

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

Desenvolvimento de Metodologias Analíticas utilizando Espectrometria
de Massas e Análise Multivariada para Aplicação em Toxicologia e em
Documentoscopia Forense

ROBERTA PETRY GORZIZA

PORTO ALEGRE, 2021

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

Desenvolvimento de Metodologias Analíticas utilizando Espectrometria de Massas e Análise Multivariada para Aplicação em Toxicologia e em Documentoscopia Forense

Tese apresentada por **Roberta Petry Gorziza** para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Renata Pereira Limberger

Co-Orientadora: Dra. Carina Maria Bello de Carvalho

Porto Alegre, 2021

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 16.03.2021, pela banca examinadora constituída por:

Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz

Universidade Federal de Goiânia

Prof. Dr. Pedro Eduardo Froehlich

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dra. Taís Regina Fiorentin

The Center for Forensic Science Research & Education

CIP - Catalogação na Publicação

Petry Gorziza, Roberta
Desenvolvimento de Metodologias Analíticas
utilizando Espectrometria de Massas e Análise
Multivariada para Aplicação em Toxicologia e em
Documentoscopia Forense / Roberta Petry Gorziza. --
2021.
311 f.
Orientador: Renata Pereira Limberger.

Coorientador: Carina Maria Bello de Carvalho.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,
BR-RS, 2021.

1. Ciências Forenses. 2. Toxicologia. 3.
Documentoscopia. 4. Espectrometria de Massas. 5.
Análise Multivariada de Imagens. I. Pereira Limberger,
Renata, orient. II. Bello de Carvalho, Carina Maria,
coorient. III. Título.

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

Agradecimentos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento de bolsa de doutorado no país e bolsa de doutorado sanduíche nos Estados Unidos (Edital CAPES PRÓ-FORENSE Processo nº 23038.006845/2014-91); ao Departamento de Ciências Forenses e Investigativas da Universidade de West Virgínia (EUA), pelo suporte científico e tecnológico, bem como equipamentos e materiais para a realização de experimentos; aos Peritos Criminais Federais Dra. Carina Maria Bello de Carvalho e Dr. Rafael Scorsatto Ortiz, da Superintendência de Polícia Federal no Rio Grande do Sul, pela colaboração científica; e, especialmente, ao grupo do Laboratório de Pesquisas e Análises em Toxicologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (LABTOXICO/UFRGS), pelo suporte científico e tecnológico para a realização desta Tese.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof. Dra. Renata Pereira Limberger, minha orientadora, à Dra. Carina Maria Bello de Carvalho, minha co-orientadora, e ao Prof. Dr. Luís Arroyo, meu co-orientador no exterior, pelo apoio e pela confiança para realização deste trabalho, bem como por todos os seus ensinamentos.

À minha mãe Suzana, e à minha família, Andresa, César e Isabela, pelo apoio e incentivo para seguir estudando e alcançar meus objetivos.

À Marina, minha grande amiga e parceira de estudos e de trabalho nas Ciências Forenses, por todo suporte e colaboração.

Ao Joe, que foi um grande apoio científico e se tornou meu parceiro de vida, agradeço por todo amor, paciência e incentivo.

Ao Prof. Dr. Marcos Flores Ferrão, do Departamento de Química da UFRGS, ao Dr. Rafael Scorsatto Ortiz, da Polícia Federal, e à Prof. Dra. Tatiana Trejos, da West Virginia University, pelos seus ensinamentos e colaborações.

A todos os meus amigos que me acompanharam nessa jornada em todos os momentos, em especial à Mariana, à Jaque e à Adri, por todo o carinho e compreensão.

Aos meus colegas de pós-graduação no Laboratório Labtóxico pelos ensinamentos e colaborações.

Aos meus colegas da West Virginia University, pela ajuda e pela paciência, e por tornar minha vida feliz em Morgantown.

A todas as pessoas que estiveram presentes em minha vida nesses anos de estudo, o meu muito obrigada!

RESUMO

A Ciência Forense é uma área multidisciplinar, que usa do conhecimento científico para a investigação de questões penais e cíveis. Dentro de suas mais diversas áreas, a Toxicologia e a Documentoscopia Forense necessitam do auxílio de métodos analíticos, como a cromatografia, a espectrometria de massas e a análise multivariada, para a análise de compostos diversos. Em Toxicologia Forense, novos métodos para a detecção das drogas de abuso anfetamina, metanfetamina, cocaína, cetamina, mitraginina e canabinoides (THC e CBD) foram desenvolvidos utilizando coleta de fluido oral em dispositivos de *dried oral fluid spots* (DOFS) em papel filtro, seguido de extração líquido-líquido e análise por LC-MS/MS. Enquanto que para cinco drogas de abuso foi realizada a validação de um método quantitativo, para os canabinoides foram encontradas dificuldades na extração do papel filtro, e foi proposto um método qualitativo. Ainda, foi realizada uma revisão bibliográfica a respeito dos métodos quantitativos para a análise de canabinoides em fluido oral. Na área da Documentoscopia Forense, uma nova metodologia não-destrutiva, de baixo custo e de fácil acesso, foi desenvolvida para a diferenciação entre marcas de canetas esferográficas azuis. Esse estudo envolveu a captura de imagens utilizando o aplicativo para celulares Photometrix PRO®, com posterior análise estatística multivariada, utilizando PCA, HCA e PLS-DA. Este método demonstra também a necessidade de que Peritos em Documentoscopia tenham conhecimentos de análise multivariada, para proceder com a correta interpretação dos resultados. Para valorizar o conhecimento das metodologias analíticas na análise de tintas de canetas, foram apresentadas duas revisões bibliográficas. A primeira objetivou a busca sistemática dos métodos analíticos já estudados para a diferenciação e para a datação de tintas de canetas esferográficas azuis e pretas. Foram encontrados diversos métodos cromatográficos, de espectroscopia, de espectrometria de massas e de análise multivariada. A segunda revisão buscou a abordagem dessas metodologias voltada para Peritos Brasileiros. Essa Tese de Doutorado destaca ainda a multidisciplinariedade das Ciências Forenses, bem como a necessidade da formação de recursos humanos adequada na Perícia Brasileira. **Palavras-chave:** ciências forenses, toxicologia, documentoscopia, métodos analíticos, drogas de abuso, *dried oral fluid spots*, DOFS, LC-MS/MS, tintas de caneta, canetas esferográficas, análise multivariada, Photometrix PRO®.

ABSTRACT

Forensic Science is a multidisciplinary area, which uses scientific knowledge in judicial questions investigations. Among its many subareas, Forensic Toxicology and Documentoscopy demand the support of analytical methodologies for several different compounds' evaluation, such as chromatographic methods, mass spectrometry and multivariate analysis. Inside Forensic Toxicology scope, new analytical methods were developed for different drugs of abuse detection (amphetamine, methamphetamine, cocaine, ketamine, mitragynine and cannabinoids THC and CBD), using oral fluid collection applied into dried oral fluid spots (DOFS), followed by liquid-liquid extraction and LC-MS/MS analysis. A quantitative method validation was proposed for all drugs, except for cannabinoids, which have shown difficulties in the filter paper extraction process. Therefore, a qualitative method validation is proposed for THC and CBD detection in DOFS. Considering this, a systematic review was conducted concerning cannabinoids quantitative analysis in oral fluid. In Forensic Documentoscopy, it was developed a new non-destructive methodology, of low-cost and easy access, to differentiate between blue ballpoint pen brands. This study used image capturing with Photometrix PRO[®], an app for smartphones, followed by multivariate analysis (PCA, HCA and PLS-DA). This method emphasizes that Documentoscopy Experts need to understand multivariate analysis, so that they can proceed with adequate results interpretation. To highlight the need for analytical methodologies knowledge in pen inks analysis, two literature reviews are presented. The first one aimed to perform a systematic search for studied analytical methods used to differentiate or to date blue and black ballpoint pen inks. Several chromatographic, spectroscopy, mass spectrometry and multivariate analysis methods were found. Thus, the second review aimed to highlight the importance of those methods approaches for Brazilian Experts. Besides the technological advance achieved with new analytical methodologies, this Doctorate Thesis highlights Forensic Science as a multidisciplinary field, also reinforcing the need for adequate human resources in Brazil. **Keywords:** forensic science, toxicology, documentoscopy, analytical methods, drugs of abuse, dried oral fluid spots, DOFS, LC-MS/MS, pen inks, ballpoint pens, multivariate analysis, Photometrix PRO[®].

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas químicas de aminas endógenas comparadas a anfetaminas comuns como drogas de abuso.....	38
Figura 2. Estruturas químicas da cocaína e de seus principais metabólitos, produzidos através de reações de hidrólise e de oxidação.....	40
Figura 3. Estruturas químicas dos principais canabinoides estudados.....	42
Figura 4. Estruturas químicas da fenciclidina e da cetamina.....	43
Figura 5. Principais efeitos do kratom no corpo humano.....	45
Figura 6. Estrutura química da mitraginina.....	46
Figura 7. Mapa de cobertura das técnicas de GC-MS e de LC-MS conforme as características químicas de diferentes analitos.....	54
Figura 8. Estrutura química, peso molecular e ponto de ebulição do 2-fenóxietanol.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estudos utilizando DOFS como método de coleta para detecção e análise de substâncias diversas.....51

Tabela 2. Parâmetros de validação de métodos analíticos e recomendações da guia do AAFS.....57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAFS: *American Academy of Forensic Sciences*

CBD: canabidiol

CBN: canabinol

DBS: *dried blood spots*

DEA: *Drug Enforcement Administration*

DOFS: *dried oral fluid spots*

DMS: *dried matrix spots*

EDDP: 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine

FDA: *Food and Drug Administration*

GC-FID: cromatografia gasosa acoplada à detecção por ionização de chama

GC-MS: cromatografia gasosa acoplada à detecção por espectrometria de massas

GC-MS/MS: cromatografia gasosa acoplada à detecção por espectrometria de massas em tandem

HCA: análise por agrupamento hierárquico

HPLC-DAD: cromatografia líquida de alta performance acoplada à detecção por arranjo de diodos

LC-MS: cromatografia líquida acoplada à detecção por espectrometria de massas

LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à detecção por espectrometria de massas em tandem

MAO: enzima monoamina oxidase

MDMA: 3,4-metilenodioximetanfetamina

NMDA: N-metil-D-aspartato

PCA: análise de componentes principais

PC: componentes principais

PLS-DA: análise discriminante de regressão por mínimos quadrados parciais

SPE: extração em fase sólida

UNODC: *United Nations on Drugs and Crime*

UPLC-ESI-MS/MS: cromatografia líquida de ultra performance acoplada à detecção por espectrometria de massas com ionização por *eletrospray*

Δ 9-THC: tetrahydrocanabinol

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	21
2.	OBJETIVOS.....	27
2.1.	Objetivos Gerais	
2.2.	Objetivos Específicos	
3.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	31
3.1.	TOXICOLOGIA FORENSE.....	33
3.1.1.	MATRIZ BIOLÓGICA: FLUIDO ORAL	35
3.1.2.	DROGAS DE ABUSO AVALIADAS NESTE ESTUDO.....	37
3.1.2.1.	Anfetamina e Metanfetamina	37
3.1.2.2.	Cocaína	39
3.1.2.3.	Canabinoides.....	41
3.1.2.4.	Cetamina	43
3.1.2.5.	Mitraginina	44
3.1.3.	PREPARO DE AMOSTRAS: <i>DRIED ORAL FLUID SPOTS</i> (DOFS).....	46
3.1.4.	MÉTODO ANALÍTICO: LC-MS/MS	54
3.1.5.	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	56
3.2.	DOCUMENTOSCOPIA FORENSE.....	61
3.2.1.	ANÁLISE DE TINTAS DE CANETAS ESFEROGRÁFICAS.....	63
3.2.2.	ANÁLISE MULTIVARIADA DE IMAGENS	65
4.	CAPÍTULO I.....	69
4.1.	ARTIGO Extraction of Dried Oral Fluid Spots (DOFS) for the Identification of Drugs of Abuse Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)	
5.	CAPÍTULO II.....	107
5.1	MANUSCRITO Study of Δ^9-Tetrahydrocannabinol (THC) and Cannabidiol (CBD) Extraction from Dried Oral Fluid Spots (DOFS) And LC-MS/MS Detection	
6.	CAPÍTULO III.....	1355
6.1	MANUSCRITO Methodologies Applied to Quantitative Analysis of Cannabinoids in Oral Fluid: A Systematic Review	
7.	CAPÍTULO IV.....	195

7.1 ARTIGO Blue Ballpoint Pen Inks Differentiation using Multivariate Image Analysis of Digital Images Captured with PhotoMetrix PRO®	
8. CAPÍTULO V.....	223
8.1 ARTIGO Blue and Black Ballpoint Pen Inks: A Systematic Review for Ink Characterization and Dating Analysis	
9. CAPÍTULO	
VI.....	2533
9.1 MANUSCRITO O Estudo de Tintas de Canetas Esferográficas: uma Revisão da Literatura para a Abordagem Pericial em Documentoscopia Forense	
10. DISCUSSÃO GERAL.....	269
11. CONCLUSÃO.....	279
12. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	283
13. REFERÊNCIAS.....	287
14. ANEXOS.....	303
15. BIOGRAFIA.....	309

1. INTRODUÇÃO

A Ciência Forense é uma área multidisciplinar, voltada para a produção e para a transferência de conhecimento científico e tecnológico em cada ramo de sua abrangência, com a finalidade de aplicação na análise de diferentes vestígios, para responder a questões de interesse da Justiça (VELHO; GEISER; ESPÍNDULA, 2013). Nesta Tese, serão abordadas duas subáreas da Ciência Forense: a Toxicologia e a Documentoscopia.

A Toxicologia é “a ciência que estuda os efeitos adversos de substâncias químicas, como drogas, fármacos e toxicantes sobre os organismos vivos” (PASSAGLI, 2013). Na área forense, objetiva-se a busca de uma evidência consistente a respeito da presença de um determinado agente tóxico que possa estar relacionado a infrações penais ou cíveis, como o uso de substâncias diversas associado a homicídios, a suicídios e a acidentes de trânsito (PASSAGLI, 2013; VELHO; GEISER; ESPÍNDULA, 2013). Dentre essas substâncias, o consumo ilícito de drogas de abuso é um grande problema global, que atinge todas as classes sociais. Dados epidemiológicos mundiais mostram que, no ano de 2018, cerca de 269 milhões de pessoas usavam algum tipo de droga de abuso (UNITED NATIONS ON DRUGS & CRIME, 2020). Dessas, cerca de 35 milhões de pessoas usam drogas de forma abusiva e apresentavam transtornos relacionados ao consumo de drogas (UNITED NATIONS ON DRUGS & CRIME, 2020). Esse cenário demonstra um grande campo de atuação na área de Toxicologia Forense, bem como a necessidade de pesquisas científicas destinadas à detecção eficiente do uso de substâncias, de qualidade e de baixo custo, para prevenção e justiça na penalização de acidentes e de crimes associados.

A Documentoscopia Forense, por sua vez, abrange o estudo e a pesquisa de falsificações e de alterações de documentos diversos, para que se possam esclarecer questões de ordem jurídica, tanto na área penal como na área cível. A Documentoscopia objetiva a determinação da autenticidade ou da inautenticidade dos materiais contestados, a detecção de alterações diversas e a busca de informações a respeito da história do documento. A determinação de autenticidade/inautenticidade de documentos pode ser feita através do estudo de marcas em documentos oficiais (Papel Moeda, Carteira Nacional de Habilitação, selos de autenticação de Cartórios, por exemplo), ou ainda por meio da análise de assinaturas (utilizando-se um estudo comparativo de escritos). Alterações diversas em documentos podem ser identificadas com o exame físico do documento (análise de manchas e de marcas de grampos, por

exemplo) ou ainda pela detecção de rasuras ou da adição de escritos. Para esse fim, é necessário o estudo de caracterização e diferenciação de tipos e de marcas de tintas de canetas, para verificar a possibilidade do uso de mais de uma caneta em um documento. Por fim, estudos de datação de documentos podem ser realizados por meio da análise do método de sua impressão, do instrumento de escrita e do papel – que podem indicar um determinado período -, por meio da análise das informações contidas no documento, como a análise ortográfica e a análise tipológica, ou, ainda, por meio do estudo de degradação de tintas de canetas em assinaturas ou outros escritos (CAMARA & SILVA; FEUERHARMEL, 2014).

Apesar de muitos métodos físicos serem aplicados na área da Documentoscopia Forense, a subárea que envolve a análise de tintas de canetas, tanto para diferenciação de marcas como para o estudo de idade de tintas, requer o conhecimento do uso de instrumentos e de métodos analíticos que são comuns à área da Toxicologia Forense, incluindo por exemplo técnicas de separação e de identificação de compostos orgânicos, como a cromatografia e a espectrometria de massas, respectivamente. Ainda, técnicas de análise multivariada, ou quimiometria, “um conjunto de métodos apropriados para a obtenção informações significativas, sob o ponto de vista químico, a partir de um conjunto de dados” (FERREIRA, 2015) são muito utilizadas.

A cromatografia líquida acoplada à detecção por espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) tem sido muito utilizada para o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos para detecção de substâncias de interesse da Toxicologia Forense. Alguns exemplos recentes, aplicados em diferentes matrizes biológicas, incluem a detecção de: *designer* benzodiazepínicos em sangue pós-mortem (MEI *et al.*, 2019); canabinoides sintéticos em fluido oral (WILLIAMS; MARTIN; GALETTIS, 2019); uma grande quantidade de drogas (75) em cabelo (SHIN *et al.*, 2019); canabinoides em leite materno (RAMNARINE; POKLIS; WOLF, 2019); fentanil e metabólitos em tecido de fígado (COX *et al.*, 2020). A cromatografia gasosa acoplada à detecção por espectrometria de massas (GC-MS) também é um método muito utilizado para detecção e para quantificação de substâncias diversas em Toxicologia Forense. Alguns exemplos são a análise de: novas substâncias psicoativas em sangue e urina (NISBET *et al.*, 2019); canabinoides naturais e sintéticos em fluido oral (ANZILOTTI *et al.*, 2019); diferentes tipos de drogas de abuso (10) em cabelo (ORFANIDIS *et al.*, 2017).

No estudo de tintas de canetas, a cromatografia líquida é aplicada para a separação e a análise de corantes (HOSU; POP; CIMPOIU, 2015; LEE; NUNURUNG; ISHAK, 2014), enquanto o método de GC-MS é utilizado para quantificação de solventes (CARVALHO; ORTIZ; LIMBERGER, 2019; KOENIG; WEYERMANN, 2018; KOENIG; MAGNOLON; WEYERMANN, 2015).

A análise multivariada também tem sido muito aplicada em ambos os contextos, da Toxicologia e da Documentoscopia Forense (KUMAR; SHARMA, 2018). Em Toxicologia Forense, alguns exemplos de estudos envolvendo análise multivariada abordam diferenciação entre medicamentos autênticos e falsos (SANTOS *et al.*, 2019), diferenciação de sementes (MARIOTTI *et al.*, 2016) ou de folhas (GONZALEZ *et al.*, 2020) de canábis apreendidas, detecção de cocaína (RISOLUTI *et al.*, 2019a), de canabinoides (RISOLUTI *et al.*, 2019b) ou de anfetaminas (RISOLUTI *et al.*, 2020) em fluído oral, ou ainda discriminação de drogas em urina (HUANG *et al.*, 2020). Em Documentoscopia Forense, alguns exemplos da análise multivariada incluem a análise de dados químicos obtidos do instrumento de espectrometria de massas Orbitrap® (CARVALHO *et al.*, 2018a), para diferenciação de tintas de canetas, e de dados químicos gerados por espectroscopia de infravermelho (CARVALHO *et al.*, 2019), para datação de tintas de canetas.

Assim, observa-se que o conhecimento em métodos analíticos diversos, em cromatografia, em espectrometria de massas, e em análise multivariada, são essenciais não somente para profissionais da Toxicologia, mas também para profissionais da Documentoscopia Forense. Nesse contexto, esta Tese de Doutorado objetiva contribuir para o desenvolvimento tecnológico nas áreas de Toxicologia e de Documentoscopia Forense, buscando também contextualizar a multidisciplinariedade da Ciências Forenses e a necessidade de capacitação de profissionais de alto nível para a atuação em diferentes âmbitos da Justiça no Brasil. Este trabalho aproxima a pesquisa científica da prática e da realidade da Ciência Forense no país, apresentando novos métodos analíticos de custo reduzido.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Este projeto visa aplicar ferramentas de espectrometria de massas e de análise multivariada no âmbito da Ciência Forense, nas seguintes subáreas:

1. Toxicologia Forense: aplicar a técnica de *dried oral fluid spots* (DOFS) e validar uma nova metodologia analítica por LC-MS/MS, para a detecção de uso recente de substâncias ilícitas em situações diversas. Discutir dificuldades analíticas.
2. Documentoscopia Forense: desenvolver uma metodologia qualitativa, não-destrutiva e de baixo custo para a diferenciação de tintas de canetas esferográficas, utilizando análise multivariada de imagens digitais. Salientar a importância do conhecimento de metodologias analíticas para exame de tintas de canetas esferográficas.

2.2. Objetivos Específicos

1. Desenvolver e validar método bioanalítico por LC-MS/MS para análise de anfetamina, de metanfetamina, de cocaína, dos canabinoides tetrahydrocannabinol (THC) e canabidiol (CBD), de cetamina e de mitraginina em fluido oral, coletados em dispositivo de *dried spots*;
2. Desenvolver uma revisão sistemática a respeito das metodologias existentes para a quantificação de canabinoides em fluido oral;
3. Desenvolver método não-destrutivo de diferenciação de canetas esferográficas, utilizando o aplicativo para celulares PhotoMetrix PRO® e análise multivariada de imagens;
4. Desenvolver uma revisão sistemática sobre os métodos analíticos existentes para diferenciação e para datação de tintas de canetas esferográficas azuis e pretas;
5. Desenvolver uma revisão crítica voltada para profissionais brasileiros de Documentoscopia Forense, salientando a importância do conhecimento dos métodos analíticos para análise de tintas de canetas esferográficas;
6. Desenvolver pesquisa em parceria internacional com a Universidade de West Virgínia (Morgantown/WV/Estados Unidos), nas áreas de Toxicologia (com o

Prof. Dr. Luis Arroyo) e de Documentoscopia Forense (com a Prof^a. Dr^a. Tatiana Trejos);

7. Incentivar a formação de recursos humanos de qualidade para atuar em diferentes âmbitos da Ciência Forense no Brasil.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. TOXICOLOGIA FORENSE

Diferentes matrizes biológicas podem ser utilizadas para a detecção de drogas de abuso em Toxicologia Forense, e a escolha deve considerar o objetivo da análise toxicológica, envolvendo o metabolismo de cada substância. Em uma análise post-mortem, amostras de fígado, de conteúdo estomacal, de humor vítreo ou mesmo de osso podem ser utilizadas, considerando a suspeita da morte (e se a substância em questão pode ser encontrada em determinada matriz) e/ou o estágio de decomposição do corpo (PASSAGLI, 2013). Em indivíduos vivos, diferentes matrizes apresentam vantagens e desvantagens, conforme a situação da detecção de drogas de abuso. Em amostras de urina serão encontrados principalmente os metabólitos de drogas de abuso, que indicam que o uso da substância ocorreu há algum tempo, estipulado conforme o metabolismo de cada droga no corpo. Da forma semelhante, a detecção de drogas de abuso em cabelo pode fornecer informações de uso e/ou de abstinência de substâncias por um período ainda mais longo (PASSAGLI, 2013). Algumas circunstâncias, como no caso de rastreamento de motoristas sob possível efeito de drogas e de identificação de uso de substâncias ilícitas em locais de trabalho ou em competições esportivas, por exemplo, requerem a detecção do uso recente de substâncias, objetivando o rastreamento de indivíduos para a prevenção do uso de substâncias ilícitas e, conseqüentemente, de acidentes e/ou de crimes. Nessas situações, sangue e fluido oral são matrizes adequadas para teste. Entretanto, enquanto a coleta de sangue requer aparatos específicos (seringa, agulha, garrote, material de desinfecção e de proteção contra agentes biológicos), e de um profissional habilitado a realizá-la, a coleta de fluido oral possui a vantagem de ser simples e econômica, podendo também ser realizada por um profissional sem treinamento (DRUMMER, 2006).

Após a escolha da matriz biológica, é preciso desenvolver um método de extração dessas substâncias a partir das amostras biológicas. O processo de preparo das amostras e extração dos analitos de interesse é dividido, de maneira geral, nas seguintes etapas: homogeneização da matriz biológica, extração do analito de interesse, limpeza dos componentes indesejados e concentração dos analitos para análise (PASSAGLI, 2013). As técnicas de extração mais comumente utilizadas são a extração em fase sólida ou *solid phase extraction* (SPE) e a extração líquido-líquido.

A SPE utiliza um cartucho contendo um disco sólido e poroso que retém os analitos de interesse através de interações químicas. A eluição dos analitos deste disco pode ser controlada com sucessivas etapas de lavagem e com o uso de um solvente de eluição apropriado para cada substância (PASSAGLI, 2013). A extração líquido-líquido, por sua vez, utiliza um solvente orgânico imiscível em água para promover a partição entre as fases orgânica e aquosa. O analito de interesse deve ser mais solúvel no solvente orgânico, para que, com agitação, seja extraído da fase aquosa. Dessa forma, as características do analito (polaridade, solubilidade, pH, entre outras) estão relacionadas com a efetividade da extração (PASSAGLI, 2013).

Por fim, é preciso desenvolver e validar um método para a análise da substância de interesse, em um instrumento adequado. Ensaio de triagem, ou testes qualitativos, são desenvolvidos para a simples identificação de analitos, enquanto ensaios quantitativos confirmam a presença dos analitos, tornando possível também a sua quantificação (PASSAGLI, 2013).

Na presente Tese, o trabalho científico na área de Toxicologia Forense foi desenvolvido no período de Doutorado Sanduíche (de março a dezembro de 2019) em parceria com a Universidade de West Virgínia, nos Estados Unidos, sob orientação do Prof. Dr. Luís Arroyo. Neste estudo, fluido oral foi escolhido como matriz biológica para detecção de anfetamina, de metanfetamina, de cocaína, de canabinoides, de cetamina e de mitraginina, drogas de interesse no Brasil e/ou nos Estados Unidos. O preparo de amostra envolveu o uso de *dried oral fluid spots* (DOFS) seguido de extração líquido-líquido. O método analítico de detecção aplicado foi o LC-MS/MS; para anfetamina, metanfetamina, cocaína, cetamina e mitraginina foi aplicada uma validação de método quantitativa (apresentado no capítulo 1) e, para os canabinoides, uma validação de método qualitativa (apresentado no capítulo 2). Devido às dificuldades analíticas observadas com relação aos canabinoides, o capítulo 3 apresenta uma revisão sistemática a respeito dos métodos quantitativos existentes, discutindo uma série de parâmetros a serem considerados.

O método de DOFS pode ser aplicado, por exemplo, no trânsito (como *screening* de motoristas sob possível uso de drogas), em testagem ocupacional (para verificação de uso de drogas por trabalhadores), em testes antidoping em atletas e, ainda, em clínicas de tratamento de recuperação de dependentes químicos, situações que requerem a detecção do uso recente de substâncias ilícitas. O uso desse método permite a prevenção e/ou a penalização de acidentes diversos.

3.1.1. MATRIZ BIOLÓGICA: FLUIDO ORAL

Devido à sua fácil coleta, que não necessita de um treinamento especializado, como a coleta de sangue, ou da supervisão de uma pessoa de mesmo sexo, como a coleta de urina, o fluido oral tornou-se uma valiosa matriz biológica para identificação e quantificação de drogas de abuso, sendo amplamente estudada (DESROSIERS; HUESTIS, 2019; REINSTADLER *et al.*, 2019; XU *et al.*, 2019; COULTER; MOORE, 2019). Ainda, em alguns casos, no fluido oral há uma boa correlação da concentração de drogas com o sangue (CONE; HUESTIS, 2007) e se identificam principalmente drogas intactas, e não seus metabólitos (CROUCH, 2005), indicando o uso recente de substâncias (APS; MARTENS, 2005). Essas características são vantajosas para o monitoramento terapêutico do uso de substâncias e para a detecção do uso recente de drogas ilícitas.

A saliva é produzida por diferentes glândulas salivares: cerca de 65% por glândulas submandibulares, 20% por glândulas parótidas, 8% por glândulas sublinguais e menos de 10% por outras glândulas. Composta por água (99%), eletrólitos (sódio, potássio, cálcio, magnésio, bicarbonato, fosfatos), imunoglobulinas, proteínas, enzimas, mucinas e compostos nitrogenados, a saliva exerce diversas funções biológicas, como a ajuda na digestão e na limpeza da cavidade oral, a modulação de pH e a ação antibactericida (CROUCH, 2005; HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001). Denomina-se fluido oral a mistura da saliva com outros materiais presentes na cavidade oral, como células epiteliais e resíduos alimentares (CROUCH, 2005).

A maior parte das drogas parece entrar no fluido oral por simples difusão passiva, caracterizada por transferência de moléculas em função de um gradiente de concentração, sem gasto de energia (APS; MARTENS, 2005; CROUCH, 2005). Para que isso ocorra, as drogas que estão circulando no plasma devem ser capazes de passar pelas paredes capilares, pela membrana basal e pela membrana das células epiteliais glandulares (APS; MARTENS, 2005). Essa transferência tem uma relação direta com as características físico-químicas de cada droga, tais como seu pKa, sua solubilidade lipídica, sua carga, seu peso molecular e sua configuração espacial, bem como a quantidade de droga que não está ligada a proteínas plasmáticas (apenas frações livres de droga podem passar para o fluido oral), a dose e a taxa de

metabolização da droga de cada indivíduo e o fluxo de fluido oral e seu pH (APS; MARTENS, 2005; CROUCH, 2005). Ainda, considerando que o fluido oral é um pouco mais ácido que o plasma, drogas básicas (como por exemplo, cocaína e anfetamina) são encontradas em maior concentração no fluido oral (CONE; HUESTIS, 2007). Entretanto, há que se considerar também que drogas que são usualmente consumidas por via oral (como metanfetamina, heroína, canábis e cocaína) também podem ser detectadas em maiores concentrações no fluido oral (CROUCH, 2005).

A coleta de fluido oral pode ser realizada por simples expectoração em um tubo ou com a ajuda de um coletor comercial, que contém soluções tampão e conservantes. A coleta por expectoração dispensa a compra de um coletor comercial, porém tem a desvantagem de obter-se uma amostra viscosa, que pode ser de difícil manipulação em laboratório. Ainda, essa amostra pode ser de baixo volume e pode conter resíduos da mucosa oral, que são possíveis interferentes da análise (BOSKER; HUESTIS, 2009; DRUMMER, 2006). A estimulação da produção de saliva pode ser realizada com o auxílio de alguns agentes, tais como goma de mascar e ácido cítrico, porém essas substâncias podem alterar o pH e a concentração de drogas de abuso no fluido oral (ELMONGY; ABDEL-REHIM, 2016; DRUMMER, 2006). Os kits comerciais são compostos por um *swab* com uma pequena espuma absorvente que, em contato com a mucosa oral, facilitam a entrada de fluido oral para o tubo coletor, o qual contém um tampão que ajuda na redução da viscosidade, no aumento de volume e na conservação da amostra (ELMONGY; ABDEL-REHIM, 2016; BOSKER; HUESTIS, 2009). Entretanto, algumas drogas podem aderir ao coletor, especialmente drogas lipofílicas, o que pode representar uma concentração mais baixa ou um resultado falso negativo. Não é possível prever que tipo de material ou de dispositivo irá proporcionar baixos valores de recuperação de droga na coleta, por isso devem ser realizados estudos para cada droga em dispositivos diversos (BOSKER; HUESTIS, 2009).

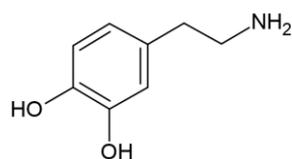
3.1.2. DROGAS DE ABUSO AVALIADAS NESTE ESTUDO

3.1.2.1. Anfetamina e Metanfetamina

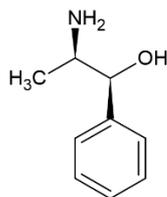
As anfetaminas são uma classe de drogas sintéticas que produzem ação estimulante no sistema nervoso central, com atividade agonista simpatomimética e adrenérgica (UDIN *et al.*, 2017). A figura 1 mostra as estruturas químicas de amins endógenas e de algumas das estruturas químicas de anfetamínicos mais utilizados como drogas de abuso: a anfetamina, a metanfetamina e o 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA ou *ecstasy*). Muitos dos efeitos biológicos das anfetaminas são semelhantes aos produzidos por amins endógenas, devido à similaridade entre essas estruturas químicas (SIMOLA; CARTA, 2016). Entretanto, as anfetaminas agem principalmente aumentando a liberação e a ação dos neurotransmissores norepinefrina e dopamina no cérebro, e não atuando em seu lugar (SIMOLA; CARTA, 2016). Ainda, podem atuar como agonistas diretos de receptores centrais 5-HT, de serotonina, e podem inibir a enzima monoamina oxidase (MAO) (HEAL *et al.*, 2013; UDIN *et al.*, 2017), a qual é responsável pela degradação de serotonina, norepinefrina e dopamina.

Os principais efeitos biológicos das anfetaminas incluem euforia, redução de fadiga, do sono e do apetite. Porém, juntamente com o aumento de energia e de sociabilidade, as anfetaminas provocam efeitos colaterais físicos, como hipertensão, taquicardia e respiração rápida, efeitos de comportamento, como aumento de confiança, fala excessiva e agressividade, e efeitos psicológicos, como paranoia e alucinações (UDIN *et al.*, 2017). Por causa de seu efeito estimulante, as anfetaminas e seus derivados são muito utilizados por motoristas de caminhão, para reduzir o sono, por atletas, para aumentar sua performance, por estudantes, para aumentar a concentração, e por pessoas que desejam perder peso (PASSAGLI, 2013), sendo que algumas formulações farmacêuticas com anfetaminas são vendidas com prescrição médica.

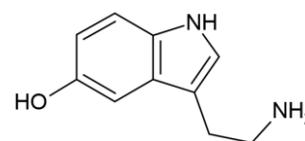
Aminas Endógenas:



Dopamina

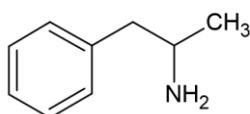


Norepinefrina

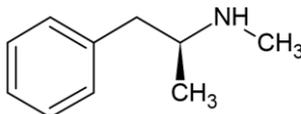


Serotonina

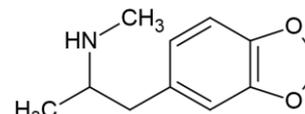
Anfetaminas Utilizadas como Drogas de Abuso:



Anfetamina



Metanfetamina



MDMA

Figura 1: Estruturas químicas de aminas endógenas comparadas a anfetaminas comuns como drogas de abuso. MDMA: 3,4-metilenodioximetanfetamina. Figura adaptada de SIMOLA; CARTA, 2016.

Historicamente, os estimulantes do tipo anfetamínicos foram muito utilizados por soldados durante a Segunda Guerra Mundial, para redução de sono e de apetite. Além disso, nos anos 50 e 60, foram bastante prescritos para tratamento de depressão e de obesidade. Em 1970, uma lei federal norte-americana (*Comprehensive Drug Abuse Prevention and Control Act*) classificou os anfetamínicos como uma droga de abuso, reduzindo drasticamente as prescrições de anfetaminas como medicamentos (UDDIN *et al.*, 2017). Nesta época, a metanfetamina começou a ser produzida ilegalmente a partir de fenil-2-propanona, de efedrina e de pseudoefedrina (ABBRUSCATO; TRIPPIER, 2018; COURTNEY; RAY, 2014). A metanfetamina atua como uma droga estimulante que tem efeitos de comportamento imediatos, como a sensação de estar alerta, o aumento de energia e a euforia, e apresenta alto potencial de abuso (ABBRUSCATO; TRIPPIER, 2018).

Atualmente, a classe de anfetamínicos é a terceira classe de drogas de abuso mais utilizada no mundo e, em 2018, já eram utilizadas por cerca de 27 milhões de indivíduos (UNITED NATIONS OF DRUGS AND CRIME, 2020). O tipo de anfetamínico utilizado varia conforme a região mundial: na América do Norte, o uso não-médico de formulações farmacêuticas e a metanfetamina são as drogas mais utilizadas; na América Central e na América do Sul, prevalecem o uso não-médico de estimulantes farmacêuticos. Na Ásia e Oceania, a metanfetamina é mais utilizada e, na Europa, a anfetamina é a substância de abuso mais observada (UNITED NATIONS

OF DRUGS AND CRIME, 2020). Nesta tese, a anfetamina e a metanfetamina foram utilizadas como demonstração da viabilidade do método analítico desenvolvido.

3.1.2.2. Cocaína

A cocaína é uma substância natural extraída das folhas da planta *Erythroxylum coca*, endógena das regiões da América do Sul, México, Indonésia e Índia Ocidental (PASSAGLIA, 2013). Existem registros de uso da planta em diversos momentos da história: folhas foram encontradas em múmias no Peru – talvez relacionado ao tratamento de feridas ou ao processo de mumificação -; impostos sobre a planta foram cobrados por Espanhóis durante a colonização em meados do século XV na América do Sul – seu uso era relacionado à perda de apetite e à maior disposição de trabalhadores de minas -; a extração do alcalóide cocaína no século XIX na Alemanha, com a descrição de seu efeito anestésico (GOLSTEIN; LAURIERS; BURDA, 2009). Ainda no século XIX, a cocaína foi amplamente incluída em bebidas, como vinho e Coca-Cola, por apresentar características revigorantes, e foi também estudada por Sigmund Freud. No século XX, foram descobertas as propriedades de adicção da cocaína, e seu uso passou a ser restrito (GOLSTEIN; LAURIERS; BURDA, 2009).

Atualmente, ainda existem muitos usuários de cocaína como droga de abuso de efeitos estimulantes: em 2018, a estimativa era de 19 milhões de usuários em todo o mundo (UNITED NATIONS OF DRUGS AND CRIME, 2020). No Brasil, em 2015, a estimativa era de que 4.683.000 pessoas já tivessem utilizado cocaína em algum momento na vida (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2017). Um estudo toxicológico de casos de mortes violenta, realizado em São Paulo, mostrou a prevalência do uso de cocaína entre as vítimas, salientando a ocorrência do uso da droga com o envolvimento em situações violentas (PEGO *et al.*, 2018). Considerando o cenário de trânsito no país, estudos realizados entre motoristas brasileiros demonstraram que a cocaína é a droga de abuso mais detectada em amostras positivas para substâncias ilícitas (BOMBANA *et al.*, 2017; ZANCANARO *et al.*, 2012).

A cocaína é primariamente metabolizada no fígado, produzindo principalmente dois metabólitos inativos, por hidrólise: a benzoilecgonina e a éster metilecgonina, além de produzir, por oxidação, o metabólito ativo norcocaína (PASSAGLI, 2013). A

figura 2 mostra as estruturas químicas destes compostos, bem como a representação das reações químicas.

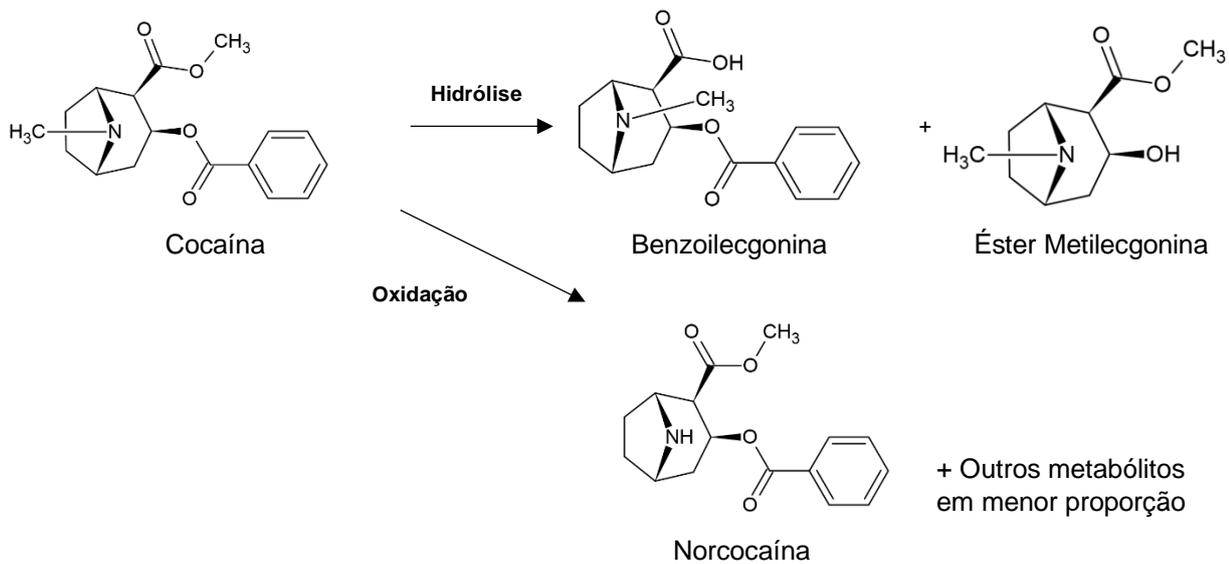


Figura 2. Estruturas químicas da cocaína e de seus principais metabólitos, produzidos através de reações de hidrólise e de oxidação. Figura adaptada de SHIMOMURA; JACKSON; PAUL, 2019.

Embora sangue e urina sejam as principais matrizes de detecção de cocaína, o fluido oral tem se mostrado uma boa matriz alternativa de detecção (FIORENTIN *et al.*, 2017; DAMS *et al.*, 2007). No fluido oral, um estudo (SCHEIDWEILER *et al.*, 2010) demonstrou a presença de cocaína após 0.08–0.32h de aplicação subcutânea, com pico em 0.2–2.1h. Para os metabólitos, a benzoilecgonina e a éster metilecgonina foram detectadas no fluido oral após 1–8 e 2–4h da administração, respectivamente. Ainda, a cocaína foi eliminada do fluido oral antes de seus metabólitos. Outro estudo avaliou as concentrações de cocaína e do metabólito benzoilecgonina após aplicação intravenosa (ELLEFSEN *et al.*, 2016). Neste estudo, o tempo de detecção da cocaína no fluido oral foi entre 6.5-12.5h e, para a benzoilecgonina, entre 28.0-30.5h, ambos na concentração de 1 ng/mL. Por ser detectada rapidamente no fluido oral, e por apresentar um período de detecção mais longo do que a cocaína, o metabólito benzoilecgonina foi escolhido para a detecção de uso de cocaína no método de DOFS desenvolvido nesta Tese.

3.1.2.3. Canabinoides

A *Cannabis sativa* L. é a droga mais comumente utilizada no mundo: já em 2018, estimava-se cerca de 192 milhões de usuários (UNITED NATIONS OF DRUGS AND CRIME, 2020). Além do amplo uso da planta com fins recreativos, a Cannabis tem sido muito estudada para fins medicinais (AMIN; ALI, 2019; WHITE, 2019). Já foram identificados mais de 60 canabinoides na planta, sendo que o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) é o seu principal componente, responsável pelos efeitos psicoativos, tais como euforia, relaxamento, sonolência, falta de concentração, mudanças de humor e alucinações (HUESTIS, 2002). O canabidiol (CBD) é o segundo componente majoritário da Cannabis, apresentando propriedades analgésicas, sedativas e anti-inflamatórias (PISANTI *et al.*, 2017). Entre outros canabinoides muito estudados estão os principais metabólitos do THC (11-OH-THC, um metabólito psicoativo, COOH-THC, um metabólito não-psycoativo, e gluc-COOH-THC, um metabólito muito estudado em amostras de urina) e o canabinol (CBN), um produto indicativo da degradação de THC (KARSCHNER; SWORTWOOD-GATES; HUESTIS, 2020). A figura 3 mostra as estruturas químicas destes seis canabinoides.

Diferentes cenários das análises toxicológicas forenses demandam a análise e o monitoramento do uso de Cannabis. Particularmente, destaca-se o fato de que a Cannabis, juntamente com o álcool, está entre as drogas de abuso mais prevalentes em condutores envolvidos em acidentes de trânsito de maior gravidade (WARD *et al.*, 2018; DOWNEY *et al.*, 2013). Em muitos países da Europa e Estados Unidos, por exemplo, a triagem de uso de drogas entre motoristas de veículos é comum, porém o Brasil ainda enfrenta problemas para a implementação dessa rotina, como uma legislação com penalização leve e falta de profissionais para inspeção (PECHANSKY *et al.*, 2019). Ainda no cenário Nacional, com a recente liberação de produtos medicinais pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2019), cresce também a preocupação com o monitoramento e a fiscalização destes produtos. De acordo com a legislação brasileira, produtos medicinais da Cannabis devem conter principalmente CBD, e concentrações máximas de 30 ng/mL de THC podem estar presentes (BRASIL, 2019). Entretanto, se estes critérios não forem corretamente obedecidos, muitos indivíduos em tratamento terapêutico poderão estar sob os efeitos psicoativos da Cannabis. Neste contexto, há também uma tendência de que o número de condutores de veículos sob efeito da Cannabis possa aumentar (FINK *et al.*, 2020).

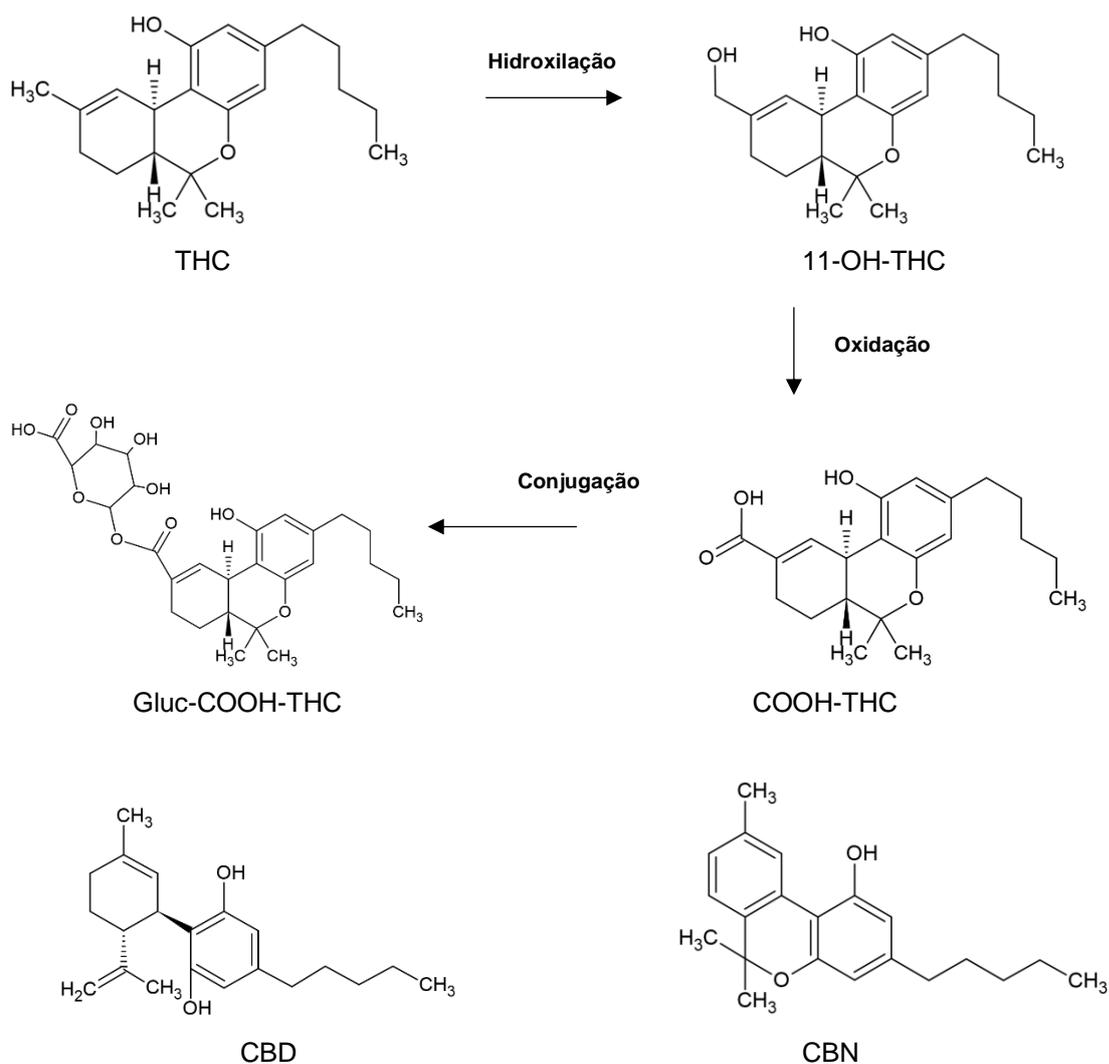


Figura 3. Estruturas químicas dos principais canabinoides estudados. THC: Δ 9-tetrahydrocannabinol; 11-OH-THC: 11-hidróxi- Δ 9-tetrahydrocannabinol; COOH-THC: 11-nor-9-carboxi- Δ 9-tetrahydrocannabinol; Gluc-COOH-THC: 11-nor-9-carboxi- Δ 9-tetrahydrocannabinol glucuronide acid; CBD: canabidiol; CBN: cannabinol. Figura adaptada de PASSAGLIA, 2013.

Considerando o impacto da Cannabis no desempenho dos condutores e o consequente risco de acidentes de trânsito, torna-se necessário o monitoramento de canabinoides em matrizes biológicas que permitam relacionar o seu uso à redução da habilidade de dirigir com segurança, como sangue e fluido oral (WALSH *et al.*, 2008). É importante ainda salientar que os testes de triagem existentes para Cannabis em fluido oral, particularmente para detecção de THC, apresentam uma série de limitações (DOBRI; MOSLEHI; DAVIES, 2019). Por isso, novos métodos, mais eficientes e de menor custo, precisam ser desenvolvidos para identificação de Cannabis nessa matriz biológica, considerando suas vantagens. Nesta Tese, THC e

CBD foram os canabinoides de escolha para o desenvolvimento de método de triagem de Cannabis em DOFS.

3.1.2.4. Cetamina

A cetamina é uma substância sintética pertencente ao grupo das arilciclohexaminas, juntamente com a fenciclidina (ou “PCP”). A figura 4 representa essas estruturas. Esse grupo de compostos atua como antagonistas de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), e por isso essas substâncias foram estudadas como anestésicos de efeito dissociativo (HO; DARGAN, 2016).

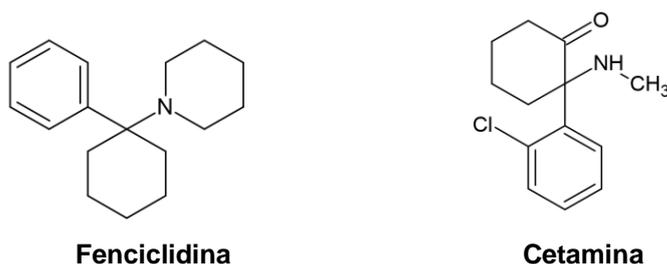


Figura 4. Estruturas químicas da fenciclidina e da cetamina. Figura adaptada de HO; DARGAN, 2016.

A fenciclidina foi o primeiro composto desse grupo a ser produzido, na década de 50, e chegou a ser aprovada pela instituição norte-americana *Food and Drug Administration* (FDA), como anestésico para humanos. Porém, após o relato de efeitos adversos severos (como agitação, psicose e catatonismo), seu uso clínico foi descartado. Nos anos 60, a cetamina foi então sintetizada e demonstrou efeitos anestésicos equivalentes à fenciclidina, porém com efeitos colaterais reduzidos, particularmente com relação a delírios. Seu uso como anestésico humano foi aprovado pelo FDA, porém com algumas restrições. Atualmente, a cetamina é um anestésico de uso comum em medicina veterinária (HO; DARGAN, 2016).

Além de anestésico, a cetamina apresenta outras aplicações, como analgésico no manejo de dores agudas e crônicas, no tratamento de depressão, de asma e de câncer, na recuperação de adicção de outras drogas e como um modelo para estudos de esquizofrenia. Porém, por apresentar efeitos como dissociação da realidade, melhora do humor, euforia, distorções visuais e auditivas e perda de atenção e de memória, a cetamina tornou-se uma substância de abuso, a partir nos anos 90, principalmente por frequentadores de festas. Altas doses da substância podem

também provocar redução da função motora, severa distorção da realidade (com experiências de sair do corpo), alucinações, taquicardia e depressão respiratória, podendo levar à morte (NOWACKA; BORCKYC, 2019; PONCE; FUKUSHIMA, 2017). A cetamina também já foi descrita como uma droga facilitadora de estupro (SHBAIR; LHERMITTE, 2010).

Considerando o cenário do trânsito, um estudo realizado em Hong Kong (CHENG *et al.*, 2007) detectou a presença de cetamina no fluido oral de 39 dos 62 participantes, os quais foram abordados ao saírem de festas. Os pesquisadores observaram os efeitos físicos nos usuários, relatando falta de convergência, nistagmo no olhar, elevada frequência de pulso, falha de atenção e de coordenação para caminhar e manter-se em uma perna. Ainda, os níveis de cetamina encontrados no fluido oral foram altos (>300 ng/mL).

Outro estudo, na Austrália (CHU *et al.*, 2012), avaliou a incidência de drogas detectadas no fluido oral de 853 motoristas, coletados em barreiras policiais nas estradas. Destes, 96% apresentou resultado positivo para alguma droga proscrita, sendo 1.5% dos casos positivos para cetamina.

No Brasil, a cetamina encontra-se na lista de substâncias C1 (substâncias sujeitas ao controle especial) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2017). Porém, por tratar-se de um medicamento de uso veterinário, existe a preocupação de que a droga possa ser adquirida facilmente pelos usuários, e essa questão já foi discutida pelo Poder Legislativo em São Paulo (ASSEMBLÉIA LEGISLATIVA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2006).

3.1.2.5. Mitraginina

Mitragyna speciosa é uma planta pertencente à família Rubiaceae, originária do sudeste asiático (ADKINS; BOYER; McCURDY, 2011). Conhecida como “Kratom”, a planta é conhecida por seu valor medicinal, indicada para tratamento de febre, de diarreia, de diabetes, de dores, de feridas e para reduzir a fadiga de atividades físicas. Com o tempo, também ficou conhecida por aliviar os sintomas de abstinência de opioides; a planta também apresenta maior disponibilidade e custo reduzido, comparado à heroína, utilizada para o mesmo efeito (MEIRELES *et al.*, 2019; ADKINS; BOYER; McCURDY, 2011). Em pequenas quantidades (1-5 g), o kratom produz moderados efeitos estimulantes; em médias doses (5-15 g) os efeitos são similares

ao uso de opioides – agindo na analgesia - e, em altas doses (> 15 g), os efeitos são sedativos (MEIRELES *et al.*, 2019). A figura 5 resume os principais receptores onde o kratom atua, bem como os principais efeitos clínicos da substância. O kratom atua como um anti-inflamatório por agir na rota das ciclooxigenases, COX-1 e COX-2, responsáveis por catalisar a formação de prostaglandina, um dos maiores mediadores da inflamação (EASTLACK; CORNETT; KAYE, 2020; MEIRELES *et al.*, 2019; WHITE, 2019). Também tem alta afinidade por receptores mu-opioides, que mediam reações de analgesia, de depressão respiratória, de euforia e também provocam efeitos gastrointestinais, sendo por isso usada para tratamento de diarreia (EASTLACK; CORNETT; KAYE, 2020; MEIRELES *et al.*, 2019; WHITE, 2019). Há também um efeito agonista nos receptores alfa-2, que foi associado com a redução de sintomas de abstinência de opioides, e inibe canais de potássio, o que pode provocar o efeito *Torsades de Pointes* – do francês “torção das pontas” – uma arritmia ventricular identificada pelo exame de eletrocardiograma (WHITE, 2019). Outros efeitos clínicos observados incluem convulsões e hiperpirexia – ou febre -, decorrentes de efeitos estimulantes da substância, o que pode conduzir à rabdomiólise (destruição de músculos estriados) e morte. Efeitos hepatotóxicos, que podem conduzir à morte, também foram observados (EASTLACK; CORNETT; KAYE, 2020; WHITE, 2019).

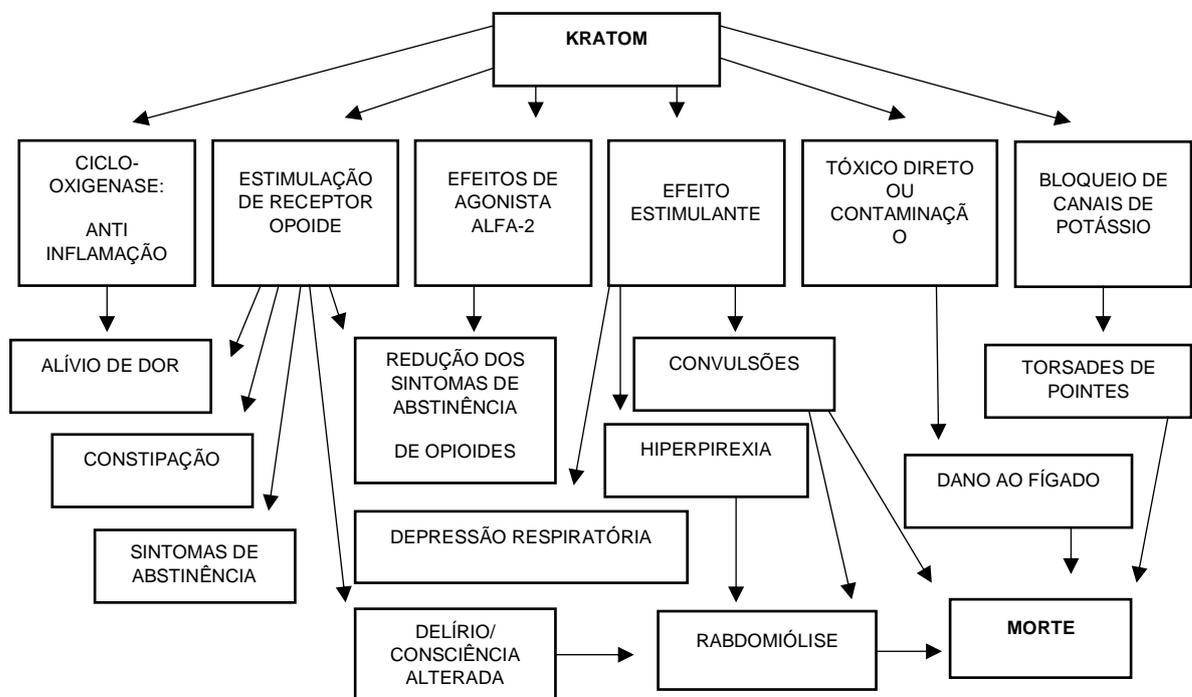


Figura 5: Principais efeitos do kratom no corpo humano. Adaptado de WHITE, 2019.

Mais de 40 alcalóides já foram identificados nas folhas de *Mitragyna speciosa* e, entre esses, a mitraginina é o principal composto – abrange cerca de 66% dos alcalóides extraídos das folhas com solventes orgânicos (ADKINS; BOYER; McCURDY, 2011; YA *et al.*, 2019). A mitraginina (Figura 6) é uma molécula básica (pKa = 8.1) e lipofílica (logP = 1.73), e sua hidrofobicidade e baixa solubilidade em água, associada à alta variabilidade da disponibilidade da droga em diferentes fluidos biológicos (como líquido estomacal e líquido intestinal) e à sua degradação em ambientes ácidos, provavelmente são os motivos da variabilidade farmacológica da planta, descrita na literatura (RAMANATHAN *et al.*, 2015).

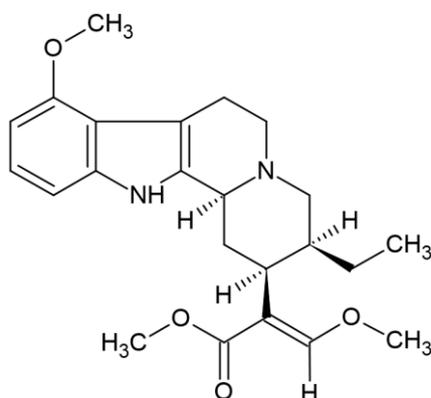


Figura 6: Estrutura química da mitraginina. Figura adaptada de YA *et al.*, 2019.

Atualmente a substância tem se tornado mais comum na Europa e nos Estados Unidos e, diferentemente do Sudeste Asiático, já provocou mortes (VELTRI; GRUNDMANN, 2019). Alguns estados dos Estados Unidos já consideram a mitraginina uma substância ilegal, porém muitos produtos de kratom estão sendo vendidos nos demais estados (POST *et al.*, 2019). A substância não é aprovada para uso medicinal pelo FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2019), e é classificada como uma droga preocupante pela instituição norte-americana *Drug Enforcement Administration* (DEA) (DRUG ENFORCEMENT ADMINISTRATION, 2017). Entre o período de 2011 e 2017, nos Estados Unidos, 1807 casos de intoxicação com mitraginina foram reportados, bem como 11 mortes (POST *et al.*, 2019). Desta forma, o uso dessa substância tem aumentado, criando também a necessidade de desenvolvimento de métodos analíticos para sua detecção.

3.1.3. PREPARO DE AMOSTRAS: *DRIED ORAL FLUID SPOTS (DOFS)*

A técnica de *Dried Matrix Spots (DMS)* consiste na aplicação de pequenas quantidades de uma matriz biológica sobre um papel filtro com especificações próprias, as quais permitem a difusão da amostra e, após a secagem, aumentam sua conservação ao longo do tempo (HANNON; THERRELL, 2014; MEI *et al.*, 2001). Esse método de coleta vem sendo utilizado desde a década de 1960, sendo conhecida para detecção neonatal de fenilcetonúria em sangue, o “teste do pezinho” (GUTHRIE; SUSI, 1963), o qual possibilitou a redução da quantidade de amostra necessária e facilitou a coleta de sangue em crianças. Desde então, foram desenvolvidos muitos métodos para detecção de substâncias diversas nos chamados *dried blood spots (DBS)*, especialmente após a introdução da técnica de espectrometria de massas nos anos 90 (ZAKARIA *et al.*, 2016).

Para o correto uso científico da técnica de DBS, é necessário um controle de qualidade e recomendações específicas (TIMMERMAN *et al.*, 2013; TIMMERMAN *et al.*, 2011), que também passaram a ser seguidas para outras matrizes biológicas, como o fluído oral. O documento NBS-01-A6 da instituição norte-americana *Clinical and Laboratory Standards Institute* (HANNON *et al.*, 2013) estabeleceu que o papel filtro para coleta deve ser feito de fibras de 100% puro algodão, sem aditivos, com pH entre 5,7 e 7,5 e com teor de cinzas máximo de 0,1%. Além disso, a espessura e a densidade do papel filtro devem ser levadas em consideração, pois essas características influenciam diretamente na absorção e na dispersão da amostra (HANNON *et al.*, 2013). Ainda é preciso considerar a padronização do volume de amostra e o tempo ideal de secagem da amostra no papel filtro, para evitar o crescimento de microorganismos durante o armazenamento e a consequente degradação da amostra (ZAKARIA *et al.*, 2016; MEI *et al.*, 2001). Durante o transporte e o armazenamento à longo prazo, as amostras devem ser protegidas de umidade e de exposição à luz solar, bem como de altas temperaturas, para manter a sua estabilidade (ZAKARIA *et al.*, 2016).

Entre as vantagens do uso de DMS, estão o uso de baixo volume de amostra, o relativo baixo custo do papel filtro, o fácil transporte e o simples armazenamento - devido ao uso de um pequeno papel filtro -, e alta estabilidade das amostras, facilitando a coleta de amostras em locais afastados, bem como a cadeia de custódia e guarda de contraprovas, quando necessário (ZAKARIA *et al.*, 2016; HANNON *et al.*,

2014). Em relação ao transporte, enquanto amostras líquidas de fluido oral ocupam frascos grandes que necessitam de refrigeração durante o transporte, além de apresentar risco de vazamento da amostra ou de dano ao frasco ao longo do trajeto, os DOFS ocupam espaços reduzidos e eliminam os riscos de perda de amostra por danos físicos. Também é importante ressaltar a diminuição no risco de contaminação e de exposição ocupacional, já que poucos são os patógenos capazes de sobreviver por longos períodos no papel (MEI *et al.*, 2001), e a redução da quantidade de solvente para extração das amostras do papel filtro, reduzindo os custos de compra de solventes e de tratamento de resíduos, bem como os danos ao meio ambiente. Considerando o fluido oral como a matriz de interesse, a utilização de DOFS ainda oferece mais uma vantagem: a coleta simples e pouco invasiva, que dispensa a necessidade de treinamento e de um profissional da área da saúde para realizá-la, como no caso da coleta de sangue. Ainda, uma vez que a amostra pode ser coletada por simples expectoração em um tubo de plástico estéril, a coleta dispensa o uso de coletores de fluido oral, reduzindo custos.

A Tabela 1 mostra estudos anteriores que já foram realizados utilizando os DOFS. O primeiro estudo foi realizado em 2014, e mostrou a extração de lidocaína de DOFS, como demonstração de seu uso (ABDEL-REHIM; ABDEL-REHIM, 2014). O estudo de DOFS para o monitoramento do uso terapêutico de substâncias ganhou espaço, pela praticidade de coleta e de transporte em clínicas de tratamento, e já foi estudado para detecção de antiepiléticos (CARVALHO *et al.*, 2019a), de antipsicóticos (CAMELO *et al.*, 2019) e de metadona e de 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EDDP) (RIBEIRO *et al.*, 2019). No diagnóstico clínico, o uso de DOFS já foi estudado para *screening* de diabetes mellitus (NUMAKO *et al.*, 2016) e para avaliação de atividade enzimática durante tratamento de câncer (ANTUNES *et al.*, 2019).

No âmbito da Toxicologia Forense, a detecção de drogas de abuso em DOFS foi realizada pela primeira vez por Stoykova (2016), porém a pesquisadora estudou apenas um protocolo de extração de substâncias de abuso. A validação completa de um método analítico para quantificação de drogas foi realizada pela primeira vez pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Análises e Pesquisas em Toxicologia (LABTÓXICO), na UFRGS (JACQUES; KERPEL; LIMBERGER, 2019), utilizando cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, anfetamina e MDMA, como demonstração da viabilidade do método. Em DBS, diferentes drogas de abuso têm sido estudadas,

como fentanil e análogos (SEYMOUR *et al.*, 2019), anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, morfina, codeína, 6-acetilmorfina, cocaína, benzoilecgonina, metadona e EDDP (SIMÕES; ALENJO; DIAS, 2018), canabinóides naturais e sintéticos (PROTTI *et al.*, 2017) ou mesmo o *screening* simultâneo de 64 diferentes drogas de abuso (AMBACH *et al.*, 2014).

Cabe salientar que, devido às propriedades físico-químicas específicas de cada substância, é necessária a otimização do método de extração para analito de interesse (ZAKARIA *et al.*, 2016). Na tabela 1, são apresentados os parâmetros utilizados na otimização de métodos envolvendo DOFS: a escolha do papel filtro, a quantidade de amostra aplicada, o tempo de secagem, o processo de extração (incluindo a escolha do solvente de extração, os parâmetros de tempo de agitação/centrifugação, o uso de sonicação e a temperatura), o instrumento de detecção/quantificação dos analitos, e o limite de detecção/quantificação.

Na maioria dos estudos prévios com DOFS (Tabela 1) observa-se o uso do papel filtro Whatmann 903[®], o qual apresenta certificação pelo FDA e por isso é recomendado pelo órgão norte-americano *Newborn Screening Quality Assurance Program* - NSQAP (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2020). Porém, um papel filtro não especificado foi utilizado no primeiro experimento com DOFS (ABDEL-REHIM; ABDEL-REHIM, 2014) e no primeiro experimento com drogas de abuso (STOYKOVA, 2016), e o papel filtro DMPK-C também já foi utilizado (NUMAKO *et al.*, 2016). O volume de amostra aplicada foi 50 µL na maioria dos estudos, à exceção do estudo de NUMAKO *et al.* (2016), que utilizaram apenas 3 µL, e de STOYKOVA (2016), que utilizou 250 µL. O tempo de secagem variou de alguns minutos a *overnight*, bem como o uso de um secador de cabelos é relatado (NUMAKO *et al.*, 2016). Em relação aos solventes de extração, observa-se o uso de metanol, metanol acidificado com ácido fórmico, acetonitrila, álcool isopropílico, etil acetato com álcool isopropílico, etil acetato com NaOH e uma mistura de acetonitrila, tampão acetato de amônia a 14 mM e metanol (Tabela 1). As quantidades de solvente utilizadas variaram entre 50 µL e 5 mL, demonstrando a necessidade de baixos volumes no método de extração de amostra e evidenciando as vantagens econômicas e ao meio ambiente. A maior parte dos estudos utiliza a centrifugação para a extração dos analitos, porém a sonicação também foi incluída nos protocolos de Toxicologia Forense (JACQUES; KERPEL; LIMBERGER, 2019; STOYKOVA, 2016). A evaporação do solvente com jato de nitrogênio é amplamente utilizada, e a

reconstituição da amostra com solvente e volume são otimizados para o instrumento de análise escolhido. As cromatografias gasosa e líquida, acopladas à detectores de espectrometria de massas, foram os métodos mais utilizados para análise de DOFS, permitindo baixos limites de detecção (Tabela 1). A estabilidade das amostras foi estudada entre 3 dias e 2 meses (Tabela 1).

Tabela 1. Estudos utilizando DOFS como método de coleta para detecção e análise de substâncias diversas.

Aplicação dos DOFS	Analito	Amostra	Processo de Extração	Método Analítico	Limite de Detecção	Estabilidade	Referência
Monitoramento do uso terapêutico de substâncias	Metadona e EDDP	50 µL de fluido oral em um papel filtro Whatmann 903®, seco <i>overnight</i> .	Imersão do spot contendo a amostra em 1mL de álcool isopropílico e 20 µL de padrões internos. Agitação do tubo por 1min, seguido de centrifugação por 15min, evaporação de todo o solvente com nitrogênio e reconstituição do resíduo em 50 µL de metanol.	GC-MS/MS ¹	5 (Metadona) e 10 (EDDP) ng/mL	2 meses	Ribeiro <i>et al.</i> , 2019.
Toxicologia Forense	Cocaína, Benzoylcegonina, Cocaetileno, Anfetamina e MDMA	50 µL de fluido oral em um papel filtro Whatmann 903®, seco por pelo menos 2h30min.	Adição de 200 µL de acetonitrila, tampão acetato de amônia a 14 mM e metanol (55:35:10 v/v) ao spot, vórtex do tubo e 10 min de sonicação. Remoção do papel filtro e filtração do sobrenadante.	LC/MS ²	40 ng/mL	3 dias	Jacques <i>et al.</i> , 2019.
Monitoramento do uso terapêutico de substâncias	Antipsicóticos	50 µL de fluido oral em um papel filtro Whatmann 903®, seco por 1h à 36°C.	Adição de 2 mL de metanol (pH 5) com 25 µL de padrões internos ao spot, e agitação por 5min. Após, foi conduzida centrifugação por 15 min, secagem do solvente com nitrogênio e reconstituição em 50 µL de solvente para derivatização e injeção da amostra.	GC-MS/MS ¹	5 e 10 ng/mL	4 dias	Caramelo <i>et al.</i> , 2019.

Aplicação dos DOFS	Analito	Amostra	Processo de Extração	Método Analítico	Limite de Detecção	Estabilidade	Referência
Avaliação de Atividade Enzimática durante Tratamento de Câncer	Uracil (U) and dihydrouracil (UH ₂)	50 µL de fluido oral em um papel filtro Whatmann 903®, seco por 3h.	Adição de 5 mL of etil acetato: álcool isopropílico (85:15) e 100 µL de padrões internos aos spots. Homogeneização por 30min e centrifugação por 15 min. 3.8 mL da solução foram transferidos para um novo tubo, o solvente foi evaporado à 60°C à vácuo, e reconstituído com 100 µL de água ultrapura.	LC-MS/MS	10 ng/mL	N/I*	Antunes <i>et al.</i> , 2019.
Monitoramento do uso terapêutico de substâncias	Antiepiléticos	50 µL de fluido oral em um papel filtro Whatmann 903®, seco por 1h.	Adição de 1mL de metanol acidificado com ácido fórmico (pH 5.5) e 20 µL de padrões internos. Agitação por 5 min e centrifugação por 15 min. O solvente foi evaporado com fluxo de nitrogênio e reconstituído em 80 µL de fase móvel.	HPLC–DAD ³	0.1 µg/mL	3 semanas	Carvalho <i>et al.</i> , 2018.
Toxicologia Forense	Anfetamina, metanfetamina, MDMA, THC, cocaína, morfina, metadona, clonazepam	250 µL de fluido oral em papel filtro não especificado, seco por 2h.	DOFS foram cortados e colocados em solução etanólica com padrão interno (50 µL) e hidróxido de sódio (500 µL). Após 3 min de sonicação, foram adicionados 3 mL de etil acetato e o papel foi apertado com uma seringa. O solvente foi evaporado com nitrogênio líquido e reconstituído para análise.	GC-MS	10-100 ng/mL	N/I*	Stoykova, 2016.

Aplicação dos DOFS	Analito	Amostra	Processo de Extração	Método Analítico	Limite de Detecção	Estabilidade	Referência
Screening para Diabetes Mellitus	D,L-ácido láctico	3 µL de fluido oral em um papel filtro DMPK-C de 5mm, seco com ar frio de um secador de cabelo.	Adição de 50 µL de acetonitrila ao <i>spot</i> e agitação à 60°C por 90 min. Após, adição de 300 µL de água e centrifugação por 5 min. Uma alíquota de 5 µL foi encaminhada para análise.	UPLC-ESI-MS/MS ⁴	15 pmol	14 dias	Numako <i>et al.</i> , 2016.
Demonstração do uso de DOFS	Lidocaína	50 µL de fluido oral em um papel filtro não especificado, seco por alguns minutos.	Adição de 150 µL de acetonitrila com padrão interno. Vortex por 30 s e amostra encaminhada para análise.	LC-MS/MS	N/I*	3 dias	Abdel-Rehim <i>et al.</i> , 2014.

*N/I: não informado.; ¹GC-MS/MS: cromatografia gasosa acoplada à detecção por espectrometria de massas em tandem; ²LC-MS: cromatografia líquida acoplada à detecção por espectrometria de massas; ³HPLC-DAD: cromatografia líquida de alta performance com detecção por arranjo de diodos; ⁴UPLC-ESI-MS/MS: cromatografia líquida de ultra performance acoplada à detecção por espectrometria de massas em tandem por ionização de *electrospray*.

3.1.4. MÉTODO ANALÍTICO: LC-MS/MS

Por muitos anos, a técnica de GC-MS foi o padrão-ouro para a identificação confiável de compostos em Toxicologia Forense, por causa de seu alto poder de separação e alta seletividade da espectrometria de massas. Entretanto, essa técnica apresenta limitações na análise de moléculas polares, termolábeis e/ou não-voláteis (ZHANG *et al.*, 2016). Ainda, o preparo de amostras para métodos de GC-MS é muitas vezes trabalhoso, e moléculas mais polares necessitam passar pelo processo de derivatização antes da análise (MARQUET; LACHÂTRE, 1999). Neste contexto, a técnica de LC-MS se tornou popular nos anos 90, com o objetivo de preencher essas limitações (MARQUET; LACHÂTRE, 1999). A figura 7 mostra a cobertura das técnicas de GC-MS e de LC-MS considerando as características químicas (peso molecular, polaridade e volatilidade) de diferentes substâncias, demonstrando que as duas técnicas são complementares para a análise de inúmeros diferentes compostos, porém a abrangência de compostos é maior para a técnica de LC-MS.

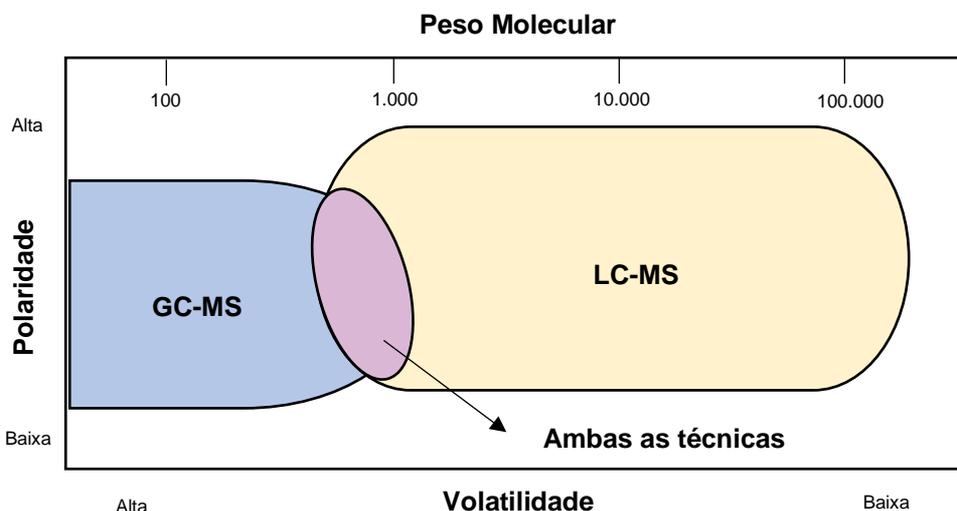


Figura 7. Mapa de cobertura das técnicas de GC-MS e de LC-MS conforme as características químicas de diferentes analitos. Figura adaptada de ZHANG *et al.*, 2016.

O aprimoramento da técnica de cromatografia líquida com detectores de massa de triplo quadrupolo (LC-MS/MS) permitiu o aumento do rendimento e da sensibilidade dos métodos (ZHANG *et al.*, 2016; MARQUET; LACHÂTRE, 1999). Devido à sua vasta possibilidade de aplicação, confiabilidade dos resultados e precisão, o método de LC-MS/MS foi se tornando muito importante nos últimos anos, e é amplamente

utilizado em diferentes análises de rotina da Toxicologia Forense (REMANE; WISSENBACH; PETERS, 2016; PETERS, 2011; PETERS; REMANE, 2012). Ainda, é amplamente utilizado em pesquisas científicas de novas metodologias analíticas, incluindo a possibilidade de análise de múltiplas substâncias (CUNHA *et al.*, 2020; SHIN *et al.*, 2019) e de tópicos emergentes, como a análise de novas substâncias psicoativas (CUNHA *et al.*, 2020; FRANK; MONTEIRO; LIMBERGER, 2019) e de matrizes alternativas, como o fluido oral (COULTER; MOORE, 2019).

Entre as vantagens da técnica de LC-MS/MS estão o uso de baixos volume de amostra e a simplicidade no preparo pré-analítico, dispensando a necessidade de derivatização dos analitos (ZHANG *et al.*, 2016). Além de sua alta especificidade, a sua alta sensibilidade permite a análise de compostos em concentrações tão baixas quanto pg/mL, dependendo do preparo de amostra, da adequada separação cromatográfica e do instrumento de espectrometria de massas para detecção (AUBRY, 2011).

Quanto às desvantagens da técnica, destaca-se o efeito de matriz, que se caracteriza pela presença de substâncias da matriz biológica que co-eluem com o analito de interesse, provocando interferências no processo de ionização, e deve ser estudado no desenvolvimento de métodos, como parte do processo de validação (ZHANG *et al.*, 2016; PETERS; REMANE, 2012). Entre as possibilidades para diminuição do efeito de matriz, estão o uso de colunas cromatográficas específicas, como colunas do tipo HILIC (*hydrophilic interaction chromatography*), ou de aditivos de fase móvel, bem como o adequado preparo de amostras, incluindo por exemplo a precipitação de proteínas (MALLET; MAZZEO, 2003).

3.1.5. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Sempre que um novo método analítico em Toxicologia Forense é desenvolvido, modificado ou implementado, a validação desse método é fundamental, considerando que resultados confiáveis e precisos são um pré-requisito para a correta interpretação de achados toxicológicos. A aplicabilidade de cada método analítico deve ser demonstrada, provando que cada substância é corretamente identificada e/ou quantificada da mesma forma em diferentes dias e/ou situações, e isso faz parte do controle de qualidade e de acreditação de laboratórios (PETERS; DRUMMER, MUSSHOFF, 2007).

Algumas das principais guias internacionais desenvolvidas para a padronização da validação de métodos analíticos em Toxicologia Forense incluem documentos formulados pelo FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2018), pelo AAFS (AMERICAN ACADEMY OF FORENSIC SCIENCES, 2019) e pela UNODC (UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME, 2009). No Brasil, a ANVISA também desenvolveu um documento com as recomendações mínimas para a validação de métodos por Laboratórios no país (BRASIL, 2012). Essas quatro guias exigem os seguintes parâmetros de validação de método: seletividade/especificidade, linearidade, exatidão, precisão, limite de quantificação, efeito de matriz (supressão ou aumento da ionização) e estabilidade. O efeito residual é mencionado nas guias do FDA, do AAFS e da ANVISA, mas não está descrito na guia da UNODC. O limite de detecção é mencionado somente nas guias do AAFS e da UNODC. O critério de recuperação é somente exigido pelas guias do FDA e da UNODC. A guia da AAFS ainda fala sobre o estudo de diluição de amostras, quando aplicável. Adicionalmente, a guia do FDA apresenta critérios de validação de métodos que utilizam *dried spots* e sangue (DBS), incluindo parâmetros de controle de temperatura de estoque e de manipulação de amostras, homogeneidade da amostra no papel filtro, influência do hematócrito, estabilidade, efeito residual e reproducibilidade (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2018).

Nesta Tese, o trabalho científico de validação de métodos seguiu a guia do AAFS (AMERICAN ACADEMY OF FORENSIC SCIENCES, 2019). A tabela 2 mostra os parâmetros recomendados, o que esses parâmetros avaliam, os experimentos que são necessários para demonstrar o propósito do método, e os critérios de aceitabilidade dos testes, conforme o documento mencionado.

Tabela 2. Parâmetros de validação de métodos analíticos e recomendações da guia do AAFS (AMERICAN ACADEMY OF FORENSIC SCIENCES, 2019).

Parâmetro	Avaliação	Experimentos Necessários	Crítérios de Aceitabilidade
Seletividade/ Especificidade	Capacidade do método de identificar somente a substância de interesse.	Avaliar matrizes brancas no método (pelo menos 10 amostras). Uso de matrizes brancas contendo padrão interno (isótopo estável). Testar outras substâncias no método.	Não apresentar interferências, incluindo estudos com a matriz biológica, com o padrão interno e com outras substâncias.
Linearidade	Faixa de concentração da substância (ou relação da área do pico do analito e de seu padrão interno) em que a resposta do instrumento analítico é linear, utilizada para quantificação de concentrações desconhecidas.	Pelo menos 6 concentrações diferentes de zero devem ser incluídas no modelo de calibração, apropriadamente espaçadas entre si. São necessárias 5 repetições de cada concentração, em 5 corridas diferentes.	Necessário obter exatidão e precisão entre as repetições. Realizar análise estatística para confirmar linearidade (regressão linear, ANOVA).
Efeito Residual	Assegura que valores altos de uma amostra não estão sendo acumulados no equipamento, contaminando a amostra seguinte.	Correr amostras brancas, sem a matriz biológica, em triplicatas, logo após uma amostra contendo uma grande quantidade do analito de interesse.	As concentrações do analito devem ser inferiores ao LOD.
Exatidão	Garante a concordância do valor calculado por um ensaio e o valor de referência teórico.	Fortificar amostras em triplicatas, em pelo menos 5 dias diferentes, para concentrações baixa, média e alta do analito.	Obter no máximo $\pm 20\%$ de variação de cada concentração da amostra, comparada ao valor teórico.
Precisão	Expressa pelo coeficiente de variação, entre corridas de um mesmo dia e de dias diferentes. É calculado pelo desvio padrão dividido pela média de cada concentração.	Fortificar amostras em triplicatas, em pelo menos 5 dias diferentes, para concentrações baixa, média e alta do analito.	Não pode exceder $\pm 20\%$ de variação, tanto em corridas de um mesmo dia, como em corridas de dias diferentes.

Parâmetro	Avaliação	Experimentos Necessários	Critérios de Aceitabilidade
LOD	A menor quantidade da substância que pode ser identificada na amostra (deve ser 10 ng/mL ou mais baixa)	Deve ser acessado em pelo menos 3 corridas, em duplicata, com pelo menos 3 diferentes fontes brancas da matriz biológica.	Pode ser estimado de diferentes formas (visualmente, a partir do ruído do sinal (> 3.3 do sinal), ou utilizando uma curva de calibração linear, por exemplo).
LOQ	O menor valor da substância que pode ser quantificado na amostra (deve ser 10 ng/mL ou mais baixa).	Um mínimo de 3 amostras fortificadas deve ser analisado em 3 corridas diferentes.	Deve atender aos critérios de exatidão e de precisão.
Efeito de Matriz	Se a matriz biológica produz supressão ou ganho de ionização no método analítico.	Comparar amostras com (n= 10) e sem (n= 6) a matriz biológica, em concentrações baixa e alta. Dividir a média das áreas dos picos das amostras com a matriz biológica sobre a média dos picos das amostras sem a matriz biológica.	Não deve ser exceder $\pm 25\%$ de efeito de matriz.
Estabilidade	Conforme a necessidade do teste/amostra.	Pode ser realizado em amostras pré-análise (como DOFS) ou pós-extração, como a avaliação do tempo e da temperatura de armazenamento.	Atender resultados semelhantes aos de amostras frescas.
Diluição de amostras	O efeito da diluição deve ser avaliado se a prática for uma rotina do laboratório.	Diluir amostras (por exemplo, 1:2) e testar no método.	Amostras diluídas devem atender aos critérios de exatidão e de precisão.
Recuperação	O valor percentual obtido após a extração dos analitos da amostra biológica.	Comparar amostras com (n= 10) e sem (n= 6) a matriz biológica, em concentrações baixa e alta.	Critério não obrigatório.

Métodos qualitativos e quantitativos requerem o ensaio de validação. Métodos qualitativos precisam ser avaliados para a possibilidade de efeito residual, quanto à seletividade e interferências, ao efeito de matriz e ao limite de detecção, podendo também ser avaliados para a estabilidade das amostras, se aplicável (AMERICAN ACADEMY OF FORENSIC SCIENCES, 2019).

Para a validação de métodos quantitativos, além de avaliar o efeito residual, a seletividade e a possibilidade de interferências, o efeito de matriz e o limite de detecção, é preciso também estabelecer um modelo de calibração ou linearidade e o limite de quantificação. Ainda, é preciso demonstrar a exatidão e a precisão do método. A estabilidade e a integridade de amostras diluídas também podem ser estudadas em casos específicos (AMERICAN ACADEMY OF FORENSIC SCIENCES, 2019).

Para ambos os testes, qualitativos e quantitativos, é possível ainda o estudo de recuperação da amostra e da eficiência do processo de extração (MATUSZEWSKI, CONSTANZER, CHAVEZ-ENG, 2003).

3.2. DOCUMENTOSCOPIA FORENSE

Em Documentoscopia Forense, os principais métodos de análise são a inspeção física dos documentos e o estudo comparativo de escritos. A inspeção física de documentos permite a detecção de recortes e montagens, de manchas ou marcas diversas, e de alterações de alinhamento do texto e de impressão. Com o auxílio de luzes (como ultravioleta e infravermelho) também é possível identificar elementos de segurança presentes em documentos oficiais, como na Carteira Nacional de Habilitação e no papel moeda, por exemplo. O estudo comparativo de escritos denomina-se grafoscopia e, por meio da análise minuciosa de diversos elementos gráficos, permite identificar a autenticidade e/ou a autoria de assinaturas e de textos (CAMARA & SILVA; FEUERHARMEL, 2014).

Entretanto, muitas vezes a inspeção física e a análise de escritos não são suficientes para resolver todas as questões judiciais em Documentoscopia Forense. Em muitos casos, é questionado se houve adição ou rasura de escritos com canetas distintas da original, como no caso de adulteração de valores de cheques ou de atestados médicos, ou ainda há quanto tempo a tinta foi aplicada no documento, em casos em que há suspeita de alteração de data. Essas situações demandam a análise química de tintas de canetas e, assim, é necessário conhecer a composição e as transformações das tintas de diferentes tipos de canetas, bem como métodos de análise (CAMARA & SILVA; FEUERHARMEL, 2014).

Nesse contexto, em 2018, a Perita Federal Criminal Dra. Carina Maria Bello de Carvalho apresentou sua Tese de Doutorado intitulada “Aplicação de Técnicas Cromatográficas e Espectrométricas no Desenvolvimento de Métodos para Datação e Investigação de Fraudes em Documentos Forenses”, sob orientação da Prof. Dra. Renata Pereira Limberger junto ao PPGCF/UFRGS (CARVALHO, 2018). Neste trabalho, técnicas de GC-MS, de espectrometria de massas utilizando o analisador Orbitrap® e de espectroscopia de infravermelho foram utilizadas na diferenciação (CARVALHO *et al.*, 2018a) e na datação (CARVALHO; ORTIZ; LIMBERGER, 2019; CARVALHO *et al.*, 2019; CARVALHO; ORTIZ; LIMBERGER, 2018) de tintas de canetas esferográficas, e

ainda na detecção de cafeína em papéis de documentos envelhecidos artificialmente (CARVALHO *et al.*, 2018b).

Na presente Tese, o trabalho científico vinculado à área de Documentoscopia Forense foi desenvolvido sob orientação da Dra. Carina Maria Bello de Carvalho, dando continuidade aos seus estudos com tintas de canetas esferográficas.

Apesar da existência de muitos diferentes métodos analíticos para a análise de tintas de canetas esferográficas, novos métodos de baixo custo e que permitem manter a integralidade dos documentos, sem a necessidade de recorte da tinta, podem contribuir muito para o desenvolvimento na área. No capítulo 4 é apresentado um novo método de análise de diferenciação de tintas de canetas esferográficas azuis, utilizando a captura de imagens digitais seguido de análise multivariada. Para clarificar e discutir metodologias aplicadas na análise de tintas de canetas esferográficas, duas revisões bibliográficas são também apresentadas nesta Tese de Doutorado, apresentadas nos capítulos 5 e 6.

3.2.1. ANÁLISE DE TINTAS DE CANETAS ESFEROGRÁFICAS

As análises de tintas de canetas, tanto para a caracterização e diferenciação de tipos e de marcas de canetas, como para o estudo da idade da tinta em um documento, demandam o conhecimento e o uso de métodos analíticos para análise de compostos orgânicos (CARVALHO, 2018).

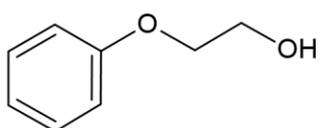
No Brasil, 80% das demandas judiciais envolvendo análises de tinta de canetas referem-se a canetas esferográficas (CAMARA E SILVA; FEUERHARMEL, 2014), por isso estas são o tipo de canetas mais estudados. De modo geral, as tintas de canetas esferográficas são compostas por corantes, veículos, resinas e aditivos. Os corantes são utilizados para determinação da cor da tinta. Os veículos são os componentes da tinta responsáveis pela homogeneização dos corantes e dos demais componentes da tinta, sendo constituídos, usualmente, por solventes voláteis. As resinas conferem à tinta viscosidade, propriedades lubrificantes, aderência ao papel e durabilidade. Por fim, os aditivos são compostos que melhoram o desempenho de uma tinta, como lubrificantes ou inibidores de corrosão da esfera (EZCURRA; GRÁVALOS, 2012; ZACCA; RISTON, 2012).

Existem dois modelos de estudo de tintas de canetas: o modelo estático e o modelo dinâmico. No modelo estático, as tintas são identificadas visualmente ou com ajuda de um microscópio, quando a distinção de sua tonalidade de cor é possível visualmente, ou por métodos analíticos, utilizando a análise da composição química de canetas, que varia entre diferentes marcas. Neste último caso, a tinta questionada é comparada com outra tinta, normalmente constante no mesmo documento. Outra possibilidade também seria comparar a tinta questionada a um banco de dados de tintas de canetas, se disponível (EZCURRA; GRÁVALOS, 2012). Neste contexto, destacam-se uma série de métodos analíticos que produzem uma enorme quantidade de dados químicos. Com a ajuda da análise multivariada, é então possível caracterizar uma determinada tinta e distinguir-se diferentes marcas de canetas esferográficas. Algumas dessas técnicas já desenvolvidas incluem: a espectroscopia de UV-Vis, combinada com análise de componentes principais (PCA, do inglês, *Principal Component Analysis*) e análise por agrupamento hierárquico (HCA, do inglês, *Hierarchical Cluster Analysis*) (ISMAIL; AUSTAD; DESA, 2014), a espectroscopia de infravermelho e PCA (SHARMA; KUMAR, 2017), a espectroscopia de Raman, a PCA, a HCA e a análise discriminante pelo método de quadrados parciais mínimos (PLS-

DA, do inglês, *Partial Least Squares Discriminant Analysis*) (ASRI, ISMAIL, SYUHAILA, 2015), o uso do instrumento VSC6000® e aplicação de PLS-DA (SILVA *et al.*, 2014) e métodos de espectrometria de massas, como o analisador Orbitrap® combinado com PCA e com HCA (CARVALHO *et al.*, 2018a) e o analisador de massas por tempo de voo (ToF-SIMS), aliado à PCA (DENMAN *et al.*, 2010).

No modelo dinâmico, é realizado o estudo da degradação dos componentes das tintas de canetas com o passar do tempo. Resumidamente, no momento da deposição da tinta de caneta no papel, começam a ocorrer diferentes transformações em seus componentes: os solventes evaporam, os corantes degradam e as resinas polimerizam, até chegar em um equilíbrio, quando a tinta perde toda a sua atividade e nenhuma modificação mais acontece. A datação de tintas de canetas é baseada no estudo das transformações da tinta, principalmente pela comparação da tinta intacta, de dentro do cartucho da caneta ou de aplicação recente, com a tinta depositada no papel há um tempo (CALCERRADA; GARCIA-RUIZ, 2015; EZCURRA *et al.*, 2010; WEYERMANN; SPENGLER, 2008). Neste modelo, muitos diferentes métodos analíticos são utilizados para quantificar solventes de tintas de canetas esferográficas ou para avaliar a degradação de corantes.

Para quantificar a quantidade de solvente restante em documentos, diversos estudos (CARVALHO; ORTIZ; LIMBERGER, 2019; KOENIG; WEYERMANN, 2018; DIAZ-SANTANA; VEGA-MORENO; CONDE-HARDISSON, 2017; KOENIG; MAGNOLON; WEYERMANN, 2015; KOENIG *et al.*, 2015; KOENIG; SAN ROMÁN *et al.*, 2015; CARVALHO, 2014) têm usado a abordagem de determinação da quantidade do solvente 2-fenóxi-etanol – apresentado na figura 8 - em função da idade da tinta, por meio da técnica de GC-MS ou de GC com Detecção por Ionização de Chama (GC/FID).



Peso Molecular: 138,2g/mol

Ponto de Ebulição: 247°C

Figura 8. Estrutura química, peso molecular e ponto de ebulição do 2-fenóxi-etanol. Figura adaptada de WEYERMANN *et al.*, 2011.

Em relação ao estudo de degradação de corantes, já foram desenvolvidas técnicas de cromatografia líquida (HOSU; POP; CIMPOIU, 2015; LEE; NUNURUNG; ISHAK, 2014), de espectrometria de massas por *paper spray* (AMADOR *et al.*, 2017), de espectrometria de massas com análise direta (DART-MS) (JONES; McCLELLAND, 2013), de espectrometria de massas com ionização por *eletrospray* (ESI-MS) (LALLI *et al.*, 2010), de espectrometria de massas com ionização de dessorção a laser (LDI-MS) (WEYERMANN *et al.*, 2009) e de espectrometria de massas com ionização por tempo de voo (TOF-MS) (COSTA *et al.*, 2019), demonstrando bons resultados. Técnicas de espectroscopia de UV-Visível (WEYERMANN *et al.*, 2009) e de Raman (SAVIELLO *et al.*, 2019) também já foram desenvolvidas.

3.2.2. ANÁLISE MULTIVARIADA DE IMAGENS

A análise multivariada de dados, por meio do uso de técnicas matemáticas de processamento de dados, como a PCA, a HCA e a PLS-DA, permite a compilação de dados provenientes de técnicas analíticas e, conseqüentemente, a extração de informações de matrizes complexas (FERREIRA, 2015).

A PCA é uma técnica de reconhecimento de padrões, a qual projeta os dados obtidos de diferentes métodos analíticos, reduzindo sua dimensão. Dessa forma, é possível visualizar e analisar a relação das amostras entre si em um gráfico, buscando similaridades, diferenças ou amostras anômalas (FERREIRA, 2015). Na análise de tintas de canetas, por exemplo, após a compilação de dados químicos obtidos em experimentos, é possível agrupar tintas de marcas semelhantes e observar tintas de marcas de canetas distintas em posições distantes no gráfico de PCA.

Ao se decompor uma matriz complexa na PCA, são formadas componentes principais (PCs), constituídas de combinações lineares das variações originais. A PC1 irá representar a maior variação no conjunto de dados, seguida pela PC2 e pelas demais PCs. Assim, na análise de dados, é possível analisar-se diferentes conjuntos de PCs, como PC1xPC2 ou PC2xPC3, por exemplo (BÖCK, 2016). Além das PCs, o conceito de *loadings* é também importante na interpretação dos resultados, representando o quanto cada variável do conjunto de dados contribuiu para a construção de cada PC (BÖCK, 2016).

Complementarmente, a técnica de HCA busca encontrar similaridades entre as amostras, agrupando amostras similares em um mesmo *cluster*. A finalidade da HCA é identificar amostras pertencentes a um mesmo grupo, distinguindo amostras de outros grupos (FERREIRA, 2015).

Carvalho *et al.* (2018) obtiveram dados de espectrometria de massas no instrumento Orbitrap®, para 33 diferentes canetas esferográficas azuis e para 36 diferentes canetas esferográficas pretas. A intensidade relativa dos picos dos principais componentes das tintas foi então analisada por PCA e por HCA. Os resultados da análise multivariada permitiram diferenciar todas as canetas azuis e todas as canetas pretas, mostrando que o analisador de massas foi muito sensível. Ainda, com a PCA foi possível identificar substâncias específicas que contribuíram para a variabilidade entre as diferentes marcas de canetas, incluindo corantes muito utilizados, como o metil violeta e o cristal violeta.

As técnicas de PCA e de HCA podem também ser aplicadas na datação de tintas de canetas. Carvalho *et al.* (2019) aplicaram as técnicas de PCA e de HCA para avaliação de espectros de infravermelho coletados de traços de canetas esferográficas azuis e pretas, de diferentes idades (14 dias, 7 meses, 1 ano, 2 anos, 2 anos e 3 meses, 2 anos e 6 meses). A PCA e a HCA foram capazes de diferenciar tintas de canetas de diferentes idades, agrupando tintas de canetas de idades semelhantes. Ainda, foi possível identificar que picos de absorção de 2-fenóxi-etanol foram responsáveis pela diferenciação entre tintas recentes e antigas.

A PLS-DA também é um método de reconhecimento de padrões, utilizado para individualizar, classificar, discriminar e caracterizar amostras, bem como detectar impurezas. Esse método permite a construção de um modelo com base em amostras de uma classe conhecida, sendo que esse modelo também pode ser usado para prever a classe de amostras desconhecidas (FERREIRA, 2015).

Silva *et al.* (2014) utilizaram dados de 25 canetas esferográficas azuis, obtidos no instrumento VSC6000® para construir um modelo de PLS-DA, incluindo os espectros de canetas como pertencentes ou não pertencentes à classe conhecida. Foram construídos 25 modelos de classes, uma para cada marca de caneta, permitindo identificar e distinguir cada uma delas.

Com o aprimoramento de técnicas de captura e de processamento de imagens, tornou-se possível também aplicar a análise multivariada de imagens (HELFER *et al.*, 2017; BÖCK, 2016), e o uso dessas técnicas vem crescendo em diferentes áreas,

como na toxicologia (MARCELO *et al.*, 2016), na medicina forense (KUCHERYAVSKI; BELYAEV; FOMINYKH, 2009), na indústria farmacêutica (COLUCCI *et al.*, 2019), no controle de qualidade em alimentos (ORLANDI *et al.*, 2018) e na classificação de plantas (RISTIVOJEVIC *et al.*, 2017). Uma imagem é composta de pixels, e é o resultado de luz absorvida, refletida e emitida por uma superfície, e a energia transmitida pode ser capturada por uma câmera (PRATS-MONTALBÁN; JUAN; FERRER, 2011). Os dados de imagens obtidos por câmeras podem ser trabalhados por diferentes programas de análise multivariada, incluindo *softwares* livres - como o Chemostat® (HELFER *et al.*, 2015) - ou pagos, como o MATLAB® ou o Minitab® (KUMAR; SHARMA, 2018). Recentemente foi desenvolvido por cientistas brasileiros um aplicativo para smartphones, o Photometrix PRO®, no qual é possível capturar imagens e proceder com análises de PCA, de HCA e de PLS-DA (HELFER *et al.*, 2017). O aplicativo avalia os pixels de cada imagem baseado na intensidade das cores RGB (vermelho, verde e azul, do inglês, *red, green, blue*), e em modelos derivados do RGB, incluindo combinações com o matiz (do inglês, *hue*) – que diferencia vermelho do amarelo -, a saturação – que diferencia a cor vermelho do rosa -, e a intensidade – que diferencia cores claras e escuras -, além do valor (do inglês, *value*) e da luminosidade, que avaliam o canal RGB (BÖCK *et al.*, 2020; HELFER *et al.*, 2017). O aplicativo Photometrix PRO® foi testado nesta Tese para a diferenciação de canetas esferográficas azuis.

4. CAPÍTULO I

Extraction of Dried Oral Fluid Spots (DOFS) for the Identification of Drugs of Abuse Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

4.1. ARTIGO I

A seguir encontra-se encartado o artigo intitulado “**Extraction of Dried Oral Fluid Spots (DOFS) for the Identification of Drugs of Abuse Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)**”, o qual foi publicado na revista *Forensic Chemistry*, em Maio de 2020, e se encontra disponível online (doi: <https://doi.org/10.1016/j.forc.2020.100254>).

Esse artigo apresenta o desenvolvimento e a validação de um método analítico de coleta de fluído oral em dispositivo de *dried spots* (DOFS), para detecção e quantificação de anfetamina, metanfetamina, benzoilecgonina, ketamina e mitraginina em um instrumento de LC-MS/MS.

5. CAPÍTULO II

Study of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) and Cannabidiol (CBD) Extraction from Dried Oral Fluid Spots (DOFS) And LC-MS/MS Detection

5.1 MANUSCRITO II

A seguir encontra-se encartado o manuscrito intitulado “**Study of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) and Cannabidiol (CBD) Extraction from Dried Oral Fluid Spots (DOFS) And LC-MS/MS Detection**”, o qual encontra-se re-submetido na revista Journal of Cannabis Research, desde a data de 20 de março de 2021.

Esse manuscrito apresenta o desenvolvimento e a validação de um método analítico de coleta de fluido oral em dispositivo de *dried spots* (DOFS), para identificação de THC e de CBD em um instrumento de LC-MS/MS.

6. CAPÍTULO III

Methodologies Applied to Quantitative Analysis of Cannabinoids in Oral Fluid: A Systematic Review

6.1 MANUSCRITO III

A seguir encontra-se encartado o manuscrito intitulado “**Methodologies Applied to Quantitative Analysis of Cannabinoids in Oral Fluid: A Systematic Review**”, o qual foi submetido na revista Journal of Forensic Sciences, na data de 15 de fevereiro de 2021.

Esse manuscrito resume e descreve estudos prévios de métodos analíticos para quantificação de canabinoides em fluído oral.

7. CAPÍTULO IV

Blue Ballpoint Pen Inks Differentiation using Multivariate Image Analysis of Digital Images Captured with PhotoMetrix PRO®

7.1 ARTIGO IV

A seguir encontra-se encartado o artigo intitulado “**Blue Ballpoint Pen Inks Differentiation using Multivariate Image Analysis of Digital Images Captured with PhotoMetrix PRO®**”, o qual foi publicado na revista Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics, em Maio de 2020, e se encontra disponível online (doi: [http://dx.doi.org/10.17063/bjfs9\(3\)y2020331](http://dx.doi.org/10.17063/bjfs9(3)y2020331)).

Esse artigo apresenta um novo método analítico de tintas de canetas esferográficas azuis, utilizando um aplicativo de smartphone para capturar imagens digitais e realizar análise multivariada (PCA, HCA e PLS-DA).

8. CAPÍTULO V

**Blue and Black Ballpoint Pen Inks: A Systematic Review for Ink
Characterization and Dating Analysis**

8.1 ARTIGO V

A seguir encontra-se encartado o artigo intitulado “**Blue and Black Ballpoint Pen Inks: A Systematic Review for Ink Characterization and Dating Analysis**”, o qual foi publicado na revista Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics, em Maio de 2019, e se encontra disponível online (doi: [https://doi.org/10.17063/bjfs8\(3\)y2019113](https://doi.org/10.17063/bjfs8(3)y2019113)).

Esse artigo apresenta uma revisão dos estudos de métodos analíticos desenvolvidos para a diferenciação e para a datação de tintas de canetas esferográficas.

9. CAPÍTULO VI

O Estudo de Tintas de Canetas Esferográficas: uma Revisão da Literatura para a Abordagem Pericial em Documentoscopia Forense

9.1 MANUSCRITO VI

A seguir encontra-se encartado o manuscrito intitulado “**O Estudo de Tintas de Canetas Esferográficas: uma Revisão da Literatura para a Abordagem Pericial em Documentoscopia Forense**”, o qual encontra-se submetido na Revista Brasileira de Criminalística, desde a data de 23 de outubro de 2020.

Esse manuscrito apresenta e discute os principais métodos analíticos utilizados em análise de tintas de canetas esferográficas, destacando a importância do conhecimento desses métodos por Peritos em Documentoscopia.

10. DISCUSSÃO GERAL

Na área de Toxicologia Forense, muitos estudos vêm utilizando fluido oral como matriz biológica para a detecção de drogas de abuso diversas (BASSOTTI *et al.*, 2020; COOMAN *et al.*, 2020; CUNHA *et al.*, 2020; SOBOLESKY *et al.*, 2019; FABRESSE *et al.*, 2018; VALEN *et al.*, 2017), porém cada método desenvolvido apresenta vantagens e desvantagens, considerando a forma de coleta do fluido oral e o método de extração de amostra, bem como as substâncias de interesse.

Por exemplo, no trabalho de Cooman *et al.* (2020), fluido oral foi coletado por simples expectoração em tubos de polipropileno, e os analitos de interesse (canabinoides sintéticos e catinonas) foram extraídos pelo método de SPE. Para a realização deste método, é necessário adquirir cartuchos comerciais nos quais os analitos serão retidos e posteriormente eluídos, aumentando os custos do processo. Considerando a quantidade de 100 µL de fluido oral, foram necessários 7 mL de solventes orgânicos diversos (metanol, 1-butanol, diclorometano) durante as etapas de condicionamento do cartucho, para limpeza da amostra biológica, e de eluição dos analitos. Ainda, além de sucessivas etapas de condicionamento e de eluição, o processo de SPE demandou a evaporação de 2 mL de solventes com o auxílio de nitrogênio líquido, o que também representa um custo.

Nos trabalhos de Bassotti *et al.* (2020) e de Cunha *et al.* (2020), o processamento da amostra de fluido oral envolveu o método de *dilute and shoot* (diluição da amostra e injeção no instrumento analítico) e extração líquido-líquido, respectivamente. Estes estudos reportam a detecção e a quantificação de 17 (BASSOTTI *et al.*, 2020) e de 104 (CUNHA *et al.*, 2020) diferentes drogas de abuso a partir de fluido oral, com processos de extração mais simplificados e de menor custo do que o método de SPE, por exemplo. Entretanto, nestes dois estudos a coleta de fluido oral foi realizada utilizando o coletor comercial Quantisal® - que contém solução tampão e conservantes de amostra –, adicionando um custo maior do que a coleta de fluido oral por expectoração em um tubo de plástico simples.

Nesse contexto, o método de coleta de amostras em DOFS, associado à extração líquido-líquido, apresenta vantagens na redução de custos tanto para a coleta de amostra e como na redução de insumos necessários para a extração dos analitos de interesse. O custo do papel filtro associado à coleta de fluido oral por simples expectoração é menor do que um coletor comercial de fluido oral, bem como o processo de extração requer apenas solventes, em quantidades reduzidas.

Previamente desenvolvida no grupo de pesquisa LABTÓXICO/UFRGS (JACQUES; SANTOS; LIMBERGER, 2019), a técnica de DOFS foi utilizada pela primeira vez em um método analítico validado para a detecção e para a quantificação de drogas de abuso, demonstrando ser uma alternativa de baixo custo para situações legais que requerem a comprovação de uso recente de substâncias. Jacques *et al.* (2019) apresentaram a validação de um método quantitativo em um equipamento de LC-MS para a detecção e a quantificação de diferentes drogas de abuso. O método demonstrou linearidade (na faixa de 40 a 500 ng/mL), precisão, exatidão, seletividade, ausência de efeito residual e de efeito de matriz, e amostras de DOFS demonstraram estabilidade de 3 dias. Considerando este instrumento analítico, o método foi capaz de detectar concentrações de drogas com limite de quantificação de 40 ng/mL. Além disso, este estudo padronizou o volume de 50 µL de fluido oral para aplicação em um papel filtro de tamanho 1,6 cm x 1,6 cm, e um tempo de secagem mínimo de 2 horas e 30 minutos.

No intuito de aprimorar o método de DOFS previamente desenvolvido, aumentando a sensibilidade na detecção de diferentes substâncias de abuso e estudando um período maior de estabilidade das amostras, o trabalho apresentado na presente Tese propôs o desenvolvimento de um método de extração de DOFS acoplado a um instrumento de LC-MS/MS. Nesse contexto, o método de extração de amostras foi adaptado. O método de JACQUES; SANTOS; LIMBERGER (2019) utilizou apenas 200 µL de solvente de extração (acetonitrila:tampão acetato de amônio:metanol, 55:35:10, v/v), seguido de sonicação, retirada do papel filtro e filtragem da solução antes da análise por LC/MS. Para a detecção de baixas quantidades de drogas de abuso, o volume final da amostra foi reduzido. Para isso, foi necessário submeter as amostras ao processo de secagem do solvente de extração com o auxílio de nitrogênio, permitindo a reconstituição do resíduo contendo os analitos de interesse no volume final de 100 µL. O novo método de extração permitiu a eliminação do preparo de solução tampão, bem como o instrumento LC-MS/MS dispensou a necessidade de filtragem da amostra.

Conforme apresentado no capítulo I, o método desenvolvido utilizou a coleta de amostra em DOFS, a extração líquido-líquido e a análise, a detecção e a quantificação de anfetamina, de metanfetamina, de benzoilecgonina, de cetamina e de mitraginina em um instrumento de LC-MS/MS. Utilizando parâmetros previamente estabelecidos por Jacques *et al.* (2019) - volume de amostra para um papel filtro de

tamanho 1,6 cm x 1,6 cm e tempo mínimo de secagem das amostras-, o método demonstrou linearidade (na faixa de 0.2 a 100 ng/mL), precisão, exatidão, seletividade, ausência de efeito residual e de efeito de matriz, e as amostras de DOFS apresentaram estabilidade pelo período de 35 dias. Desta forma, o método validado no instrumento LC-MS/MS permite a detecção de drogas em concentrações muito baixas, sendo apropriado para aplicação em regimes de tolerância zero de uso de substâncias ilícitas.

A estabilidade dos analitos em amostras DOFS representa outra grande vantagem desse método na aplicação em Toxicologia Forense, especialmente quando é necessário coletar amostras em locais distantes do laboratório de análise. Associado ao fácil transporte e armazenamento dos DOFS, a sua estabilidade permite que as amostras aguardem um maior tempo para sua análise. Em nosso método, foi possível estudar a estabilidade dos analitos por 35 dias, período no qual todas as substâncias se mantiveram estáveis em armazenamento à 6°C. Entretanto, estudos envolvendo sangue armazenado em papel filtro (*dried blood spots*) mostram até 8 meses de estabilidade para diversas drogas de abuso (SIMÕES; ALENJO; DIAS, 2018; AMBACH *et al.*, 2019). Períodos mais longos de armazenamento de DOFS ainda precisam ser estudados para diferentes substâncias de abuso.

Quando as amostras de fluido oral são mantidas em sua forma líquida, sua estabilidade é dependente do recipiente, da adição de tampões e/ou conservantes e das condições de armazenamento. Por exemplo, Turfus *et al.* (2014) estudaram diferentes condições de armazenamento de fluido oral em tubos de polipropileno, para avaliar a estabilidade de MDMA, de metanfetamina e de THC em temperatura ambiente, à 4°C e em altas temperaturas (60°C). As amostras se mostraram estáveis por um período de 2 meses, porém amostras contendo THC não se mantiveram estáveis em altas temperaturas. Outro estudo, conduzido por Marchei *et al.* (2020), demonstrou que diferentes drogas de abuso foram estáveis em fluido oral sem adição de um tampão por apenas duas semanas, mantidas em refrigeração tanto à 4°C como à -20°C. A adição de um tampão ao fluido oral estendeu a estabilidade dos analitos em até um ano, também em refrigeração. Ainda, a estabilidade também depende do tipo de material e/ou tampão adicionado aos mais diversos coletores comerciais de fluido oral, bem como do analito estudado. Langel *et al.* (2008) avaliaram 9 diferentes coletores de fluido oral durante períodos de 0, 14 e 28 dias para diferentes analitos, encontrando diferenças substanciais entre os dispositivos, especialmente para o THC.

Entretanto, a técnica de DOFS apresenta também desafios. Considerando a grande variedade de substâncias de interesse da Toxicologia Forense, bem como as propriedades físico-químicas individuais de cada analito, observa-se que algumas substâncias apresentam maior interação com o papel filtro, dificultando sua extração e análise. No capítulo I desta Tese, dentre as cinco substâncias estudadas para a demonstração do método DOFS, a mitraginina apresentou números significativamente mais baixos de recuperação do papel filtro (55%) do que as demais (média de 82%). Da mesma maneira, os canabinoides estudados, THC e CBD, apresentaram um percentual de recuperação ainda mais baixo, na média de 25%. A baixa recuperação dos canabinoides prejudicou a validação de um método quantitativo. Dessa forma, foi demonstrado no capítulo II desta Tese a validação de um método qualitativo para detecção de THC e de CBD, bem como a discussão das dificuldades encontradas para a extração dos canabinoides do papel filtro.

Adicionalmente, considerando as dificuldades analíticas encontradas neste trabalho, foi realizada uma revisão sistemática a respeito dos métodos quantitativos já desenvolvidos para a análise de canabinoides. Esta revisão foi apresentada no capítulo III desta Tese, compilando dados de diferentes métodos para contribuir no desenvolvimento de protocolos e de novas pesquisas.

Visando ainda encontrar uma alternativa analítica para substâncias de difícil extração de DOFS, foram estudadas ponteiras de SPE (SPE *tips*). Apesar de representarem também um custo na extração, o método de simples pipetagem das amostras de fluido oral utilizando ponteiras, que contêm discos porosos e sais capazes de reter e eluir os analitos de interesse, reduz também tempo de extração e quantidades de solventes, dispensando ainda o uso de nitrogênio líquido para evaporação de solventes e concentração das substâncias. O uso de ponteiras SPE demonstrou o aumento na recuperação de mitraginina e também dos canabinoides, e é uma técnica bastante interessante para ser estudado em novas pesquisas para validação de métodos quantitativos para drogas de abuso em fluido oral. Esse método pode ainda ser complementar à triagem de canabinoides por DOFS.

Resumidamente, nesta Tese foram apresentados e discutidos novos métodos para detecção de drogas de abuso diversas em fluido oral. Esses métodos apresentam um potencial de aplicação em diferentes situações, como a triagem de motoristas sob possível influência do uso de drogas, o monitoramento terapêutico em clínicas de recuperação de usuários de drogas e/ou outras condições, o rastreamento

antidoping de atletas em competições esportivas ou ainda a avaliação de colaboradores em locais de trabalho.

Na área de Documentoscopia Forense, destaca-se a importância do conhecimento de metodologias analíticas e de análise multivariada para a análise de tintas de canetas, especialmente para Peritos Brasileiros. No Brasil, existem três diferentes possibilidades de trabalho com Perícia Forense: o Perito Judicial, que atua na área de justiça cível (BRASIL, 2015), o Perito Criminal, que atua em investigações de origem penal (BRASIL, 1491), e o Assistente Técnico, um profissional que pode ser contratado tanto pela parte Autora como pela parte Ré de processos cíveis e penais, e é escolhido a critério das Partes para defesa de seus argumentos (BRASIL, 2015).

O Perito Judicial é cadastrado junto a Tribunais de Justiça, estaduais e Federais, mediante apresentação de diploma de ensino superior e Carteira de Registro Profissional (BRASIL, 2015). Quando da necessidade de esclarecimentos científicos específicos em um processo judicial cível, os Peritos Judiciais são recrutados através da livre nomeação de escolha dos Juízes (BRASIL, 2015). Enquanto a comprovação para a atuação em Toxicologia Forense é bastante clara e específica (formação em Farmácia, Biomedicina e Toxicologia Analítica, por exemplo), a atuação em Documentoscopia Forense requer formação em qualquer área de conhecimento de nível superior e comprovação de especialização na área de Documentoscopia, que normalmente ocorre por cursos de formação do tipo extensão, sem um regimento específico.

Peritos Criminais Estaduais e Federais são aprovados mediante concurso público para áreas de atuação específicas, de acordo com a formação acadêmica de cada Perito. No Estado do Rio Grande do Sul, os cargos de Peritos Criminais para o Instituto Geral de Perícias estão divididos em dezoito áreas (GOVERNO DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, 2014), porém todas elas, incluindo a Farmácia e a Biomedicina, por exemplo, contemplam a atribuição “Proceder à perícia na área de balística forense e de documentoscopia” (GOVERNO DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, 2014). Da mesma maneira, os cargos destinados a Peritos Criminais Federais (POLÍCIA FEDERAL DO BRASIL, 2020), encontram-se distribuídos em dezenove diferentes áreas, sem uma denominação específica para a Documentoscopia. Tanto na esfera estadual como na esfera federal, a especialização

em Documentoscopia é realizada por um curso de formação interno de cada órgão governamental.

Dessa forma, tanto na área cível como na área criminal, a ampla possibilidade de formação de Peritos em Documentoscopia no país pode dificultar a execução de análises químicas em tintas de canetas e a interpretação de resultados. Além disso, enquanto Peritos Criminais contam com instrumentos analíticos adquiridos por órgãos governamentais, Peritos Judiciais e Assistentes Técnicos apresentam dificuldades de acesso a equipamentos, devido ao alto custo para aquisição individual. Nesse contexto, a produção de conhecimento e o desenvolvimento de metodologias de baixo custo e de fácil acesso em Documentoscopia Forense representam uma necessidade no Brasil.

Em vista dessa problemática, no capítulo IV desta Tese foi apresentado um novo método para a diferenciação de tintas de canetas esferográficas azuis, utilizando análise multivariada de imagens. A coleta de amostras é realizada através do aplicativo para celulares Photometrix PRO[®], que disponibiliza as análises de estatística multivariada PCA, HCA e PLS-DA a partir dos dados capturados nas imagens. Por utilizar apenas um aparelho celular, o método é de baixo custo e de amplo acesso aos Peritos. Entretanto, é necessário que os Peritos em Documentoscopia tenham conhecimento de análise estatística multivariada para a interpretação dos resultados. Além da vantagem de acesso e de redução de custos com o uso da análise multivariada de imagens, essa técnica é ainda não-destrutiva, evitando o recorte dos documentos questionados em questões judiciais. Métodos não-destrutivos permitem manter a integridade dos documentos como guarda de contraprova na cadeia de custódia, e contribuem para a celeridade processual, pois dispensam a necessidade de autorização judicial para recorte e análise dos documentos.

Apesar de não ter sido capaz de diferenciar todas as marcas de canetas testadas no estudo, a análise multivariada de imagens utilizando o aplicativo Photometrix PRO[®] conseguiu diferenciar tintas de tonalidades de cores distintas, bem como agrupar tintas de mesma marca. Novas pesquisas, utilizando diferentes marcas de celulares e de canetas, poderão tornar o método em uma alternativa de triagem na diferenciação de tintas de canetas esferográficas. O aplicativo Photometrix PRO[®] também já foi estudado como método de identificação de falsificação de papel moeda brasileiro (VITTORAZZI *et al.*, 2020), indicando também outras possibilidades de uso

deste método em Documentoscopia Forense. Ainda, demonstrando a multidisciplinariedade do uso do método em Ciências Forenses, o aplicativo Photometrix PRO® já foi também aplicado na área da Toxicologia, para análise do padrão de degradação de extratos de *Cannabis sativa* L. (DUARTE *et al.*, 2020).

A análise multivariada de imagens para análise de tintas de canetas também foi explorada por Valderrama e Valderrama (2016) e por Valderrama, Março e Valderrama (2020). Em ambos os estudos foi realizada a coleta de imagens de tintas de canetas utilizando um smartphone do tipo iPhone®, seguido de análise por PLS-DA: no primeiro estudo (VALDERRAMA; VALDERRAMA, 2016) foram diferenciadas tintas provenientes de diferentes tipos de canetas azuis; no segundo (VALDERRAMA; MARÇO; VALDERRAMA, 2020), o método foi utilizado para a determinação da sequência de traços, utilizando traços de tintas de diferentes canetas azuis e também de tintas de textos impressos. Esses trabalhos demonstram o crescente interesse da aplicação da análise multivariada de imagens em Documentoscopia.

Muitas outras metodologias também têm sido estudadas para a análise de tintas de canetas esferográficas. No capítulo V desta Tese, foi apresentada uma revisão sistemática para melhor compreensão das análises de tintas de canetas esferográficas, visando particularmente a diferenciação entre marcas e o estudo de idade de tintas. Neste trabalho, diversas técnicas de cromatografia, de espectrometria de massas e de espectroscopia são descritas para tais finalidades. Ainda, foram observados muitos métodos utilizando análise multivariada para a interpretação dos resultados obtidos. A revisão compilou estudos utilizando diferentes métodos, demonstrando diversas possibilidades de análise de tintas de canetas esferográficas, que podem ser adotadas por Laboratórios e/ou Peritos em Documentoscopia.

Por fim, visando ampliar a discussão e trazer conhecimento das metodologias de análise de tintas de canetas esferográficas para Peritos em Documentoscopia brasileiros, o capítulo VI desta Tese apresenta uma revisão crítica sobre o tema. Neste trabalho, as técnicas utilizadas são brevemente explicadas, bem como é apresentado um panorama de estudos realizados para diferenciação, datação e análise de cruzamento de traços de tintas de canetas esferográficas. Esse trabalho contribui para a produção de uma referência bibliográfica para Peritos Brasileiros.

Os estudos apresentados nesta Tese contribuem para o combate a diversos tipos de fraudes em documentos. A diferenciação de tintas de canetas esferográficas contribui para a elucidação de questionamentos a respeito de fraudes por adição de

escritos - como a inclusão de números em cheques para aumento de valor - ou por alteração de escritos – como a transformação do número de dias de afastamento em um atestado médico. Além desses exemplos, muitas questões envolvendo contratos, recibos e documentos financeiros, documentos comprobatórios de aposentadoria, entre outros, podem ser resolvidas com o auxílio de métodos analíticos em Documentoscopia Forense. Os estudos de idade de tintas de canetas, por sua vez, contribuem para a elucidação de fraudes de alteração de datas, adição de escritos posteriores à confecção do documento ou ainda confecção de documentos com idade antiga forjada, por exemplo.

11. CONCLUSÃO

Nesta Tese, foram desenvolvidas novas metodologias analíticas na área de Toxicologia – utilizando *dried oral fluid spots* (DOFS) e detecção de drogas de abuso por espectrometria de massas - e de Documentoscopia Forense – utilizando o aplicativo Photometrix PRO® e análise multivariada de imagens para a diferenciação de tintas de canetas esferográficas azuis.

O método de DOFS representa uma alternativa de amostragem de custo reduzido, facilitando a coleta, a extração e o transporte de amostras, permitindo a detecção do uso recente de substâncias ilícitas de abuso. A alta estabilidade de amostras DOFS também permite que a coleta seja realizada em locais distantes do laboratório de análise. Ainda, quando acoplado à análise com o instrumento LC-MS/MS, o método permite a detecção de quantidades muito baixas dos analitos de interesse, sendo apropriado para uso em regimes de tolerância zero de uso de substâncias de abuso. Entretanto, a extração de diferentes substâncias do papel filtro não é uniforme, devido às propriedades físico-químicas de cada analito. Nesse trabalho, os canabinoides representaram o desafio de extração de amostras. As dificuldades analíticas de se trabalhar com métodos quantitativos para avaliação de canabinoides foram então discutidas.

O método qualitativo de diferenciação de tintas de canetas utilizando o aplicativo Photometrix PRO® apresenta a vantagem de ter baixo custo e alta disponibilidade para os Peritos, bem como é um método não destrutivo. Entretanto, é preciso que os Peritos tenham conhecimento em análise multivariada para a interpretação dos resultados gerados nas análises. Além disso, métodos de cromatografia, de espectrometria de massas e de espectroscopia são amplamente utilizados na análise de tintas de canetas, e o conhecimento dessas técnicas é necessário para Peritos em Documentoscopia.

Estes trabalhos contribuem para o desenvolvimento tecnológico nas Ciências Forenses, apresentando possibilidades de metodologias de custo reduzido para resolução de problemas práticos observados no contexto brasileiro. O trabalho demonstra também a multidisciplinariedade das Ciências Forenses e a necessidade da formação adequada por partes dos profissionais atuantes.

12. PERSPECTIVAS FUTURAS

O método de DOFS desenvolvido nesta Tese apresentou como demonstração a detecção de algumas drogas de abuso (anfetamina, metanfetamina, benzoilecgonina, THC, CBD, cetamina e mitraginina). Novos estudos podem incluir um painel maior de substâncias ilícitas, bem como avaliar períodos mais longos de armazenamento em diferentes condições, para estudo de estabilidade.

Ainda, técnicas de triagem de substâncias diretamente no papel filtro poderiam reduzir ainda mais os custos dos testes. Por exemplo, técnicas de Espectroscopia de Raman, de Espectrometria de Massas por *Paper Spray* (PS-MS) ou de Análise Direta por Espectrometria de Massas (DART-MS) podem ser estudadas para primeiramente identificar drogas de abuso, que posteriormente podem ser confirmadas e quantificadas por LC-MS/MS. Tal procedimento evitaria o custo de extração de amostras com resultados negativos na triagem.

Além de apresentar novos métodos analíticos em Toxicologia Forense, a presente Tese de Doutorado demonstrou a necessidade de que Peritos em Documentoscopia também conheçam essas metodologias e saibam interpretar resultados para a resolução de questões judiciais envolvendo tintas de canetas, com destaque para o uso da análise multivariada. Entretanto, há ainda outras situações em Documentoscopia Forense, além do estudo de tintas de canetas, em que metodologias analíticas e a análise multivariada podem ser utilizadas, como no estudo de idade de papéis, da análise de tintas de documentos impressos ou na avaliação da autenticidade de documentos oficiais, como papel moeda.

13. REFERÊNCIAS

ABBRUSCATO, Thomas J.; TRIPPIER, Paul C. DARK Classics in Chemical Neuroscience: Methamphetamine. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 9, n. 10, p. 2373-2378, 2018.

ABDEL-REHIM, Abbi; ABDEL-REHIM, Mohamed. Dried saliva spot as a sampling technique for saliva samples. **Biomedical Chromatography**, v. 28, p. 875-877, 2014.

ADKINS, Jessica E.; BOYER, Edward W.; McCURDY, Christopher R. Mitragyna speciosa, a psychoactive tree from Southeast Asia with opioid activity. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1165-1175, 2011.

AMADOR, Victoria Silva *et al.* Paper Spray Mass Spectrometry for the Forensic Analysis of Black Ballpoint Pen Inks. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 28, n. 9, p. 1965-1976, 2017.

AMBACH, Lars *et al.* Rapid and simple LC-MS/MS screening of 64 novel psychoactive substances using dried blood spots. **Drug Testing and Analysis**, v. 6, p. 367-375, 2014.

AMBACH, Lars *et al.* Quantification of Cocaine and Cocaine Metabolites in Dried Blood Spots from a Controlled Administration Study Using LC-MS/MS. **Drug Testing and Analysis**, v. 11, n. 5, p. 709-720, 2019.

AMERICAN ACADEMY OF FORENSIC SCIENCES (AAFS). **Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology**. First Edition. Washington: Academy Standards Board (ASB) Standard 036, 2019.

AMIN, Md Ruhul; ALI, Declan W. Pharmacology of Medical Cannabis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1162, p. 151-165, 2019.

ANTUNES, Marina Venzon *et al.* Determination of Endogenous Concentrations of Uracil and Dihydrouracil in Dried Saliva Spots by LC-MS/MS: Method Development, Validation, and Clinical Application. **Therapy Drug Monitoring**, v. 41, n. 3, p. 383-390, 2019.

ANZILLOTTI, Luca *et al.* Determination of synthetic and natural cannabinoids in oral fluid by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography/mass spectrometry: A pilot study. **Talanta**, v. 201, p. 335-341, 2019.

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

ASSEMBLÉIA LEGISLATIVA DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Projeto Se Lei Nº 214, de 2006**. Proíbe a comercialização livre de quetamina, no âmbito do Estado de São Paulo, e fixa outras providências. São Paulo/SP, 2006.

ASRI, Mohamed; ISMAIL, DzulKiflee, SYUHAILA, Wan Nur. Raman spectroscopy of ballpoint-pen inks using chemometric techniques. **Australian Journal of Forensic Sciences**, v. 249, p. 73-82, 2015.

AUBRY, Anne-Françoise. LC–MS/MS bioanalytical challenge: ultra-high sensitivity assays. **Bioanalysis**, v. 3, n. 16, p. 1819–1825, 2011.

BASSOTTI, Elisa *et al.* A new LC-MS/MS confirmation method for the determination of 17 drugs of abuse in oral fluid and its application to real samples. **Forensic Science International**, v. 302, p. 110330, 2020.

BÖCK, Fernanda Carla. **Desenvolvimento de Métodos de Análise de Superfície e Calibração Utilizando Imagens Digitais**. Santa Cruz do Sul: Universidade de Santa Cruz do Sul, 2016. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Sistemas e Processos Industriais, Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, 2016.

BÖCK, Fernanda Carla *et al.* Photometric and colorimetric image analysis using smartphones. **Journal of Chemometrics**, v. 34, p. e3251, 2020.

BOMBANA, Henrique Silva *et al.* Prevalence of drugs in oral fluid from truck drivers in Brazilian highways. **Forensic Science International**, v. 273, p. 140–143, 2017.

BOSKER, Wendy; HUESTIS, Marylin A. Oral Fluid Testing for Drugs of Abuse. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 11, p.1910–193, 2009.

BRASIL. RDC Nº 325, de 3 de dezembro de 2019. Dispõe sobre a atualização do Anexo I (Listas de Substâncias Entorpecentes, Psicotrópicas, Precursoras e Outras sob Controle Especial) da Portaria SVS/MS nº 344, de 12 de maio de 1998. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa Nº 35, de 11 de setembro de 2017. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2017.

BRASIL. Lei Nº 13.105, de 16 de março de 2015. Código de Processo Civil. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 27 de 17 de maio de 2012. Requisitos mínimos para validação de métodos bioanalíticos, **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2012.

BRASIL. Decreto-Lei Nº 3.689, de 3 de outubro de 1941. Código de Processo Penal. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 1941.

CALCERRADA, Matias; GARCIA-RUIZ, Carmen. Analysis of questioned documents: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 853, n. 1, p. 143–166, 2015.

CÂMARA & SILVA, Erick Simões; FEUERHARMEL, Samuel. **Documentoscopia: Aspectos Científicos, Técnicos e Jurídicos**. 1ª Edição. São Paulo: Millenium Editora, 2014.

CARAMELO, Débora *et al.* Determination of antipsychotic drugs in oral fluid using dried saliva spots by gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 411, p. 6141–6153, 2019.

CARVALHO, Carina Maria Bello de *et al.* Application of Multivariate Statistics (PCA and HCA) on ballpoint pen ink Infrared spectra for dating of forensic relevant documents. **Journal of the American Society of Questioned Document Examiners Inc.**, v. 22, n. 1, 19-35, 2019.

CARVALHO, Joana *et al.* Determination of Antiepileptic Drugs Using Dried Saliva Spots. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 43, n. 1, p. 61–71, 2019a.

CARVALHO, Carina Maria Bello de; ORTIZ, Rafael Scorsatto; LIMBERGER, Renata Pereira. Manuscripts from Different Brands of Ballpoint Pens – GC/MS Ageing Profile in Brazilian Tropical Weather. **Current Chromatography**, v. 6, n. 1, p. 15-29, 2019.

CARVALHO, Carina Maria Bello de. **Aplicação de Técnicas Cromatográficas e Espectrométricas no Desenvolvimento de Métodos para Datação e Investigação de Fraudes em Documentos Forenses**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2018. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

CARVALHO, Carina Maria Bello de; ORTIZ, Rafael Scorsatto; LIMBERGER, Renata Pereira. Figures of Merit Evaluation of GC/MS Method for Quantification of 2-Phenoxyethanol from Ballpoint Pen Ink Lines and Determination of the Influence of Support Paper on Solvent Extraction. **Química Nova**, v. 42, n. 1, p. 42-48, 2018.

CARVALHO, Carina Maria Bello de *et al.* Characterization and Differentiation of Ballpoint Pen Ink Strokes on Paper Using Orbitrap Mass Spectrometry and Multivariate Statistic. **Forensic Science & Addiction Research**, v. 2, n. 2, p. 1-8, 2018a.

CARVALHO, Carina Maria Bello de *et al.* Using GC/MS to Detect Caffeine in Real Case of Artificially Aged Forged Documents and Method Optimization. **Current Chromatography**, v. 5, p. 53-64, 2018b.

CARVALHO, Carina Maria Bello de. Análise da concentração basal dos solventes de tintas de canetas esferográficas. **Revista Brasileira de Ciências Policiais**, v. 5, n.1, p.65-96, 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Newborn Screening Quality Assurance Program** - Laboratory Quality Assurance and Standardization Programs. Disponível em: <https://www.cdc.gov/labstandards/nsqap.html>, acesso em outubro de 2020.

CHENG, Wing-Chi *et al.* Roadside detection of impairment under the influence of ketamine—Evaluation of ketamine impairment symptoms with reference to its concentration in oral fluid and urine. **Forensic Science International**, v. 170, p. 51–58, 2007.

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

COLUCCI, Domenico *et al.* Application of multivariate image analysis for on-line monitoring of a freeze-drying process for pharmaceutical products in vials. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 187, p. 19-27, 2019.

COOMAN, Travon *et al.* Development, validation and evaluation of a quantitative method for the analysis of twenty-four new psychoactive substances in oral fluid by LC–MS/MS. **Forensic Chemistry**, v. 19, p. 100231, 2020.

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

COSTA, Karina F.F. *et al.* Document ink dye age estimation by direct injection-mass spectrometry and correlation analysis. **Microchemical Journal**, v. 147, p. 1123–1132, 2019.

COULTER, Cynthia A.; MOORE, Christine M. Analysis of Drugs in Oral Fluid Using LC-MS/MS. **Methods in Molecular Biology**, v. 1872, p. 237-259, 2019.

COURTNEY, Kelly E.; RAY, Lara A. Methamphetamine: An Update on Epidemiology, Pharmacology, Clinical Phenomenology, and Treatment Literature. **Drug Alcohol Dependence**, v. 0, p. 11–21, 2014.

COX, Joseph *et al.* Quantitation of Fentanyl and Metabolites from Liver Tissue Using a Validated QuEChERS Extraction and LC–MS-MS Analysis. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 00, p.1–11, 2020.

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

CUNHA, Kelly Francisco *et al.* Screening of 104 New Psychoactive Substances (NPS) and Other Drugs of Abuse in Oral Fluid by LC–MS-MS. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 44, n. 7, p. 697–707, 2020.

DAMS, Riet *et al.* Oral Fluid as an Alternative Matrix to Monitor Opiate and Cocaine Use in Substance-Abuse Treatment Patients. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 87, n. 2-3, p. 258-267, 2007.

DENMAN, John A. *et al.* Organic and inorganic discrimination of ballpoint pen inks by TOF-SIMS and multivariate statistics. **Applied Surface Science**, v. 256, n. 7, p. 2155-2163, 2010.

DESROSIERS, Nathalie A.; HUESTIS, Marylin A. Oral Fluid Drug Testing: Analytical Approaches, Issues and Interpretation of Results. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 43, n. 6, p. 415-443, 2019.

DIAZ-SANTANA, Oscar; VEGA-MORENO, Daura; CONDE-HARDISSON, Francisco. Gas chromatography-mass spectrometry and high-performance liquid

chromatography-diode array detection for dating of paper ink. **Journal of Chromatography A.**, v. 1515, p. 187-195, 2017.

DOBRI, S.C.D.; MOSLEHI, A.G.; DAVIES, T.C. Are oral fluid testing devices effective for the roadside detection of recent cannabis use? A systematic review. **Public Health**, v. 171, p. 57-65, 2019.

DOWNEY, Luke A. *et al.* The effects of cannabis and alcohol on simulated driving: Influences of dose and experience. **Accidents, Analysis and Prevention**, v. 50, p. 879-886, 2013.

DRUG ENFORCEMENT ADMINISTRATION. **Drugs of abuse: a DEA resource guide**. 2017 Edition. Arlington (VA): Drug Enforcement Administration, U.S. Department of Justice, 2017.

DRUMMER, Olaf H. Drug Testing in Oral Fluid. **Clinical Biochemistry Reviews**, v. 27, p. 147-159, 2006.

DUARTE, Jonathaline Apollo *et al.* Application of Multivariate Analysis on Digital Images of *Cannabis sativa* L. Extracts. **Revista Brasileira de Ciências Policiais**, v. 11, n. 3, p. 25-48, 2020.

EASTLACK, Steven C.; CORNETT, Elyse M.; KAYE, Alan D. Kratom - Pharmacology, Clinical Implications, and Outlook: A Comprehensive Review. **Pain Therapy**, v. 9, n. 1, p. 55-69, 2020.

ELLEFSEN, Kayla N. *et al.* Oral fluid cocaine and benzoylecgonine concentrations following controlled intravenous cocaine administration. **Forensic Science International**, v. 260, p. 95–101, 2016.

ELMONGY, Hatem; ABDEL-REHIM, Mohamed. Saliva as an alternative specimen to plasma for drug bioanalysis: A review. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 83, p. 70–79, 2016.

EZCURRA Magdalena *et al.* Analytical methods for dating modern writing instrument inks on paper. **Forensic Science International**, v. 197, p.1-20, 2010.

EZCURRA Magdalena; GRÁVALOS, Goyo R. **Análise Forense de Documentos – Instrumentos de Escrita Manual e suas Tintas**: Volume I. 1 edição. São Paulo: Millenium Editora, 2012.

FABRESSE, Nicolas *et al.* Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous detection of 10 illicit drugs in oral fluid collected with FLOQSwabs™ and application to real samples. **Drug Testing and Analysis**, v. 11, n. 6, p. 824-832, 2018.

FERREIRA, Márcia Miguel Castro. **Quimiometria: Conceitos, Métodos e Aplicações**. 1ª Edição. São Paulo: Editora Unicamp, 2015.

FIORENTIN, Taís Regina *et al.* 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 of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 86, p. 60–66, 2017.

FINK, David S. *et al.* Medical Marijuana Laws and Driving Under the Influence of Marijuana and Alcohol. **Addiction**, v. 115, n. 10, p. 1944-1953, 2020.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FDA and kratom. Silver Spring (MD): U.S. **Food and Drug Administration**, 2019.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Bioanalytical Method Validation - Guidance for Industry. **Food and Drug Administration**, 2018.

FRANK, Maria Cristina; MONTEIRO, Maristela Goldnadel; LIMBERGER, Renata Pereira. Development and Validation of a LC-ESI-MS/MS Method for Simultaneous Whole Blood Analysis of 51 New Psychoactive Substances. **Drug Analytical Research**, v. 3, n. 2, p. 36-45, 2019.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). **III Levantamento Nacional sobre o uso de Drogas pela População Brasileira**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde do Brasil, 2017.

GONZALEZ, Marina *et al.* Application of Chemometric Tools on Cannabis Samples Analyzed by the FTIR-ATR Method. **Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics**, v. 9, n. 4, p. 477-498, 2020.

GOLSTEIN, Rachel A.; LAURIERS, Carol; BURDA, Anthony M. Cocaine: History, Social Implications, and Toxicity—A Review. **Seminars in Diagnostic Pathology**, v. 26, n. 1, p. 10-17, 2009.

GOVERNO DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL. Lei Nº 14.519, de 8 de abril de 2014. Reestrutura o Plano de Classificação de Cargos e Vencimentos do Instituto-Geral de Perícias – IGP. **Diário Oficial [do] Estado**, Rio Grande do Sul, 2014.

GUTHRIE, Robert; SUSI Ada. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. **Pediatrics**, v. 32, n. 3, p. 338–343, 1963.

HANNON W. Harry; THERRELL Bradford L. Overview of the history and applications of dried blood samples. In: LI Wenkui; LEE, Mike S. **Dried Blood Spots: Applications and Techniques**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., p. 1-15, 2014.

HANNON, W. Harry *et al.* NBS-01-A6: Blood Collection on Filter Paper for Newborn Screening Programs; Approved Standard - Sixth Edition. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, v. 33, n. 9, p. 1-35, 2013.

HEAL, David J. *et al.* Amphetamine, past and present – a pharmacological and clinical perspective. **Journal of Psychopharmacology**, v. 27, n. 6, p. 479–496, 2013.

HELPER, Gilson A. *et al.* Chemostat, um Software Gratuito para Análise Exploratória de Dados Multivariados. **Química Nova**, v. 38, n. 4, p. 575-579, 2015.

HELPER, Gilson A. *et al.* PhotoMetrix: An Application for Univariate Calibration and Principal Components Analysis Using Colorimetry on Mobile Devices. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 2, p. 328-335, 2017.

HO, James H.; DARGAN, Paul I. Arylcyclohexamines (Ketamine, Phencyclidine, and Analogues). In: BRENT J. *et al.* **Critical Care Toxicology**. Suíça: Springer International Publisher, 2016.

HOSU, Anamaria; POP, Bianca; CIMPOIU, Claudia. The Forensic Analysis of Pigments from Some Inks by HPTLC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 38, p. 1109–1112, 2015.

HUANG, Lijuan *et al.* Discrimination of narcotic drugs in human urine based on nanoplasmonics combined with chemometric method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.186, p. 113174, 2020.

HUESTIS, Marylin A. Cannabis (Marijuana) – Effects on Human Performance and Behavior. **Forensic Science Reviews**, v. 14, p. 15-60, 2002.

HUMPHREY, Sue P.; WILLIAMSON, Russel T. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 85, n. 2, p. 162-169, 2001.

ISMAIL, Dzulkiflee; AUSTAD, Zulkefli; DESA, Wan Nur Syuhaila Mat. Ultra-Violet and Visible (UV-VIS) Spectroscopy and Chemometrics Techniques for Forensic Analysis of Ballpoint Pen Inks: A Preliminary Study. **Malaysian Journal of Forensic Sciences**, v. 5, p. 47-52, 2014.

JACQUES, Ana Laura B.; SANTOS, Maíra Kerpel; LIMBERGER, Renata Pereira. Development and Validation of a Method Using Dried Oral Fluid Spot to Determine Drugs of Abuse. **Journal of Forensic Sciences**, v. 64, n. 6, p. 1906-1912, 2019.

JONES, Roger W.; McCLELLAND, John F. Analysis of writing inks on paper using direct analysis in real time mass spectrometry. **Forensic Science International**, v. 231, n. 1-3, p. 73-81, 2013.

KARSCHNER, Erin L.; SWORTWOOD-GATES, Madeleine J.; HUESTIS, Marylin A. Identifying and Quantifying Cannabinoids in Biological Matrices in the Medical and Legal Cannabis Era. **Clinical Chemistry**, v. 66, n. 7, p. 888-914, 2020.

KOENIG, Agnes; WEYERMANN, Celine. Ink Dating, Part I: Statistical Distribution of Selected Ageing Parameters in a Ballpoint Inks Reference Population. **Science and Justice**, v. 58, n. 1, p. 17–30, 2018.

KOENIG, Agnes; MAGNOLON, Sophie; WEYERMANN, Celine. A comparative study of ballpoint ink ageing parameters using GC/MS. **Forensic Science International**, v. 252, p. 93–106, 2015.

KOENIG, Àgnes *et al.* Ink dating using thermal desorption and gas chromatography/mass spectrometry: comparison of results obtained in two laboratories. **Journal of Forensic Sciences**, v.60, n. 1, p. 52-61, 2015.

KUCHERYAVSKI, Sergey; BELYAEV, Ivan; FOMINYKH, Sergey. Estimation of age in forensic medicine using multivariate approach to image analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 97, n. 1, p. 39-45, 2009.

KUMAR, Raj; SHARMA, Vishal. Chemometrics in Forensic Science. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 105, p. 191-201, 2018.

LALLI, Priscila M. *et al.* Fingerprinting and aging of ink by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. **Analyst**, v. 135, n. 4, p. 745-750, 2010.

LANGEL, Kaarina *et al.* Drug Testing in Oral Fluid - Evaluation of Sample Collection Devices. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 32, p. 393-401, 2008.

LEE Loong C.; NUNURUNG Sitti M.; ISHAK Ab A. Forensic Analysis of Blue Ballpoint Pen Inks on Questioned Documents by High Performance Thin Layer Chromatography Technique (HPTLC). **The Malaysian Journal of Analytical Sciences**, v. 18, n. 2, p. 226 – 233, 2014.

MALLET, Claude R.; MAZZEO, Jeff R. 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, 2003.

MARCELO, M.C.A. *et al.* Scott test evaluation by multivariate image analysis in cocaine samples. **Microchemical Journal**, v. 127, p. 87-93, 2016.

MARCHEI, Emilia *et al.* Stability and Degradation Pathways of Different Psychoactive Drugs in Neat and in Buffered Oral Fluid. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 44, p.570–579, 2020.

MARIOTTI, Kristiane de Cássia *et al.* Seized cannabis seeds cultivated in greenhouse: A chemical study by gas chromatography–mass spectrometry and chemometric analysis. **Science and Justice**, v. 56, p. 35–41, 2016.

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

MATUSZEWSKI, B.K.; CONSTANZER, M.L.; CHAVEZ-ENG, C.M. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 3019-3030, 2003.

MEI, Joanne V. *et al.* Use of Filter Paper for the Collection and Analysis of Human Whole Blood Specimens. **The Journal of Nutrition**, v. 131, n. 5, p. 1631S-6S, 2001.

MEI, Victoria *et al.* Validation of an LC-MS/MS Method for the Quantification of 13 Designer Benzodiazepines in Blood. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 43, p. 688–695, 2019.

MEIRELES, Vânia *et al.* Mitragyna speciosa: Clinical, Toxicological Aspects and Analysis in Biological and Non-Biological Samples. **Medicines**, v. 6, n. 1, p. E35, 2019.
NISBET, Lorna A. *et al.* Gas Chromatography-Mass Spectrometry Method for the Quantitative Identification of 23 New Psychoactive Substances in Blood and Urine. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 43, n. 5, p. 346–352, 2019.

NOWACKA, Agata; BORCZYC, Malgorzata. Ketamine applications beyond anesthesia – A literature review. **European Journal of Pharmacology**, v. 860, p. 172547, 2019.

NUMAKO, Masahiro *et al.* Dried Saliva Spot (DSS) as a Convenient and Reliable Sampling for Bioanalysis: An Application for the Diagnosis of Diabetes Mellitus. **Analytical Chemistry**, v. 88, p. 635-639, 2016.

ORFANIDIS, A. *et al.* A GC–MS method for the detection and quantitation of ten major drugs of abuse in human hair samples. **Journal of Chromatography B**, v. 1047, p. 141-150, 2017.

ORLANDI, Giorgia *et al.* Automated quantification of defective maize kernels by means of Multivariate Image Analysis. **Food Control**, v. 85, p. 259-268, 2018.

PASSAGLI, Marcos F. **Toxicologia Forense: Teoria e Prática**. 4ª edição. São Paulo: Millenium Editora, 2013.

PECHANSKY, Flávio *et al.* User experience and operational feasibility of four point-of-collection oral fluid drug-testing devices according to Brazilian traffic agents. **Traffic Injury Prevention**, v. 20, n. 1, p. 30-36, 2019.

PEGO, Ana Miguel Fonseca *et al.* Cocaine toxicological findings in cases of violent death in Sao Paulo city - Brazil. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, v. 60, p. 3–8, 2018.

PETTERS, Frank T.; DRUMMER, Olaf H.; MUSSHOF, Frank. Validation of new methods. **Forensic Science International**, v. 165, p. 216–224, 2007.

PETTERS, Frank T. Recent advances of liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. **Clinical Biochemistry**, v. 44, p. 54–65, 2011.

PETTERS, Frank T; REMANE, Daniela. Aspects of matrix effects in applications of liquid chromatography–mass spectrometry to forensic and clinical toxicology—a review. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 408, n. 8, p. 2155-2172, 2012.

PISANTI, Simona *et al.* Cannabidiol: State of the art and new challenges for therapeutic applications. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 175, p. 133–150, 2017.

POLÍCIA FEDERAL DO BRASIL. Ministério Da Justiça E Da Segurança Pública. **Requisitos e Atribuições dos Cargos de Carreira Policial**. Disponível em: <http://www.pf.gov.br/servicos-pf/concursos/caracteristicas-dos-cargos/carreira-policial/requisitos-e-atribuicoes-dos-cargos-da-carreira-policial-federal>.

PONCE, Fernando; FUKUSHIMA, André Rinaldi. Aspectos Farmacologicos e Toxicologicos da Cetamina: Uma Revisão de Literatura. **Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics**, v. 6, n. 2, p. 210-227, 2017.

POST, Sara *et al.* Kratom exposures reported to United States poison control centers: 2011–2017. **Clinical Toxicology**, v. 57, n. 10, p. 847-854, 2019.

PRATS-MONTALBÁN, J.M.; JUAN, A. de; FERRER, A. Multivariate image analysis: A review with applications. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 107, p. 1-23, 2011.

PROTTI, Michele *et al.* Dried haematic microsamples and LC–MS/MS for the analysis of natural and synthetic cannabinoids. **Journal of Chromatography B**, v. 1044–1045, p. 77–86, 2017.

RAMANATHAN, Surashi *et al.* Understanding the Physicochemical Properties of Mitragynine, a Principal Alkaloid of *Mitragyna speciosa*, for Preclinical Evaluation. **Molecules**, v. 20, p. 4915-4927, 2015.

RAMNARINE, Rhea S.; POKLIS, Justin L.; WOLF, Carl E. Determination of Cannabinoids in Breast Milk Using QuEChERS and Ultra-Performance Liquid Chromatography and Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 43, p. 746–752, 2019.

REINSTADLER, Vera *et al.* A validated workflow for drug detection in oral fluid by non-targeted liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 411, p. 867–876, 2019.

REMANE, Daniela; WISSENBACH, Dirk T.; PETTERS, Frank T. Recent advances of liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry in clinical and forensic toxicology — An update. **Clinical Biochemistry**, v. 49, p. 1051–1071, 2016.

RIBEIRO, Andrea *et al.* Determination of methadone and EDDP in oral fluid using the dried saliva spots sampling approach and gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 411, p. 2177–2187, 2019.

RISOLUTI, Roberta *et al.* Miniaturized analytical platform for cocaine detection in oral fluids by MicroNIR/Chemometrics. **Talanta**, v. 202, p. 546–553, 2019a.

RISOLUTI, Roberta *et al.* MicroNIR/Chemometrics: A new analytical platform for fast and accurate detection of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) in oral fluids. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 205, p. 107578, 2019b.

RISOLUTI, Roberta *et al.* Real time detection of amphetamine in oral fluids by MicroNIR/Chemometrics. **Talanta**, v. 208, p. 120456, 2020.

RISTIVOJEVIC, Petar *et al.* Comparative study of different approaches for multivariate image analysis in HPTLC fingerprinting of natural products such as plant resin. **Talanta**, v. 162, n. 1, p. 72-79, 2017.

SANTOS, Máira Kerpel dos *et al.* Comparison between counterfeit and authentic medicines: A novel approach using differential scanning calorimetry and hierarchical cluster analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 166, p. 304–309, 2019.

SAN ROMAN, I. *et al.* DATINK pilot study: An effective methodology for ballpoint pen ink dating in questioned documents. **Analytica Chimica Acta**, v. 892, n. 10, p. 105-114, 2015.

SAVIELLO, Daniela *et al.* Raman Spectroscopy and Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) for the Analysis of Blue and Black Writing Inks: Identification of Dye Content and Degradation Processes. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, p. 727, 2019.

SCHEIDWELLER, Karl 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, n. 5, p. 628-637, 2010.

SEYMOUR, Craig *et al.* Determination of Fentanyl Analog Exposure Using Dried Blood Spots with LC–MS–MS. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 43, p. 266–276, 2019.

SHARMA Vishal; KUMAR, Raj. Fourier transform infrared spectroscopy and high-performance thin layer chromatography for characterization and multivariate discrimination of blue ballpoint pen ink for forensic applications. **Vibrational Spectroscopy**, v. 92, p. 96–104, 2017.

SHBAIR, M.K.S.; LHERMITTE, M. Drug-facilitated crimes: Definitions, prevalence, difficulties, and recommendations. A review. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 68, p. 136—147, 2010.

SHIMOMURA, Eric T.; JACKSON, George F.; PAUL, Buddha D. Cocaine, Crack Cocaine, and Ethanol: A Deadly Mix. In: DASGUPTA, Amitava. **Critical Issues in Alcohol and Drugs of Abuse Testing**. 2ª edição. Texas: Academic Press, 2019.

SHIN, Yongho *et al.* Simultaneous determination of 75 abuse drugs including amphetamines, benzodiazepines, cocaine, opioids, piperazines, zolpidem and metabolites in human hair samples using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 33, p. e4600, 2019.

SILVA, Verônica A.G. *et al.* Non-destructive identification of different types and brands of blue pen inks in cursive handwriting by visible spectroscopy and PLS-DA for forensic analysis. **Microchemical Journal**, v. 116, p. 235-243, 2014.

SIMÕES, Susana Sadler; ALENJO, Antonio Castañera; DIAS, Mário João. Dried blood spots combined to an UPLC–MS/MS method for the simultaneous determination of

drugs of abuse in forensic toxicology. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 634–644, 2018.

SIMOLA, Nicola; CARTA, Manolo. Amphetamine Usage, Misuse, and Addiction Processes: an overview. In: PREEDY, Victor R. **Neuropathology of Drug Addictions and Substance Misuse**. Cambridge: Academic Press, 2016.

SOBOLESKY, Philip M. *et al.* Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for analyzing cannabinoids in oral fluid. **Clinica Chimica Acta**, v. 491, p. 30-38, 2019.

STOYKOVA, Silviya. Isolation and Characterization of Drugs of Abuse in Oral Fluid by a Novel Preconcentration Protocol. **Journal of Analytical Letters**, v. 49, n. 17, p. 2822-2832, 2016.

TIMMERMAN, Philip *et al.* EBF recommendation on the validation of bioanalytical methods for dried blood spots. **Bioanalysis**, v. 14, p. 1567–75, 2011.

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

TURFUS, Sophie C. *et al.* An assessment of the stability of MDMA, methamphetamine and THC in oral fluid. **Australian Journal of Forensic Sciences**, v. 46, n. 4, p. 397-410, 2014.

UDDIN, Sarah *et al.* Amphetamines: Potent Recreational Drug of Abuse. **Journal of Addiction Research & Therapy**, v. 8, n. 4, p. 1000330, 2017.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME (UNODC). World Drug Report 2020. Viena, Austria, **United Nations publications**, 2020.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME (UNODC). Guidance for the validation of analytical methodology and calibration of equipment used for testing of illicit drugs in seized materials and biological specimens. Viena, Austria, **United Nations publications**, 2009.

VALDERRAMA, Leonardo; VALDERRAMA, Patrícia. Nondestructive identification of blue pen inks for documentoscopy purpose using iPhone and digital image analysis including an approach for interval confidence estimation in PLS-DA models validation. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 156, p. 188–195, 2016.

VALDERRAMA, Leonardo; MARÇO, Paulo Henrique; VALDERRAMA, Patrícia. Model precision in partial least squares with discriminant analysis: A case study in document forgery through crossing lines. **Journal of Chemometrics**, v. 34, n. 12, p. e3265, 2020.

VALEN, Anja *et al.* Determination of 21 drugs in oral fluid using fully automated supported liquid extraction and UHPLC-MS/MS. **Drug Testing and Analysis**, v. 9, n. 5, p. 808-823, 2017.

VELTRI, Charles; GRUNDMANN, Oliver. Current perspectives on the impact of Kratom use. **Substance Abuse and Rehabilitation**, v. 10, p.23-31, 2019.

VELHO, Jesus Antonio; GEISER, Gustavo Caminoto; ESPINDULA, Alberi. **Ciências Forenses: Uma Introdução às Principais Áreas da Criminalística Moderna**. 2ª Edição, São Paulo: Millenium Editora, 2013.

VITTORAZZI, Bruno V. *et al.* Classificando Cédulas Brasileiras (R\$) usando Análise de Imagem por *Smartphone*. **Química Nova**, v. 43, n. 4, p. 1-8, 2020.

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

WARD, Nicholas J. *et al.* Developing a theoretical foundation to change road user behavior and improve traffic safety: Driving under the influence of cannabis (DUIC). **Traffic Injury Prevention**, v. 19, n. 4, p. 358-363, 2018.

WEYERMANN, Celine; SPENGLER, Berhardnt. The potential of artificial aging for modeling of natural aging processes of ballpoint ink. **Forensic Science International**, v. 180, p.23-31, 2008.

WEYERMANN, Celine *et al.* Evaluation of the Photodegradation of Crystal Violet upon Light Exposure by Mass Spectrometric and Spectroscopic Methods. **Journal of Forensic Sciences**, v. 54, n. 2, p. 339-345, 2009.

WEYERMANN, Celine *et al.* Minimum requirements for application of ink dating methods based on solvent analysis in casework. **Forensic Science International**, v. 210, p. 52–62., 2011.

WILLIAMS, Michele; MARTIN, Jennifer; GALETTIS, Peter. A Validated Method for the Detection of Synthetic Cannabinoids in Oral Fluid. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 43, p. 10–17, 2019.

WHITE, C. Michael. Pharmacologic and clinical assessment of kratom: An update. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 76, n. 23, p. 1915-1925, 2019.

YA, Kimheang *et al.* Pharmacokinetics of mitragynine, a major analgesic alkaloid in kratom (*Mitragyna speciosa*): A systematic review. **Asian Journal of Psychiatry**, v. 43, p. 73-82, 2019.

XU, Chuting *et al.* Potential analytical methods for on-site oral drug test: Recent developments and applications. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 120, p. 115649, 2019.

ZACCA, Jorge J & RISTON, José Roberto. Análise Físico-Química de Fraudes em Documentos. In: BRUNI, Aline; VELHO, Jesus Antonio; Oliveira, Marcelo Firmino.

Fundamentos de Química Forense – Uma análise prática da química que soluciona crimes. São Paulo: Millenium Editora, 2012.

ZAKARIA, Rosita *et al.* Advantages and challenges of dried blood spot analysis by mass spectrometry across the total testing process. **The Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 27, n. 4, p. 288-317, 2016.

ZANCANARO, Ivomar *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.

ZHANG, Yan Victoria *et al.* Liquid Chromatography– Tandem Mass Spectrometry an Emerging Technology in the Toxicology Laboratory. **Clinical Laboratory Medicine**, v. 36, p. 635–661, 2016.

14.1. Anexo I

Certificado de prêmio de melhor trabalho na área da Documentoscopia Forense no evento Interforensics 2019 – Conferência Internacional de Ciências Forenses, realizado em São Paulo/SP, em maio de 2019.

O trabalho **“Diferenciação de Canetas Esferográficas Através de Quimiometria de Imagens Digitais”** foi selecionado para apresentação oral, e foram apresentados resultados parciais do artigo constante no Capítulo IV desta Tese, **“Blue Ballpoint Pen Inks Differentiation using Multivariate Image Analysis of Digital Images Captured with PhotoMetrix PRO®”**.



interFORENSICS 2019
CONFERÊNCIA INTERNACIONAL DE CIÊNCIAS FORENSES

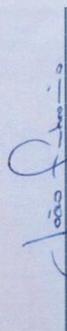
CERTIFICADO DE PREMIAÇÃO

Certificamos que o trabalho intitulado

DIFERENCIAÇÃO DE CANETAS ESFEROGRÁFICAS ATRAVÉS DE QUIMIOMETRIA DE IMAGENS DIGITAIS,

de autoria de **Roberta Petry Gorziza, Carina Maria Bello de Carvalho, Marina Gonzalez, Marco Flores Ferrão, Rafael Scorsatto Ortiz e Renata Pereira Limberger**, foi premiado na **InterFORENSICS 2019 - Conferência Internacional de Ciências Forenses**, realizada pela Academia Brasileira de Ciências Forenses - ABCF, no período de 21 a 24 de maio de 2019, no Centro de Convenções Frei Caneca, São Paulo - SP.

São Paulo, 24 de maio de 2019.


João Carlos Ambrósio
Presidente da Academia Brasileira
de Ciências Forenses - ABCF

REALIZAÇÃO:



APOIO:



ARCO INSTITUCIONAL:



SECRETARIA EXECUTIVA E COMERCIALIZAÇÃO:



COTA CURSO:



Roberta Petry Gorziza é graduada em Biomedicina (UFRGS/2010), Mestre em Genética e Biologia Molecular (UFRGS/2012) e Especialista em Perícia Criminal e Ciências Forenses (IPOG/2016). Possui experiência como Perita Judicial em Documentoscopia Forense, bem como em Perícias em Análises Laboratoriais (análises clínicas, toxicologia, genética e patologia).

Além das publicações incluídas nesta Tese, atuou como autora colaboradora nos seguintes artigos científicos, relacionados à Ciência Forense:

1. “Application of Multivariate Analysis on Digital Images of Cannabis sativa L Extracts”

Autores: Jonathaline Apollo Duarte, Marina Gonzalez, **Roberta Gorziza**, Luiza Manica Caffarate, Leonardo Correa Venturini dos Santos, Sabrina Laiz Buttenbender, Mariana Fernandes Ramos, Flavio Anastácio de Oliveira Camargo, Marco Flôres Ferrão, Renata Pereira Limberger.

Brazilian Journal of Police Sciences - Setembro de 2020

2. “Application of Chemometric Tools on Cannabis Samples Analyzed by the FTIR-ATR Method”

Autores: Marina González, Bruna Tassi Borille, Maíra Kerpel dos Santos, **Roberta Gorziza**, Mariana Fernandes Ramos, Natália Mai de Rose, Mauro Sander Fett, Rafael Scorsatto Ortiz, Flávio Anastácio de Oliveira Camargo, Marco Flôres Ferrão, Renata Pereira Limberger.

Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics - Setembro de 2020

3. “Methodologies Applied to Fingerprint Analysis”

Autores: Marina González, **Roberta Gorziza**, Kristiane de Cássia Mariotti, Renata Pereira Limberger.

Journal of Forensic Sciences - Março de 2020