

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

***ESTIMULANTES TIPO-ANFETAMÍNICOS: uma abordagem no trânsito, analítica
e forense***

KRISTIANE DE CÁSSIA MARIOTTI

Porto Alegre, 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

***ESTIMULANTES TIPO-ANFETAMÍNICOS: uma abordagem no trânsito, analítica
e forense***

Tese apresentada por **Kristiane de Cássia
Mariotti** para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR
em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof^a. Dr^a. Renata Pereira Limberger

Coorientador: Prof. Dr. Pedro Eduardo Froehlich

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 26.04.2013, pela Banca Examinadora constituída por:

Profª Dr. Simone Cristina Baggio Gnoatto
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profª Dr. Mirna Bainy Leal
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profª Dr. Fabiane Moreira Farias
Universidade Federal do Pampa

Profª Dr. Eliane Dallegrove
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Mariotti, Kristiane de Cássia
ESTIMULANTES TIPO-ANFETAMÍNICOS: uma abordagem no
trânsito, analítica e forense / Kristiane de Cássia
Mariotti. -- 2013.
119 f.
Orientadora: Renata Pereira Limberger.
Coorientador: Pedro Eduardo Froehlich.
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BRRS, 2013.
1. Estimulantes tipo-anfetamínicos. 2. Validação
Bioanalítica. 3. Medicamentos Falsificados. I.
Pereira Limberger, Renata, orient. II. Froehlich,
Pedro Eduardo, coorient. III. Título.

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

"Em relação a todos os atos de iniciativa e criação, existe uma verdade elementar: no momento em que nos comprometemos, a providência também se põe em movimento. Todo um fluir de acontecimentos surge a nosso favor. Como resultado da decisão, surgem todas as formas imprevistas de coincidências, encontros e ajuda, que nenhum homem jamais poderia ter sonhado encontrar. Qualquer coisa que você possa fazer ou sonhar, você pode começar. A coragem contém em si mesma o poder, o gênio e a magia."

Goethe

AGRADECIMENTOS

À Profª Dr. Renata P. Limberger por todos esses anos de adorável convívio, pelo incentivo ao crescimento profissional e pessoal. Ao Prof. Dr. Pedro E. Froehlich pelos direcionamentos no caminho científico.

Aos amigos do Laboratório de Toxicologia: Gabriela, Eloisa, Maíra, Paulinha, Ivão, Madson, Rose, Ana Laura, Otávio, Vitória, Priscila, Rosana. Ao Leo Meneghini, Vini Bica e Gabriel Rubensam pela acolhida e auxílio nas análises.

Ao IGP-SC, em especial à amiga Bruna Boff, pela pareceria na realização do estudo do trânsito.

Ao Fabiano Barreto, pela amizade de longa data, pela presteza e auxílio, pelo exemplo profissional. Seba, muito obrigada!

À Daniele Zago, amiga preciosa, sempre pronta para ensinar, ajudar, colaborar e enriquecer este trabalho.

Às amadas amigas de Frederico Westphalen pelo companheirismo fiel de uma vida toda!!

Ao Mano, Carol, Ju e Gabi Ferreira parceiros firmes desde 2002/01.

À Ivete, minha dinda dedicada, pelo incentivo, pelo apoio e pela torcida.

À minha querida Avó Sumpta, exemplo maior de vida.

Às manas Carla e Karina, alicerces da minha formação pessoal e profissional. Amor incondicional.

Ao Joãozinho e à Lulu, que possuem os sorrisos mais sapecas e mais curativos que existe!

Aos meus pais, João e Elenir, pelo incentivo, pela dedicação, pelo amor. Pela preocupação e pelo apoio. Por serem meus pais, obrigada sempre!

Ao Rafael, por trazer paz e acalento, pelo esforço e compreensão nos longos dias de estudo, pelo amor imenso e por ter o incrível dom de realizar sonhos.

APRESENTAÇÃO

APRESENTAÇÃO

De acordo com as normas vigentes no Estatuto do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a presente tese foi redigida na forma de capítulos, para melhor organização e discussão dos resultados obtidos em cada etapa. Assim, este trabalho encontra-se dividido da seguinte forma:

1. Introdução, contendo a caracterização e justificativa do estudo proposto;
2. Objetivos, geral e específicos;
3. Manuscritos I a V, artigos aceitos e submetidos a periódicos científicos:
 - a. Manuscrito I: *Amphetamine-type medicines: a review of pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicological aspects*
 - b. Manuscrito II *Drug usage, age and sex of persons killed in traffic accidents in State of Santa Catarina, Brazil*
 - c. Manuscrito III: *Simultaneous analysis of amphetamine-type-stimulants in plasma by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry*
 - d. Manuscrito IV: *Development and validation of a method for simultaneous determination of fenproporex, diethylpropione and methylphenidate in oral fluid by liquid-chromatography/ tandem mass*
 - e. Manuscrito V: *Trends in counterfeits amphetamine-type stimulants after its prohibition in Brazil*
4. Discussão geral, visando um entendimento global dos resultados apresentados nas diferentes etapas do trabalho;
5. Conclusões;
6. Referências

Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
2.1 Objetivo geral.....	6
2.2 Objetivos específicos.....	6
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
3.1 Aspectos gerais dos ATS.....	8
3.2 Utilização de ATS no trânsito.....	10
3.3 Matrizes biológicas para estudo dos ATS.....	13
3.4 Falsificações de ATS.....	15
4. MANUSCRITO I: <i>Amphetamine-type medicines: a review of pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicological aspects</i>	17
5. MANUSCRITO II: <i>Drug usage, age and sex of persons killed in traffic accidents in State of Santa Catarina, Brazil</i>	21
6. MANUSCRITO III: <i>Simultaneous analysis of amphetamine-type-stimulants in plasma by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry</i>	37
7. MANUSCRITO IV: <i>Development and validation of a method for simultaneous determination of fenproporex, diethylpropione and</i>	

<i>methylphenidate in oral fluid by liquid-chromatography/ tandem mass</i>	51
8. MANUSCRITO V: <i>Trends in counterfeits amphetamine-type stimulants after its prohibition in Brazil</i>	67
9. DISCUSSÃO GERAL	71
10. CONCLUSÕES.....	79
11. REFERÊNCIAS	83
12. ANEXOS.....	93
1 Carta de aceite do artigo intitulado <i>Amphetamine-type stimulants: a review of pharmacokinetics, pharmacodynamics, and toxicological aspects</i>	94
2 Carta de aceite do artigo intitulado <i>Trends in counterfeits amphetamine-type stimulants after its prohibition in Brazil</i>	95
3 Pareceres da banca examinadora	96
4 Ata de defesa de Tese.....	100

Lista de Figuras

Figura 1. a) Estrutura química da DIE; b) Estrutura química do FEN	9
Figura 2. Estrutura química do MPH.....	10
Figura 3. Number of victims in fatal traffic accidents between june 2008 to november 2010.	27
Figura 4. Cases of traffic accidents by age group.....	27
Figura 5. Prevalence of drug used in victmis of traffic accidents..	28
Figura 6. Sex ratio among victims of traffic accident tested positive for cannabinoids and cocaine.....	29
Figura 7. Results of database analysis of DFT.	29
Figura 8. Peak area comparison of FEN, DIE and AMP after plasma precipitation with TCA 10 % or zinc sulfatate 10 % in 0.5 M NaOH.	45
Figura 9. Central composite design of variables adsorption time and amount of PCF: a) DIE; b) FEN; c) AMP.....	46
Figura 10. a) Reference chromatograms from FEN, DIE, MPH and IS; The extracted ion chromatograms (XICs) from quantifier transition of: b) DIE; c) FEN; d) MPH.....	60
Figura 11. Calibration curves of (●) pure analytes dissolved in mobile phase; (◻) analytes added after the extraction of the matrix and (◻◻) the analytes spiked OF before its extraction for a) FEN; b) DIE and c) MPH.	61
Figura 12: Encadeamento das hipóteses formuladas para estudo nesta tese...	80
Figura 13: Desenho esquemático das etapas desenvolvidas nesta tese... ..	81

Lista de Abreviaturas

AMP: Anfetamina

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATS: Estimulantes tipo-anfetamínicos

LC-MS/MS: Cromatografia líquida acoplada a detector de massas em tandem

LC-MS: Cromatografia líquida acoplada a detector de massas

GC-MS: Cromatografia gasosa acoplada a detector de massas

DIE: Dietilpropiona

FDA – Food and Drug Administration

FEN: Femproporex

MPH: Metilfenidato

PROP: Propranolol

SMPE: Micro-extração em fase sólida

SNC – Sistema Nervoso Central

SPA: Substâncias Psicoativas

TCA: Ácido Tricloroacético

TDAH: Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade

RESUMO

A utilização de substâncias estimulantes tipo-anfetamínicos (ATS) por motoristas com objetivo de aumentar o tempo de vigília é um conhecido problema nacional com consequências sociais e legais. A dietilpropiona (DIE) e o femproporex (FEN) figuram entre os estimulantes do sistema nervoso central (SNC) mais utilizados por condutores no trânsito brasileiro. O metilfenidato (MPH) é um fármaco que apresenta propriedades similares à cocaína e à anfetamina (AMP). Sua utilização como droga de rua e recreacional tem aumentado nos últimos anos e seu uso tem ganhado espaço com a restrição da comercialização de DIE e FEN pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2011. O estudo do trânsito implica necessariamente o conhecimento do perfil dos condutores e da prevalência do uso de substâncias. Para a monitorização do consumo de substâncias no trânsito, é necessário o emprego de métodos analíticos validados para as matrizes biológicas de interesse. Sabe-se ainda que muitos condutores compram medicamentos ATS ilegalmente, em postos de combustível e pela internet. Conhecer o perfil químico e detectar falsificações desses medicamentos é parte essencial no desenvolvimento e aplicação de políticas públicas preventivas do uso de substâncias no trânsito.

Objetivos: avaliar dados do trânsito da região sul do Brasil, enfatizando o uso de substâncias, a idade e o sexo dos envolvidos em acidentes; desenvolver e validar métodos cromatográficos acoplados a detector de massas para quantificação simultânea de FEN, DIE e MPH em fluido oral e em plasma; avaliar o perfil de falsificações de medicamentos a base de ATS. **Resultados:** os dados de acidentes de trânsito com vítimas fatais no Estado de Santa Catarina no período de junho de 2008 a novembro de 2010, revelaram que 11,9 % dos casos apresentaram resultados toxicológicos positivos, sendo canabinóides (42 %) e cocaína (29,4 %) as substâncias mais prevalentes, seguidas de antidepressivos (10,3 %), anfetamínicos (9,5 %), benzodiazepínicos (7,1 %) e barbitúricos (1,6 %). A maioria das vítimas (44 %) era jovem – entre 16 e 30 anos – e do sexo masculino. O desenvolvimento e validação de método de extração e quantificação simultânea de AMP, FEN e DIE em plasma utilizando a técnica de imersão direta em micro-extração em fase sólida (SPME-DI) seguida de análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS) compreendeu etapas de desproteção da matriz e derivatização dos ATS. O método foi linear de 5,0 a 100 ng/ml. Os limites de

detecção foram 1,0; 1,5; 2,0 ng/ml para AMP, DIE e FEN respectivamente. A exatidão variou de 85,58 a 108,33 % e a precisão, calculada pelo desvio padrão relativo, não excedeu 15 %. A recuperação esteve entre 46,35 – 84,46 %. Também foi desenvolvida e validada metodologia para análise simultânea de FEN, DIE e MPH em fluido oral por cromatografia líquida acoplada a detector de massas em tandem (LC-MS/MS). As curvas de calibração utilizando o padrão interno propranolol apresentaram linearidade entre 2,5 e 90 ng/ml. O limite inferior de quantificação e o limite de detecção foram de 2,5 ng/ml e 0,5 ng/ml respectivamente, para todos os ATS. Precisão e exatidão intra e inter-dias mantiveram-se dentro dos limites preconizados pelas guias regulatórias. Não foram observados efeito de matriz nem *carry-over*. Por fim, foram desenvolvidos e aplicados métodos para a análise de apreensões de ATS os quais revelaram a existência de ativo farmacêutico diverso (sibutramina) daquele especificado no rótulo do medicamento (FEN), em concentrações que variaram de 1/3 até 2 vezes a dose diária preconizada. Pela análise estatística dos espectros de infravermelho foi possível diferenciar amostras autênticas e amostras falsas e ainda agrupar falsificações com perfis semelhantes.

Conclusões: os objetivos de estudo propostos nesta tese foram satisfatoriamente cumpridos e os resultados alcançados estão dispostos na forma de cinco artigos. Estes manuscritos contemplam temas relacionados ao uso de substâncias no trânsito, ao desenvolvimento e validação de metodologias analíticas e à análise de falsificações de medicamentos a base de ATS, demonstrando assim, a amplitude e multidisciplinariedade envolvidas no estudo dos compostos anfetamínicos.

Palavras-chaves: estimulantes tipo-anfetamínicos; validação; falsificação de medicamentos.

ABSTRACT

The use of amphetamine-type stimulants compounds (ATS) for drivers aiming to stay awake is a known national problem, with social and legal implications. Diethylpropion (DIE) and fenproporex (FEN) are among the central nervous system stimulant most used by drivers in Brazil. Methylphenidate (MPH) is a drug that has properties similar to cocaine and amphetamine (AMP). Its use as a recreational and street drug has increased in recent years and its use has achieved space by the restriction of the marketing of DIE and FEN by the National Agency for Sanitary Surveillance (ANVISA) in 2011. The traffic analysis necessarily implies knowledge of the profile of drivers and the prevalence of substance use. To monitor the consumption of substances in transit, validated analytical methods in different biological matrices should be employed and toxicological data interpreted according pharmacokinetics of each substance. It is also known that many motorists buy ATS illegally in gas stations and the Internet. Knowing the chemical profile and detect forgeries of these medications is an essential part in the development and implementation of public policies to prevent the use of ATS in traffic. **Objectives:** to evaluate the traffic data from southern Brazil, emphasizing the use of substances, age and sex of those involved in traffic accidents; develop and validate chromatographic methods coupled to mass spectrometry for quantification of FEN, DIE and MPH in oral fluid and in plasma; evaluate the profile of counterfeit medications based on ATS. **Results:** data analysis of traffic accidents with fatalities from June 2008 to November 2010 in the State of Santa Catarina revealed that 11.9 % of cases had positive toxicology results. Cannabinoids (42 %) and cocaine (29.4 %) had the highest prevalence, followed by antidepressants (10.3 %), amphetamines (9.5 %), benzodiazepines (7.1 %) and barbiturates (1.6 %). Most victims (44 %) were aged between 16 and 30 years old and male. A validated method for the simultaneous analysis of AMP, DIE and FEN in plasma samples employing direct immersion-solid phase microextraction (DI-SPME) followed by gas chromatographic/mass spectrometric analyses (GC-MS) was developed. Deproteinization and derivatization of ATS were employed. The method was linear from 5.0 ngml⁻¹ at 100 ngml⁻¹. The detection limits were 1.0, 1.5, 2.0 ngml⁻¹ for AMP, DIE and FEN respectively. The accuracy ranged from 85.58 to 108.33 % and precision, calculated by the relative standard deviation did not exceed 15 %. The recovery was between 46.35 to 84.46 %. Also was developed and validated a new

method for simultaneous determination of FEN, DIE and MPH in oral fluid by liquid-chromatography coupled to atmospheric pressure ionization tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The calibration curves, using an internal standard, demonstrated good linearity throughout the concentration range from 2.5–90 ngml⁻¹ in oral fluid. The lower limit of quantification and the limit of detection were 2.5 and 1.0 ngml⁻¹ respectively for all ATS. Intra- and inter-assay precision and accuracy values were within regulatory limits. Matrix effect and carry-over were not detected. Finally, methods have been developed and applied to analysis of seizures of ATS and the results showed the existence of active pharmaceutical (sibutramine) other than that specified on the label of the drug (FEN). The concentrations founded ranging from 1/3 to 2 times the recommended daily dose. Through the statistical analysis of the infrared spectra was possible to distinguish between authentic samples and counterfeit samples and also cluster the counterfeit ATS by their similar profiles. **Conclusions:** the proposed objectives of this thesis were satisfactorily completed and the results are arranged in the form of five manuscripts. These articles address issues related to substance use in traffic, development and validation of analytical methodologies and analysis of counterfeit medications based on ATS, highlighting the extent and multidisciplinary in the study of amphetamine compounds.

Keywords: amphetamine-type stimulants; validation, drug counterfeiting.

Os ATS são potentes estimulantes do SNC, apresentando marcada influência sobre as atividades psíquicas e psicomotoras e alto potencial de abuso, o que propicia o desenvolvimento de farmacodependência (Rang *et al.*, 2007). A utilização dessas substâncias por motoristas e as consequências dela decorrentes têm sido objeto de constante preocupação das autoridades nacionais e internacionais. No Brasil, os ATS mais utilizados com propósitos não terapêuticos por condutores são os chamados “rebites” (denominação popular entre motoristas para designação de substâncias estimulantes) os quais pertencem à classe dos moderadores do apetite, possuindo em sua composição principalmente femproporex (FEN) e dietilpropiona (DIE) (também denominado de anfepramona) (Nappo *et al.*, 2002; Leyton *et al.*, 2002; Leyton *et al.*, 2012).

O metilfenidato (MPH) é o fármaco mais frequentemente prescrito para o tratamento do Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH). Sua utilização na terapêutica tem aumentado proporcionalmente ao seu consumo como droga de rua e recreacional, gerando graves preocupações devido ao seu potencial para o desenvolvimento de farmacodependência e a suas propriedades estimulantes semelhantes à anfetamina (AMP) e à cocaína (Bolanós *et al.* 2003; Federici *et al.* 2005; Balcioglu *et al.*, 2009). Em recente estudo publicado por Zancanaro e colaboradores, foi encontrada uma prevalência de 9,8% de resultados positivos para uso de MPH por motorista em rodovias federais no Brasil em análises confirmatórias de fluido oral por cromatografia líquida acoplada a detector de massas em tandem (LC-MS/MS) (Zancanaro *et al.*, 2012). Com a recente proibição da venda de FEN e DIE pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Brasil, 2011), estima-se que o uso de MPH cresça como alternativa à maior dificuldade de acesso aos fármacos tradicionalmente utilizados como “rebites”.

No trânsito brasileiro, estudos apontam uma grande prevalência do consumo de cocaína e ATS, principalmente por motoristas profissionais, para aumentar o estado de alerta físico e mental durante as longas jornadas de trabalho (Leyton *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2005; Nascimento *et al.*, 2007; Pechansky *et al.*, 2010; Leyton *et al.*, 2012; Zancanaro *et al.*, 2012). O conhecimento do perfil dos condutores e do uso de substâncias no trânsito deve considerar as particularidades de cada Estado, pois sendo o Brasil um país continental, fronteiro a dez dos treze países que

compõem a América do Sul, cada Estado sofre as influências de suas fronteiras. Levando em consideração esses aspectos territoriais e culturais, faz-se necessário o conhecimento pontual do perfil dos condutores de cada Estado e as tendências de uso de substâncias psicoativas (SPA) no tráfego local para buscar a efetiva prevenção. Tendo como enfoque o sul do país, poucos estudos foram encontrados acerca do perfil do uso de substâncias no trânsito desses Estados (Pechansky *et al.*, 2010; De Boni *et al.*, 2011) demonstrando que ainda há um vasto campo de estudo a ser explorado. Com base nesses apontamentos, observou-se a necessidade de levantamento das estatísticas do trânsito e dos dados toxicológicos dos condutores do Sul do Brasil, buscando viabilizar o desenvolvimento de políticas públicas preventivas, orientadas quanto ao perfil do público-alvo e quanto aos danos provocados pelas substâncias encontradas nos resultados toxicológicos.

Para a satisfatória determinação, quantificação e interpretação de resultados toxicológicos faz-se necessário o emprego de métodos analíticos bem caracterizados e totalmente validados (Shah *et al.*, 2000) para as matrizes biológicas de interesse. Cada técnica analítica tem suas próprias características as quais podem variar de acordo com o analito e com o objetivo final do estudo, entretanto, critérios específicos de validação são definidos em guias nacionais e internacionais. Em um contexto amplo, validação pode ser definida como a confirmação através da análise e demonstração de evidências objetivas de que os requisitos para um uso específico foram atingidos (ICH, 2005; FDA, 2001), garantindo a qualidade das medições analíticas, sua comparabilidade, rastreabilidade e credibilidade. Em toxicologia, a escolha do método analítico dependerá do problema a ser resolvido (Maurer, 2005) e os resultados assim obtidos, em sua grande maioria, possuirão implicações legais e sociais. Portanto, considera-se imperiosa a utilização de metodologia validada para que os dados oriundos das análises possam sustentar o caráter de inequívocos e incontestáveis.

Em 2011, a ANVISA, após concluir um relatório sobre Avaliação de Eficácia e Segurança dos Medicamentos Inibidores do Apetite, concluiu pela retirada do mercado brasileiro e proibição da venda dos inibidores do apetite DIE, FEN e mazindol (RDC 52/11) devido à ausência de evidências sobre segurança e eficácia e ao elevado risco de efeitos adversos apresentados por esses anorexígenos (Brasil,

2011). Simultaneamente à proibição, ocorreu o aumento do número de apreensões de medicamentos a base de ATS suspeitos de falsificação. Essas falsificações representam um novo desafio as análises forenses no que concerne ao desenvolvimento de método que facilite a verificação da autenticidade ou inautenticidade de um medicamento apreendido e a aplicação de ferramenta(s) estatística(s) de análise melhor que se aplica(m) ao tratamento dos dados experimentais gerados.

Diante do exposto, verifica-se que os ATS possuem um vasto potencial para o desenvolvimento científico. Assim, esta tese estudou a relação entre uso de substâncias e acidentes de trânsito; desenvolveu e validou método para detecção e quantificação de ATS em fluido oral e plasma e avaliou o perfil de falsificações de medicamentos a base de ATS.

Tendo como ponto de partida tal tema, a abordagem de tratamento e os questionamentos, encontram-se dispostos na sequência dos trabalhos desenvolvidos.

2.1 Objetivo geral

Avaliar a relação entre uso de substâncias e acidentes de trânsito. Desenvolver e validar metodologia analítica para a determinação simultânea do teor de FEN, DIE e MPH por LC-MS/MS ou GC-MS, em fluido oral e plasma. Estudar o perfil químico de falsificações de medicamentos a base de ATS.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a relação entre uso de substâncias e acidentes de trânsito tendo como matriz de estudo o Estado de Santa Catarina e os dados estatísticos do Instituto Geral de Perícias de Santa Catarina (IGP-SC);
2. Determinar o pré-tratamento ideal para as amostras de plasma visando análise de FEN, DIE e AMP por GC-MS;
3. Determinar o pré-tratamento ideal para as amostras de fluido oral visando análise de FEN, DIE e MPH por LC-MS/MS;
4. Otimizar e padronizar protocolo analítico para a extração e pré-concentração de FEN, DIE e AMP por SPME;
5. Desenvolver e validar metodologia analítica para a determinação simultânea do teor de FEN, DIE e MPH por LC-MS/MS em fluido oral;
6. Desenvolver e validar metodologia analítica para a determinação simultânea do teor de FEN, DIE e AMP por GC-MS em plasma;
7. Avaliar o perfil físico e químico de apreensões de falsificações de medicamentos contendo ATS realizadas pelo Departamento de Polícia Federal no estado do Rio Grande do Sul.

3.1 Aspectos Gerais dos ATS

O abuso de SPA é hoje um problema global, atingindo tanto países desenvolvidos como em desenvolvimento. De acordo com a *United Nations* (2011) na última década houve um aumento significativo não apenas na produção e suprimento de drogas ilícitas, refletido pela grande quantidade de apreensões realizadas pelas autoridades policiais, mas também na demanda da população por estas substâncias. Ao mesmo tempo, no referido período verificou-se um crescimento no abuso e má utilização de drogas utilizadas tradicionalmente para fins medicinais, como anfetamínicos, opióides, benzodiazepínicos, barbitúricos, analgésicos, dentre outros (*United Nations*, 1995; *United Nations*, 2001; *United Nations*, 2011).

Em relatório divulgado pelo *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC), no ano de 2009 entre 149 e 272 milhões de pessoas entre 15 e 64 anos fizeram uso de substâncias ilícitas pelo menos uma vez naquele ano, sendo *Cannabis* a droga mais comumente utilizada, seguida de ATS (UNODC, 2011). O consumo *per capita* de anorexígenos anfetamínicos é cerca de três vezes maior no continente americano do que em qualquer outra região do globo (*United Nations*, 2008), e a utilização destes fármacos nas Américas tem crescido a cada ano. O Brasil está entre os maiores consumidores mundiais de ATS e levantamentos domiciliares realizados entre 2001 e 2005, revelam um consumo ascendente desses estimulantes do SNC no país (Carlini *et al.*, 2002, 2006).

A DIE, o FEN (Figura 1) e o mazindol figuram entre os três anorexígenos estimulantes do SNC mais utilizados no mundo (*United Nations*, 2008) e a realidade brasileira segue essa tendência mundial quanto ao consumo de ATS (Leyton *et al.*, 2002; Leyton *et al.*, 2012). Os dados divulgados pelo Centro de Informações Toxicológicas do Rio Grande do Sul (CIT-RS) refletem bem a situação local em relação à utilização de anorexígenos: do total de 113 casos de exposição humana tóxica a estes medicamentos atendidos no ano de 2011, 29 referiam-se à ingestão de DIE e 13 à FEN (CIT/RS, 2011).

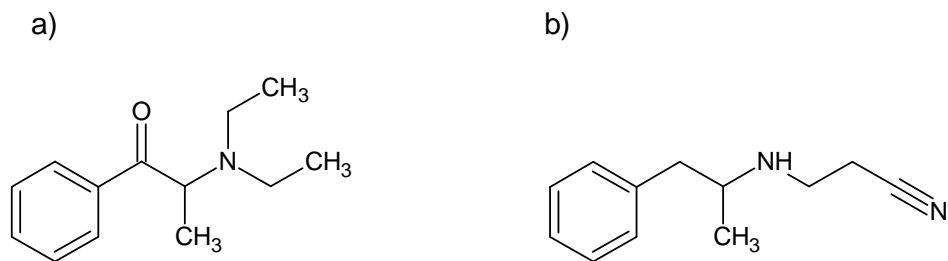


Figura 1: a) Estrutura química da DIE; b) Estrutura química do FEN.

Recentemente, com o objetivo promover um conjunto de ações para eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde, a ANVISA concluiu pela retirada do mercado brasileiro e proibição da venda dos inibidores do apetite DIE, FEN, mazindol conforme RDC 52/11 (Brasil, 2011). Tal decisão foi baseada em relatório divulgado pela agência, o qual consistiu em uma compilação de dados da literatura e concluiu pela ausência de evidências sobre segurança e eficácia e pelo elevado risco de efeitos adversos apresentados por esses anorexígenos (Brasil, 2011). A sibutramina também foi alvo de investigação, mas apesar de “apresentar relação benefício/risco desfavorável para sua utilização clínica como adjuvante no tratamento da obesidade” não foi retirada do mercado, porém, maiores restrições foram impostas à sua comercialização.

O MPH (Figura 2) é um composto com propriedades estimulantes utilizado na terapêutica para o tratamento do TDAH e da narcolepsia (Goodman & Gilman, 2006). O abuso de MPH tem sido relatado nos Estados Unidos e na Suíça desde 2004, e é definido como a utilização sem prescrição, ou em dose maior do que a prescrita, ou ainda quando sua administração ocorre por via não-oral (Bruggisser *et al.*, 2011). O uso intranasal ou injetável de MPH produz efeitos tóxicos como: hipertensão, taquicardia, agitação, hiperatividade, irritabilidade, insônia, convulsões e coma. Paranóia e outros comportamentos psicóticos também foram relatados (Farquhar *et al.*, 2002). Devido a seus efeitos estimulantes e a sua crescente utilização como droga de rua e recreacional investiga-se o seu potencial para o desenvolvimento de farmacodependência (Balcioglu *et al.*, 2009). O MPH age através do aumento da liberação e do bloqueio da recaptação de dopamina e norepinefrina, sendo

que o aumento dos níveis de dopamina é dose-dependente e produz respostas motoras elevadas após administração de doses repetidas (Bolanõs *et al.*, 2003; Federici *et al.*, 2005).

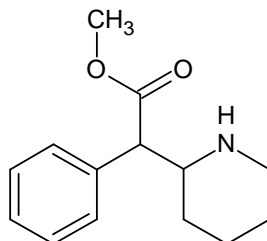


Figura 2: Estrutura química do MPH.

De modo geral, os ATS podem aumentar a pressão sanguínea, os batimentos cardíacos e a temperatura corporal; bem como diminuir o sono e o apetite. O uso repetido de psicoestimulantes pode acarretar sentimentos de hostilidade e paranóia (NIDA, 2011). Devido à influência sobre as atividades psíquicas e psicomotoras possuem alto potencial de abuso, propiciando o desenvolvimento de farmacodependência e ocorrência elevada de efeitos colaterais, cumulativas com o uso contínuo (Gatley *et al.*, 1999; Schenk and Izenwasser 2002; Bolaños *et al.*, 2003; Brandon *et al.*, 2003; Rothman and Baumann 2003; Guerriero *et al.*, 2006).

3.2 Utilização de ATS no trânsito

A utilização de SPA por motoristas e suas consequências no trânsito têm sido objeto de constante preocupação de autoridades nacionais e internacionais. O Código de Trânsito Brasileiro (CTB) Lei 9.503/97 (Brasil, 1997), recentemente alterado pela Lei nº 12.760/12 (Brasil, 2012), tipifica como crime na Seção II (Dos crimes em Espécie), artigo 306 a conduta de “Conduzir veículo automotor com capacidade psicomotora alterada em razão da influência de álcool ou de outra substância psicoativa que determine dependência” e prevê com a pena “detenção, de seis meses a três anos, multa e suspensão ou proibição de se obter a permissão ou a habilitação para dirigir veículo automotor”. O artigo 165 do CTB ainda estabelece que “dirigir sob

influência de álcool ou de qualquer substância psicoativa que determine dependência é infração de natureza gravíssima”. Apesar disso, estudos nacionais têm evidenciado grande prevalência no consumo de SPA no trânsito, notadamente de cocaína e compostos anfetamínicos, utilizados principalmente por motoristas profissionais para aumentar o estado de alerta físico e mental durante as jornadas de trabalho (Leyton *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2005; Leyton *et al.*, 2012; Zancanaro *et al.*, 2012).

A evolução do número de mortes por acidentes de trânsito no Brasil chama a atenção: em 1971, a taxa de mortes por acidentes de trânsito era de 11,1 a cada 100 mil habitantes, sendo que em 2010 passou para 22,5. O estado de Santa Catarina destaca-se dentre os demais, pois nos anos de 2005 a 2007 possuía a maior taxa média de mortes a cada 100 mil/ hab. do país (33,1), seguido do Mato Grosso do Sul (30,4) e Paraná (29,8). Além disso, a maior parte dos municípios com as maiores taxas de morte no trânsito do país eram de Santa Catarina. (CNM, 2012). Apesar da expressiva contribuição desse estado para os dados de mortes por acidentes de trânsito, na revisão bibliográfica realizada nesta tese, não foram encontrados estudos que correlacionem o uso de substâncias e acidentes em Santa Catarina.

De modo geral, apesar do grande número de vítimas fatais no trânsito nacional, poucos estudos foram encontrados acerca do tema. Dentre esses, Silva e colaboradores (2003) analisaram 728 amostras de urina de motoristas de caminhão das regiões Nordeste, Sudeste e Sul do país e evidenciaram a presença de anfetamina ou cocaína em 5,4% das amostras (Silva *et al.*, 2003). Em 2004, Yonamine analisou amostras de urina (n=558) e saliva (n=559) coletadas aleatoriamente de motoristas de caminhões nas rodovias de São Paulo, tendo encontrado positividade para anfetamina ou benzoilecgonina (metabólito da cocaína) em 2,5 % das amostras de urina e para anfetamina ou cocaína em 1,2 % das amostras de saliva (Yonamine *et al.*, 2004). Em 2005, Souza e colaboradores entrevistaram 260 motoristas de caminhão do Estado do Mato Grosso do Sul e identificaram uma prevalência de 11,1 % no consumo de estimulantes anorexígenos (DIE e FEN), sendo de 77,1 % a taxa de utilização destes medicamentos seis ou mais vezes na semana (Souza *et al.*,

2005). Em estudo posterior, realizado por Nascimento e colaboradores (2007), com 91 caminhoneiros do Estado de Minas Gerais, 66 % deles informaram utilizar anfetamínicos durante os percursos de viagem, sendo tais substâncias adquiridas de forma ilícita em postos de combustíveis e até mesmo nas empresas transportadoras. Dos caminhoneiros usuários de anfetamínicos, 27 % relataram o envolvimento em acidentes de trânsito decorrentes do uso destes fármacos (Nascimento *et al.*, 2007).

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

Em 2012, Zancanaro e colaboradores investigaram a presença de 32 SPA em 2235 amostras de fluido oral de condutores em rodovias federais em 24 estados brasileiros. Dessas, 236 (~10 %) apresentaram resultados toxicológicos positivos, sendo cocaína (47,5 %) e compostos anfetamínicos (25,4 %) as substâncias mais prevalentes. No mesmo ano, Leyton e colaboradores publicaram estudo relativo ao uso, por motoristas de caminhão, de cocaína, anfetamínicos e canabinóides nas estradas do estado de São Paulo. Amostras de urina com resultados toxicológicos positivos foram encontrados em 42 (9,3 %) dos 452 motoristas que concordaram em participar do estudo apontaram. Dentre os compostos investigados houve uma prevalência de 26 (5,8 %) para anfetamínicos, 10 (2,2 %) para cocaína e 5 (1,1 %) para canabinóides.

Apesar de atualmente não ser comercializada no Brasil nenhuma especialidade farmacêutica contendo o fármaco anfetamina (Brasil, 2002), alguns derivados anfetamínicos, tais como o FEN, a selegilina, o clobenzorex, o mefenorex dentre outros, são metabolizados a anfetamina durante a sua biotransformação no organismo (AGSA, 2006). Assim, os resultados positivos para anfetamina obtidos nos estudos com amostras de urina acima citados podem refletir a utilização de outras substâncias. De fato, no estudo realizado por Silva e colaboradores (2003), 52,7% das amostras de urina positivas para anfetamina evidenciaram também a presença de FEN, indicando que aquela era originária da biotransformação desta droga (Silva *et al.*, 2003).

Apesar de a pesquisa envolvendo o uso de álcool e outras drogas no trânsito brasileiro ter se desenvolvido consideravelmente nos últimos anos, evidencia-se, ainda, a escassez de dados relativos às regiões do sul. Considerando o alto impacto sócio-econômico dos acidentes de trânsito, destaca-se a necessidade do conhecimento do perfil de uso de substâncias no trânsito desses Estados. Para viabilização desses estudos é necessário desenvolver e validar métodos, garantindo a qualidade das medições analíticas, sua comparabilidade, rastreabilidade e credibilidade. Cabe ressaltar que em toxicologia analítica, quando se trata de análises no âmbito forenses, os resultados normalmente possuem implicação legal e buscam estabelecer relação de causa e efeito; apontar para a licitude ou ilicitude da substância e/ou da situação; auxiliar na inteligência policial; investigar o perfil químico e as tendências do uso e do tráfico, dentre outros. Por questões de princípio geral, científico, ético e legal, tais resultados devem ser inequívocos e incontestáveis.

3.3 Matrizes biológicas para estudo de ATS

Tradicionalmente, a urina tem sido o exemplo mais comum de matriz biológica selecionada na triagem do uso recente de drogas de abuso, pois é uma das matrizes com menor número de interferentes endógenos, uma vez que é constituída principalmente por água. Além disso, quando comparada ao

sangue, a urina frequentemente apresenta concentrações mais altas de xenobióticos e/ou seus produtos de biotransformação (Moreau, 2008).

A utilização das matrizes convencionais, sangue e urina, foi complementada pela incorporação do fluido oral o qual reflete o perfil de concentração e tempo da droga no sangue (Kankaanpää *et al.*, 2004). O fluido oral, que consiste de saliva e outros fluidos e substâncias presentes na cavidade oral, é considerado como a principal matriz alternativa ao sangue para a detecção do uso recente de medicamentos e drogas de abuso (Concheiro *et al.*, 2007). A utilização do fluido oral para a monitorização do consumo de drogas no trânsito apresenta uma série de vantagens sobre as matrizes tradicionais, e vem sendo empregada em diversos países do mundo (Samyn *et al.*, 2002; Bernhoft *et al.*, 2005; Toennes *et al.*, 2005; Wylie *et al.*, 2005; Drummer *et al.*, 2007). Dentre as vantagens dessa matriz destaca-se a coleta fácil e não invasiva, podendo ser realizada no próprio local da abordagem, sob vigilância e sem constrangimentos, além do fato de fornecer informação sobre o consumo recente (algumas horas) de SPA. Ainda, no fluido oral encontram-se basicamente as SPA na forma inalterada, tendo sua análise facilitada (Drummer 2006; Concheiro *et al.*, 2007). As desvantagens apresentadas pelo fluido oral, como o elevado conteúdo glicoprotéico (mucina), reduzido volume de amostra e baixa concentração de fármacos, podem ser suplantadas pela utilização de métodos adequados de extração e pré-concentração dos analitos, como a SPME, unidos a técnicas sensíveis de detecção, tais GC-MS e LC-MS/MS (Yonamine, 2004).

Amostras de sangue e seus derivados (soro ou plasma) são de especial importância nas análises toxicológicas, pois por intermédio dos níveis sanguíneos de determinados xenobióticos quase sempre é possível realizar correlações com os efeitos dessa substância sobre o organismo (Moreau, 2008). A droga no sangue costuma equilibrar-se rapidamente nas células sanguíneas e nas proteínas plasmáticas. Portanto, qualquer fluido (sangue total, plasma ou soro) pode ser utilizado para refletir o perfil sistêmico temporal do analito (Tozer e Rowland, 2009).

3.4 Falsificações de ATS

Com as medidas restritivas aplicadas pela ANVISA relativas à comercialização dos medicamentos anorexígenos (Brasil, 2011), ocorreu o aumento do número de apreensões de medicamentos a base de ATS suspeitos de falsificação. Por definição, medicamentos falsificados são produtos farmacêuticos que “foram rotulados de forma errônea – deliberada e fraudulentamente – no que diz respeito à identidade e/ou à origem” (WHO, 1999). A produção de medicamentos falsificados é um problema criminal e sanitário, acarretando sérios riscos à saúde pública no mundo todo. Na tentativa de combater este fenômeno, a Organização Mundial da Saúde (OMS) criou em 2006 uma coalizão global denominada *IMPACT (International Medical Products Anti-Counterfeiting Taskforce)*. O grupo tem trabalhado na formação de colaboração internacional para buscar soluções globais para este desafio bem com na conscientização sobre os perigos da contrafacção de produtos farmacêuticos (WHO, 2008).

As análises envolvendo a verificação e a comprovação da falsificação de um medicamento representam um desafio aos analistas forenses: tanto os produtos de origem natural quanto os sintéticos constituem-se, normalmente, de misturas complexas que raramente contêm a droga isolada. Além disso, salienta-se as condições de produção peculiares dos laboratórios clandestinos, isentos de controle de qualidade na produção, sua composição química exhibe grande variabilidade (Ensing *et al.*, 1992; Dams *et al.*, 2001; UNODC, 2005; Andersson *et al.*, 2007; Lociciro *et al.*, 2007; Lociciro *et al.*, 2008; Weyermann *et al.*, 2008; Marquis *et al.*, 2008; Dujourdy *et al.*, 2008).

Conforme Ortiz (2013), de modo geral, a análise da falsificação de um medicamento fundamenta-se em uma comparação entre o produto original ou dados da literatura e o produto questionado. A detecção da falsificação inclui, de uma maneira geral:

(1) exames macroscópicos das embalagens e bulas;

(2) avaliação externa da forma farmacêutica, referentes aos aspectos visuais e aspectos tecnológicos, gerando um perfil dos aspectos físicos, e;

(3) análises químicas para caracterização da formulação visando identificar ou quantificar fármacos e adjuvantes tecnológicos. Estes exames são executados cronologicamente.

Considerando a classe dos ATS classificados como anorexígenos, a exemplo do FEN e da DIE, nenhum estudo envolvendo análises de falsificações desses medicamentos foi encontrado na literatura. Assim, as falsificações de medicamentos ATS representam um novo desafio às análises forenses no que concerne ao desenvolvimento de método que facilite a verificação da autenticidade ou inautenticidade de um medicamento apreendido e a aplicação de ferramenta(s) estatística(s) de análise que melhor se aplica(m) ao tratamento dos dados experimentais gerados.

Considerando os dados citados, esta tese estudou a relação entre uso de substâncias e acidentes de trânsito; desenvolveu e validou método para detecção e quantificação de ATS em fluido oral e plasma e avaliou o perfil de falsificações de medicamentos a base de ATS.

4 MANUSCRITO I – *Amphetamine-type medicines: a review of pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicological aspects*

Manuscrito I

A seguir encontra-se artigo intitulado “*Amphetamine-type medicines: a review of pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicological aspects*” Este artigo traz uma revisão atual dos principais aspectos farmacocinéticos, farmacodinâmicos e toxicológicos de MPH, FEN e DIE.

Este artigo foi aceito para publicação na revista *Current Clinical Pharmacology*. A versão completa pode ser acessada no sitio do periódico.

Amphetamine-Type Medicines: A Review of Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Toxicological Aspects

K.C. Mariotti^a, L.G. Rossato^b, P.E. Fröhlich^a and R.P. Limberger^{a,*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil; ^bREQUIMTE, Laboratório de Toxicologia, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Portugal

Abstract: Amphetamine-like drugs are sympathomimetic agents with marked central and peripheral stimulant properties. Despite the street illegal drugs such as amphetamine and ecstasy, some amphetamine-like compounds are also legally marketed under medical prescription in the treatment of attention deficit-hyperactivity disorder (methylphenidate) and obesity/overweight (fenproporex and diethylpropione). However, similar with what happens with their illicit analogues, therapeutic amphetamine-like drugs also share important toxicological risks. Although methylphenidate is considered the first choice in the treatment of attention deficit-hyperactivity disorder, its high popularity among teenagers and children is raising concern in the medical community. Regarding weight-loss purposes, the use of amphetamine-like compounds are very controversial, though. Thus, the present review will address pharmacokinetic, pharmacodynamic, and toxicological aspects of amphetamine-like compounds used with therapeutic aims.

Keywords: Amphetamine, amphetamine, diethylpropione, fenproporex, methylphenidate, stimulants.

**5 MANUSCRITO II – *Drug usage, age and sex of persons killed
in traffic accidents in State of Santa Catarina, Brazil***

Manuscrito II

A seguir encontra-se artigo intitulado “*Drug usage, age and sex of persons killed in traffic accidents in State of Santa Catarina, Brazil*”, submetido ao periódico *Accident Analysis & Prevention*. Esta é a versão corrigida enviada à revista após sugestões de seus revisores.

Este estudo foi desenvolvido junto ao IGP-SC e avaliou o perfil dos condutores envolvidos em acidentes de trânsito que resultaram em vítimas fatais naquele estado, tendo como variáveis de estudo: uso de drogas; idade e sexo. Destaca-se neste estudo a prevalência de amostras toxicológicas positivas em 11,9% dos casos, sendo canabinóides (42 %) e cocaína (29,4 %) as substâncias mais prevalente, seguida de antidepressivos (10,3 %), anfetamínicos (9,5 %), benzodiazepínicos (7,1 %) e barbitúricos (1,6 %). A maioria das vítimas (44 %) eram jovens entre 16 e 30 anos e do sexo masculino.

DRUG USAGE, AGE AND SEX OF PERSONS KILLED IN TRAFFIC ACCIDENTS IN THE STATE OF SANTA CATARINA, BRAZIL

Kristiane de Cássia Mariotti^{a*}; Bruna de Souza Boff^b; Rafael Scorsatto Ortiz^c; Pedro Eduardo Froehlich^a; Renata Pereira Limberger^{a*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2752 Ipiranga Avenue, Santana, Zip Code 90610-000 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

^b Instituto Geral de Perícias do Estado de Santa Catarina, 590 Pastor William Richard Schisler Filho Street, Itacorubi, Zip Code 88034-100, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

^c Setor Técnico-Científico, Superintendência Regional do Departamento de Polícia Federal no Rio Grande do Sul, 1365 Ipiranga Avenue, Azenha, Zip Code 90160-093 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

* Corresponding author. Tel.: +55 51 33085297; fax: +55 51 33085437.

E-mail address: rlrenata@yahoo.com (R.P. Limberger); krisMariotti@gmail.com (K.C. Mariotti).

Abstract

According to statistics provided by the Department of Forensic Toxicology and the Forensic General Institute of the State of Santa Catarina, Brazil, a total of 1,682 victims were killed in traffic accidents over the approximately two years from June 2008 to November 2010. Forensic autopsies were completed for a total of 941 cases (56%), and urine was sent for toxicological analysis. Positive toxicology results for 112 samples (11.9%) revealed that the majority of subjects were males (n=92; 82.1%) between 16 to 30 years of age (44%). In addition, positive tests for one or more drugs showed that cannabinoids had the highest prevalence (n=53; 42%), followed by cocaine and its metabolites (n=37; 29.4%),

antidepressants (n=13; 10.3%), amphetamines (n=12; 9.5%), benzodiazepines (n=9; 7.1%) and barbiturates (n=2; 1.6%). In the 14 cases with (13%) poly-drug results, the most frequent combination was cocaine and cannabinoids (n=8). Even without taking alcohol use into account, the prevalence of drug use in cases of traffic accidents is alarming. Our register-based study shows a large and increasing prevalence of drug use in fatal traffic accidents in the state of Santa Catarina (SC). These data are consistent with other Brazilian studies and show that driving under the influence of drugs (DUID) is a major public health problem.

Keywords: DUID; Driving; Drugs; Fatal traffic accidents.

1. Introduction

Driving under the influence of drugs (DUID) is a significant global problem and is still among the leading causes of car accidents and casualties (Walsh et al., 2005; Ronen et al., 2010; Zhuo et al., 2010). According to the *Global Status Report on Road Safety: Time for Action* (WHO, 2009), reported road traffic fatalities in Brazil in 2006 numbered 35,155 (82% males, 18% females). In Santa Catarina (SC), one of the smallest Brazilian states, the number of traffic fatalities is very high, with a prevalence of 31/100,000 inhabitants (CNM, 2009).

Many studies on the prevalence of DUID have been completed in European countries, Australia and the United States (Drummer et al., 2004; Holmgren et al., 2005; Holmgren et al., 2008; Elliott et al., 2009; Steentoft and Linnet, 2009; Jones et al., 2009; Musshoff and Madea, 2010; Jones et al., 2011). One study investigated the incidence of alcohol and drug use by 3,398 fatally injured drivers in Australia between 1990–1999. The prevalence of alcohol, drugs (other than alcohol) and psychotropic drugs was 29.1%, 26.7% and 23.5%, respectively. It was observed that the presence of *Cannabis* and opioids increased throughout the decade, while alcohol use decreased (Drummer et al., 2003).

In mid-2009 in Victoria, Australia, drug tests on the blood from 1,714 injured drivers taken to the hospital revealed that alcohol (0.01 g/100 mL) was present in 29% of the samples and drugs were present in 35% of the samples (Drummer et al., 2011). In South Australia, blood samples from 2,500 injured drivers were analyzed for alcohol, cannabinoids, benzodiazepines and stimulants. Drivers who tested positive for alcohol only, benzodiazepines only and the combinations of alcohol and THC or alcohol and benzodiazepines were significantly more likely to be culpable for the crash when compared with the drug-free group (Longo et al., 2001). In five Nordic European countries between the years 2001 and 2002, blood samples from drivers that died within 24 h of their accident demonstrated that 60% of the drivers in single vehicle crashes had drugs in their system, compared to only 30% of drivers killed in collisions with other vehicles (Morland et al., 2011).

It is known that impaired brain function after exposure to psychoactive drugs is linked to a variety of traffic accidents (Zhuo et al., 2010). There is a strong relationship between drug use and increased crash culpability; furthermore, key factors of the DUID offender in crash causation include age, ethnicity, education, employment status, income and marital status (Nochajski and Stasiewicz, 2006; Berghaus et al., 2007; Watling and Freeman, 2011). These factors have a significant influence on the occurrence of traffic accidents and are of fundamental importance for road safety.

Unfortunately, data reports regarding the prevalence of DUID in Brazil are lacking. There are only a small number of epidemiological studies that have focused on toxicological analysis (Leyton et al., 2011), despite a high number of deaths due to traffic accidents in the country. These missing analyses represent an obstacle in the elucidation of local risk factors associated with fatal traffic accidents. Thus, this study was developed to consolidate data reports and aid in the implementation and development of public prevention policies to increase road safety.

2. Materials and methods

In this study, we estimated risk factors (Berghaus et al., 2007) using the Department Forensic Toxicology (DFT) database. The urine samples of fatal traffic accident victims were processed at DFT. The individual substances assessed included cocaine and its metabolites, cannabinoids, antidepressants, barbiturates, benzodiazepines, amphetamines and opioids. This study focused on the statistical descriptive analysis of data extracted from the DFT using the means, medians, and standard deviations. We compiled data regarding the drug use prevalence, age and gender of fatal traffic accident victims throughout the state of SC.

3. Results

SC has a total population of 6,248,436 and is one of the smallest Brazilian states. Despite this fact, the rate of traffic fatalities is one of the largest in Brazil and is estimated at 31/100,000 inhabitants (CNM 2009). These data provided the motivation for this research. In each Brazilian state, a central forensic laboratory performed a full toxicological investigation on all driver fatalities irrespective of type or cause. In SC, 1,682 people were killed in road traffic crashes (including cases of trampling) between June 2008 and November 2010 (Figure 1). After considering the circumstances of the accident and the victim's condition, 941 urine samples were analyzed. This total case number was used in all statistical analyses.

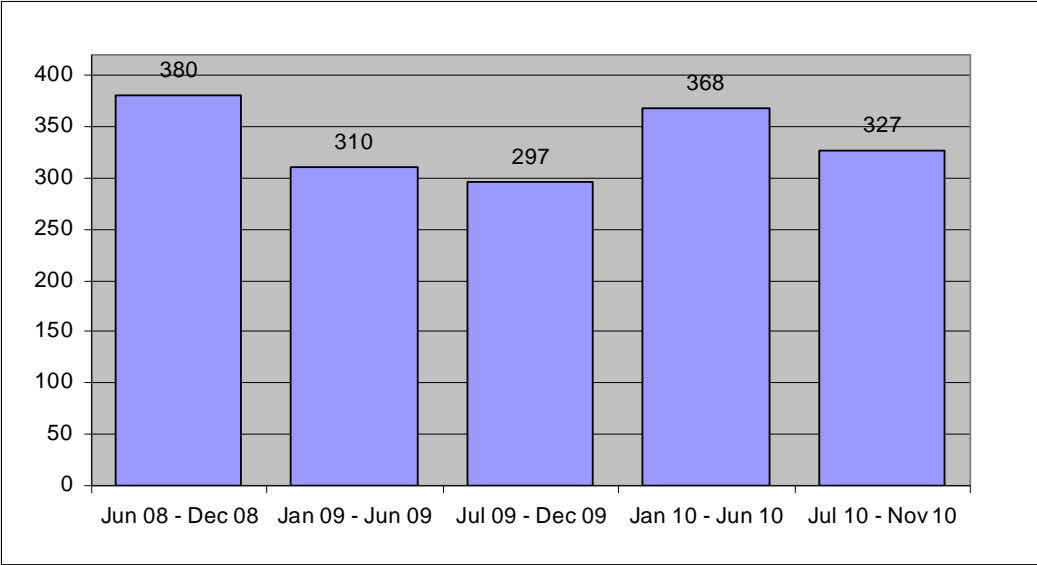


Figure 1. The number of victims in fatal traffic accidents between June 2008 and November 2010.

The age distribution of the traffic victims is shown in Figure 2. The age group that showed the highest mortality rate in traffic accidents was 16 to 30 years of age. This group was responsible for 44% of the total deaths.

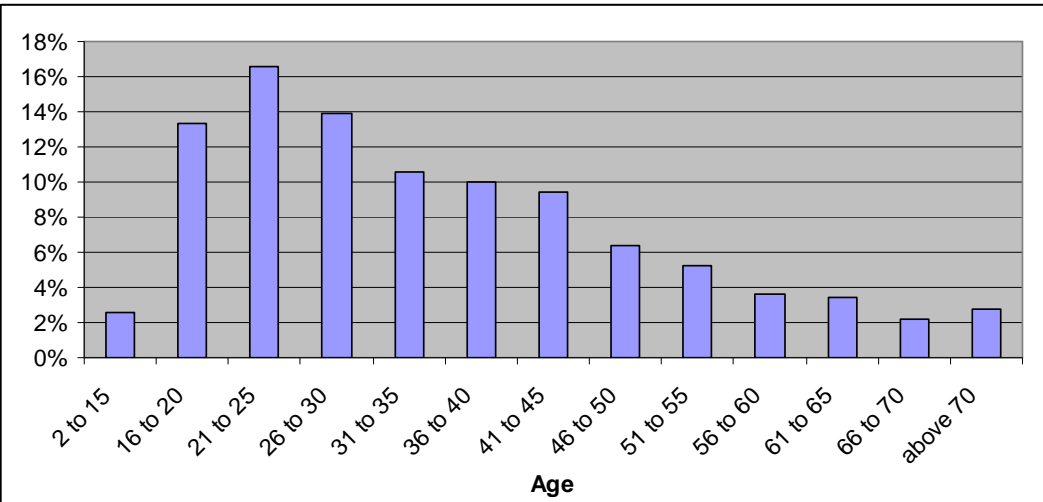


Figure 2. The number of traffic accidents based on age group.

Among the 941 cases, the toxicological tests yielded positive results in 112 samples (11.9%). Toxicological analyses were performed for cocaine and its metabolites, cannabinoids, antidepressants, barbiturates, benzodiazepines, amphetamines and opioids. The most frequently detected substance was cannabinoids (n=53; 42%), followed by cocaine and its metabolites (n=37; 29.4%), antidepressants (n=13; 10.3%), amphetamines (n=12; 9.5%), benzodiazepines (n=9; 7.1%) and barbiturates (n=2; 1.6%) (Figure 3). Opioids were not detected in any of the samples analyzed.

Poly-drug use was present in 14 cases (13%). Of these 14 cases, the simultaneous presence of cocaine and cannabinoids was observed in 8 cases, of cocaine and antidepressants in 2 cases, of cannabinoids and amphetamines in 2 cases, of benzodiazepines and antidepressants in 1 case and of amphetamines, barbiturates and antidepressants in 1 case.

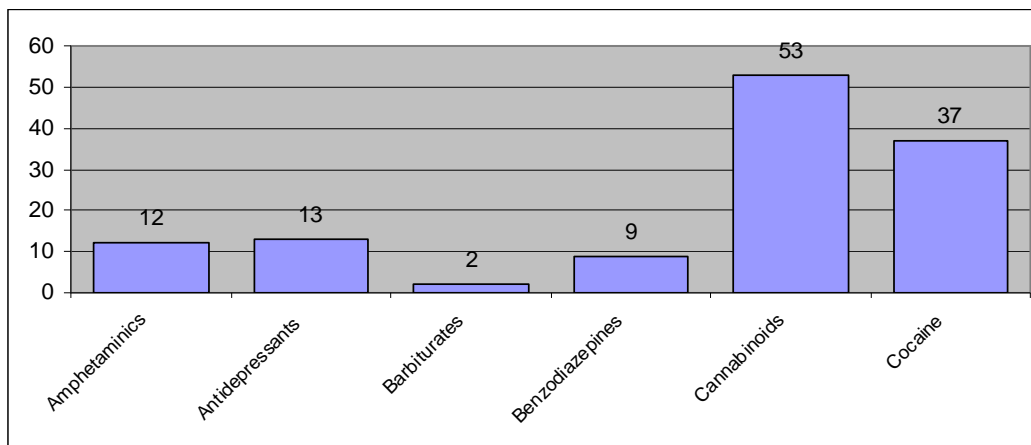


Figure 3. The prevalence of drug use among traffic accident victims.

We evaluated the relationship between gender and the two most frequently detected drugs. The number of males that died in traffic accidents and tested positive for cocaine or cannabinoids was 50 and 33, respectively. The number of women that tested positive for cocaine and cannabinoids was 4 and 3, respectively (Figure 4).

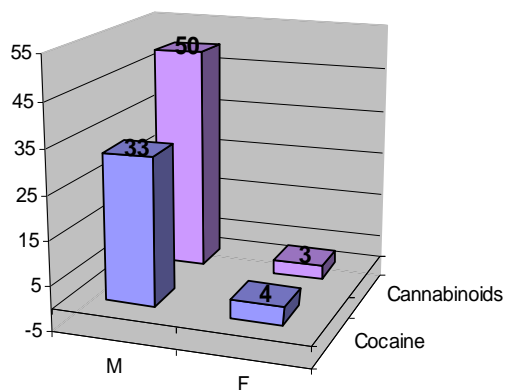


Figure 4. Sex ratios among traffic accident victims who tested positive for cannabinoids and cocaine.

The percentages of positive toxicological results based on sex and drug type are summarized in Figure 5.

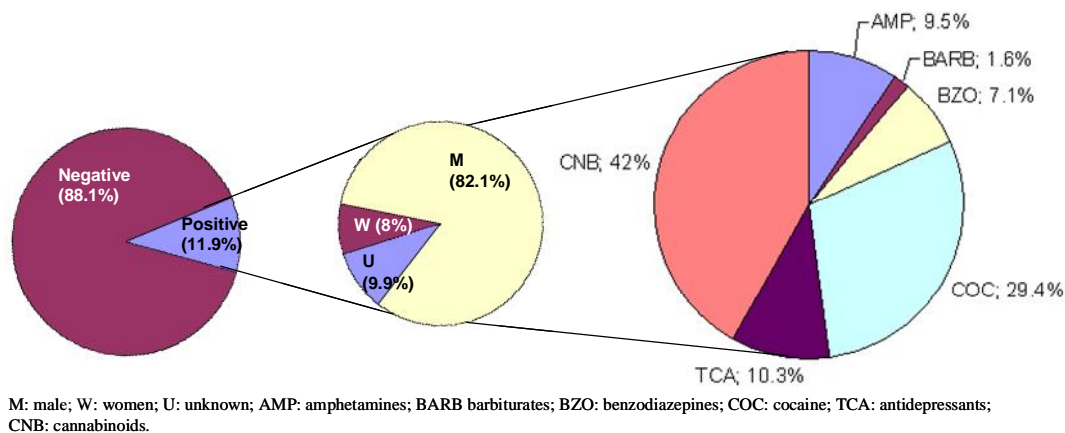


Figure 5: The results of an analysis of the DFT database.

4. Discussion

The research on alcohol and/or psychotropic drug use related to traffic accidents in Brazil is still lacking when compared with the international contributions to the subject. Indeed, Brazil is currently working to form an

appropriate framework of epidemiological information that can guide public policy (Paula et al., 2010).

The data collection conducted for this study can aid in the development of national data to support legal sanctions, deterring future DUID behavior. In addition, these data can be used in rehabilitation programs aimed at educating DUID offenders about the risks of DUID and/or treating underlying cases of substance abuse (Nochajksi and Stasiewicz, 2006).

The incidence of fatal traffic accidents between June 2008 to November 2010 in the State of SC were evaluated. A total of 1,682 cases of traffic deaths were recorded in the DFT database, but only the 941 cases with samples collected for toxicological analysis were used in our statistical analysis. Important data inclusion criteria were complete police reports and the good condition of the specimens collected. In many cases, toxicological tests were not possible because of low sample volume or the lack of a sample due to the extent of the trauma. Only cases with sufficient urine sample analysis were evaluated in this study. Of the 914 samples, 11.9% of the toxicological tests were positive. This finding is in agreement with other studies that reported a prevalence of drugs other than alcohol in fatally injured drivers of between 6 and 37% (Siegel, et al., 2000). Drug use in Brazil has followed international trends (Ojaniemi et al., 2009; Musshoff and Madea 2010; Senna et al., 2010; Drummer et al., 2011). By far the most common drug found in fatally injured drivers was cannabinoids (42%), followed by cocaine (29.4%) and other psychoactive medicinal drugs with a warning label. These findings were particularly pronounced in the younger age group. These observations suggest that collision prevention efforts should be targeted to these age and drug groups.

DUID is an important road safety problem, and the characteristics of drivers impaired by alcohol or drugs are relevant for targeted interventions (Vaez and Laflamme 2005). There are various ways in which drugs may impair driving skills, including decreasing alertness, degradation of motor skills, reducing visual acuity and degradation of judgment and decision-making (Augsburger and Rivier 1997; Morland et al., 2011).

According to the Brazilian Traffic Code, driving under the influence of alcohol or other addictive psychoactive substances is a grave offense (Brasil, 1997). Since a “zero tolerance” policy was adopted in 2008, it has been forbidden to drive with any level of alcohol present in the blood in Brazil (Brazil, 2008). The newest Brazilian law in the 165th article of the Road Traffic guidelines states that driving under the influence of alcohol (at any concentration per liter of blood) or psychoactive substances that may cause dependence is a very serious offense, subject to fines, suspension of the driver’s license for twelve months, seizure of the car until an authorized driver is presented and retention of the driver’s license. Despite the legal means to monitor drivers suspected of being under the influence of psychoactive substances, only the estimated amount of alcohol can be assessed through the use of a breathalyzer. There are no regulated methods for immediate analysis of drugs other than alcohol in Brazil. Therefore, a driver that did not drink but used other drugs will be released for transit due to lack of proof.

A great national problem is the lack of investment in public toxicological analysis laboratories. Usually there is only one Department of Forensic Analysis for each Brazilian State, which is insufficient to handle the huge demand of traffic accidents and other fatalities. This leads to an overload for laboratories that have a small amount of equipment and available professionals.

It is also necessary to develop methods that address the reality of the country’s problem. Public agencies often use immunoassays for drug screening analysis. These immunoassays were developed for analysis of amphetamine or methamphetamine; however, one of the most consumed stimulants in local traffic is diethylpropione, which is not metabolized to amphetamine and, therefore, would not be detected in urine screening tests. This leads to underestimated data as to the consumption of amphetamines. In addition, methamphetamine is not a significantly used drug in Brazil. The immunoassays for cocaine were developed focusing specifically on benzoylecgonine, the main cocaine metabolite found in the urine. This is problematic because in Brazilian contexts, there are many users that smoke cocaine, and cocaine immunoassays do not detect the percentage of the drug degraded by pyrolysis in the heating of cocaine base during crack smoking that results in the formation

of an anhydroecgonine methyl ester, which is metabolized to anhydroecgonine. These issues hinder the establishment of a risk factor profile that is associated with traffic accidents in Brazil. Numerous factors should be considered and overcome to develop routine drug testing procedures in Brazil.

These difficulties encountered in drug research deserve special attention from public authorities. Indeed, there is an urgent need to develop and encourage epidemiological studies based on toxicological analyses in Brazil.

5. Conclusions

Currently, the clinical and social effects of alcohol and other drug use in traffic accidents are considered some of the most important problems of public safety. The feasibility of testing for the use of psychoactive substances is important for the control and prevention of drug use, and it is an area that requires urgent national attention.

Specific measures should be developed for each Brazilian State. Therefore, the assessment of traffic accidents is essential for the development and implementation of prevention policies by national authorities based on localized risk factors.

The results of our study indicate that a significant proportion of traffic accident victims use medicine or illegal drugs that could impair driving ability. We found a high prevalence of illegal drug use in fatal traffic accidents. Furthermore, our data suggest that the younger male population deserves special attention in prevention policies.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the Forensic General Institute of the State of Santa Catarina. KCM thanks to CAPES-Brazil for her PhD grant and RPL thanks to CNPq for research grant.

References

Augsburger, M., Rivier, L., 1997. Drugs and alcohol among suspected impaired drivers in Canton de Vaud (Switzerland). *Forensic Science International* 85, 95-104.

Berghaus, G., Ramaekers, J.G., Drummer, O. H., 2007. Demands on scientific studies in different fields of forensic medicine and forensic sciences Traffic medicine—Impaired driver: Alcohol, drugs, diseases. *Forensic Science International* 165, 233–237.

Confederação Nacional dos Municípios, 2009. Mapeamento das mortes por acidentes de trânsito no Brasil. In: http://www.cnm.org.br/institucional/estudos_tecnicos.asp.

Brasil. Lei nº. 11.705 de 19 de junho de 2008. *Diário Oficial da União, Brasília, DF*, 20 jun. 2008. Seção 1, p.1.

Drummer, O.H., Gerostamoulos, J., Chu, M., Batziris, H., J.R.N., C., Robertson, M.D., 2003. The prevalence of alcohol and drugs in Australia. *Forensic Science International* 134, 154–162.

Drummer, O.H., Gerostamoulos, J., Chu, M., Batziris, Chu, M., Caplehorn, J., Robertson, M. D., Swann, P., 2004. The involvement of drugs in drivers of motor vehicles killed in Australian road traffic crashes. *Accident Analysis and Prevention* 36, 239–248.

Drummer, O. H., Kourtis, I., Beyer, J., Tayler, P., Boorman, M., Gerostamoulos, D., 2011. The prevalence of drugs in injured drivers. *Forensic Science International* 215, 14-17.

Elliott, S., Woolacott, H., Braithwaite, R., 2009. The prevalence of drugs and alcohol found in road traffic fatalities: A comparative study of victims. *Science and Justice* 49, 19–23.

Holmgren, P., Holmgren, A., Ahlner, J., 2005. Alcohol and drugs in drivers fatally injured in traffic accidents in Sweden during the years 2000-2002. *Forensic Science International* 151, 11-17.

Holmgren, A., Holmgren, P., Kugelberg, F. C., Jones, A. W., Ahlner, J., 2008. High re-arrest rates among drug-impaired drivers despite zero-tolerance legislation. *Accident Analysis and Prevention* 40, 534–540.

Jones, A. W., Kugelberg, F. C., Holmgren, A., Jones, J.A., 2009. Five-year update on the occurrence of alcohol and other drugs in blood samples from drivers killed in road-traffic crashes in Sweden. *Forensic Science International* 186, 56–62.

Jones, A.W., Kugelberg, F.C., Holmgren, A., Ahlner, J., 2011. Drug poisoning deaths in Sweden show a predominance of ethanol in mono-intoxications, adverse drug–alcohol interactions and poly-drug use. *Forensic Science International* 206, 43–51.

Longo, M.C., Lokan, R.J., White, J.M., 2001. The relationship between blood benzodiazepine concentration and vehicle crash culpability. *Journal of Traffic Medicine: an international journal of traffic safety* 29, 36–43.

Morland, J., Steentoft, A., Simonsen, K. W., Ojanperä, I., Vuori, E., Magnusdottir, K., Kristinsson, J., Ceder, G., Kronstrand, R., Christophersen, A., 2011. Drugs related to motor vehicle crashes in northern European countries: A study of fatally injured drivers. *Accident Analysis and Prevention* 43, 1920–1926.

Musshoff, F., Madea, B., 2010. Cocaine and benzoylecgonine concentrations in fluorinated plasma samples of drivers under suspicion of driving under influence. *Forensic Science International* 200, 67–72.

Nochajski, T. H., Stasiewicz, P. R., 2006. Relapse to driving under the influence (DUI): A review. *Clinical Psychology Review* 26, 179– 195.

Ojaniemi, K. K., Lintonen, T. P., Impinen, A. O., Lillsunde, P. M., Ostamo, A. I., 2009. Trends in driving under the influence of drugs: A register-based study of DUID suspects during 1977–2007. *Accident Analysis and Prevention* 41, 191–196.

Paula, F. C., Pechansky, F., Machado, V., 2010. Um breve histórico da relação entre álcool e trânsito no Brasil. In *Uso de bebidas alcoólicas e outras drogas nas rodovias brasileiras e outros estudos*, Porto Alegre, pp.22.

Ronen, A., Chassidim, H. S., Gershon, P., Parmet, Y., Bar-Hamburger, R., Cassuto, Y., Shinar, D., Rabinovich, A., 2010. The effect of alcohol, THC and their combination on perceived effects, willingness to drive and performance of driving and non-driving tasks. *Accident Analysis and Prevention* 42, 1855–1865.

Senna, M. C., Augsburger, M., Aebi, B., Briellmann, T. A., Dubugnon, J. L., Iten, P. X., Staub, C., Sturm, W., Sutter, K., Donze, N., 2010. First nationwide study on driving under the influence of drugs in Switzerland. *Forensic Science International* 198, 11–16.

Steentoft, A., Linnet, K., 2009. Blood concentrations of clonazepam and 7-aminoclonazepam in forensic cases in Denmark for the period 2002–2007. *Forensic Science International* 184, 74–79.

Vaez, M., Laflamme, L., 2005. Impaired driving and motor vehicle crashes among Swedish youth: An investigation into drivers' sociodemographic characteristics. *Accident Analysis and Prevention* 37, 605–611.

Zhuo, X., Cang, Y., Yan, H., Bu, J., Shen, B., 2010. The prevalence of drugs in motor vehicle accidents and traffic violations in Shanghai and neighboring cities. *Accident Analysis and Prevention* 42, 2179–2184.

Walsh, J. M., Flegel, R., Atkins, R., Cangianelli, L. A., Cooper, C., Welsh, C., Kerns, T. J., 2005; Drug and alcohol use among drivers admitted to a Level-1 trauma Center. *Accident Analysis and Prevention* 37, 894–901.

Watling, C. N., Freeman, J., 2011. Exploring the theoretical underpinnings of driving whilst influenced by illicit substances. *Transportation Research Part F: Traffic Psychology and Behaviour* 14, 567-578.

World Health Organization (WHO), 2009. Global status report on road safety: time for action. Geneva, (www.who.int/violence_injury_prevention/road_safety_status/2009).

**6 MANUSCRITO III – *Simultaneous analysis of
amphetamine-type stimulants in plasma by solid-phase
microextraction and gás chromatography-mass
spectrometry***

Manuscrito III

A seguir encontra-se disposto o artigo intitulado *Simultaneous analysis of amphetamine-type stimulants in plasma by solid-phase microextraction and gás chromatography-mass spectrometry* submetido à *Journal of Chromatography B*. O artigo trata do desenvolvimento de um método de extração e quantificação simultânea de AMP, FEN e DIE em plasma utilizando SPME seguida de análise por GC-MS. Esse trabalho representa o seguimento e a ampliação de uma linha de estudo do Laboratório de Toxicologia, que iniciou-se com a análise desses ATS em fluido oral. Considerando a maior complexidade do plasma, otimizações e reconsiderações das condições experimentais foram essenciais para a transposição do método do fluido oral para o plasma. Além do desenvolvimento científico *per se*, a validação deste método visa sua aplicação nas análises toxicológicas clínicas e forenses.

SIMULTANEOUS ANALYSIS OF AMPHETAMINE-TYPE STIMULANTS IN PLASMA BY SOLID-PHASE MICROEXTRACTION AND GAS CHROMATOGRAPHY–MASS SPECTROMETRY

Kristiane de Cássia Mariotti^{a,*}, Roselena Schuh^a, Priscila Ferranti^a, Rafael S. Ortiz^b, Daniele Z. Souza^b, Flavio Pechansky^c, Pedro E. Froehlich^a, Renata P. Limberger^a

Affiliations

a) Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2752 Ipiranga Avenue, Santana, Zip Code 90610-000 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

b) Setor Técnico-Científico, Superintendência Regional do Departamento de Polícia Federal no Rio Grande do Sul, 1365 Ipiranga Avenue, Azenha, Zip Code 90160-093 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

c) Centro de Pesquisa em Álcool e Drogas (CPAD), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2350, Ramiro Barcelos Street, Zip Code 90035-903 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

***Corresponding author:**

Kristiane de Cássia Mariotti

Laboratório de Análises e Pesquisas Toxicológicas

Ipiranga Avenue, Santana, Zip Code 90610-000 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Tel.: +55 51 3308-5762; fax: +55 51 3308-5437.

E-mail address: krismariotti@gmail.com (K. C. Mariotti).

Abstract

Brazil is considered one of the world's highest users of amphetamine-type-stimulants (ATS), mainly diethylpropion (DIE), fenproporex (FEN). Most of the ATS use is linked to diverted prescription stimulants and this misuse is widely associated with the consumption by drivers. A validated method for the simultaneous analysis of amphetamine (AMP), DIE and FEN in plasma samples employing direct immersion-solid phase microextraction (DI-SPME) followed by gas chromatographic/mass spectrometric analyses (GC-MS) was developed. For plasma deproteinization trichloroacetic acid 10 % was used. *In situ* derivatization with propylchloroformate was employed. The linear range of the method varied from 5.0 ng mL⁻¹ to 100 ng mL⁻¹. The detection limits were 1.0, 1.5, 2.0 ng mL⁻¹ for AMP, DIE and FEN respectively. Accuracy of quality control samples remained within 85.58–108.33 % of the target concentrations. Precision has not exceeded 15 % of the relative standard deviation and recoveries ranged from 46.35 to 84.46 %. This method is suitable to be used in screening and confirmation in plasma forensic toxicology analyses of these basic drugs.

Keyword: amphetamine, diethylpropione, fenproporex, amphetamine-type-stimulants, validation.

1. Introduction

Brazil has been reported for 2009 high levels of consumption of amphetamine-type-stimulants (ATS), being considered one of the world's highest users of ATS, mainly the anorectic drugs diethylpropion (DIE), fenproporex (FEN) [1,2]. Most of the ATS use is linked to diverted prescription stimulants and this misuse is widely associated with the consumption by drivers to increase the time of alertness and due to other stimulants properties [3].

To monitor the use of ATS by drivers it is necessary to develop and valid analytical methods. The scientific literature provides several studies on amphetamines and designer drugs but it has been focused mainly on amphetamine (AMP), methamphetamine, methylenedioxymethamphetamine and

methylenedioxyamphetamine [4-13]. Despite of the large use of anorectic amphetamine compounds, there are few analytical methods developed to detect these drugs [14, 15].

Recently, our research group [14] developed a gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method for analysis of ATS in oral fluid using direct immersion solid-phase microextraction (DI-SPME). In the present study the method previously developed was adapted and validated to simultaneous analysis of FEN, DIE and AMP applied to human plasma, which has been undoubtedly considered to be one of the most suitable specimens for the evaluation of driving impairment due to drug consumption [16]. This method allows the dosages of these ATS in situations when is not possible to collect oral fluid, for example: extensive trauma, coma or fatal victims. Whereas plasma is more complex and complicated than oral fluid, optimization and reconsideration of experimental conditions were essential for replace the analytical technical to plasma matrix.

2. Materials and methods

2.1 Materials

AMP and AMP-D5 (internal standard, IS) were purchased from Cerilliant (Round Rock, TX, USA) as 1 mg mL⁻¹ methanol solutions. FEN and DIE were gently donated by Aché (Guarulhos, SP, Brazil) and Novartis (Resende, RJ, Brazil).

2.2 Blank plasma

Drug-free EDTA-plasma samples were obtained from healthy male adults. The specimens were pooled and frozen.

2.3 Standard solutions and work samples

Individual stock solutions of the compounds were prepared in methanol, at a concentration of $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ and stored at $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Working solutions were prepared by appropriate dilution with methanol.

2.4 Selection of optimum condition for SPME

In order to find out the optimal SPME conditions were used a Central Composite Design (CCD) employing two factor of variation: adsorption time and amount of propylchloroformate (PRCF).

2.5 Extraction and derivatization procedure

A plasma sample (2 mL) was spiked with ATS. Protein precipitation was performed with 1 mL of TCA 10 %. Sample was vortexed for 10 s and centrifuged for 10 min at $3000\times g$. The supernatant was removed and buffered with a solid system of $\text{Na}_2\text{CO}_3 / \text{NaHCO}_3$ (9:1) in the quantity of 10 % (w/v). This procedure increase sample pH to around 10.2. An aliquot of 1.5 mL was transferred to a 2 mL vial containing a magnetic stirring bar. A $10 \mu\text{L}$ of PRCL and $7 \mu\text{L}$ of a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ IS solution were added and vortex vigorously by 1 min. Then the ATS were extracted by direct immersion of a SPME fiber (PDMS $100 \mu\text{m}$) in sample solution under magnetic stirring (1200 rpm) for 35 min, at room temperature ($20 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$).

2.6 GC–MS analysis

The analytical conditions, regarding the GC-MS were performed according to our previous experience [14]. The analysis were carried out on a 7890A gas chromatograph coupled to 5975C inert mass selective detector (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) with a $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.25 \mu\text{m}$ 5 % phenylmethylpolysiloxane column (HP-5MS, Agilent J&W Scientific, Folsom, CA, USA). Ions used for identification were (underlined ions were used for quantification in the SIM mode): m/z 100, 105, 72 (DIE); m/z 130, 162, 91 (AMP

propylcarbamate, AMP PROPYL); m/z 134, 167, 92 (AMP-D5 propylcarbamate, AMP-D5 PROPYL); m/z 183, 97, 91 (FEN propylcarbamate, FEN PROPYL).

2.7 Method validation

Method validation was performed according to the FDA bioanalytical guideline following the accepted criteria for bioanalytical method validation [17]. For this purpose, the performance characteristics evaluated were selectivity, linearity, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), recovery, precision and accuracy (intra and inter-day).

The selectivity was evaluated by analysis of samples obtained from six different volunteers with and without addition of analytes. Linearity was calculated by four standard curves, run at different days and prepared in human drug-free plasma by spiking blank plasma samples with reference compounds mixture to final concentrations of 5, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ng mL⁻¹ of AMP, FEN, and DIE. The analytical curves were obtained by plotting the peak area ratio between each drug and AMP-D5 (IS) and analysis of variation (ANOVA) was performed on natural logarithm (ln)-transformed [14]. The intra and inter-day accuracy and precision were evaluated by analyzing of plasma spiked at quality controls concentrations (10, 40 and 80 ng mL⁻¹) on the same day (five replicates) and over four consecutive days. Precision was expressed as relative standard deviation (RSD) and accuracy was manifested as percent of theoretical concentration. For the quantification, selected ion monitoring (SIM) mode was used and the selected ions were $m/z=$ 134.1 for AMP-D5, $m/z=$ 130.1 for AMP, $m/z=$ 97.1 for FEN, and $m/z=$ 100.1 for DIE. The limit of detection (LOD) was defined as the lowest concentration of the drug resulting in a signal-to-noise ratio of 3:1. The lowest quantification limit (LLOQ) was defined in a signal-to-noise ratio of 10:1 with suitable precision (not exceed 20 % of the RSD) and accuracy (not deviate by more than 20 %). The extraction recovery from protein precipitation was estimated as a percentage by comparison between ratio peak area achieved when plasma or water were spiked with the three target drugs at quality controls concentration (10; 40 and 80 ng mL⁻¹) Analyses were performed in triplicates.

3. Results and discussion

3.1 Protein precipitation and buffer systems

For protein precipitation, two solvent precipitation, zinc sulphate 10 % (w/v) in 0.5 M NaOH and trichloroacetic acid (TCA) 10 % and different proportions (0.2; 0.25; 0.5; 0.75 and 1.0 mL) for 1 mL of plasma were tested. Among these TCA 10 % in the ratio of 0.5:1 (v/v) was chosen because it provided a better precipitation of proteins, low dilution of the sample and a recovery almost two times higher than those achieved with zinc sulphate 10 % (w/v) in 0.5 M NaOH (Figure 1). The procedure of deproteinization with TCA in plasma provide a improve the matrix, and to concentrated free drugs, reduce viscosity and prolong the service live of the fiber [18].

After selecting the solvent precipitation, four solid buffer systems in different molar ratio to obtain a pH values above 10.0 were tested: $\text{Na}_3\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (2:1); $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ (2:1); $\text{K}_2\text{PO}_4/\text{KHPO}_4$ (1:1); $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ (9:1). Among these $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ (9:1) system was chosen because it increases sample pH to around 10 in a low quantity of 10 % (w/v). The pH of sample is crucial for the SPME and it is explained theoretically by the coupled extraction equilibrium and acid-base equilibrium [19]. For ATS, the value of pH higher than 10 is essentials, because the high acid dissociation constants of amphetamines. Since the SPME fiber coatings are neutral, the pH should be adjusted such that the analyte of interest is also neutral. Recoveries of basic analytes are enhanced by basic pH [20].

In order to increase matrix ionic strength and increase the absorbed amount of ATS, the effect of sodium chloride in the quantity of 10 % (w/v) was determined. In principle, the matrix should be supersaturated by this salt and the salting-out effect is expected. However, the addition of salt reduced the recovery in approximately 50 % of area of the ATS analyzed. In the combined base and salt conditions, the extraction was worst than that obtained with pH alone. The reason is at basic condition, the saturated salt hinders the shift of the ionized form of ATS towards the neutral form, which has a higher affinity for the fiber [21]. Moreover the effect of pH is more clearly than the effect of salt in plasma matrix,

this result may be related with the salt interference on decrease of pH that is critical for basic compounds [19, 22].

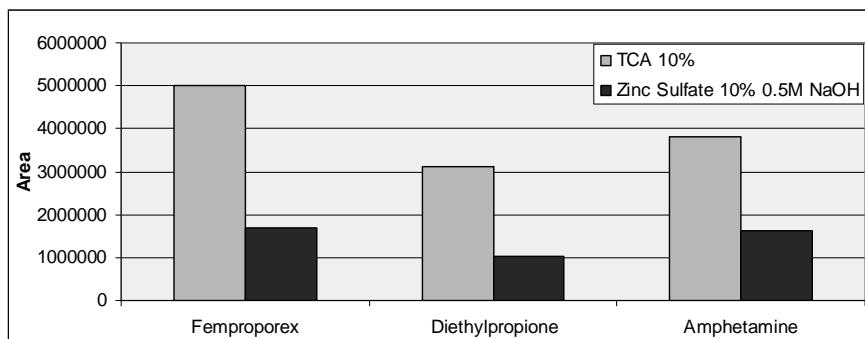


Figure 1: Peak area comparison of FEN, DIE and AMP after plasma precipitation with TCA 10 % or zinc sulfate 10 % in 0.5 M NaOH.

3.2 SPME conditions: adsorption time and amount of PRCF

For SPME of ATS in biological materials by GC-MS, derivatization procedure is necessary to obtain good accuracy and sensitivity, because a free base can be easily adsorbed to an injection port, column and surface of every gas route [23]. In polar compounds such ATS the conversion of polar amino groups into less polar analogues increase their partitioning to the fiber coating, thus enhancing the amount of drug extracted [24]. Also the amount of PRCF must be carefully observed to minimize the damage to the fiber and maximize the reaction [23].

Therefore the amount of agent of derivatization added to the reaction medium and the extraction time are prerequisites for method optimization. The evaluating of these variables was performed by analysis of peak area of ATS in thirteen different analytical runs provided by a CCD. Experimental designs are tools that offer a fast and reliable optimization of an analytical method. In this study CCD provide the most favorable conditions of derivatization and extraction procedures (Figure 2).

It is possible observe that DIE, AMP and FEN show a similar behavior in face of the changes made in the variables under study. Therefore the statistical and experimental condition most favorable for analysis was 10 μL of PRCL and 35 min for extraction.

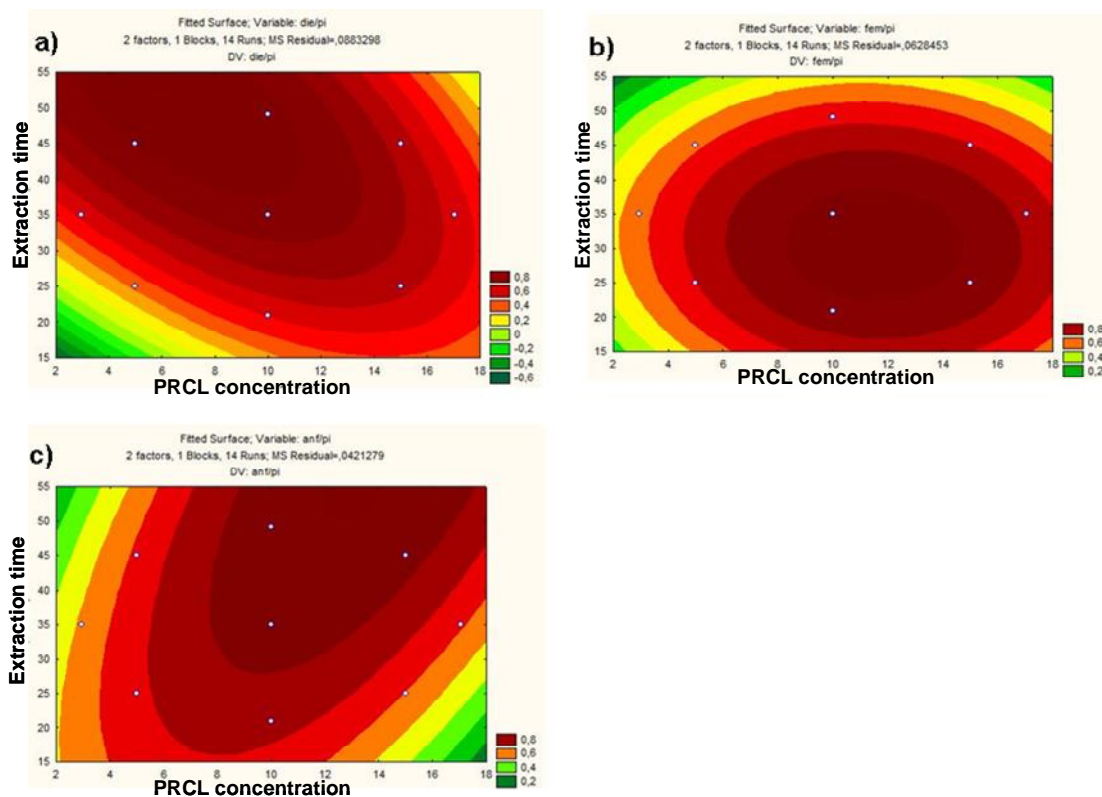


Figure 2: Central composite design of variables adsorption time and amount of PRCF: a) DIE; b) FEN; c) AMP.

3.3 Validation Parameters

The evaluation of selectivity demonstrated that there were no coeluting compounds in the same retention time of the target compounds. Also No carry over with the desorption time of 15 min at 260 $^{\circ}\text{C}$ was observed when the fiber was re-tested after sampling-desorption of 100 ng mL^{-1} sample.

The method was validated over 4 days using six different concentrations along the analytical curve of each drug. The linear range of the method varied from 5.0

ng mL⁻¹ to 100 ng mL⁻¹ calculated by studying the regression significance and the linearity deviation of the matrix-matched analytical curves by ANOVA, considering a p < 0.05 as significant. The statistical analysis was performed with mathematical transformations by applying natural logarithm for both concentrations (x) and peak area ratios (y). The observed method accuracy was within 85.58–108.33 % of the target concentrations. The relative standard deviation (RSD) of intra and inter-day validation data did not exceed 15 %. These data are shown in Table 1.

Table 1: Accuracy (%) and precision (RSD) of the proposed method.

ATS	Low QC		Middle QC				High QC					
	Intra-day (n=5)		Inter-day (4 days; n=8)		Intra-day (n=5)		Inter-day (4 days; n=8)		Intra-day (n=5)		Inter-day (4 days; n=8)	
	Accuracy (%)	RSD (%)	Accuracy (%)	RSD (%)	Accuracy (%)	RSD (%)	Accuracy (%)	RSD (%)	Accuracy (%)	RSD (%)	Accuracy (%)	RSD (%)
AMP	86.26	9.75	90.19	7.13	101.41	14.96	94.72	14.22	85.68	7.27	92.79	14.86
DIE	93.19	14.33	86.76	6.50	106.34	14.99	104.51	7.03	94.16	10.05	93.71	4.63
FEN	89.21	13.07	99.45	12.88	108.33	4.77	105.33	7.90	85.58	7.53	94.57	13.29

The LOD in plasma ranged depending on the ATS, as showed in Table 2. The lowest validation point for these ATS (5.0 ng mL⁻¹) was found to be the lower limit of quantification (LLOQ) with a (S/N) ratio of 10:1 (Table 2).

Table 2: Limits of detection (LOD), Pearson correlation coefficients (r), lower (LLOQ) and upper (ULOQ) limits of quantification for calibration results (n = 6).

ATS	r	LOD (ngmL ⁻¹)	LLOQ (ngmL ⁻¹)	ULOQ (ngmL ⁻¹)
AMP	0.9855	1.0	5.0	100
DIE	0.9948	1.5	5.0	100
FEN	0.9959	2.0	5.0	100

The recovery varied from 46.35 to 84.46 % (Table 3). DIE had better recovery than AMP and FEN. It seems to be due to DIE is not derivatized in the reaction medium and therefore DIE could access the fiber more quickly and/or with greater fiber affinity than the others compounds.

Table 3: Recovery (n=3) of ATS from aqueous medium.

ATS	Low QC		Middle QC		High QC	
	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
AMP	54.58	3.09	62.21	14.17	68.01	14.32
DIE	69.51	13.98	83.47	7.18	84.46	8.13
FEN	46.35	12.77	67.00	13.34	69.42	14.88

The determination and quantification of FEN, DIE and AMP is required considering: (1) the few available methods in the scientific literature; (2) the large use of these drugs by drivers in Brazil; (3) the recent prohibition of use and commercialization of FEN and DIE by Brazilian Sanitary Surveillance Agency (ANVISA) [25] and (4) the fact that in Brazil the annual number of blood samples analyzed for drugs other than alcohol has been very limited over the years, being necessary to provide tools to enable the plasma analysis. Also can be highlighted that knowledge about the concentrations of a psychoactive substance in blood or plasma is necessary to permit drawing conclusions about the likely effects on the individual, the risk of any drug–drug interactions and whether the concentrations in blood are unusually high or low compared with many controlled dosing studies [26].

Considering that driving under influence of drug is a global significant problem and is still among the leading causes of car accidents and casualties [27-28] efforts should be made to developed analytical methods that are enable to monitoring the use of ATS by traffic drivers.

4. Conclusion

This study developed a validated method for simultaneous determination of AMP, FEN and DIE in plasma sample using SPME combined with CG-MS. This method has been optimized for maximum extraction of analytes using this simple and solvent free extraction SPME technique, involving only the addition of small

amounts of derivatizing agent to produce volatile analytes needed for GC-MS. The recovery, precision and accuracy are satisfactory. The method sensitivity is suitable to be used in forensic toxicology for the quantitation of drugs usually encountered in biological samples of Brazilian drivers.

Acknowledgements

KCM thanks CAPES-Brazil for her PhD grant. RPL thanks CNPq for her research grant.

Reference

- [1] S. Nappo, R. Tabach, A. Noto, J. Galduróz, E. Carlini, *Eat Behav.* 3 (2002) 153-165.
- [2] United Nations Office on Drugs and Crime, *World Drug Report 2011*, United Nations, New York, 2011.
- [3] V. Leyton, D. Sinagawa, K. Oliveira, W. Schmitz, G. Andreuccetti, B. De Martinis, M. Yonamine, D. Munoz, *Forensic Sci Int.* 215 (2012) 25-27.
- [4] M. Concheiro, A. Castro, O. Quintela, A. Cruz, M. López-Rivadulla, *Forensic Sci Int.* 170 (2007) 156–162.
- [5] R.J.F. Schepers, J.M. Oyler, R.E. Joseph Jr., E.J. Cone, E.T. Moolchan, M.A. Huestis, *Clin Chem.* 49 (2003) 121–132.
- [6] H.H. Maurer, J. Bickeboeller-Friedrich, T. Kraemer, F.T. Peters, *Toxicol Lett.* 112-113 (2000) 133-142.
- [7] M.R. Moeller, S. Steinmeyera, T. Kraemer, *J. Chromatogr B*, 713 (1998) 91–109
- [8] A.A.S. Marais, J.B. Laurens, *Forensic Sci Int.* 183 (2009) 78–86.
- [9] E.A. Kolbrich, R.S. Goodwin, D.A. Gorelick, R.J. Hayes, E.A. Stein, M.A. Huestis, *Ther Drug Monit.* 30 (2008) 320–332.
- [10] K. Nakashima, *J Health Sci.* 51 (2005) 272-277.
- [11] S.W. Toennes, G.F. Kauerta, S. Steinmeyerb, M.R. Moeller, *Forensic Sci Int.* 152 (2005) 149–155.

- [12] J.M. Oyler, E.J. Cone, R.E. Joseph, Jr., E.T. Moolchan, M.A. Huestis, *Clin Chem.* 48 (2002) 1703–1714.
- [13] M. Wood, M. Laloup, M. del Mar R. Fernandez, K.M. Jenkins, M.S. Young, J.G. Ramaekers, G. De Boeck, N. Samyn, *Forensic Sci Int.* 150 (2005) 227–238.
- [14] D.Z. Souza, P.O. Boehl, E. Comiran, K.C. Mariotti, F. Pechansky, P.C.A.V. Duarte, R. De Boni, P.E. Froehlich, R.P. Limberger, *Anal. Chim. Acta* 696 (2011) 67–76.
- [15] I. Zancanaro, R.P. Limberger, P.O. Bohel, M.K. Dos Santos, R.B. De Boni, F. Pechansky, E.D. Caldas, *Forensic Sci Int.* 223 (2012) 208-16.
- [16] M. Augsburger, N. Donzé, A. Ménétrety, C. Brossard, F. Sporkert, C. Giroud, P. Mangin, *Forensic Sci. Int.* 153 (2005) 11–15.
- [17] Guidance for Industry, Bioanalytical of Health and Human Services, Food and Drug Administration, May 2001. Available: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>. Accessed in: 01 dec 2012.
- [18] L. Junting, C. Peng, O. Suzuki, *Forensic Sci. Int.* 97 (1998) 93-100.
- [19] S. Ulrich, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 167-194.
- [20] N. Fucci, N. De Giovanni, M. Chiarotti, *Forensic Sci. Int.* 134 (2003) 40.
- [21] M.R Lee, Y.S. Song, B.H. Hwang, C.C. Chou, *J. Chromatogr. A* 896 (2000) 265-273.
- [22] F. Spokert, F. Pragst, *Forensic Sci. Int.* 107 (2000) 129-148.
- [23] M. Yahata, A. Namera, M. Nishida, M. Yashiki, T. Kuramoto, K. Kimura, *Forensic Toxicol.* 24 (2006) 51 51-57.
- [24] H.G. Ugland, M. Krogh, K.E. Rasmussen, *J. Chromatogr. B* 701 (1997) 29-38.
- [25] Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/rdc0052_06_10_2011.pdf. Accessed in: 08 jan 2013.
- [26] A.W. Jones, A. Holmgren, F.C. Kugelberg, *Forensic Sci. Int.* 177 (2008) 133–139
- [27] J.M. Walsh, R. Flegel, R. Atkins, L.A. Cangianelli, C. Cooper, C. Welsh, T.J. Kerns, *Accid. Anal. Prev.* 37 (2005) 894–901.
- [28] A. Ronen, H.S. Chassidim, P. Gershon, Y. Parmet, R. Bar-Hamburger, Y. Cassuto, D. Shinar, A. Rabinovich, *Accid. Anal. Prev.* 42 (2010) 1855–1865.

7 MANUSCRITO IV – *Development and validation of a method for simultaneous determination of fenproporex, diethylpropione and methylphenidate in oral fluid by liquid-chromatography/tandem mass spectrometry*

Manuscrito IV

A seguir encontra-se artigo intitulado *Development and validation of a method for simultaneous determination of fenproporex, diethylpropione and methylphenidate in oral fluid by liquid-chromatography/tandem mass spectrometry* submetido à *Journal of Chromatography B*. Este artigo tem como enfoque o desenvolvimento e a validação de metodologia para análise simultânea de FEN, DIE e MPH em fluido oral utilizando LC-MS/MS. O método desenvolvido foi linear, sensível, específico, com precisão e exatidão consideradas adequadas conforme limites determinados pelas guias de validação bioanalítica.

A escolha do fluido oral como matriz biológica de estudo considerou as vantagens oferecidas para futura aplicação em análises do trânsito brasileiro, tanto com propósitos clínicos quanto toxicológicos.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A METHOD FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF FENPROPOREX, DIETHYLPROPIONE AND METHYLPHENIDATE IN ORAL FLUID BY LIQUID-CHROMATOGRAPHY/TANDEM MASS SPECTROMETRY

Kristiane de Cássia Mariotti^a; Gabriel Rübensam^b; Fabiano Barreto^{a,b}; Vinicius C. Bicca^b; Leonardo Zanchetti Meneghini^b; Rafael S. Ortiz^{a, c}; Pedro E. Fröhlich^a; Renata P. Limberger^a

Affiliations

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2752 Ipiranga Avenue, Santana, Zip Code 90610-000 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^b National Agricultural Laboratory of Rio Grande do Sul, LANAGRO/RS, Ponta Grossa Street, Zip Code 91780-580 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^c Setor Técnico-Científico, Superintendência Regional do Departamento de Polícia Federal no Rio Grande do Sul, 1365 Ipiranga Avenue, Azenha, Zip Code 90160-093 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Corresponding author:

Kristiane de Cássia Mariotti

Laboratório de Análises e Pesquisas Toxicológicas

Ipiranga Avenue, Santana, Zip Code 90610-000 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Tel.: +55 51 3308-5297; fax: +55 51 3308-5437.

E-mail address: krismariotti@gmail.com (K. C. Mariotti).

Abstract

A liquid-chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method has been developed and validated for quantification of three amphetamine-type stimulants (ATS) in oral fluid (OF), including fenproporex (FEN), diethylpropione (DIE) and methylphenidate (MPH) which are misused by some Brazilian's drivers and have potential dangerous consequences in road traffic. In this method the OF was extracted by a simple and fast liquid-liquid extraction using acetonitrile. Calibration curves were linear throughout the concentration range from 2.5–90 ng/mL in OF, using internal standard. The lower limit of quantification and the limit of detection were 2.5 and 0.5 ng/mL respectively for all ATS. Intra- and inter-assay precision and accuracy values were within regulatory limits. Matrix effect and carry-over were not detected. The present analytical method was considered simple and sensitive for simultaneous determination of FEN, DIE, and MPH in OF and suitable for forensic toxicology.

Keywords: fenproporex; diethylpropione; methylphenidate; oral fluid; liquid-chromatography tandem mass spectrometry.

1. Introduction

The global consumption of amphetamine-type stimulants (ATS) has increased over the last two decades, being the second most commonly used drugs of abuse in the world and an important public health concern due to a variety of consequences linked with their use, including road-traffic accidents [1]. ATS drugs are generally used by drivers of motor vehicle for its sympathomimetic activity in order to stay awake for excessive hours while driving for long periods [2,3]. On the other hand, this is usually followed by an emotional instability, blurred vision, and fatigue, causing certain degree of impairment or a diminished capacity to drive safely [4,5].

Brazil has one of the highest rates of ATS users worldwide, mainly diethylpropione (DIE), fenproporex (FEN) [1,6], and more recently the stimulant methylphenidate (MPH), which has been consumed by road-traffic drivers [7]. Preventive and punitive actions has been implemented by the Brazilian

government in order to reduce the incidence rates of traffic accidents related to the use of psychoactive drugs. For this purpose, exploratory programs have been undertaken using screening tests in order to identify *in loco* drivers under the influence of drugs. Positive cases are subjected to a confirmatory analysis, which would include gas and, more recently, liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Using these techniques, the chemical identity of the analyzed drug could then be confirmed (and also quantified) in different biological matrices. The matrices of choice for these cases traditionally are blood and urine. However, oral fluid (OF) has been used as an alternative matrix because a wide range of drugs are excreted on this fluid at concentrations comparable to found in the other matrices [7-15], a non-invasive sampling, with reduced risk of adulteration, and because OF can be used for both road-site tests and laboratory analysis, increasing the degree of confidence of the obtained data [8,9,15,16].

Considering the need for efficient control of stimulants compounds in road traffic, the importance and the advantages to use OF for monitoring drug use in official control programs was developed a simple and sensitive analytical method for simultaneous determination of FEN, DIE and MPH in OF. In addition, this method was validated according to FDA bioanalytical guideline [17] and was able to accurately quantify these analytes at very low concentrations, with low consumption of sample and solvents.

Finally, it is important to highlight that despite of the high rates of use ATS, few studies about analytical purposes of stimulant anorectic drugs were found [7,18]. Most of the reports are focused on amphetamine and designer drugs, like methamphetamine, methylenedioxymethamphetamine and methylenedioxyamphetamine [9,10, 19-26].

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and standards

Acetonitrile, HPLC grade, was purchased from Merck (Darmstadt,Germany); methanol, HPLC grade, from J.T. Baker (Deventer, HO); formic acid (88%), analytical grade, from Sigma-Aldrich (Piscataway, NJ, USA); ammonium

formate, sodium carbonate (Na_2CO_3), and sodium bicarbonate (NaHCO_3), analytical-reagent grade, from Fluka (Buchs, Switzerland). Water was purified in a Milli-Q system (Millipore Corporation, Bedford, MA) to obtain analytical grade. DI-threo-MPH HCl (M.W. 269.8 g/mol, freebase 233.3 g/mol), was gently donated by Novartis (Resende, RJ, Brazil) and FEN.HCL (M.W. 224.73 g/mol, freebase 188.27 g/mol) and DIE.HCL (M.W. 241.76 g/mol, freebase 205.30 g/mol) were gently donated by Aché (Guarulhos, SP, Brazil). Propranolol (PROP.HCL) (M.W. 295.34 g/mol, freebase 259.34 g/mol) was purchase from Changzhou Yabang Pharm (Changzhou, China), and was used as internal standard (IS).

2.2. Solutions

Standard stock solutions were prepared separately at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in methanol. Working solution was prepared daily as mixtures of FEN, DIE and MPH at 500 ng/mL by dilution in methanol. IS working solution was prepared at 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in methanol. All solutions were stored at $-20\text{ }^\circ\text{C}$. The mobile phases consisted of ammonium formate buffer (10 mM ammonium acetate and 0.1 % formic acid) for solvent A and acetonitrile with ammonium acetate 10 mM and 0.1 % formic acid for solvent B. A gradient chromatography consist in: 90 % solvent A over 8 min; 90 % solvent B over 2 min and 90 % solvent A over 5 min. A flow-rate of 0.4 mL/min at $20\text{ }^\circ\text{C}$ was used.

2.3 Quality controls and sample preparation

Blank oral fluid was obtained from different volunteers who had not taken the compounds, collected in 50 mL polypropylene tubes. The samples were pooled and frozen; in the everyday analysis, an aliquot was thawed. Calibration curves were obtained by spiking 0.5 mL of blank OF with working solution at final concentrations of 2.5, 10, 20, 30, 50, 90 ng/mL . The IS was added in all samples at 40 ng/mL . Low (LQC), middle (MQC) and high (HQC) quality controls were obtained in a similar way at 5.0, 40.0 and 70.0 ng/mL respectively for all analytes.

The samples were pre-processed by agitation in a vortex for 20 s and centrifuged for 3 min at 3000×g in order to discard the mucous fraction. An aliquot of 0.4 mL of supernatant was added in a clean tube containing 20 % (w/v) of solid buffer system consisted of Na₂CO₃/NaHCO₃ (9:1). The OF was vortex for 20 s and then extracted with 1 mL of acetonitrile, followed by agitation in a vortex for 30 s and centrifugation at 3000×g for 3 min. This extract (200 µL) was transferred to a clean glass vial and injected (10 µL) onto HPLC. LQC (5 ng/mL), MQC (40 ng/mL) and HQC (70 ng/mL) were prepared at the same way.

2.4 Instrumentation

The liquid-chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analyses were performed on a High Performance Liquid Chromatography (HPLC) system Agilent 1100 series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), coupled to an API 5000 triple quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) equipped with an electrospray ionization interface (ESI) operating in the positive mode. The interface was set at 600 °C and the ion-spray needle was operated at + 5500 V. Nitrogen was used as nebulizer gas (GS1) (40 units), auxiliary gas (GS2) (40 units), curtain gas (CUR) (20 units), and as collision activated dissociation gas, CAD (set on 4).

Instrument control, integration, and calculation were performed using Analyst 1.6.1 software. Infusion experiments for multiple reaction monitoring (MRM) optimizations were performed with a Harvard Apparatus 11 Plus syringe pump (Holliston, MA) at a flow rate of 10 µL/min. HPLC was carried out on a Brownlee C18 100 mm×4.6 mm i.d., 3 µm (PerkinElmer, USA), equipped with a guard column (4 mm × 2.0 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA).

2.5. Validation procedure

Method validation was performed according to the FDA bioanalytical guideline following the accepted criteria for bioanalytical method validation [17]. For this purpose, the performance characteristics evaluated were selectivity, specificity, linearity, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), recovery, precision

(in terms of intra and inter-assay precision), and analyte stability in the matrix. The selectivity was evaluated by analysis of samples obtained from six different volunteers with and without addition of analytes. Linearity was calculated by studying the regression significance and the linearity deviation of the matrix-matched calibration curves by analysis of variance, considering a $p < 0.05$ as significant. LOD and LOQ were defined as the lowest concentration of the drug resulting in a signal-to-noise ratio of 3:1. The lowest quantification limit (LLOQ) was defined in a signal-to-noise ratio of 10:1 with suitable precision (not exceed 20 % of the RSD) and accuracy (not deviate by more than 20 %). Analyte recovery was evaluated by comparing analyte peak areas in two different sets of samples: one prepared in blank OF extracts from different sources and spiked with ATS and IS after extraction (100 %) and one prepared in blank matrix from the same sources but spiked before extraction. The recovery was calculated as a percentage the response of spiked after extraction samples in relation to that of spiked before extraction samples [27]. Intra-day precision and accuracy were obtained analyzing five replicates at LQC, MQC and HQC concentrations in one day. Inter-assay precision was performed for four independent experimental assays of the aforementioned replicates. Precision was expressed as % relative standard deviation (RSD) of concentrations calculated for QC samples and accuracy was manifested as percent of theoretical concentrations. Stability was evaluated in low and high concentrations, in triplicate, after short-term: 48 h at room temperature (21 ± 2 °C); at refrigerator temperature (4 ± 2 °C) and at freeze temperature (-20 ± 2 °C). The stability was expressed as a percentage of the initial concentration (first analyzed batch).

In addition, effects from matrix co-extractives and system carryover were investigated by comparing peak areas obtained from OF spiked with analytes and analytes diluted in solvent. This procedure was performed at concentrations ranging from 2.5 to 110 ng/mL, injecting samples alternately.

3. Results and discussion

In this study, tandem mass spectrometer was operated in the multiple reaction monitoring (MRM) mode for two transitions for MPH, DIE, FEN and one for the IS in order to allow confirmatory quantitative method, based on the conditions presented in the Table 1. The MRM mode provides a high selectivity analyses which is especially important for complex matrixes. The most intense transition was used for quantification while the remaining transitions were used for confirmation of analyte identity.

Table 1: Mass spectrometry settings for analysis of FEN, DIE, and MPH.

Analyte	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	DP (volts)	CE (volts)
FEN	189.139	91*	41	29
	189.139	118.9	41	15
DIE	206.117	105*	76	31
	206.117	100.2	76	31
MPH	234.171	84.2*	76	27
	234.171	56.1	76	65
IS	260.216	183.1	91	25

(*) Product ion used for quantification. Legend: FEN: fenproporex; DIE: diethylpropione; MPH: methylphenidate; IS: internal standard; DP: declustering potential; CE: collision energy

Under the developed chromatographic conditions, co-eluting compounds were not observed (Fig. 1a), and due the use of different mass transitions for each compound, method selectivity and specificity was respectively obtained (Fig. 1b, 1c, and 1d).

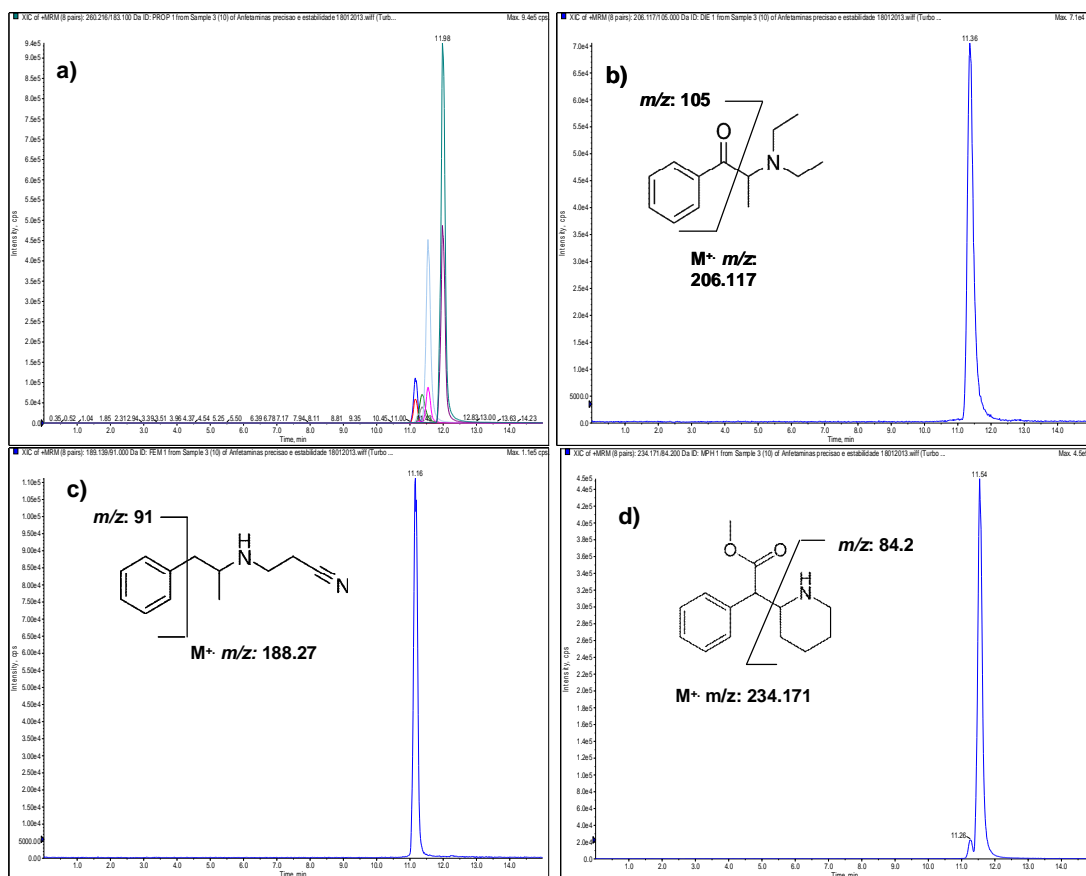


Figure 1: a) Chromatograms of FEN, DIE, MPH and IS; the extracted ion chromatograms (XICs) of the confirmatory transition of: b) DIE; c) FEN; d) MPH.

Although the selectivity and specificity of a LC-MS/MS method can be proved, interferences from biological matrices in the electrospray ionization source must be taken into account to obtain quantitatively accurate results. For this purpose, calibration curves prepared with analytes diluted in mobile phase and analytes added to OF before and after the extraction procedure were compared. According to Figure 2, negligible matrix effects were obtained for all analytes studied. Poor analyte recoveries were obtained (Table 2), probably because free amines are difficult to extract from sample matrices [28], however the reproducibility was considered satisfactory.

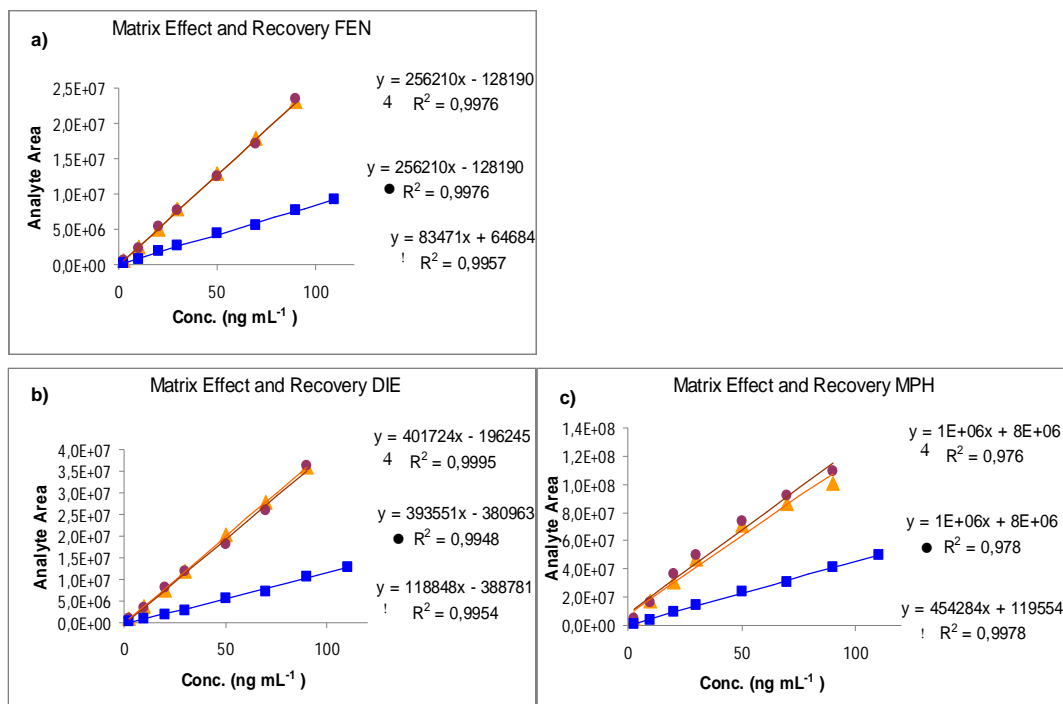


Figure 2: Calibration curves of (●) pure analytes dissolved in mobile phase; (◻) analytes added after the extraction of the matrix and (◄) the analytes spiked OF before its extraction for a) FEN; b) DIE and c) MPH.

In order to overcome poor analyte recoveries, and considering the semi volatile properties of the analytes [29], the procedure of solvent evaporation was not carried out. Additionally, a concentration step was not required due to the satisfactory LOD and LOQ of the proposed method. Therefore, to provide a simple and fast extraction procedure, was adopted one-step liquid-liquid extraction in the OF.

Carry-over was not detected in zero OF samples after the analysis of the highest point of the calibration curve. Calibrations showed satisfactory linear responses in the range of 2.5–90 ng/mL for all ATS studied. The correlation coefficients (r) founded were: 0.9974 for FEN, 0.9993 for DIE and 0.9948 for MPH. Applying ANOVA to obtained data, it has been verified no deviation from linearity ($p > 0.05$) and a correct adjust to the linear model, with a high significance ($p < 0.0001$) of the regression for all ATS curves. The results obtained for intra-assay and inter-assay precision and accuracy satisfactorily

meting the internationally established acceptance criteria [17]. RSD for precision and accuracy at LOQ were always better than 20 %.

The LOD was 0.5 ng/mL for all analytes considering a signal-to-noise ratio higher than 3:1 for the confirmatory MS/MS transitions. LOQ was 2.5 ng/mL for all analytes, considering a signal-to-noise ratio higher than 10:1 for the quantitation MS/MS transitions. The upper limit of quantification (ULOQ) in which was possible to keep the linear model was 90 ng/mL.

Table 2. Summary of the calculated parameters from the validation study.

Analytes	Concentrations assessed											
	LQC				MQC				HQC			
	R (%)	Intra-day (RSD)	Inter-day (RSD)	Acc. (%)	R (%)	Intra-day (RSD)	Inter-day CV (%)	Acc. (%)	R (%)	Intra-day (RSD)	Inter-day (RSD)	Acc. (%)
FEN	33.42	16.08	12.28	98.02	36.07	7.08	7.92	98.59	30.84	9.25	3.27	99.04
DIE	26.35	10.90	14.60	115.18	27.57	6.06	4.84	94.48	26.35	11.98	4.52	98.58
MPH	25.1	10.66	7.26	89.83	33.60	6.80	3.19	99.75	35.22	6.24	2.90	98.52

Legend: R (%): percent recovery; RSD: relative standard deviation; Acc.: accuracy; FEN, fenproporex; DIE, diethylpropion; MPH, methylphenidate; low quality control (LQC; 5 ng mL⁻¹), middle quality control (MQC; 40 ng mL⁻¹) and high quality control (HQC; 70 ng mL⁻¹).

The stability assays were performed aimed to simulate a common routine of OF collection and analysis. For these, short-term stability was accessed. No relevant degradation was observed, with deviations of less than 15 % of the initial concentrations.

4. Conclusion

In the present work, a LC–MS/MS confirmatory method was developed for the simultaneous determination of the stimulants FEN, DIE, and MPH in oral fluid. Satisfactory results were obtained in the validation processes, in terms of selectivity, specificity, and method precision. Although the procedure of analyte extraction presented poor recoveries, this method was proved to be appropriated for analyses of ATS in OF due to the low limits of detection, which allows the precise and accurate confirmation and of analyte identity and quantitation at very low concentrations. In addition, the absence of a concentration step in this method makes it faster and simpler than the methods previously consulted. The developed method could be use to toxicological, forensic and clinical purposed.

References

- [1] UNODC (United Nations Office on Drugs and Crime). (2011). 2011 Global ATS Assessment, available online at: http://www.unodc.org/documents/ATS/ATS_Global_Assessment_2011.pdf.
- [2] J.L. Pilgrim, D. Gerostamoulos, O.H. Drummer, M. Bollmann, Involvement of Amphetamines in Sudden and Unexpected Death, *J Forensic Sci.* 54 (2009) 478-485.
- [3] S.W. Myung, H.K. Min, S. Kim, M. Kim, J.B. Cho, T.J. Kim, Determination of amphetamine, methamphetamine and dimethamphetamine in Human Urine by Solid-Phase Microextraction (SPME)-Gas Chromatography/Mass Spectrometry, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 716(1998) 359–365.
- [4] M. Hjalmdahl, A. Vadeby, A. Forsman, C. Fors, G.C. Per Woxler, R. Kronstrand, Effects of d-amphetamine on simulated driving performance before and after sleep deprivation. *Psychopharmac.* 222 (2012) 401-411.
- [5] B.K. Logan, Methamphetamine - Effects on Human Performance and Behavior. *Forens Sci Rev.* 14(2002)133-51.
- [6] S. Nappo, R. Tabach, A. Noto, J. Galduróz, E. Carlini, Use of anorectic amphetamine-like drugs by Brazilian women, *Eat Behav.* 3 (2002) 153-165.
- [7] I. Zancanaro, R.P. Limberger, P.O. Bohel, M.K. Dos Santos, R.B. De Boni, F. Pechansky, E.D. Caldas, Prescription and illicit psychoactive drugs in oral fluid-LC-MS/MS method development and analysis of samples from Brazilian drivers, *Forensic Sci Int.* 223 (2012) 208-16.
- [8] O.H. Drummer, Drug Testing in Oral Fluid, *Clin Biochem Rev.* 27 (2006) 147-159.
- [9] M. Concheiro, A. Castro, O. Quintela, A. Cruz, M. López-Rivadulla, Confirmation by LC-MS of drugs in oral fluid obtained from roadside testing, *Forensic Sci Int.* 170 (2007) 156–162.
- [10] R.J.F. Schepers, J.M. Oyler, R.E. Joseph Jr., E.J. Cone, E.T. Moolchan, M.A. Huestis, Methamphetamine and Amphetamine Pharmacokinetics in Oral Fluid and Plasma after Controlled Oral Methamphetamine Administration to Human Volunteers, *Clin Chem.* 49 (2003) 121–132.

- [11] E. Marchei, M. Farrè, M. Pellegrini, Ó. García-Algar, O. Vall, R. Pacifici, S. Pichini, Pharmacokinetics of methylphenidate in oral fluid and sweat of a pediatric subject, *Forensic Sci Int.* 196 (2010) 59–63
- [12] A. Pehrsson, T. Gunnar, C. Englom, H. Seppä, A. Jama, P. Lillsunde, Roadside oral fluid test: comparison of the results of drugwipe 5 and drugwipe benzodiazepines on-site tests with laboratory confirmation results of oral fluid and whole blood, *Forensic Sci. Int.* 175 (2008) 140-148.
- [13] D.J. Crouch, J.M. Walsh, L. Cangianelli, O. Quintela, Laboratory evaluation and field application of roadside oral fluid collectors and drug testing devices, *Ther Drug Monit.* 30 (2008) 188-95.
- [14] F.T. Peters, Recent advances of liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry in clinical and forensic toxicology, *Clin Biochem.* 44 (2011) 54–65.
- [15] A.G. Verstraete. Oral fluid testing for driving under the influence of drugs: history, recent progress and remaining challenges, *Forensic Sci Int.* 150 (2005) 143–150.
- [16] P. Meng, Y. Wang, Small volume liquid extraction of amphetamines in saliva, *Forensic Sci Int.* 197 (2010) 80-4.
- [17] Guidance for Industry, Bioanalytical of Health and Human Services, Food and Drug Administration, May 2001. Available: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>
- [18] D.Z. Souza, P.O. Boehl, E. Comiran, K.C. Mariotti, F. Pechansky, P.C.A.V. Duarte, R. BONI, P.E. Froelich, R.P. Limberger, Determination of amphetamine-type stimulants in oral fluid by solid-phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 696, (2011) 67-76.
- [19] H.H. Maurer, J. Bickeboeller-Friedrich, T. Kraemer, F.T. Peters, Toxicokinetics and analytical toxicology of amphetamine-derived designer drugs ('Ecstasy'), *Toxicol Lett.* 112-113 (2000) 133-142.
- [20] M.R. Moeller, S. Steinmeyera, T. Kraemer, Determination of drugs of abuse in blood *J. Chromatogr B*, 713 (1998) 91–109
- [21] A.A.S. Marais, J.B. Laurens, Rapid GC–MS confirmation of amphetamines in urine by extractive acylation, *Forensic Sci Int.* 183 (2009) 78–86.

[22] E.A. Kolbrich, R.S. Goodwin, D.A. Gorelick, R.J. Hayes, E.A. Stein, M.A. Huestis, Plasma Pharmacokinetics of 3,4- Methylendioxyamphetamine After Controlled Oral Administration to Young Adults *Ther Drug Monit.* 30 (2008) 320–332.

[23] K. Nakashima, High-performance liquid chromatographic analysis of drugs of abuse in biologic samples, *J Health Sci.* 51 (2005) 272-277.

[24] S.W. Toennes, G.F. Kauerta, S. Steinmeyerb, M.R. Moeller, Driving under the influence of drugs — evaluation of analytical data of drugs in oral fluid, serum and urine, and correlation with impairment symptoms, *Forensic Sci Int.* 152 (2005) 149–155.

[25] J.M. Oyler, E.J. Cone, R.E. Joseph, Jr., E.T. Moolchan, M.A. Huestis, Duration of Detectable Methamphetamine and Amphetamine Excretion in Urine after Controlled Oral Administration of Methamphetamine to Humans, *Clin Chem.* 48 (2002) 1703–1714.

[26] M. Wood, M. Laloup, M. del Mar R. Fernandez, K.M. Jenkins, M.S. Young, J.G. Ramaekers, G. De Boeck, N. Samyn, Quantitative analysis of multiple illicit drugs in preserved oral fluid by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Forensic Sci Int.* 150 (2005) 227–238.

[27] F.T. Peters, O.H. Drummer, F. Musshoff, Validation of new methods, *Forensic Sci Int.* 165 (2007) 216–224.

[28] A. Namera, M. Yashiki, T. Kojima, Automated Headspace Solid-Phase Microextraction and In-Matrix Derivatization for the Determination of Amphetamine-Related Drugs in Human Urine by Gas Chromatography–Mass Spectrometry, *J. Chromatogr. Sci.* 40 (2002) 19-25.

[29] N. Raikos, K. Christopoulou, G. Theodoridis, H. Tsoukali, D. Psaroulis, Determination of amphetamines in human urine by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 789 (2003) 59-63.

8 MANUSCRITO V – *Trends in counterfeit amphetamine-type stimulants after its prohibition in Brazil*

Manuscrito V

A seguir encontra-se disposto o artigo intitulado *Trends in counterfeits amphetamine-type stimulants after its prohibition in Brazil*. Este trabalho foi aceito para publicação pela *Forensic Science International*. O acesso ao conteúdo integral está disponível no sítio do periódico.

Como objeto de estudo, foram analisadas as características físicas e químicas de cápsulas contendo medicamento ATS, provenientes de três apreensões pelo Departamento de Polícia Federal (Rio Grande do Sul) em 2012, após a proibição da venda de medicamentos contendo FEN, DIE e mazindol pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2011). O perfil físico mostrou-se útil na indicação de falsificações. As análises químicas revelaram ativos farmacêuticos diferentes daquele indicado na embalagem de apreensão, com teores que variaram de 1/3 a 2 vezes a quantidade de fármaco encontrada no produto comercial. O tratamento estatístico utilizando análise multivariada com aplicação de Análise de Componentes Principais nos dados da espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier por Refletância Total Atenuada classificou as amostras de acordo com suas similaridades, indicando que duas apreensões possuíam origem comum. Esse artigo representa o primeiro estudo brasileiro analisando a falsificação de cápsulas de medicamentos ATS.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Forensic Science International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/forensiint

Trends in counterfeit amphetamine-type stimulants after its prohibition in Brazil



Kristiane de Cássia Mariotti^{a,*}, Rafael S. Ortiz^b, Daniele Z. Souza^b, Thayse C. Mileski^b, Pedro E. Fröhlich^a, Renata P. Limberger^{a,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacéuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2752 Ipiranga Avenue, Santana, 90610-000 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^b Setor Técnico-Científico, Superintendência Regional do Departamento de Polícia Federal no Rio Grande do Sul, 1365 Ipiranga Avenue, Azenha, 90160-093 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 January 2013

Received in revised form 9 March 2013

Accepted 15 March 2013

Available online

Keywords:

Amphetamine-type stimulants

Fenproporex

Sibutramine

Forensic analysis

ABSTRACT

Brazil is one of the world's highest users of anorectic drugs, mainly diethylpropione, fenproporex and sibutramine. The present work focuses on physical and chemical characteristics of 17 counterfeited capsules containing amphetamine-type stimulants (ATS) from three seizures conducted by Brazilian Federal Police. The physical profile was useful in indicating forgery, bring complementary information, but the use of this data singly was not sufficient to distinguish between authentic and counterfeited medicines. The chemical analysis revealed that the seizures capsules labeled as Desobesi-M[®] (fenproporex 25 mg), actually contained the active pharmaceutical ingredient (API) sibutramine. The amount of this API ranged from 1/3 to 2 times the amount of drug found in commercial product, may reach twice the recommended daily dose. Multivariate analysis with application of principal component analysis on data from spectroscopy attenuated total reflectance Fourier transform infrared classified the samples according to their similarities, indicating that two seizures had common origin. This study represents the first step in the elucidation of falsification of ATS in Brazil. Considering the forensic intelligence these information are valuable in order to develop and establish a database that enables correlate samples from different locations and/or suppliers and to map the profile and trends of trafficking.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

9. DISCUSSÃO GERAL

A presente tese tem como enfoque o estudo de ATS. A escolha do tema baseou-se em extensa revisão da literatura, apresentada no Manuscrito I, o qual demonstrou o potencial e a necessidade de desenvolvimento científico no que se refere ao estudo dessas substâncias. A grande utilização na América do Sul, em especial no Brasil, de ATS tem sido destaque nos relatórios divulgado pelo Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime; entretanto esses ATS vêm sendo timidamente estudados por pesquisadores no país.

No trânsito brasileiro, a utilização de estimulantes, popularmente conhecidos como “rebites” visa a aumentar o estado de alerta e o tempo de vigília, sendo um reconhecido problema nacional. O uso de ATS implica uma série de efeitos colaterais como: aumento da pressão sanguínea, agitação, aumento da temperatura corporal, midríase (que torna a retina mais sensível a luz, podendo gerar fotofobia) e, dependendo da dose e do tempo de uso, alucinações e psicoses. Além dos riscos à saúde, o uso de SPA tem consequências legais, previstas no Código de Trânsito Brasileiro. Apesar da proibição do uso de substâncias por condutores estar normatizada, ela não tem sido monitorada: atualmente não existem dispositivos aprovados e regulamentados para realização de análises *in loco*, exceto para medidas do consumo de álcool. A regulamentação desprovida de fiscalização gera o descumprimento e o abuso por parte dos condutores. Assim, um dos primeiros aspectos discutidos nessa tese (Manuscrito II) foi uma abordagem epidemiológica, vinculando os resultados toxicológicos de 1682 vítimas fatais do trânsito Catarinense com os respectivos perfis de idade e sexo. A prevalência encontrada do uso de substâncias foi respectivamente: compostos canabinóides; cocaína e metabólitos, antidepressivos, anfetamínicos, benzodiazepínicos e barbitúricos. Dentre os poli-usuários, a maior frequência foi do uso cocaína e canabinóides. A maioria das vítimas eram jovens e do sexo masculino. Dentre os aspectos discutidos no estudo, salientam-se as dificuldades representadas pela centralização dos Institutos de Perícia, o que acaba por inviabilizar análises forenses em determinadas circunstâncias. Para exemplificar esses fatores dificultadores, podemos citar as ocorrências do interior dos Estados, situação em que o tempo de deslocamento dos peritos pode inviabilizar a preservação do local e a própria perícia. Outras dificuldades

surgem na coleta, no transporte e no acondicionamento adequados das amostras, além do aumento do risco de falhas na fundamental preservação da cadeia de custódia. Essa dificuldade, em parte, é refletida pelo fato de que de um total de 1682 vítimas, em apenas 941 foi realizada necropsia e investigação toxicológica.

Por fim, observam-se neste estudo as particularidades de consumo de SPA no trânsito dos estados brasileiros. Como destacado na parte introdutória desta tese, reforçamos o entendimento de que a abordagem preventiva deve atender as particularidades de cada região. Estudos nacionais são de grande valia, entretanto, sendo o Brasil um país continental, fronteiro a diversos países e, portanto, influenciado pela acessibilidade a diferentes culturas, o perfil local pode não corresponder ao perfil nacional. Isso ficou evidente no estudo do trânsito de Santa Catarina, o qual, diferentemente dos estudos desenvolvidos em outras regiões (Souza *et al.*, 2005; Nascimento *et al.*, 2007, Leyton *et al.*, 2012, Zancanaro *et al.*, 2012) apresentou uma maior prevalência no consumo de canabinóides (42%) enquanto que de modo geral, estudos nacionais e em outros estados demonstram uma maior prevalência do uso de ATS e cocaína. Tal fato pode estar relacionado à proximidade geográfica, e, portanto, a maior facilidade de acesso, ao Paraguai, um dos maiores produtores de *Cannabis sp.* na América do Sul (UNODC, 2011).

Para a monitorização do consumo de substâncias no trânsito, é necessário o emprego de métodos analíticos validados para as matrizes biológicas de interesse. Os resultados gerados por essas análises toxicológicas devem ser inequívocos e incontestáveis. Dados analíticos não-confiáveis podem não só ser contestados juridicamente, podendo implicar em consequências legais injustificadas ao réu, como também podem levar ao tratamento errado de paciente. Os métodos analíticos a serem utilizados na área forense e/ou na toxicologia clínica, exigem um desenvolvimento cuidadoso e uma validação completa do método. A importância dos dados analíticos de alta qualidade não pode ser subestimada (Peters, 2007).

A literatura científica considera que o abuso de substâncias estimulantes por motoristas de trânsito é uma realidade global e centra a

maioria dos estudos em compostos estimulantes alucinógenos (chamado grupo dos *ecstasys*) e de drogas de desenho (*designer drugs*). Poucos estudos foram encontrados acerca da determinação de medicamentos estimulantes. Considerando a necessidade de desenvolvimento de métodos aplicados à realidade nacional de consumo de substâncias, nesta tese foram desenvolvidos e validados dois métodos para análise de AMP, FEN, DIE e MPH em diferentes matrizes biológicas.

Primeiramente, foi desenvolvido um método de extração e quantificação simultânea de AMP, FEN e DIE em plasma utilizando SPME-DI seguida de análise por GC-MS (Manuscrito III). Na análise de compostos anfetamínicos livres por GC-MS ocorrem perdas na sensibilidade e na reprodutibilidade devido à adsorção e à interação dos analitos com a coluna (Nishida *et al.*, 2006). Para contornar esse problema, etapas de derivatização são necessárias e têm como objetivo converter analitos polares em análogos menos polares e assim, minimizar a perda da sensibilidade e da reprodutibilidade (Ugland *et al.*, 1997). Ao mesmo tempo, essa conversão química de aminas livres (mais polares/menos voláteis) a compostos menos polares favorece o aumento da partição entre o analito e a fibra de SPME, aumentando a quantidade extraída (Ugland *et al.*, 1997; Nishida *et al.*, 2006). Como agente de derivatização optou-se pela utilização de alquilcloroformato, especificamente o propilcloroformato, que reage rapidamente com aminas primárias e secundárias gerando derivados de carbamatos em soluções aquosas alcalinas, o que viabiliza a derivatização de compostos anfetamínicos diretamente na matriz biológica. Considerando que o propilcloroformato reage em meio aquoso e que não se recomenda o uso de solventes orgânicos em fibras de SPME a fim de evitar seu rápido desgaste, buscou-se o emprego de agentes precipitantes de proteínas plasmáticas que fossem aquosos. Dentre os testados, o ácido tricloroacético (TCA) resultou em menor perda de analito durante a precipitação e melhor *clean-up* das amostras. Para contornar a acidez do meio gerada pela adição do TCA, após a precipitação protéica do plasma, utilizou-se tampão básico, a fim de alcançar um pH próximo a 10,0, o qual contempla a faixa de aproximadamente 2 unidades de pH acima do pKa dos analitos, garantindo assim, que a maioria dos fármacos em solução estariam em sua forma não

ionizada, o que permite uma adequada reação de derivatização e, conseqüentemente, uma maior interação com a fibra e uma melhor sensibilidade e reprodutibilidade analítica.

A quantidade de derivatizante e o tempo de extração são fatores essenciais no pré-tratamento ideal das amostras, assim para a otimização desses parâmetros foi satisfatoriamente utilizado um desenho estatístico de experimentos, empregando o modelo do Desenho Composto Central para esses dois fatores e tendo como variável de saída as áreas dos picos cromatográficos. Esse modelo pode fornecer gráficos na forma de superfície de resposta os quais facilitam a interpretação dos resultados. Assim, aplicando-se um desenho estatístico foi possível obter, através de poucas análises, um resultado ótimo para dois fatores considerados críticos para a técnica de SPME. Além disso, por meio da SPME, a qual extrai e concentra os analitos derivatizados, foi possível alcançar reduzidos limites de detecção e quantificação.

Para a descrição adequada dos dados da validação foi necessária a aplicação de logaritmo natural nas duas variáveis (área e concentração) conforme previamente descrito por Souza e colaboradores (Souza *et al.*, 2011). Os resultados para os parâmetros de validação analisados encontraram-se de acordo com o preconizado pela guia de validação de métodos bioanalíticos do Food and Drug Administration (FDA). Salienta-se que esse trabalho representou o seguimento e a ampliação de uma linha de estudo do Laboratório de Toxicologia, que se iniciou com a análise desses ATS em fluido oral por GC-MS com aplicação de SPME (Souza *et al.*, 2011).

A segunda metodologia analítica desenvolvida empregou LC-MS/MS para análise simultânea de FEN, DIE, MPH em fluido oral (Manuscrito IV). A elevada especificidade, sensibilidade e seletividade representadas pela utilização da técnica de varredura de monitoramento de múltiplas reações (*multiple reaction monitoring* -MRM); a possibilidade da etapa cromatográfica ocorrer em curto tempo de execução e um potencial para redução da preparação da amostra, considerando não haver necessidade de derivatização, estão tornando a LC-MS/MS a técnica de escolha na etapa de confirmação da

determinação de múltiplas drogas em amostras de fluidos orais (Wood *et al.*, 2005). Devido a essas vantagens a utilização de LC-MS/MS vem ganhando espaço entre as análises toxicológicas. No método desenvolvido, para o preparo de amostras, foi empregada extração líquido-líquido, objetivando manter a simplicidade e a rapidez da técnica. Os parâmetros do espectrômetro de massas foram otimizados para os analitos em questão e as análises realizadas segundo as normas preconizadas pelo FDA. Os dados de validação foram adequadamente descritos pelo modelo linear numa faixa de 2,5 a 90 ngml⁻¹. Resultados da precisão e exatidão inter e intra-dia apresentaram-se de acordo com os limites estabelecidos na normativa do FDA.

As metodologias analíticas foram desenvolvidas e validadas em diferentes sistemas cromatográficos, empregando duas matrizes de ampla utilização em análises toxicológicas. Essas técnicas poderão ser implementadas em laboratórios nacionais para aplicações tanto com propósitos clínicos quanto toxicológicos, como, por exemplo, em estudos farmacocinéticos e em análises de amostras do trânsito brasileiro.

Por fim, sabe-se que a utilização de “rebites” por condutores e a suas aquisições em postos de combustível e pela *internet* são problemas conhecidos pelas autoridades sanitárias e pelas forças policiais. No entanto, como a venda desses produtos em locais proibidos por si só já configura crime conforme a legislação nacional, as análises forenses sobre o conteúdo dessas apreensões ficam preteridas. Aliado a isso, o baixo número de toxicologistas no serviço público e alta demanda de trabalho acabam por inviabilizar os estudos físicos e químicos de amostras de ATS apreendidas (Manuscrito V).

Até o presente momento não foram encontradas na literatura análises toxicológicas desses produtos e por isso as falsificações de medicamentos a base de ATS também foram objeto de estudo nesta tese. Esse é um projeto visado há muito tempo pelo Laboratório de Toxicologia da UFRGS, porém, amostras forenses reais são objetos de estudo raramente disponíveis para experimentos em pesquisa científica. O pesquisador não tem outra fonte de matéria-prima senão os materiais apreendidos pelas forças policiais e encaminhados para exames periciais (Ortiz, 2013). Apesar das dificuldades em

trabalhar com amostras forenses e do reduzido número de exemplares, investigou-se o perfil físico e o químico de medicamentos falsificados de ATS.

Esse estudo revelou dados bastante interessantes: os produtos avaliados foram apreendidos em embalagens falsas de Desobesi M[®], porém apresentavam como ingrediente farmacologicamente ativo a sibutramina. A dose estimada variou em aproximadamente 1/3 a 2 vezes a quantidade de fármaco encontrada no produto comercial (Saciette[®]). Duas apreensões puderam ser correlacionadas pelo emprego de análise estatística multivariada, através da técnica de Análise de Componentes Principais das bandas obtidas nos experimento de infravermelho com transformada de Fourrie. Esse estudo é de grande importância, pois demonstra a praticidade e as limitações na execução de análises físicas sobre as cápsulas, além de evidenciar a necessidade da realização de análises químicas, considerando as particularidades inerentes às amostras forenses.

Os resultados obtidos neste artigo inovam no sentido de apresentar o desenvolvimento de soluções analíticas simples para o estudo dessas falsificações, além de servir de alerta para a necessidade de implementação de análises químico-toxicológicas das apreensões de produtos estimulantes. Com a publicação desses dados esperamos sensibilizar os demais estados brasileiros bem como os países vizinhos para que, a exemplo do que se verifica em outros continentes, possamos desenvolver uma rede integrada de dados que auxilie as autoridades policiais no combate a falsificação de medicamentos estimulantes.

Por fim, salienta-se a amplitude e a multidisciplinaridade do estudo dos ATS que constituiu o tema central desta tese e que foi abordado por diferentes maneiras, seja envolvendo o conhecimento de análises químicas; o estudo dos aspectos epidemiológicos; a análise e a interpretação toxicológicas de resultados; o aspecto forense, juntamente com o conhecimento de suas implicações jurídico-legais; as aplicações em clínica médica. Assim, a presente tese mostrou-se um estudo amplo, construído a partir de um problema da realidade brasileira atual, verificado tanto cientificamente por dados epidemiológicos no trânsito quanto pelo surgimento do aspecto forense

relacionando-se ao tema, implicando desenvolvimento científico em diferentes campos do conhecimento do profissional farmacêutico-toxicologista.

Fundamentado em criteriosa revisão bibliográfica (manuscrito 1) verificou-se a controversa eficiência e o potencial risco que o uso dos ATS representa. A partir deste ponto formularam-se hipóteses de estudo que visaram abordar de modo amplo e aplicável o tema referente aos ATS, quais sejam: análise no trânsito, analítica e forense, conforme demonstrados pela figura 3.

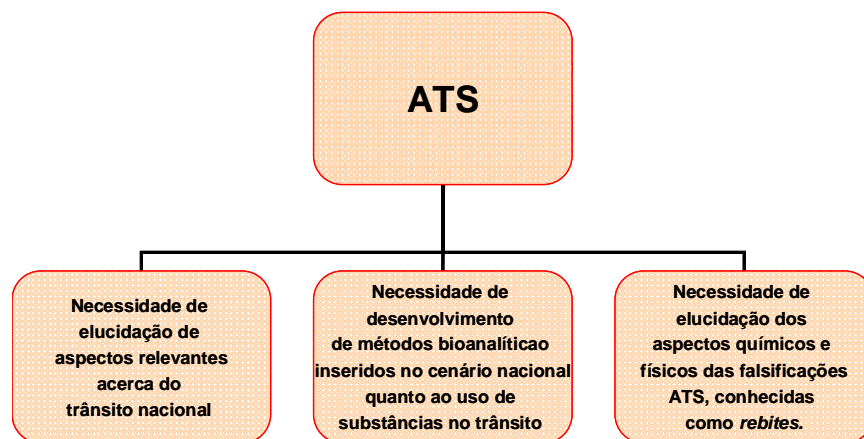


Figura 3: Encadeamento das hipóteses formuladas para estudo nesta tese.

Por meio da verificação da prevalência de uso de substâncias e o perfil de idade e sexo dos motoristas envolvidos em acidentes fatais no trânsito de Santa Catarina (manuscrito II) levantaram-se dados ainda desconhecidos acerca de um dos Estados com os maiores índices de vítimas no trânsito. Considerando a relevância social do tema, espera-se que essas estatísticas possam embasar estudos preventivos.

Também foram desenvolvidas de ferramentas analíticas de imediata aplicabilidade com vista à determinação simultânea de ATS em diferentes matrizes biológicas e em diferentes sistemas cromatográficos (manuscrito III e IV). O desenvolvimento de métodos validados prima pela excelência nas técnicas bioanalíticas, sendo, portanto, um requisito indispensável para a garantia da qualidade e para a correta interpretação dos resultados encontrados. As técnicas aqui descritas poderão ser amplamente empregadas

por laboratórios públicos e privados para análises clínicas, toxicológicas e forenses.

Por fim, na abordagem forense, foram analisados os perfis físicos e químicos de medicamentos falsificados contendo ATS (manuscrito V). Este estudo representou um pioneirismo na área, até então obscura no que se refere a falsificações de ATS, e demonstrou o expressivo risco ao qual a população, principalmente motoristas profissionais, está exposta ao consumir essas contrafações. Esta etapa fechou um elo necessário de uma cadeia de conhecimentos acerca do estudo de ATS (figura 4).



Figura 4: Desenho esquemático das etapas desenvolvidas nesta tese.

Assim, entende-se que a maior contribuição desta tese é a construção de conhecimento científico elaborado sobre diferentes faces de um problema amplo e atual na sociedade brasileira: o uso de ATS.

AGSA. Drug Abuse Testing Guidelines, 2006. Disponível em <www.cscq.ch/agsa> Acesso em: 20 jan. 2010.

ANDERSSON, K.; JALAVA, K; LOCK, E.; FINNON, Y.; HUIZER, H.; KAA, E.; LOPES, A.; VAN DER MEER, A.P.; COLE, M.D.; DAHLÉN, J.; SIPPOLA, E. Development of a harmonised method for the profiling of amphetamines: III. Development of the gas chromatographic method. *Forensic Science International*, v. 169, p. 50–63, 2008.

BALCIOGLU, A.; REN, J. Q.; MCCARTHY, D.; SPENCER, T. J.; BIEDERMAN, J.; BHIDE, P. G. Plasma and brain concentrations of oral therapeutic doses of methylphenidate and their impact on brain monoamine content in mice. *Neuropharmacology*. v. 57, p. 687–693, 2009.

BECKETT, A.; D. MIHAILOVA, The stereochemistry of carbonyl reduction of diethylpropion and related amino-ketones in man. *Biochemical Pharmacology* 1974; 23; 3347-52.

BERNHOF, I.M.; STEENTOF, A.; JOHANSEN, S.S.; KLITGAARD, N.A.; LARSEN, L.B.; HANSEN, L.B. Drugs in injured drivers in Denmark. *Forensic Science International*, v. 150, p. 181-189, 2005.

BOLANÓS, C.A.; BARROT, M.; BERTON, O.; WALLACE-BLACK, D.; NESTLER, E.J. Methylphenidate Treatment during Pre- and Periadolescence Alters Behavioral Responses to Emotional Stimuli at Adulthood. *Biological Psychiatry*, v. 54, p. 1317–1329, 2005.

BRANDON, C.; MARINELLI, M.; WHITE, F. Adolescent exposure to methylphenidate alters the activity of rat midbrain dopamine neurons. *Biological Psychiatry*, v. 54, p. 1338-44, 2003.

BRASIL. Lei nº. 9.503 de 23 de setembro de 1997. Institui o Código Brasileiro de Trânsito. In: *Diário Oficial da União*, Brasília, 24 set. 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta a bancos de dados – Produtos registrados das empresas de medicamentos e hemoderivados (2002). Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/banco_med.htm>. Acesso em: 20 jan. 2010.

BRASIL. Lei nº. 12.760 de 20 de dezembro de 2012. Altera a Lei no 9.503, de 23 de setembro de 1997, que institui o Código de Trânsito Brasileiro. Disponível

em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2011-2014/2012/Lei/L12760.htm
Acesso em 20 jan 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/rdc0052_06_10_2011.pdf
f. Acessado em: 08 jan 2013.

BREITENBACH, T. C. ; PECHANSKY, F. ; BENZANO, D. ; DE BONI, R. . High rates of injured motorcycle drivers in emergency rooms and the association with substance use in Porto Alegre, Brazil. *Emergency Medicine Journal*, v. 29, p. 205-207, 2011.

BRUGGISSER, M.; CESCHIB, A.; BODMERA, M.; WILKSD, M.F.; KUPFERSCHMIDT, H.; LIECHTIA, M.E. Retrospective analysis of stimulant abuse cases reported to the Swiss Toxicological Information Centre during 1997–2009. *Swiss Med Wkly*, v140, w13115, 2010.

CARLINI, E. A.; GALDURÓZ, J. C. F.; NOTO, A. R.; NAPPO, S. A. I Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 107 maiores cidades do país – 2001. São Paulo : CEBRID/UNIFESP, 2002. 380 p.

CARLINI, E. A.; GALDURÓZ, J. C. F.; SILVA, A. A. B.; NOTO, A. R.; FONSECA, A. M.; CARLINI, C. M.; OLIVEIRA, L. G. O.; NAPPO, S. A; MOURA, Y. G.; SANCHEZ, Z. V. M. II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país – 2005. São Paulo : CEBRID/UNIFESP, 2006. 468 p.

CNM. Confederação Nacional de Municípios. As mortes e as internações por acidentes de trânsito no Brasil de 2000 a 2011: o crescimento da frota brasileira de veículos e suas conseqüências. Disponível em http://www.cnm.org.br/index.php?option=com_content&view=category&id=65&Itemid=198. Acessado em 24 de março de 2013.

CODY, J.; VALTIER, S. Detection of amphetamine following administration of fenproporex. *Journal of Analytica Toxicology*, v. 6, p. 425-31, 1996.

CODY, J.; VALTIER, S.; STILLMAN, S. Amphetamine and fenproporex levels following multidose administration of fenproporex. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 23, 187-94, 1999.

COMIRAN, E.; SOUZA, D.Z.; BOEHL, P.O.; MARIOTTI, K.C.; PECHANSKY, F.; DUARTE, P.C.A.V.; DE BONI, R.B.; FROEHLICH, P.E.; LIMBERGER, R.P. Fenproporex and Amphetamine Pharmacokinetics in Oral Fluid After Controlled Oral Administration of Fenproporex. *Therapeutic and Drug Monitoring*. v. 34, p.545-553, 2012.

CONCHEIRO, M.; DE CASTRO, A.; QUINTELA, O.; CRUZ, A.; LOPEZ-RIVADULLA, M. Confirmation by LC-MS of drugs in oral fluid obtained from roadside testing. *Forensic Science International*. v.170, p.156-162, 2007.

DAMS, R.; BENIJTS, T.; LAMBERT, W.E.; MASSART, D.L.; DE LEENHEER, A.P. Heroin impurity profiling: trends throughout a decade of experimenting. *Forensic Science International*, v. 123, p. 81-88, 2001.

DE BONI, R., BOZZETTI, M.C., HILGERT, J., SOUSA, T., VON DIEMEN, L., BENZANO, D., MENEGON, G., HOLMER, B., DUARTE, P.C.A.V., PECHANSKY, F. Factors associated with alcohol and drug use among traffic crash victims in southern Brazil. *Accident Analysis and Prevention*, v. 43, p. 1408-1413, 2011.

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

DRUMMER, O. H.; GEROSTAMOULOS, D.; CHU, M.; SWANN, P.; BOORMAN, M.; CAIRNS, I. Drugs in oral fluid in randomly selected drivers. *Forensic Science International*. v. 170, p. 105-110, 2007.

DUJOURDY, L.; BESACIER, F. Headspace profiling of cocaine samples for intelligence purposes. *Forensic Science International*, v. 177, p. 153-161, 2008.

FARQUHAR, S.; FAWCETT, P.; FOUNTAIN, J. Illicit intravenous use of methylphenidate (Ritalin) tablets: a review of four cases. *Australian Emergency Nursing Journal*, v.5, p.25-29, 2002.

ENSING, J.G.; RACAMY, C.; DEE ZEEW, R.A. A rapid gas chromatographic method for fingerprinting of illicit cocaine samples. *Forensic Science International*, v. 37, p. 446–459, 1992.

FEDERICI, M.; GERACITANO, R.; BERNARDI, G.; MERCURI, N. B. Actions of Methylphenidate on Dopaminergic Neurons of the Ventral Midbrain. *Biological Psychiatry*. v. 57, p.361–365, 2005.

GATLEY, S.; VOLKOW, N.D.; GIFFORD, A.N.; FOWLER, J.S.; DEWEY, S.L.; DING, Y.S.; LOGAN, J. Dopamine-transporter occupancy after intravenous doses of cocaine and methylphenidate in mice and humans. *Psychopharmacology*, v.146, p. 93-100, 1999.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. *The pharmaceutical basis of therapeutics*. 11th. Ed. New York: McGraw-Hill 2007. 2148 p.

GUERRIERO, R.; HAYES, M.M.; DHALIWAL, S.K.; REN, J.Q.; KOSOFKY, B.E. Preadolescent methylphenidate versus cocaine treatment differ in the expression of cocaine-induced locomotor sensitization during adolescence and adulthood. *Biological Psychiatry*, v.60, p.1171-80, 2006.

ICH. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (Q2R1)*. Geneva: International Conference on Harmonization, 2005.

KANKAANPÄÄ, A.; GUNNAR, T.; ARINIEMI, K.; LILLSUNDE, P.; MYKKÄNEN, S.; SEPPÄLÄ, T. Single-step procedure for gas chromatography–mass spectrometry screening and quantitative determination of amphetamine-type stimulants and related drugs in blood, serum, oral fluid and urine samples. *Journal of Chromatography B*, v. 810, p. 57–68, 2004.

KRAEMER, T.; PFLUGMANN, T.; BOSSMANN, M.; KNELLER, N.M.; PETERS, F.T.; PAUL, L.D.; SPRINGER, D.; STAACK, R.F.; MAURER, H.H. Fenproporex N-dealkylation to amphetamine—enantioselective in vitro studies in human liver microsomes as well as enantioselective in vivo studies in Wistar and Dark Agouti rats. *Biochemical Pharmacology*. v.68, p. 947-57, 2004.

LEYTON, V.; CARVALHO, D. G.; JESUS, M. G. S.; MUÑOZ, D. R. Uso de anfetamínicos por motoristas profissionais. brasileiros: aspectos gerais. *Saúde, Ética & Justiça*. 5/7(1-2):32 -6, 2000-2002.

LEYTON, V.; SINAGAWA, D.M.; OLIVEIRA, K.C.; SCHMITZ, W.; ANDREUCETTI, G.; DE MARTINIS, B.S.; YONAMINE, M.; MUNOZ, D.R. Amphetamine, cocaine and cannabinoids use among truck drivers on the roads in the State of Sao Paulo, Brazil. *Forensic Science International* v.215, p.25-7, 2011.

LOCICIRO, S.; HAYOZ, P.; ESSEIVA, P.; DUJOURDY, L.; BESACIER, F.; MARGOT, P. Cocaine profiling for strategic intelligence purposes, a cross-border project between France and Switzerland : Part I. Optimisation and harmonisation of the profiling method. *Forensic Science International*, v. 167, p. 220–228, 2007.

LOCICIRO, S.; ESSEIVA, P.; HAYOZ, P.; DUJOURDY, L.; BESACIER, F.; MARGOT, P. Cocaine profiling for strategic intelligence, a cross-border project between France and Switzerland. Part II. Validation of the statistical methodology for the profiling of cocaine. *Forensic Science International*, v. 177, p. 199–206, 2008.

MARCHEI, E.; FARRÈ, M.; PELLEGRINI, M.; GARCÍA-ALGAR, Ó.; VALL, O.; PACIFICI, R.; PICHINI, S. Pharmacokinetics of methylphenidate in oral fluid and sweat of a pediatric subject. *Forensic Science International*, v. 196, 59-63, 2010.

MARQUIS, R.; WEYERMANN, C.; DELAPORTE, C.; ESSEIVA, P.; AALBERG, L.; BESACIER, F.; BOZENKO JR., J.S.; DAHLENBURG, R.; KOPPER, C.; ZRCEK, F. Drug intelligence based on MDMA tablets data. 2. Physical characteristics profiling. *Forensic Science International*, v. 178, p. 34–39, 2008.

MARKOWITZ, J.; DEVANE, C.; BOULTON, D.; NAHAS, Z.; RISCH, S.; DIAMOND, F.; PATRICK, K. Ethylphenidate formation in human subjects after the administration of a single dose of methylphenidate and ethanol. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 28, p. 620-24, 2003.

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

MEY, B., PAULUS, H.; LAMPARTER, E.; BLASCHKE, G. Enantioseparation of amfepramone (rac-diethylpropion): preparative separation of the enantiomers and enantioselective analysis. *Chirality*, v. 11, p. 772-80, 1999.

MOREAU, R. L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B.; *Toxicologia Analítica*. 1ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

NAPPO, S.; TABACH, R.; NOTO, A.; GALDURÓZ, J.; CARLINI, E. Use of anorectic amphetamine-like drugs by Brazilian women. *Eating Behavior*, v. 3, p. 153-65, 2002.

NASCIMENTO, E. C.; NASCIMENTO, E.; SILVA, J. P. Uso de álcool e anfetaminas entre caminhoneiros de estrada. *Revista de Saúde Pública*, v. 41, n. 2, p. 290-293, 2007.

NIDA, NIDA. 2011, National Institute of Drug Abuse. Stimulant ADHD Medications: Methylphenidate and Amphetamines

NISHIDA, M.; YASHIKI, A.; NAMERA, A.; KIMURA, K. Single hair analysis of methamphetamine and amphetamine by solid phase microextraction coupled with in matrix derivatization. *Journal of Chromatography B*, v. 842, p. 106-110, 2006.

ORTIZ, R.S. Perfil químico e tecnológico de comprimidos perorais contendo sildenafil e tadalafila, Porto Alegre: UFRGS, 2013. 185 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

PECHANESKY, F., DUARTE, P.C.A.V., DE BONI, R.B. Uso de bebidas alcoólicas e outras drogas nas rodovias brasileiras e outros estudos. Porto Alegre: Secretaria Nacional de Políticas Sobre Drogas, 2010. 121p.

RANG, H.; DALE, M.; RITTER, J.; FLOWER, R. CNS stimulants and psychotomimetic drugs, In: *Pharmacology*. 2007, Elsevier: London.

RIO GRANDE DO SUL. CENTRO DE INFORMAÇÃO TOXICOLÓGICA DO RIO GRANDE DO SUL. http://www.cit.rs.gov.br/images/stories/2011_ver02.pdf. Acessado em 20 de março de 2013.

ROTHMAN, R.; BAUMANN, M. Monoamine transporters and psychostimulant drugs. *European Journal of Pharmacology*, v. 479, p. 23-40, 2003.

SAMYN, N.; DE BOECK, G.; VERSTRAETE, A. G. The use of oral fluid and sweat wipes for the detection of drugs of abuse in drivers. *Journal of Forensic Sciences*, v. 47, n. 6, p. 1-8, 2002.

SCHENK, S.; IZENWASSER, S. Pretreatment with methylphenidate sensitizes rats to the reinforcing effects of cocaine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 72, p. 651-57, 2002.

SHAH, V.P., MIDHA, K.K., FINDLAY, J.W. A., HILL, H.M., HULSE, J.D., MCGILVERAY, I.J., MCKAY, G., MILLER, K.J., PATNAIK, R.N., POWELL, M.L., TONELLI, A., VISWANATHAN, C.T., YACOBI, A. Bioanalytical Method Validation—A Revisit with a Decade of Progress. *Pharmaceutical Research*, v. 17, p.1551-1557, 2000.

SILVA, O. A.; GREVE, J. M. D.; YONAMINE, M.; LEYTON, V. Drug use by truck drivers in Brazil. *Drugs: education, prevention and policy*, v. 10, n. 2, p. 135-139, 2003.

SØRENSEN, L., Determination of cathinones and related ephedrines in forensic whole-blood samples by liquid-chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v. 879, p. 727-36, 2011.

SOUZA, D.Z.; BOEHL, P.O.; COMIRAN, E.; MARIOTTI, K.C.; PECHANSKY, F.; DUARTE, P.C.A.V.; BONI, R.; FROELICH, P.E.; LIMBERGER, R.P. Determination of amphetamine-type stimulants in oral fluid by solid-phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 696, p. 67-76, 2011.

SOUZA, J. C.; PAIVA, T.; REIMÃO, R. Sleep habits, sleepiness and accidents among truck drivers. *Arquivos de Neuro-psiquiatria*, v. 63, n. 4, p. 925-930, 2005.

TOENNES, S. W.; KAUERT, G. F.; STEINMEYER, S.; MOELLER, M. R. Driving under the influence of drugs – evaluation of analytical data of drugs in oral fluid, serum and urine, and correlation with impairment symptoms. *Forensic Science International*, v. 152, p. 149-155, 2005.

TOENNES, T.; HARDER, S.; SCHRAMM, M.; NIESS, C.; KAUERT, G. Pharmacokinetics of cathinone, cathine and norephedrine after the chewing of khat leaves. *Journal of Clinical Pharmacology*, v. 56, p. 125-30, 2002.

TOZER, T.N.; ROWLAND, M. Introdução à Farmacocinética e à Farmacodinâmica: as bases quantitativas da terapia farmacológica. Porto Alegre:Artmed, 2009.

TUERCK, D.; WANG, Y.; MABOUDIAN, M.; WANG, Y.; SEDEK, Y.; POMMIER, F.; APPEL-DINGEMANSE, S. Similar bioavailability of dexamethylphenidate extended (bimodal) release, dexamethylphenidate immediate release and racemic methylphenidate extended (bimodal) release formulations in man. International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, v. 45, p. 662-68, 2007.

UGLAND, H. G.; KROGH, M.; RASMUSSEN, K. E. Aqueous alkylchloroformate derivatisation and solid-phase microextraction: determination of amphetamines in urine by capillary gas chromatography. Journal of Chromatography B. v. 701, p. 29-38, 1997.

UNITED NATIONS. International Drug Control Programme. Recommended methods for the detection and assay of heroin, cannabinoids, cocaine, amphetamine, methamphetamine and ring-substituted amphetamine derivatives in biological specimens. New York: United Nations, 1995. 88 p.

UNITED NATIONS: United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). Guidelines for testing drugs under international control in hair, sweat and saliva. New York: United Nations, 2001.

UNITED NATIONS. International Narcotics Control Board. International Narcotics Control Board 2007 report. New York: United Nations, 2008a. 130 p. Disponível em: < <http://www.incb.org/incb/en/annual-report-2007.html>>. Acesso em: 20 jan. 2010.

UNODC. United Nations Office on Drugs and Crime. Methods for Impurity Profiling of Heroin and Cocaine. United Nations: New York, 2005.

UNODC. United Nations Office on Drugs and Crime, World Drug Report 2011, United Nations, New York, 2011.

ZANCANARO, I.; LIMBERGER, R.P.; BOHEL, P.O.; DOS SANTOS, M.K.; DE BONI, R.B.; PECHANISKY, F.; CALDAS, E.D. 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. 208-16, 2012.

WEYERMANN, C.; MARQUIS, R.; DELAPORTE, C.; ESSEIVA, P.; LOCK, E.; AALBERG, L.; BOZENKO JR., J.S.; DIECKMANN, S.; DUJOURDY, L.; ZRCEK, F. Drug intelligence based on MDMA tablets data. I. Organic impurities profiling. *Forensic Science International*, v. 177, p. 11–16, 2008.

WHO. Department of Essential Drugs and Other Medicines. *Counterfeit Drugs: Guidelines for the Development of Measures to Combat Counterfeit Drugs*. World Health Organization: Genebra, 1999.

WHO. International medical products anti-counterfeiting taskforce (IMPACT), Technical report. World Health Organization (2008). Disponível no endereço eletrônico <http://www.who.int/entity/impact/FinalBrochureWHA2008a.pdf>.

WYLIE, F. M.; TORRANCE, H.; SEYMOUR, A.; BUTTRESS, S.; OLIVER, J. S. Drugs in oral fluid – part II. Investigation of drugs in drivers. *Forensic Science International*, v. 150, p. 199-204, 2005.

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

YU, H.; ROTHMAN, R.; DERSCH, C.; PARTILLA, J.; RICE, K. Uptake and release effects of diethylpropion and its metabolites with biogenic amine transporters. *Bioorganica and Medicinal Chemistry*, v.8, p. 2689–92, 2000.

Carta de aceite do artigo intitulado *Amphetamine-type stimulants: A Review Of Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, And Toxicological Aspects* pela revista *Current Clinical Pharmacology*.

●  [CCP] Editor Decision | BSP-CCP-2012-30

De: **Current Clinical Pharmacology** 

Reference#: BSP-CCP-2012-30

Submission Title: AMPHETAMINE-TYPE MEDICINES: A REVIEW OF PHARMACOKINETICS, PHARMACODYNAMICS, AND TOXICOLOGICAL ASPECTS.

Dear Ms. Kristiane de Cássia Mariotti,

Thanks for submitting this manuscript.

We have reached a decision regarding your submission to Current Clinical Pharmacology. The manuscript has been reviewed by the editorial board members of the journal and independent experts in the field. Based on the reviewers comments, I am delighted to inform you that the manuscript is now accepted for publication in the journal. On behalf of the Editorial Board, I would like to thank for your contribution and hope that you will consider this journal for future manuscripts.

Again, I sincerely thank you for submission of the manuscript in Current Clinical Pharmacology.

Our decision is to: Accept

With warm regards,

Editorial Office
Bentham Science Publishers
Current Clinical Pharmacology
<http://bsp-cms.eurekaselect.com/index.php/CCP>

Carta de aceite do artigo intitulado *Trends in counterfeit amphetamine-type stimulants after its prohibition in Brazil* pela revista *Forensic Science International*

Date: Mar 15, 2013
To: "KRISTIANE DE CÁSSIA MARIOTTI" krismariotti@gmail.com
From: Olaf Drummer olaf@vifm.org
Subject: Your Submission: FSI-D-13-00090R2

Ref.: Ms. No. FSI-D-13-00090R2
TRENDS IN COUNTERFEITS AMPHETAMINE-TYPE STIMULANTS AFTER ITS PROHIBITION IN BRAZIL
Forensic Science International

Dear Mrs. MARIOTTI,

I am pleased to tell you that your work has now been accepted for publication in *Forensic Science International*.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards

Olaf H. Drummer, PhD
Associate Editor
Forensic Science International

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923> Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Pareceres da banca examinadora.

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

Nível: Doutorado

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Título: "Estimulantes Tipo-Anfetamínicos: uma abordagem no trânsito, analítica e forense."

Doutoranda: KRISTIANE DE CÁSSIA MARIOTTI

PARECER

A tese foi composta por 5 (cinco) artigos, sendo 2 artigos e um é fase final de correção recomendada pelos referidos.

O trabalho foi muito bem escrito e apresentado os resultados estão de acordo com os objetivos propostos e foram muito bem discutidos.

Toda a tese apresenta relevância científica e grande possibilidade de aplicação prática.

A doutoranda mostrou-se muito segura na apresentação e arguição da tese, demonstrando elevado grau de conhecimento sobre o tema do trabalho.

Considero a doutoranda aprovada com conceito A com louvor.

Mirna Baimy Leal

Prof(a). Dr(a). MIRNA BAIMY LEAL
Porto Alegre, 26 de abril de 2013.

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

Nível: Doutorado

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Título: "Estimulantes Tipo-Anfetamínicos: uma abordagem no trânsito, analítica e forense."

Doutoranda: KRISTIANE DE CÁSSIA MARIOTTI

PARECER

A doutoranda Kristiane de Cássia Mariotti na apresentação oral e escrita demonstrou domínio sobre o tema, considerado de extrema relevância. Ao longo da tese foram demonstrados resultados consistentes reunidos em uma visão global do processo detalhada em 5 manuscritos sequenciados logicamente. Considero que a doutoranda está aprovada para receber o grau de doutor com grande mérito científico.

Eliane Dallegrave

Profa. Dra. Eliane Dallegrave
Porto Alegre, 26 de abril de 2013.

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

Nível: Doutorado

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Título: "Estimulantes Tipo-Anfetamínicos: uma abordagem no trânsito, analítica e forense."

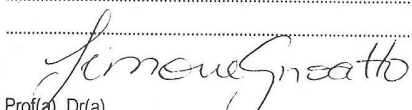
Doutoranda: KRISTIANE DE CÁSSIA MARIOTTI

PARECER

O trabalho desenvolvido apresenta mérito científico, demonstrado especialmente, pelas três artigos científicos já publicados e pelos outros dois escritos.

Os dados foram bem apresentados e refletem um trabalho bem planejado e bem desenvolvido e o domínio da candidata sobre o assunto.

Com base no exposto sou de parecer favorável a atribuição de título de Doutor em Ciências Farmacêuticas a candidata.


Prof(a). Dr(a).
Porto Alegre, 26 de abril de 2013.

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

Nível: Doutorado

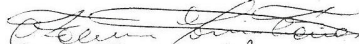
Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Título: "Estimulantes Tipo-Anfetamínicos: uma abordagem no trânsito, analítica e forense."

Doutoranda: KRISTIANE DE CÁSSIA MARIOTTI

PARECER

A tese intitulada "Estimulantes tipo-anfetamínicos: uma abordagem no trânsito, analítica e forense", apresentada pela doutoranda Kristiane Mariotti, aborda temas de grande relevância, apresentando casos de interesse claro e bem escritos. A tese demonstra domínio de objetivos com adequação de delineamento experimental e com resultados consistentes, bem analisados e adequadamente discutidos. Como resultado do trabalho desenvolvido, foram submetidas para publicações cinco manuscritos, dos quais dois já foram aceitos, fato que reforça a relevância do tema abordado e a qualidade dos resultados obtidos. Assim sendo, considero o trabalho APROVADO.


Prof(a). Dr(a). Fabiane Moraes Facias
Porto Alegre, 26 de abril de 2013.

Ata de defesa de Tese.

Gerar Ata para Assinatura

<https://www1.ufrgs.br/PosGraduacao/InformacoesProgramas/AtaBa...>

ATA PARA ASSINATURA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de FarmáciaPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - Doutorado
Ata de defesa de TeseAluno: Kristiane de Cassia Mariotti, com ingresso em 01/04/2010
Título: **ESTIMULANTES TIPO-ANFETAMÍNICOS: uma abordagem no trânsito, analítica e forense.**
Orientador: Profª Drª Renata Pereira Limberger
Coorientador: Prof. Dr. Pedro Eduardo FroehlichData: 26/04/2013
Horário: 09:00
Local: Faculdade de Farmácia- UFRGS

Banca Examinadora	Origem
Mirna Bairy Leal	UFRGS
Simone Cristina Baggio Gnoatto	UFRGS
Fabiane Moreira Farias	UNIPAMPA
Eliane Dallegrave	UFCSPA

Porto Alegre, 26 de abril de 2013

Membros	Assinatura	Conceito	Avaliação	Indicação de Voto de Louvor
Mirna Bairy Leal		A	Aprovada	SIM
Simone Cristina Baggio Gnoatto		A	Aprovada	SIM
Fabiane Moreira Farias		A	Aprovada	SIM
Eliane Dallegrave		A	Aprovada	SIM

Conceito Geral da Banca: (APROVADA) Correções solicitadas: () Sim () Não
Indicação de Voto de Louvor: () Sim () Não

Observação: Esta Ata não pode ser considerada como instrumento final do processo de concessão de título ao aluno.
O Diploma somente será emitido após terem sido preenchidos todos os demais requisitos para a concessão do mesmo, o que deve ocorrer no prazo máximo de 90 (noventa) dias após esta data.

Kristiane Mariotti
Aluno

Renata Pereira Limberger
Orientador

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Av. Ipiranga, 2752 Prédio 21106 - Bairro Santana - Telefone 33085243
Porto Alegre - RS