Point-of-Collection Drug Screening Devices

Juliana Nichterwitz Scherer<sup>1,\*†</sup>, Tais Regina Fiorentin<sup>2,†</sup>, Tanara Rosângela Vieira Sousa<sup>1</sup>, Renata Pereira Limberger<sup>2</sup>, and Flavio Pechansky<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Center for Drug and Alcohol Research, Collaborating Center on Alcohol and Drugs – HCPA/SENAD, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Professor Álvaro Alvim, 400, 90420-020 Porto Alegre, RS, Brazil, and <sup>2</sup>Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>†</sup>Both authors contributed equally to this work

\*Author to whom correspondence should be addressed. Email: juliananscherer@gmail.com/jnscherer@hcpa.edu.br

### Abstract

The use of point-of-collection testing (POCT) devices for drugs of abuse in oral fluid (OF) is an advantageous tool that has been used for different purposes—particularly traffic enforcement. However, even with the widespread report of cocaine consumption, the reliability of POCT devices has been reported in different magnitudes. This study evaluated the reliability of two POCT devices for the detection of cocaine in OF samples of 110 cocaine users: (i) the DDS2™ (cutoff = 30 ng/mL) and (ii) the Multi-Drugs Multi-Line—Twist Screen Test Device™ (MDML) (cutoff = 20 ng/mL). Results of the screening tests were compared with a Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (LC–MS) assay. Sensitivity, specificity and accuracy of DDS2™ were 100, 77.77 and 80% when compared with LC–MS with a cutoff of 30 ng/mL, and 88.89, 89.15 and 89.09% with a cutoff of 10 ng/mL. The MDML™ device achieved sensitivity, specificity and accuracy of 100, 65.6 and 70.9% when compared with LC–MS with a cutoff of 20 ng/mL, and 92.6, 71.1 and 76.6% with a cutoff of 10 ng/mL. When compared with a 10 ng/mL cutoff, the DDS2™ achieved reliability parameters higher than 80%. On the other hand, the MDML™ device did not achieve the minimal recommendation of 80% for all parameters at the same time. Taking into consideration the reliability results showed here, the authors believe that the use of these POCT devices seems to be suitable for cocaine detection in forensic tests only if all positive specimens are further confirmed by a validated method.