



Universidade de São Paulo
Faculdade De Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

LEANDRO OKA DUARTE

“*Dried Spots* associado com um método LC-DAD para determinação simultânea de MDMA (*ecstasy*) e MDA em amostras de fluido oral”

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2021

LEANDRO OKA DUARTE

“*Dried Spots* associado com um método LC-DAD para determinação simultânea de MDMA (*ecstasy*) e MDA em amostras de fluido oral”

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Firmino de Oliveira

RIBEIRÃO PRETO - SP

2021

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Duarte, Leandro Oka

Dried Spots associado com um método LC-DAD para determinação simultânea de MDMA (ecstasy) e MDA em amostras de fluido oral. Ribeirão Preto, 2021.

144 p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientador: Oliveira, Marcelo Firmino de

1. Toxicologia forense. 2. Técnicas de preparo de amostras. 3. Anfetaminas do tipo metilenodioxí. 4. Mancha de fluido oral seca. 5. Cromatografia líquida.

DUARTE, L. O. *Dried Spots* associado com um método LC-DAD para determinação simultânea de MDMA (*ecstasy*) e MDA em amostras de fluido oral. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área: Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP, 2021.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof.(a) Dr(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof.(a) Dr(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof.(a) Dr(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Devido ao espaço limitado desta seção que não me permite agradecer devidamente a todas as pessoas, deixo palavras de agradecimento, mas com um sentimento de profundo reconhecimento para aquelas que não citar aqui. Primeiramente, ao professor Marcelo, pela orientação, oportunidade e apoio nas escolhas realizadas durante meu ingresso e subsequentes estudos no mestrado, o meu sincero agradecimento pela confiança que depositou em mim e disponibilidade que sempre revelou para comigo. Ao professor José Fernando, por estar sempre à disposição, seja para sanar dúvidas, compartilhar experiências, ou até mesmo emprestar seus valiosos e queridos livros em prol do conhecimento. Ao professor Anderson, pelos ensinamentos e disponibilidade. Agradeço também pelas valiosas sugestões e doação de vários reagentes para que eu pudesse concluir o meu trabalho de mestrado.

Ao Bruno, grande amigo e irmão que fiz neste período de pós-graduação. Meu enorme agradecimento pelos momentos de descontração, pela força, críticas, parceria, e a todos os bons momentos passados aos longos destes dois anos, inclusive nas longas, cansativas, mas divertidas horas de trabalho no laboratório. À Fernanda, por me auxiliar em vários momentos dentro da vida de pós-graduando, pelos conselhos, puxões de orelha e, claro, pelas amizades, boas conversas e risadas. Vocês são pessoas incríveis que merecem sempre o de melhor. Ao Guilherme, que me auxiliou em vários momentos para me enviar os dados que no computador estavam, e a todas as pessoas que fizeram parte do meu cotidiano durante esses anos em Ribeirão Preto e que, de alguma forma, compartilharam comigo momentos de alegria e conhecimento. A todos, o meu muito obrigado.

À minha família, um enorme e sincero obrigado pelo apoio e por sempre acreditarem em mim, mesmo nos momentos mais difíceis. Obrigado, pai e mãe, por todos os sacrifícios que fizeram e fazem por mim. Não existem palavras o suficiente para demonstrar a minha gratidão. Não existem palavras que expressem o quanto os dois significam para mim.

À minha querida e incrível Ana, que sempre teve paciência e que me apoiou desde que nos conhecemos. Agradeço imensamente pelo carinho, amor e companheirismo que tem me demonstrado. Você tem o dom de fazer as pessoas felizes e é um exemplo de superação. Obrigado por sempre acreditar em mim, obrigado pela transmissão de confiança e de força, em todos os momentos. Nos momentos mais difíceis procurei em você motivação para continuar e nunca me desapontei. Por tudo, a minha enorme gratidão.

RESUMO

DUARTE, L. O. ***Dried Spots* associado com um método LC-DAD para determinação simultânea de MDMA (*ecstasy*) e MDA em amostras de fluido oral**. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área: Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP, 2021.

O *ecstasy* é uma droga sintética cujo compostos 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) e 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA, metabólito) são seus principais constituintes. Por tornarem o usuário mais sociável, são populares entre os jovens mesmo sendo um sério problema de saúde devido aos seus efeitos como alteração sensorial, arritmias e hipertermia. Neste sentido, a análise forense de drogas se faz uma importante ferramenta para inibir seu consumo e distribuição e, portanto, um método para determinação simultânea do MDMA e MDA, utilizando a técnica de amostragem *dried oral fluid spot* (DOFS) combinada com sistema LC-DAD, foi desenvolvido com foco em sua aplicabilidade na toxicologia forense. As amostras DOFS, preparadas a partir de 150 μL de fluido oral, lidocaína (padrão interno) e papel aquarela (gramatura 300 g m^{-2}), foram extraídas com metanol e pré-concentradas em ácido trifluoroacético (TFA) 0,05% v/v. A separação cromatográfica foi realizada utilizando coluna fenil e fase móvel composta por acetonitrila:10 mmol L^{-1} TFA, em modo isocrático. A detecção e identificação foi obtida com detector de arranjo de diodos monitorando os comprimentos de onda entre 195 e 300 nm. O método estabelecido foi validado com diversos ensaios experimentais em termos de seletividade, efeito matriz (82,4 – 106 %), recuperação (84,2 – 98,2 %), efeito residual, precisão intra e interdia (1,37 – 9,85 e 5,78 – 15,3 %, respectivamente), exatidão (0,23 – 4,91 %), integridade de diluição e robustez (de -19,1 a 7,31 %). Estudos de estabilidade de curta (temperatura ambiente, 3 dias) e longa duração (- 6°C, 30 dias), de pós processamento (20 °C, 2 dias) e após ciclos de congelamento e descongelamento (3 ciclos de 12h) também foram realizados, e os resultados indicaram total integridade das amostras. Com uma faixa linear entre 0,012 e 5,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e limites de detecção e de quantificação de 0,006 e 0,012 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, o procedimento por DOFS se mostrou com alto potencial para determinação de MDMA e MDA em fluido oral, mesmo em sistemas de menor sensibilidade como a LC-DAD, representando uma alternativa relativamente simples e de baixo custo para as convencionais técnicas instrumentais e de amostragem dentro do campo forense.

Palavras-chave: Toxicologia forense. Técnicas de preparo de amostras. Anfetaminas do tipo metilenodioxi. Mancha de fluido oral seca. Cromatografia líquida.

ABSTRACT

DUARTE, L. O. ***Dried Spots associated to an LC-DAD method for the simultaneous determination of MDMA (ecstasy) and MDA in oral fluid samples.*** 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área: Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP, 2021.

Ecstasy is a synthetic drug whose compounds 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) and 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA, metabolite) are its main constituents. As they make the user more sociable, they are popular with young people, even though it is a serious health problem due to its effects such as sensory changes, arrhythmias, and hyperthermia. In this sense, forensic drug analysis becomes an important tool to inhibit its consumption and distribution. Therefore, a method for simultaneous determination of the MDMA and MDA, using the dried oral fluid spot (DOFS) sampling technique combined with the LC-DAD system, was developed with a focus on its applicability within of forensic toxicology. The DOFS samples, prepared from 150 μL oral fluid, lidocaine (internal standard), and watercolor paper (weight 300 g m^{-2}), were extracted with methanol and pre-concentrated in trifluoroacetic acid (TFA) 0.05% v/v. Chromatographic separation was performed using phenyl column and mobile-phase constituted of acetonitrile: 10 mmol L^{-1} TFA, in isocratic mode. Detection and identification were achieved with a diode array detector monitoring wavelength between 195 and 300 nm. The established method was validated through different experimental assays in terms of selectivity, matrix effect (82.4 – 106 %), recovery (84.2 - 98.2 %), residual effect, intra- and interday precision (1.37 – 9.85 and 5.78 – 15.3 %, respectively), accuracy (0.23 - 4.91 %), dilution integrity and robustness (from -19,1 to 7.31 %). Studies of short- (room temperature, 3 days) and long-term (- 6°C, 30 days) stabilities, processed samples in autosampler (20°C, 2 days), and freeze-thaw cycles (3 cycles of 12 h) stabilities also were also performed, and the results indicated total integrity of the samples. With a linear range between 0.012 and 5.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and detection and quantification limits of 0.006 and 0.012 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively, the DOFS procedure proved to have a high potential for determining MDMA and MDA in oral fluid, even in less sensitive systems such as liquid chromatography coupled to the diode array detector, outlining a relatively simple and low-cost alternative to the conventional instrumental and sampling techniques within the forensic field.

Keywords: Forensic toxicology. Sampling techniques. Methylenedioxy-type amphetamine. Dried Oral Fluid Spot. Liquid chromatography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química geral das fenetilaminas e as modificações químicas estruturais sob controle da Portaria 344/98 do Serviço de Vigilância em Saúde do Brasil	22
Figura 2 – Distribuição percentual da quantidade de amostras <i>de ecstasy</i> apreendidas entre os anos de 2014 e 2018	24
Figura 3 - Variedade de formas e cores de amostras apreendidas de <i>ecstasy</i>	26
Figura 4 – (a) Percentual de substâncias detectadas só com, sem e com MDMA em amostras vendidas como <i>ecstasy</i> e (b) número de substâncias e amostras detectadas e analisadas por ano, durante o período de 2010 a 2019	28
Figura 5 – Rotas sintéticas para produção de MDMA e metilenodioxí-substituídos a partir dos precursores piperonal, safrol, isosafrol e PMK	31
Figura 6 – Produtos de biotransformação obtidos após o metabolismo hepático do MDMA	33
Figura 7 – Número de publicações com os termos (a) dried blood spot, (b) dried urine spot e (c) dried oral fluid spot ou dried saliva spot.....	49
Figura 8 – (a) Amostragem de fluido biológico em papel com indicador de cor e (b) processo de armazenamento em bolsa de fecho para armazenamento/transporte.....	50
Figura 9 – Papéis filtro (a) FTA DMPK-C, (b) FTA DMPK-C com indicador, (c) FTA clássico com indicador de cor e (d) Whatman® 903	57
Figura 10 – Esquema para realização dos ensaios de recuperação, efeito matriz e eficiência do processo no processo de performance analítica.....	68
Figura 11 – (a) Cromatograma LC-DAD, (b) eficiência, (c) fator de assimetria e (d) tempo de retenção dos picos de MDA e MDMA quando o pH do tampão é variado entre 2,2 e 7,2.....	73
Figura 12 – (a) Cromatogramas LC-DAD sob diferentes (b) aditivos ácidos.....	75
Figura 13 – (a) Cromatogramas LC-DAD, (b) tempo de retenção e (c) média do fator de assimetria para diferentes concentrações de n-hexilamina (2,5, 5,0 e 7,5 mmol L ⁻¹)	77
Figura 14 – Etapas realizadas durante a otimização do método por cromatografia líquida....	78
Figura 15 – Cromatogramas LC-DAD da solução 10 µg mL ⁻¹ mostrando a variação do fator de assimetria (em parênteses) e retenção dos picos entre as colunas de fase octadecil e fenil.	79

Figura 16 – Cromatogramas LC-DAD durante a otimização com uma solução padrão contendo MDA e MDMA a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$	80
Figura 17 – Espectros UV dos (a) analitos e do (b) padrão interno (lidocaína), e (c) cromatograma LC de uma solução contendo MDA, MDMA e PI a $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$	81
Figura 18 – Representação dos papéis (a) filtro, 80 g m^{-2} , (b) sulfite, 90 g m^{-2} , (c) cartolina, 180 g m^{-2} e (d) aquarela, 300 g m^{-2}	86
Figura 19 – Dimensão da mancha de fluido oral quando diferentes volumes de fluido oral são aplicados aos papéis (a) filtro, (b) cartolina, (c) sulfite e (d) aquarela	86
Figura 20 – Pipetagem de $150 \mu\text{L}$ de fluido oral sobre papel de aquarela e subsequente procedimento de secagem por 4 h para formação da mancha seca. Visualização a 254 nm	87
Figura 21 – Cromatogramas LC-DAD mostrando a recuperação da amostra DOFS contendo MDA, MDMA e lidocaína (PI) a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ usando metanol como solvente extrator.....	88
Figura 22 – Avaliação do pH do papel antes e após o tratamento com etanol:clorofórmico (80:20 v/v) e ácido nítrico 1,0 %. Como referência, pH da água destilada (no centro).	90
Figura 23 – Recuperação de MDA, MDMA e lidocaína (PI) em <i>dried spot</i> antes e depois do tratamento do papel com ácido nítrico 1,0% e etanol:clorofórmio 80:20 v/v ($k = 3$).	90
Figura 24 – Cromatogramas LC-DAD representando a comparação entre as recuperações obtidas com papel aquarela sem e com tratamento por ácido nítrico 1,0 % v/v e etanol:clorofórmio 80:20 v/v	91
Figura 25 – Gráfico de contorno para a otimização do tipo simplex-axial envolvendo acetonitrila, ácido trifluoroacético e metanol para extração de (a) MDA e (b) MDMA. As linhas de contorno indicam o valor de recuperação obtido para dada condição mínima. Valor de predição de 0,981.....	92
Figura 26 – Recuperação de MDA e MDMA sob diferentes tempos de sonicação ($k = 3$)	94
Figura 27 – Recuperação de MDA e MDMA sob diferentes tempos de secagem ($k = 3$)	94
Figura 28 – Cromatogramas LC-DAD das DOFS branco e fortificado com MDA e MDMA a $0,0125 \mu\text{g mL}^{-1}$ e lidocaína (PI) a $2,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ monitorados em (a) 285 e (b) 262 nm.....	97
Figura 29 – Cromatogramas LC-DAD dos padrões preparados em metanol a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e analisados sob os comprimentos de onda (a) 285 e (b) 262 nm.	99

Figura 30 – Cromatograma LC-DAD de uma amostra DOFS a $2,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ contendo apenas os compostos próximos ao tempo de eluição dos analitos MDA e MDMA e do padrão interno (lidocaína).....	100
Figura 31 – Efeito residual do (a-c) método LC-DAD pela injeção imediata da fase móvel após análise da solução $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ em TFA 0,05 % v/v e da (d-f) extração por meio da injeção imediata da solução da amostra DOFS branco após análise da DOFS a $5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$	101
Figura 32 – Curvas analíticas obtidas para o (a) MDA e (b) MDMA em DOFS na faixa de concentração entre $0,0125$ e $5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$	102
Figura 33 – Gráfico dos resíduos em função da resposta estimada para o (a) MDA e (b) MDMA e comportamento do erro padrão relativo para os analitos (c) MDA e (d) MDMA.....	103
Figura 34 – Representação gráfica da curva analítica, erro padrão relativo e resíduo padronizado em função das concentrações de (a-c) MDA e (d-f) MDMA quando o fator $w = 1/y$ é aplicado aos dados.	104
Figura 35 – Cromatograma LC-DAD evidenciando a razão sinal-ruído (S/N) das DOFS a $0,0125$ (LIQ) e $0,00625 \mu\text{g mL}^{-1}$ (LD) de MDMA e MDA + PI $2,50 \mu\text{g mL}^{-1}$	106
Figura 36 – (a) Cromatogramas LC-DAD das amostras DOFS submetidas a diferentes temperaturas de secagem (25 , 75 e $100 \text{ }^\circ\text{C}$) e (b) espectro UV do pico interferente a $75 \text{ }^\circ\text{C}$.	115
Figura 37 – Cromatograma GC-MS dos papéis branco submetidos a 25 , 75 e $100 \text{ }^\circ\text{C}$	116
Figura 38 – Espectro MS dos picos encontrados no papel submetido a secagem a $75 \text{ }^\circ\text{C}$. Os picos referem-se ao (a) furfural, (b) ácido furanocarboxílico e (c) hidroximetoxietilfurano .	116
Figura 39 – E-mail de informação sobre a aprovação do projeto submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da FFCLRP/USP.....	133
Figura 40 - <i>Screenshot</i> da página da Plataforma Brasil para consulta da aprovação	133
Figura 41 – Cromatograma LC-DAD exemplo para o cálculo da resolução, fator de assimetria e eficiência dos picos analisados através das variáveis tempo de retenção e largura do pico	135
Figura 42 – Cromatogramas LC-DAD sobrepostos das 28 soluções padrão a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ avaliadas no ensaio de seletividade a (a) 285 e (b) 262 nm	137
Figura 43 – Espectro UV do acetaminofeno, ácido acetilsalicílico, ácido salicílico, atenolol, bromazepam, cafeína, ketamina, citalopram, clonazepam e diazepam avaliados no ensaio de seletividade	138

Figura 44 – Espectro UV da dipirona, efedrina, fenacetina, ibuprofeno, lidocaína, MDA, MDMA, MDEA, metanfetamina e metoprolol	139
Figura 45 – Espectro UV do midazolam, omeprazol, procaína, propranolol, sildenafil, tadalafil, teobromina e cocaína	140
Figura 46 – Cromatogramas LC-DAD obtidos durante o ensaio de robustez com solução padrão contendo cafeína, MDA, MDMA, lidocaína (PI) e MDEA a 10 µg mL ⁻¹	143

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Localização, ano, faixa de concentração do MDMA e compostos identificados em amostras apreendidas de <i>ecstasy</i>	29
Tabela 2 – Características da urina, sangue fluido oral quando em análises toxicológicas	32
Tabela 3 – Estudos farmacológicos realizados em amostras de urina coletadas de humanos sob administração controlada de MDMA	34
Tabela 4 – Estudos farmacológicos realizados em amostras de sangue/plasma coletadas de humanos sob administração controlada de MDMA ou MDA.....	36
Tabela 5 – Estudos farmacológicos realizados em amostras de fluido oral coletadas de humanos sob administração controlada de MDMA.....	38
Tabela 6 – Técnicas cromatográficas e condições de extração para determinação de MDMA em amostras apreendidas de <i>ecstasy</i>	43
Tabela 7 – Técnicas cromatográficas e de extração para determinação de MDMA e análogos em amostras de fluido oral.....	45
Tabela 8 – Técnicas instrumentais e condições de extração das amostras DMS contendo analitos de interesse para a toxicologia forense.....	52
Tabela 9 – Proporções em volume (total de 600 µL) de acetonitrila, metanol e ácido trifluoroacético 0,05% v/v da mistura extratora para realização do experimento do delineamento simplex-axial	63
Tabela 10 – Compostos utilizados para avaliar a seletividade do método <i>LC-DAD</i>	65
Tabela 11 – Combinação fatorial de oito parâmetros para avaliação da robustez.....	69
Tabela 12 – Comparação das condições cromatográficas de trabalhos que empregam cromatografia líquida para determinação de MDMA e/ou MDA	84
Tabela 13 – Condições da extração das amostras DOFS para quantificação de MDMA e/ou MDA em diferentes matrizes biológicas	96
Tabela 14 – Tempo de retenção (t_R) dos analitos, PI e dos 25 compostos avaliados para o ensaio de seletividade, todos a 10 µg mL ⁻¹ , e seus respectivos comprimentos de onda de máxima absorção ($\lambda_{m\acute{a}x}$).....	98
Tabela 15 – Resolução entre os picos do MDA, MDMA e lidocaína no <i>LC-DAD</i>	99

Tabela 16 – Resultado dos testes estatísticos para avaliação da linearidade das curvas de MDA e MDMA usando o modelo de regressão linear simples	103
Tabela 17 – Resultado dos testes estatísticos para avaliação da linearidade das curvas de MDA e MDMA usando o modelo de regressão linear ponderada ($w = 1/y$).....	105
Tabela 18 - Precisão e exatidão (<i>bias</i>) do MDA e MDMA em DOFS por LC-DAD.....	107
Tabela 19 – Efeito da variação sobre a robustez do método LC-DAD.....	108
Tabela 20 – Resultado do efeito matriz (EM%), recuperação (R%) e eficiência do processo (EP%) para o MDA e MDMA em DOFS, com padrão interno a $2,50 \mu\text{g mL}^{-1}$	109
Tabela 21 - Resultados para o ensaio de integridade de diluição das amostras de fluido oral fortificadas com MDA e MDMA a $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ antes do processo da amostragem.....	110
Tabela 22 – Valores de EPR% (em relação ao T_o) e DPR% para a estabilidade ($k = 3$) das DOFS a $0,0375$ (CQB) e $4,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ (CQA) sob diferentes condições	111
Tabela 23 –Performance analítica para trabalhos que envolvem determinação de MDA e/ou MDMA em matrizes biológicas por <i>dried matrix spot</i>	114
Tabela 24 – Estabilidade do MDA e MDMA nas temperaturas de 25 e 100 °C ($k = 3$)	117
Tabela 25 – Parâmetros da equação da reta obtidos por regressão linear simples ($w = 1/x_0$) e ponderada, e seus respectivos resultados de probabilidade dos testes estatísticos (p -valores, teste- t para significância dos coeficientes, teste de Brown-Forsythe e Falta de ajuste).....	141
Tabela 26 – Conformidade do sistema em função do fator de assimetria (A_s) e eficiência (N) para amostras DOFS fortificadas com MDA e MDMA.....	142
Tabela 27 – Resultados experimentais da área, fator de assimetria e número de pratos teóricos das corridas cromatográficas realizadas no ensaio de robustez.....	144
Tabela 28 – Resolução entres os pares críticos e analitos no ensaio de robustez.....	144

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

n-FA	n-Fluoroanfetamina
n-CA	n-Cloroanfetamina
6-MAM	6-Monoacetilmorfina
AM	Anfetamina
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BF	Teste de Brown-Forsythe
BSTFA	<i>N-o-bis</i> -trifluoroacetamida
BZE	Benzoilecgonina
BZP	Benzilpiperazina
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CE	Eletroforese capilar (<i>Electrophoresis capillary</i>)
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CET	Cocaetileno
Comp.	Comprimido
CQA	Controle de qualidade de alta concentração
CQB	Controle de qualidade de baixa concentração
CQD	Controle de qualidade de diluição
CQM	Controle de qualidade de média concentração
DBZP	Dibenzilpiperazina
DAD	Detector de arranjo de diodos (<i>Diode-array detector</i>)
DBS	<i>Dried Blood Spots</i>
d.i.	Diâmetro interno
DHA	3,4-Dihidroxianfetamina
DHMA	3,4-Dihidroximetanfetamina
DMS	<i>Dried Matrix Spots</i>
DOFS/DSS	<i>Dried Oral Fluid Spots</i>
DPR	Desvio padrão relativo
DRUID	<i>Driving Under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicine in Europe</i>
DUS	<i>Dried Urine Spots</i>
DXM	Dextrometorfano
e. g.	por exemplo (<i>exempli gratia</i>)

ECD	Detector eletroquímico (<i>Electrochemical detector</i>)
ECF	Cloroformato de etila
EDDP	2-Etil-1,5-dimetil-3,3-difenil pirrolinium
EI	Ionização por impacto de elétrons
EM	Efeito matriz
EMCDDA	<i>European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction</i>
EME	Ecgonina metiléster
EP	Eficiência do processo
EPR	Erro padrão relativo
EUA	Estados Unidos da América
EWDTs	<i>European Workplace Drug Testing Society</i>
FID	Detector por ionização de chama (<i>Flame ionization detector</i>)
FD	Detector de fluorescência (<i>Fluorescence detector</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FFCLRP	Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
GC	Cromatografia a gás (<i>Gas chromatography</i>)
GB	Ácido γ -hidroxibutírico
HFBA	Ácido heptafluorobutírico
HFAA	Anidrido do ácido heptafluorobutírico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HMA	3-Hidroxi-4-metoxianfetamina
HMMA	3-Hidroxi-4-metoximetanfetamina
HRMS	Espectrometria de massas de alta resolução (<i>high resolution mass spectrometry</i>)
HS	<i>Headspace</i>
KET	Ketamina
LC	Cromatografia líquida (<i>Liquid chromatography</i>)
LD	Limite de detecção
LDI	Limite de detecção instrumental
LLE	Extração líquido-líquido (<i>Liquid-liquid extraction</i>)
LIQ	Limite inferior de quantificação
LTP	Partição em baixa temperatura (<i>Low temperature partition</i>)
LOF	Falta de ajuste (<i>Lack of fit</i>)
LPME	Microextração em fase líquida (<i>Liquid-phase microextraction</i>)

LQI	Limite de quantificação instrumental
LSE	Extração líquido-sólido (<i>Liquid-solid extraction</i>)
LSQ	Limite superior de quantificação
MA	Metanfetamina
MBDB	Metilbenzodioxolilbutamina
mCPP	<i>m</i> -Clorofenilpiperazina
MDA	3,4-Metilenodioxianfetamina
MDEA	3,4-Metilenodioxietilamfetamina
MDMA	3,4-Metilenodioximetanfetamina
MDMB	3,4-Metilenodioximetilbenzilamina
MDMC	Metilona
MDP	3,4-Metilenodioxifenil-2-propanol
MEPS	Microextração em sorvente empacotado (<i>Microextraction by packed sorbent</i>)
ME	Metilecgonina
MOR	Morfina
MS	Espectrometria de massas (<i>Mass spectrometry</i>)
MS/MS	Espectrometria de massas sequencial (<i>Tandem mass spectrometry</i>)
MSTFA	<i>N</i> -(trimetilsilil)trifluoroacetamida
MTD	Metadona
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
NPD	Detector de nitrogênio-fósforo (<i>Nitrogen-phosphorus detector</i>)
NPS	Novas substâncias psicoativas (<i>New psychoactive substances</i>)
OF	Fluido oral (<i>Oral fluid</i>)
ONU	Organização das Nações Unidas
PCP	Fenciclidina
PF	Polícia Federal
PI	Padrão interno
PID	Padrão interno deuterado
pH	Potencial hidrogeniônico
pK _a	Constante de dissociação ácida
PMA	<i>p</i> -Metoxianfetamina
PMK	3,4-Metilenodioxifenil-2-propanona
PMMA	<i>p</i> -Metoximetanfetamina

PPT	Precipitação proteica (<i>Protein precipitation</i>)
PRCF	Cloroformato de <i>N</i> -propila
PTFE	Politetrafluoroetileno
R	Recuperação
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
ROSITA	<i>Roadside Testing Assessment</i>
SAMHSA	<i>Substance Abuse and Mental Health Services Administration</i>
SE	Solução estoque
SLE	Extração líquido suportada (<i>Supported liquid extraction</i>)
S/N	Razão sinal-ruído (<i>signal-noise</i>)
SPE	Extração em fase sólida (<i>Solid-phase extraction</i>)
SPME	Microextração em fase sólida (<i>Solid-phase microextraction</i>)
SQR	Substância química de referência
STA	Análise toxicológica sistemática (<i>Systematic toxicological analysis</i>)
SWGDRUG	<i>Scientific Working Group for Analysis of Seized Drugs</i>
SWGTOX	<i>Scientific Working Group for Forensic Toxicology</i>
t. a.	Temperatura ambiente
TEA	Trietilamina
TFA	Ácido trifluoroacético
TFMPP	Trifluorometilfenilpiperazina
THC	Tetrahidrocanabinol
TIAFT	<i>The International Association of Forensic Toxicologists</i>
UNODC	<i>United Nations Office on Drugs and Crime</i>
UPLC/UHPLC	Cromatografia líquida de ultra performance (<i>Ultra-performance liquid chromatography</i>)
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

%	Percentual
°C	Graus celsius
α	Nível de confiança
μg	Micrograma
μm	Micrômetro
μL	Microlitro
λ	Comprimento de onda
Å	Angstrom
A_s	Fator de assimetria
b	Coefficiente linear (intercepto y)
k	Número de replicatas
kg	Quilograma
g	Gramma
h	Hora
L	Litro
logP	Coefficiente de partição
m	Coefficiente angular (inclinação)
m	Massa
m^2	Metros quadrados
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmol	Milimolar
n	Número de níveis da curva analítica
N	Número de pratos teóricos, ou eficiência
nm	Nanômetro
ng	Nanogramas
p	Probabilidade
r	Coefficiente de correlação
R^2	Coefficiente de determinação
R_s	Resolução

rpm	Rotações por minuto
S_{yx}	Desvio padrão residual
t_c	Valor de t crítico
T_0	Tempo zero
t_R	Tempo de retenção
v	Volume
w	Fator empírico (peso)
x	Concentração do analito
y	Resposta instrumental (área)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	21
2.	FUNDAMENTOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1.	Estimulantes do Tipo Anfetamina	22
2.1.1.	Estimulantes do grupo do <i>ecstasy</i>	23
2.2.	Análise forense de drogas	25
2.3.	Amostras biológicas e não biológicas	26
2.3.1.	Amostras apreendidas e perfil químico do <i>ecstasy</i>	26
2.3.2.	Matrizes biológicas e estudos farmacocinéticos.....	32
2.3.3.	Métodos instrumentais baseados em cromatografia.....	39
2.3.4.	Preparo de amostras.....	42
2.4.	Dried Matrix Spots (DMS).....	48
2.4.1.	Dried Oral Fluid Spot (DOFS)	50
3.	OBJETIVOS	59
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	60
4.1.	Equipamentos e consumíveis	60
4.1.1.	Padrões, reagentes e solventes.....	60
4.1.2.	Materiais e equipamentos	60
4.1.3.	Instrumentação analítica.....	61
4.1.4.	Soluções e amostras.....	62
4.2.	Procedimento experimental.....	63
4.2.1.	Dried oral fluid spot (DOFS).....	63
4.2.2.	Cromatografia líquida/arranjo de diodos (LC-DAD)	64
4.2.3.	Cromatografia a gás/espectrometria de massas (GC-MS).....	64
4.2.4.	Performance analítica	65
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	72
5.1.	Cromatografia líquida / arranjo de diodos (LC-DAD)	72
5.1.1.	Desenvolvimento do método.....	72

5.1.2.	Otimização dos parâmetros operacionais	78
5.1.3.	Considerações sobre a LC-DAD	82
5.2.	Dried Oral Fluid Spot (DOFS)	85
5.2.1.	Seleção do papel	85
5.2.2.	Tratamento <i>in-house</i> dos papéis para amostragem.....	89
5.2.3.	Otimização de misturas: solvente/solução extratora	91
5.2.4.	Otimização das condições de extração	93
5.2.5.	Condições DOFS deste trabalho.....	95
5.2.6.	Considerações sobre a DOFS	95
5.3.	Performance analítica	97
5.3.1.	Método LC-DAD.....	97
5.3.2.	Método DOFS	109
5.3.3.	Considerações sobre a performance do método	112
5.4.	Abordagem DOFS alternativa: estudos preliminares.....	115
5.4.1.	Tempo e temperatura de secagem	115
5.4.2.	Estabilidade	117
6.	CONCLUSÃO.....	118
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
ANEXO A	- Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	133
APÊNDICE A	- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	134
APÊNDICE B	- Performance do sistema (<i>System Suitability</i>).....	135
APÊNDICE C	- Ensaio de seletividade: cromatogramas e espectros ultravioletas.....	137
APÊNDICE D	- Ensaio da linearidade: resultados da Regressão Linear Ponderada.....	141
APÊNDICE E	- System Suitability	142
APÊNDICE F	- Ensaio de robustez: cromatogramas e resultados	143

1. INTRODUÇÃO

As drogas estão presentes em todos os setores da sociedade. Em 2018, um levantamento apontou que aproximadamente 5,4% da população global (cerca de 269 milhões de pessoas), entre 15 e 64 anos, já fez uso de drogas ilícitas pelo menos uma vez nesse ano, sendo a porcentagem maior em algumas jurisdições e populações (UNODC, 2020a). Comparado ao ano de 2009, por exemplo, essa estimativa representa um aumento de mais de 12% e 25% em relação à população global e ao número de usuários, respectivamente, indicando que a prevalência de drogas no mundo vem aumentando na última década. Apesar da maioria desses usuários não estarem associados com a criminalidade, cerca de 13% das 269 milhões de pessoas já desenvolveram sintomas de dependência ou doenças relacionadas ao uso de drogas (e. g., síndrome da imunodeficiência adquirida e transtornos psiquiátricos) (UNODC, 2020a).

A maconha e as substâncias da classe dos opioides/opiáceos continuam sendo as drogas ilícitas mais utilizadas no mundo, com valores estimados em torno de 192 e 88 milhões de usuários em 2018, respectivamente. Os estimulantes, em especial os do tipo anfetamina (incluindo o *ecstasy*) e a cocaína, foram consumidos por 45 e 19 milhões de pessoas, respectivamente, neste mesmo ano, sendo as anfetaminas associadas à Europa e a cocaína às Américas (UNODC, 2020a). Adicionalmente, as chamadas novas substâncias psicoativas (*NPS*) têm surgido em massa e se tornado frequente nos últimos anos, sendo desenvolvidas especialmente para estarem fora da legislação de drogas. Além dessas drogas, existem aquelas substâncias banidas (e. g., agentes anabolizantes e hormônios) por entidades desportivas que são utilizadas para aumentar a performance de atletas e aquelas de uso lícito e/ou controlado (e. g., álcool e benzodiazepínicos) que podem ser administradas em conjunto com as drogas ilícitas. Drogas que alteram o humor, tais como aquelas para tratar a ansiedade, insônia e várias doenças também são comuns, uma vez que quando consumidas em excesso são capazes de provocar mudanças comportamentais (DRUMMER; GEROSTAMOULOS, 2013).

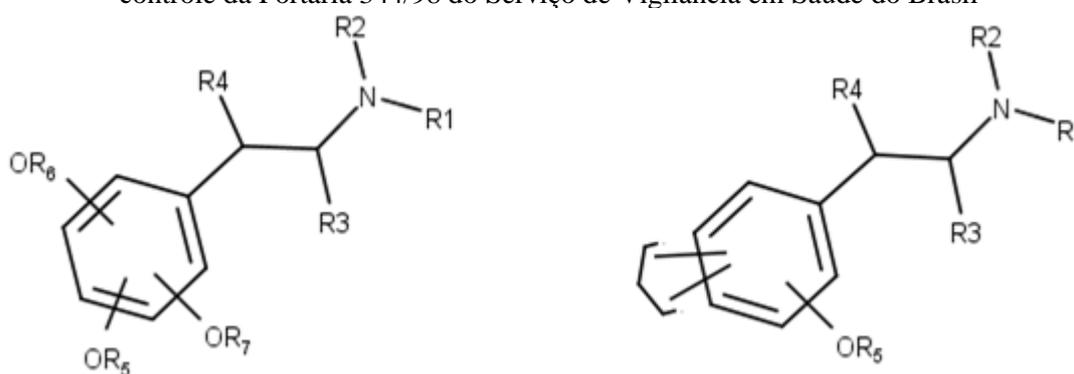
Dentre essas drogas ilícitas, os estimulantes do tipo anfetamina, que são de origem sintética, são de longe as mais versáteis em termos de simplicidade, flexibilidade e potencial de expansão da sua produção ilícita. O *ecstasy*, por exemplo, foi reportado pela primeira vez como droga recreativa em meados de 1980 e até hoje é considerada popular entre jovens e adultos devido seus efeitos positivos sobre o comportamento social, mesmo apresentando diversos efeitos adversos. Essas informações ilustram a importância das análises de drogas nos laboratórios forenses e a diversidade e escala das substâncias que precisam ser analisadas.

2. FUNDAMENTOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Estimulantes do Tipo Anfetamina

Estimulantes do tipo anfetamina são um grupo de substâncias sintéticas estruturalmente derivados da β -fenetilamina (**Figura 1**) que, em diferentes graus, são considerados estimulantes do sistema nervoso central com potencial de toxicidade quando consumidas em excesso por longos períodos, podendo produzir um ou mais efeitos dependendo da dose administrada, incluindo euforia e bem-estar, aumento do estado de alerta e alucinações (UNODC, 2006).

Figura 1 – Estrutura química geral das fenetilaminas e as modificações químicas estruturais sob controle da Portaria 344/98 do Serviço de Vigilância em Saúde do Brasil



Fonte: ANVISA (1998)

Moléculas cujas modificações químicas são provenientes da estrutura da classe das fenetilaminas (**Figura 1**), e que se adequam às descrições estabelecidas pela Portaria 344/1998 do Serviço de Vigilância em Saúde do Brasil e Resolução RDC 404/2020 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, estão sob controle (SVS/MS, 1998; ANVISA, 2020). Essa generalização indica que quaisquer produtos provenientes da modificação nos grupos R_n são considerados de uso proscrito. Com essa proibição, centenas de novos derivados têm sido sintetizados desde 1986 por laboratórios clandestinos de modo a contornar esses regulamentos. Somando todas as substâncias psicoativas monitoradas até o fim de 2019 na Europa, pelo menos 790 novas drogas foram detectadas. Desde 2015, cerca de 400 novas drogas são reportadas anualmente (EMCDDA, 2020). Assim, como tentativa de padronizar essas novas substâncias, os estimulantes do tipo anfetamina mais comuns podem ser divididos em três grandes grupos estruturais: aqueles sem substituição no anel aromático (e. g., anfetamina, metanfetamina e etilamfetamina), com adição de um grupo metilenodioxo no anel aromático (e. g., 3,4-metilenodioxianfetamina, 3,4-metilenodioximetanfetamina e 3,4-metilenodioxietilamfetamina) e aqueles com padrões de substituição diferente dos dois primeiros grupos (e. g., *p*-metoxianfetamina e *p*-metoximetanfetamina) (UNODC, 2006).

2.1.1. Estimulantes do grupo do *ecstasy*

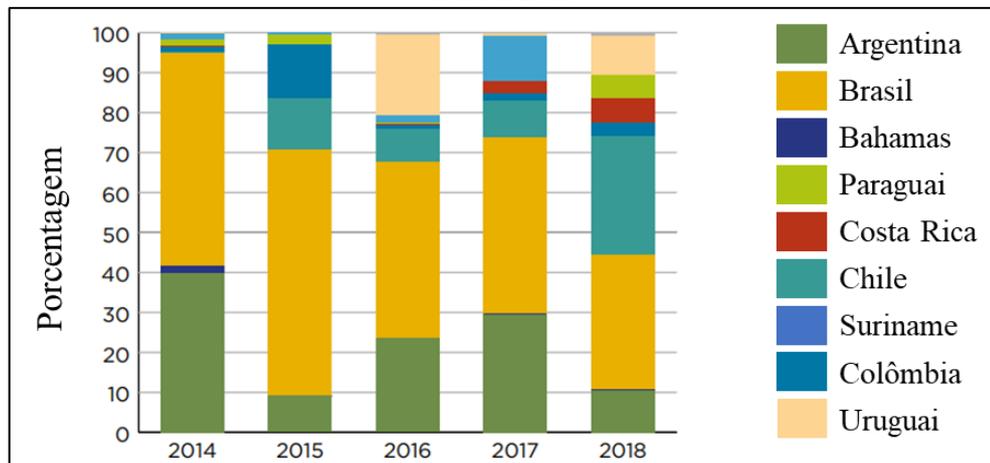
As substâncias que caem dentro do grupo do *ecstasy* são aquelas que se referem às substâncias sintéticas quimicamente relacionadas aos estimulantes do tipo anfetamina, mas que se diferem em alguma extensão em seus efeitos. Desde sua síntese em 1912, o termo *ecstasy* foi dado as amostras contendo o 3,4-metilenedioximetanfetamina (MDMA). No entanto, análogos como 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA) e 3,4-metilenodioxietilanfetamina (MDEA) têm sido reportados nessas amostras ilícitas. Quanto ao MDMA, ele emergiu no mercado europeu em meados de 1980 e se tornou popular em festas noturnas devido aos seus efeitos estimulantes que levam a euforia e bem estar, melhora da autoestima, diminuição da fadiga, desinibição em relações sociais e aumento da empatia, sendo, portanto, frequentemente associada a públicos mais jovens (XAVIER et al., 2008; BAGGOTT et al., 2019). No entanto, devido aos problemas de abuso que levam a diversos efeitos colaterais (e. g., náuseas, bruxismo, taquicardia, hipertensão, arritmias e hipertermia), seu uso foi banido na maioria dos países, inclusive pela Organização das Nações Unidas (ONU), que tornou essa substância de uso proscrito em nível internacional. No Brasil, por exemplo, o MDMA e seus análogos estão inclusos na Lista F de substâncias proscritas, definida pela Portaria 344/1998, do Serviço de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (SVS/MS, 1998), e atualizada sob a resolução RDC 404/2020 da ANVISA (ANVISA, 2020).

2.1.1.1. Tendências do mercado

O mercado das drogas sintéticas é único devido a uma série de fatores, tais como a simplicidade, flexibilidade e potencial de expansão da produção ilícita; disponibilidade de precursores e rotas sintéticas; a existência de indústrias farmacêuticas utilizando compostos e métodos de produção similares; a sua independência em relação a temporadas de cultivo e condições ambientais. Em razão disso, a disponibilidade, acessibilidade e pureza das drogas sintéticas têm aumentado, bem como os danos à saúde associados ao seu uso. Dentre essas drogas sintéticas, os estimulantes do tipo anfetamina são os mais conhecidos, e incluem a anfetamina, metanfetamina e o MDMA, princípio ativo do *ecstasy*. Como são de natureza sintética, traficantes vendem essas drogas em diversas formas, tais como pós, comprimidos, cápsulas e cristais. As drogas sintéticas, portanto, podem ser ingeridas, fumadas, inaladas ou injetadas (UNODC, 2020b).

Aumentos acentuados nas quantidades de *ecstasy* apreendidas foram relatados nos últimos anos, com as apreensões globais mais do que dobrando de 5 toneladas em 2013 para quase 12 toneladas em 2018 (UNODC, 2020a). Nessa estatística, a Europa domina as apreensões globais em termos de quantidade, seguida pelo Leste e Sudeste Asiático, Oceania e América do Norte. No entanto, o tráfico de *ecstasy* continua a se expandir, com a produção ilícita e apreensões sendo relatadas por países da Ásia Central, Norte e Sul da África, América Central, Caribe e América do Sul. As maiores produções dessa droga foram relatadas na Europa, principalmente na Bélgica e na Holanda, de onde é traficada para os mercados de consumo em todo o mundo (UNODC, 2020a, 2020b). Quanto a América do Sul (**Figura 2**), embora a quantidade de *ecstasy* apreendido em 2018 tenha sido menor em relação ao ano de 2017, principalmente devido à queda de apreensões na Argentina e no Brasil, aumentos anuais têm sido observados desde 2014. O Chile relatou aumento nas quantidades apreendidas desde 2016, sendo que 80% das drogas sintéticas apreendidas na forma de comprimidos no ano de 2018 foram de *ecstasy*. Além disso, nesse mesmo ano, aumentos em relação ao ano anterior foram relatados pelo Uruguai e principalmente pelo Paraguai, que reportou a maior apreensão no país com 14 kg de *ecstasy*. Quantidades enormes ainda continuam a ser traficadas a partir da Europa para a região em 2019. Além de outras apreensões de *ecstasy*, a alfândega argentina fez uma apreensão de 31,2 kg de MDMA em uma remessa oriunda da Espanha em 2019. Da mesma forma, em dezembro de 2019, autoridades bolivianas apreenderam um carregamento de 1,5 kg de comprimidos. No Brasil, em abril de 2020, mais de 200.000 comprimidos (cerca de 65 kg) foram apreendidos pela Polícia Federal (PF) em um laboratório clandestino, sendo considerado até então a maior apreensão de drogas sintéticas do país.

Figura 2 – Distribuição percentual da quantidade de amostras de *ecstasy* apreendidas entre os anos de 2014 e 2018



Fonte: Traduzido de UNITED NATIONS (2020).

Um ponto importante é que, apesar de a maioria do *ecstasy* traficado na região ser proveniente da Europa, alguns países do Caribe e América do Sul tem reportado a produção ilícita dessa droga. A Colômbia registrou o desmonte de um laboratório clandestino em 2014, o Brasil relatou 8 laboratórios e a Argentina mais um outro em 2017. Enquanto os laboratórios anteriores consistiam principalmente em instalações de pequena escala para corte e compressão de MDMA originados fora do país, o Brasil, em 2019 e 2020, desmontou diversos laboratórios que tinham capacidade de fabricar milhares de comprimidos de *ecstasy* (UNODC, 2020b).

2.1.1.2. Prevalência do consumo

O relatório publicado pela *United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC)*, intitulado *World Drug Report 2020*, estima que aproximadamente 0,4% da população mundial (20,5 milhões de pessoas) com idade entre 15 e 64 anos já consumiu *ecstasy* pelo menos uma vez no ano de 2018 (UNODC, 2020a). Nesse mesmo relatório, os dados indicam que a prevalência de usuários se concentra na Austrália e Nova Zelândia, seguido da América do Norte e da Europa Central e Ocidental, que juntas representam um total de 3,9% da população. Na América do Sul e no Brasil, segundo a estimativa realizada pela Fundação Oswaldo Cruz, a prevalência era de 0,2% em 2018 (BASTOS et al., 2017). Essas informações demonstram a importância da análise forense de drogas no contexto da química e toxicologia analítica.

2.2. Análise forense de drogas

A análise forense de drogas representa um grande campo de atuação e está intimamente relacionada aos conhecimentos teóricos e práticos da química e toxicologia analítica, que abrange inúmeros procedimentos cujos resultados podem ser utilizados na resolução de diversas questões judiciais (DRUMMER; GEROSTAMOULOS, 2013). No âmbito da análise de drogas, a química e toxicologia forense possuem foco em investigar a presença de drogas ilícitas e substâncias controladas em materiais apreendidos, frequentemente na forma de pós, cristais, ervas e comprimidos, e em amostras biológicas *ante e post mortem*, tais como sangue, urina, cabelo e fluido oral (WYMAN, 2012; DRUMMER; GEROSTAMOULOS, 2013), respectivamente. Em ambos os casos, os resultados geralmente são alcançados por meio de um conjunto de procedimentos analíticos que se baseiam na análise toxicológica sistemática. A Análise Toxicológica Sistemática (*STA*) é uma ferramenta útil na análise forense, e baseia-se em um planejamento experimental eficiente para verificar e identificar tantos compostos quanto forem possíveis, e cujo princípio pode ser estendido para quaisquer amostras de interesse

forense. De forma geral, a *STA* se divide em três ou quatro etapas que envolvem o preparo das amostras, a detecção dos compostos presentes, a identificação e a quantificação, esta última quando se fizer necessária (PETERS et al., 2017).

2.3. Amostras biológicas e não biológicas

Antes de se iniciar a análise toxicológica sistemática em si, é importante conhecer o material com que se está trabalhando e a finalidade para o qual se está realizando as análises. Essas informações são necessárias para que o procedimento analítico de preparo de amostras mais adequado seja selecionado e possa com sucesso identificar as substâncias presentes.

2.3.1. Amostras apreendidas e perfil químico do *ecstasy*

Baseado nas apreensões dos últimos dez anos, o *ecstasy* está disponível em três principais formatos, sendo eles os comprimidos, pós e os cristais com composição variando entre a ausência de MDMA para altas concentrações do MDMA, este na forma química de cloridrato, fosfato ou até mesmo sulfato. O *ecstasy* é normalmente processado como comprimido e tende a apresentar símbolos ou formatos característicos a fim de conseguir obter maior atenção de públicos adolescentes e jovens adultos. Essas características físicas, em alguns casos, podem auxiliar na obtenção de informações sobre a origem de sua produção ilícita (**Figura 3**).

Figura 3 - Variedade de formas e cores de amostras apreendidas de *ecstasy*



Fonte: Laboratório Drug Detection, Erowid Center (<https://www.drugsdata.org/stats.php>)

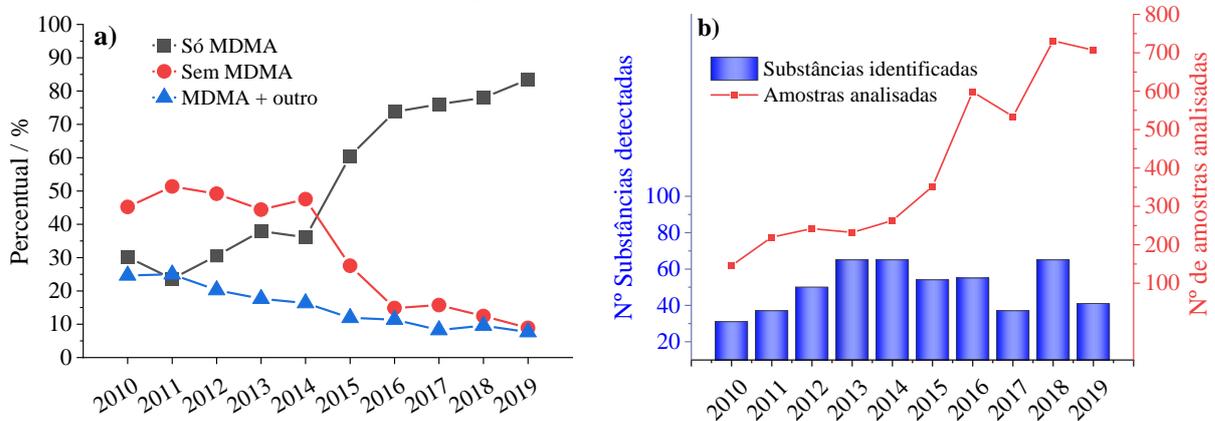
Enquanto no passado um comprimido de *ecstasy* não continha mais do que 50 a 80 mg de MDMA, o intervalo de pureza do MDMA e MDA utilizados de forma recreacional hoje em dia varia de 50 a 150 mg por comprimido, com a tendência alarmante de altas doses, podendo

ultrapassar 200 mg. Por exemplo, em 2006, Wood et al. (2011) quantificaram 101 amostras de *ecstasy* apreendidas em Swansea e Londres, no Reino Unido, e verificaram que 96% dos comprimidos positivos para o MDMA resultaram em concentrações abaixo de 100 mg, com uma média total de 58 mg. Doze anos depois, em 2018, a pureza média (N = 30) estimada por Couchman et al. (2019) esteve entre 49 e 241 mg MDMA/comp., com valor médio de 105. Na Bélgica, por outro lado, a análise de 267 amostras ilícitas de *ecstasy* mostrou que a dosagem média para o MDMA nas amostras positivas foi de 155,2 mg/comp., com a menor concentração em 52,1 mg/comp. e a maior de 235 mg/comp. (DECONINCK et al., 2019). De acordo com o relatório de drogas europeu publicado pela *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA)*, observou-se um aumento na pureza das amostras *ecstasy* no período entre janeiro e junho de 2019. A concentração de MDMA nos comprimidos apreendidos neste período variaram de 6 a 367 mg/comp., representando uma média de 180 mg/comp. para 70% das 969 amostras avaliadas. Isso implica em um aumento em relação à média de 102 mg encontrados no mesmo período em 2012 (EMCDDA, 2020). Em relação à América do Sul, entre 2009 e 2011 no Rio de Janeiro, Brasil, Alves et al. (2013) mostraram que 25 das 42 amostras positivas para MDMA continham concentrações variando entre 2,3 e 173,2 mg por comprimido. Entre agosto/2011 e julho/2012, no estado de São Paulo, outro estudo determinou que a concentração de MDMA em 44,7% das 150 amostras apreendidas variou entre 12 e 125 mg/comp. (TOGNI et al., 2015). De forma similar, Almeida et al. (2018) relataram níveis de pureza de 39 a 152 mg/comp. no período entre 2011 e 2013 (N = 39). Já no Uruguai, um estudo de 2018 encontrou que, das 20 amostras de *ecstasy*, 60% continham mais do que 150 mg MDMA (UNODC, 2020b). Além dessas informações, é importante destacar que muitos países não requisitam que seus laboratórios determinem a quantidade de MDMA nas amostras, e por isso altas doses desta droga podem ser mais comuns do que os reportados pelos relatórios, e que é impossível determinar a concentração do MDMA nos comprimidos se baseando apenas na aparência dessa droga. Sabe-se que muitos comprimidos aparentemente idênticos contém quantidades diferentes do MDMA e de outras impurezas, o que eleva os riscos de saúde para os usuários (WADDELL-SMITH, 2007; ALVES; SABINO, 2013; UNODC, 2020b).

Aliado à variabilidade da pureza, os produtos vendidos como *ecstasy* têm se diversificado no que diz respeito a presença ou não de MDMA e de outros compostos ativos. Devido a disponibilidade e acesso aos diversos compostos que são produzidos em escala global pelas indústrias farmacêuticas e, conseqüentemente, aos precursores, adulterantes e novas substâncias psicoativas têm sido produzidas de forma clandestina a fim de mimetizar, potencializar ou mesmo substituir o MDMA na composição, o que tem tornado a tarefa da

análise forense de drogas cada vez mais complexa (UNODC, 2020a, 2020b). Em razão disso, estudar a composição química do *ecstasy* pode ser útil na identificação da origem dos comprimidos ou das suas rotas de produção e estimativa dos riscos que os usuários estão expostos, guiando as agências de regulação para as questões de segurança e saúde pública. O perfil químico das amostras, portanto, pode ser descrito como um conjunto de características específicas baseadas na presença de compostos ativos, de impurezas orgânicas (provenientes da síntese) e de excipientes (diluente). De acordo com o laboratório *Drug Detection*, os produtos ilícitos vendidos como *ecstasy* podem não conter o MDMA, mas sim outros compostos ativos como metanfetamina e análogos (EROWID CENTER, 2020). Conforme a **Figura 4a** é possível observar que em 2019 aproximadamente 80% das amostras de *ecstasy* continham apenas MDMA e que 10% não foram detectados o MDMA em sua composição, mas sim outros compostos. Na mesma figura, em 2012, essas porcentagens eram de 30 e 50%, respectivamente, indicando a tendência de pureza. A **Figura 4b**, por sua vez, indica o aumento desproporcional das amostras de *ecstasy* em relação ao número de novos diferentes compostos identificados, mostrando que o MDMA está voltando a dominar o mercado de drogas sintéticas.

Figura 4 – (a) Percentual de substâncias detectadas só com, sem e com MDMA em amostras vendidas como *ecstasy* e (b) número de substâncias e amostras detectadas e analisadas por ano, durante o período de 2010 a 2019



MDMA + outro: contém o MDMA na presença de pelo menos uma outra substância farmacologicamente ativa, *Sem MDMA*: qualquer amostra que não possui MDMA. Fonte: Do Autor, com base nos dados do Laboratório DrugsData (<https://www.drugsdata.org/stats.php>)

Vários estudos têm sido realizados para se obter o perfil químico do *ecstasy*. A **Tabela 1** resume alguns trabalhos e mostra informações sobre a localização de onde as amostras foram coletadas, o ano, os compostos identificados e a faixa de concentração de MDMA. Os principais compostos identificados no Brasil são a cafeína e o MDA. Já na Europa, anfetamina, metanfetamina e derivados da piperazina são os mais comuns.

Tabela 1 – Localização, ano, faixa de concentração do MDMA e compostos identificados em amostras apreendidas de *ecstasy*

Localização	Ano	Compostos detectados	N	N+	Concentração / mg comp. ⁻¹	Referência
Leeds, Inglaterra	-	MDMA, MDEA, cafeína, anfetamina, metanfetamina, efedrina, ketamina e acetaminofeno	25	12	2,0 - 140	(SHERLOCK et al., 1999)
Vários estados dos EUA	1999 a 2000	MDMA, MDA, MDEA, DXM, cafeína, pseudo/efedrina e salicilatos	107	67	-	(BAGGOTT et al., 2000)
Inglaterra	2001	MDMA e MDEA	80	80	20 - 109	(COLE et al., 2002)
Irlanda	2002 a 2003	MDMA, anfetamina, metanfetamina, cafeína e MDEA	183	180	7,0 – 78,8	(MC FADDEN et al., 2006)
São Paulo, Brasil	-	Análise exclusiva para MDMA	47	47	4,8 – 67,1	(COSTA et al., 2009)
Swansea, Wales e Londres, Inglaterra	2006	Análise exclusiva para MDMA	101	-	20 – 40 60 – 80	(WOOD et al., 2011)
Irã	2007 a 2008	MDMA, ketamina, pseudo/efedrina, metanfetamina, femetrazina, cafeína e tramadol	50	40	60 – 180	(KHAJEAMIRI et al., 2011)
Rio de Janeiro, Brasil	2009 a 2011	MDMA, Cafeína, difenidramina, teofilina, metanfetamina, mCPP, pseudoefedrina, benzocaína, TFMPP, femproporex, cocaína, metoclopramida, anfepramona, lidocaína	42	25	2,3 – 173,2	(ALVES et al., 2013)
São Paulo, Brasil	2011 a 2012	Cafeína, clobenzorex, DXM, MDMC Amido, dióxido de titânio e celulose	-	-	-	(MOREIRA et al., 2016)

continua

Tabela 1 – Localização, ano, faixa de concentração do MDMA e compostos identificados *em* amostras apreendidas de *ecstasy*

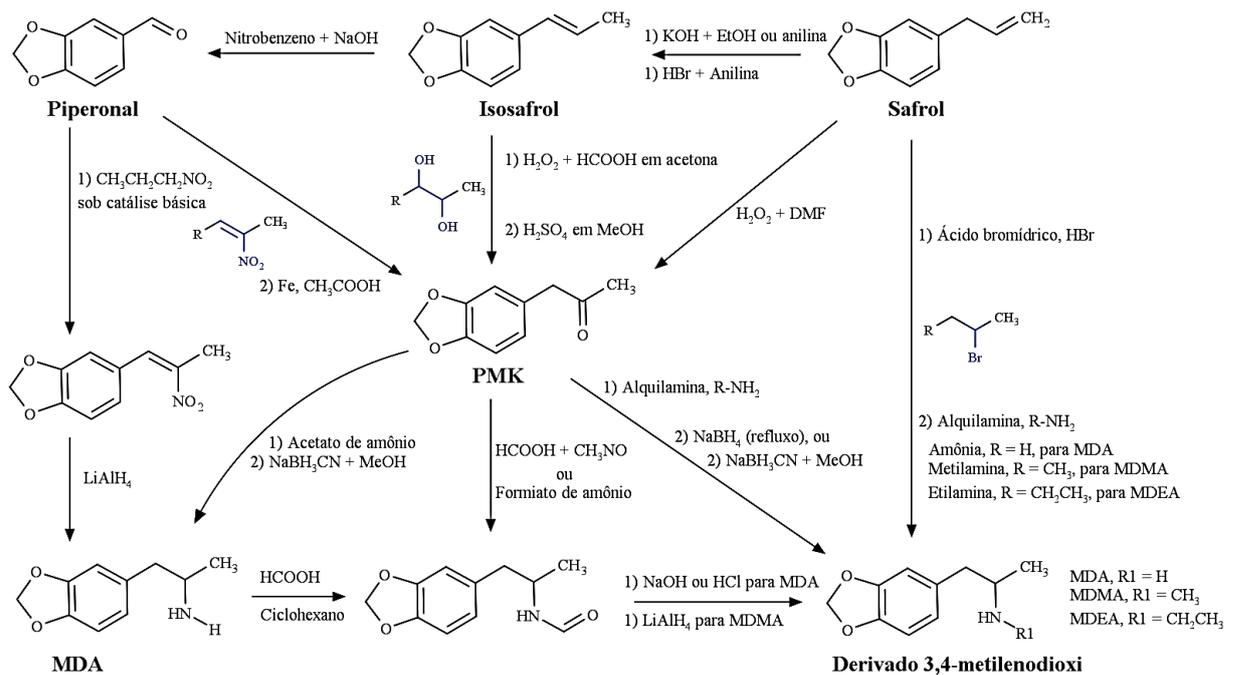
Localização	Ano	Compostos detectados	N	N+	Concentração / mg comp. ⁻¹	Referência
São Paulo, Brasil	2011 a 2012	MDMA, metanfetamina, 2C-B, anfetamina, anfepramona, benzocaína, cafeína, ketamina, clobenzorex, efedrina, femproporex, PCP, fenobarbital, lidocaína, mCPP, TFMPP, cocaína, DMA	150	67	12 - 125	(TOGNI et al., 2015)
Brasília, Brasil	2011 a 2013	MDMA, anfetamina, aminopirina, cafeína, procaína, celulose, sacarose, amido, e ésteres de cadeia longa	38	-	39 – 152	(ALMEIDA et al., 2018)
Azerbaijan, Irã	-	Análise exclusiva para MDMA	85	-	0,05 – 70,7	(GHAFARI et al., 2014)
Bélgica	2016 a 2017	MDMA, anfetamina, MDA, metanfetamina, sildenafil, cafeína, diazepam, 3-FA, 4-FA e lidocaína	267	214	52,1 – 235	(DECONINCK et al., 2019)
Reino Unido	2001 a 2018	MDMA, cafeína, anfetamina, metanfetamina, MDEA, cocaína, ketamina, metilefedrina, fentermina, BZP, DBZP, difenidramina, mCPP	412	-	3,0 – 255	(COUCHMAN et al., 2019)
Minas Gerais, Brasil	-	MDMA, MDA e MDEA	7	4	135 – 144	(TEÓFILO et al., 2020)
São Paulo, Brasil	-	MDMA, cafeína, MDA e MDEA	8	7	14,7 e 35,1% (m/m)	(DUARTE et al., 2020)

N: número de amostras analisadas, *N*+: número de amostras positivas para o MDMA, 2C-B: 4-bromo-2,5-dimetoxifenetilamina, BPZ: benzilpiperazina, DBZP: dibenzilpiperazina, DMA: dimetoxianfetamina, DXM: dextrometorfano, FA: fluoroanfetamina, mCPP: clorofenilpiperazina, MDA: 3,4-metilenodioxianfetamina, MDMB: 3,4-metilenodioximetilbenzilamina, MDEA: 3,4-metilenodioxietanfetamina, MDMA: 3,4-metilenodioximetanfetamina, MDMC: metilona, MDP: 3,4-metilenodioxifenil-2-propanol, PCP: fenciclidina, TFMPP: 1-[3-(trifluorometil)fenil]piperazina, PMMA: *p*-metoximetanfetamina

2.3.1.1. Síntese do MDMA e análogos: impurezas orgânicas

A identificação de impurezas orgânicas, classificadas em precursores, subprodutos e/ou intermediários, aditivos e diluentes, pode ser útil para identificar apreensões de amostras ilícitas provenientes de um mesmo laboratório ou mesmo de um mesmo lote (WADDELL-SMITH, 2007; ALVES; SABINO, 2013). Para a síntese de derivados metilenodioxo-substituídos, por exemplo, existem quatro principais precursores comumente utilizados, os quais se encontram na Lista D1 da Portaria 344/98 da ANVISA (SVS/MS, 1998). São eles: o safrol, isosafrol, piperonal e o 3,4-metilenodioxifenil-2-propanona (PMK), cujas estruturas e rotas sintéticas partindo destes quatro compostos estão sumarizadas na **Figura 5**. Como cada rota sintética apresenta suas próprias características, a análise comparativa de suas impurezas pode resultar em diversas informações acerca do preparo, produção e distribuição dessas drogas.

Figura 5 – Rotas sintéticas para produção de MDMA e metilenodioxo-substituídos a partir dos precursores piperonal, safrol, isosafrol e PMK



Fonte: Adaptado de Shulgin (1986) e Cason (1990)

O safrol pode ser considerado o material chave de partida, já que os outros três podem ser sintetizados a partir dele. Na patente da Merck, em 1914, o MDMA é obtido através do intermediário bromosafrol, formado pela reação entre ácido bromídrico, safrol e metilamina, em baixa temperatura (SHULGIN, 1986; GIMENO et al., 2002; UNODC, 2006). Similarmente, o MDA e MDEA podem ser obtidos empregando amônia e etilamina, respectivamente (CASON, 1990; UNODC, 2006). Outra forma comum e a mais popular entre os laboratórios

clandestinos é a síntese destes derivados a partir do precursor PMK via aminação redutiva, em que aldeídos ou cetonas são reduzidas na presença de amônia ou aminas primárias e secundárias para gerar um grupo amina de ordem maior (SHULGIN, 1986). A síntese pela rota do nitropropeno também é popular, e envolve a reação com o piperonal na presença de catálise básica (UNODC, 2006). Acrescenta-se, ainda, que o recente aumento na demanda de *ecstasy* está ocorrendo em paralelo com a identificação de novos precursores derivados do PMK, como o PMK ácido glicídico e o PMK metil glicidato, ambas já incluídas na lista D1 da ANVISA em 2019. Segundo a UNODC, isso se deveu às condições mais rígidas de controle para os tradicionais precursores, que levou os laboratórios clandestinos a desenvolver compostos exclusivamente para produção ilícita do *ecstasy* (UNODC, 2020a, 2020b). Em decorrência dessa realidade, o perfil de impurezas tem sido avaliado objetivando identificar os tradicionais e novos precursores nas diversas rotas sintéticas e criar ações para que um controle mais rígido possa ser estabelecido (GIMENO et al., 2002, 2005; CHENG; POON; CHAN, 2003; ŚWIST; WILAMOWSKI; PARCZEWSKI, 2005; WADDELL-SMITH, 2007; ALVES et al., 2013; ALVES; SABINO, 2013; MOREIRA et al., 2016).

2.3.2. Matrizes biológicas e estudos farmacocinéticos

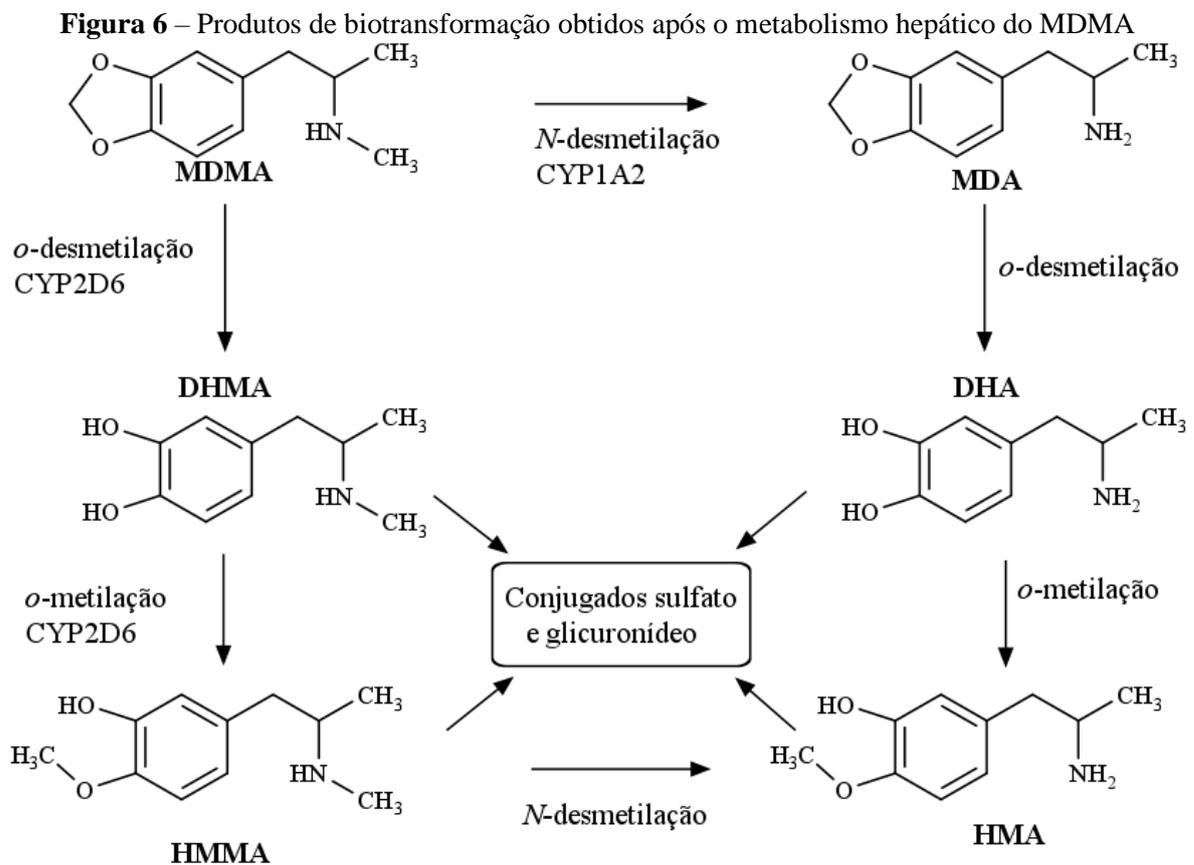
Com o passar dos anos e com o desenvolvimento de novos métodos de análises mais sensíveis, diversas amostras biológicas se tornaram acessíveis e possíveis para a toxicologia. Dentre as matrizes amplamente conhecidas (sangue, urina e fluido oral), estudos têm sido realizados para obter informações acerca da janela de detecção (tempo viável de detecção da droga), do método de coleta, da faixa de concentração das drogas e do preparo de amostras. A **Tabela 2**, por exemplo, lista algumas características conhecidas para o MDMA.

Tabela 2 – Características da urina, sangue fluido oral quando em análises toxicológicas

	Sangue	Urina	Fluido oral
Período de detecção médio ^a	3 dias	7 dias	3 dias
Grau de invasividade	Alto	Médio	Baixo
Potencial de adulteração	Nenhum	Alto	Baixo
Taxa de recusa	Alto	Médio	Baixo
Concentração dos analitos	Baixo	Alto	Médio
Presença de metabólitos	Sim	Sim	Sim
Coleta <i>in-loco</i>	Não	Sim	Sim

a. para o MDMA (*ecstasy*). Fonte: Schwaninger et al. (2011) e Desrosiers et al. (2013)

De forma geral, sabe-se que o MDMA é facilmente absorvido pelo trato gastrointestinal devido sua lipofilicidade e apresentam seus primeiros efeitos no organismo entre 20 e 60 min, podendo durar aproximadamente entre 6 e 8 horas (XAVIER et al., 2008). De acordo com Hartman (2014), baixas concentrações no sangue/plasma se devem à rápida distribuição dessas drogas para os tecidos e da conversão do MDMA em seus produtos de biotransformação por duas rotas metabólicas (**Figura 6**). A primeira tem a enzima CYP2D6 como mediadora principal do processo de *o*-desmetilação para o 3,4-dihidroxi metanfetamina (DHMA), seguido da *o*-metilação para 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina (HMMA). O outro processo é o de *N*-desmetilação, mediada pela enzima CYP1A2, que converte o MDMA para seu análogo MDA, seguido da *o*-desmetilação para o intermediário 3,4-dihidroxi anfetamina (DHA) e *o*-metilação para o 4-hidroxi-3-metoxianfetamina (HMA). No final, os quatro metabólitos, especialmente os derivados 4-hidroxi-3-metoxi, são excretados na forma de conjugados de glicuronídeo e/ou sulfato na urina (XAVIER et al., 2008), sendo o MDMA e o MDA os únicos farmacologicamente ativos.



MDMA: 3,4-metilenodioximetanfetamina, HMMA: 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina, DHMA: 3,4-dihidroxi metanfetamina, MDA: 3,4-metilenodioxianfetamina, HMA: 4-hidroxi-3-metoxianfetamina, DHA: 3,4-dihidroxi anfetamina. Fonte: Adaptado de de la Torre et al. (2004) e Silva et al. (2018).

2.3.2.1. Urina

A urina é uma das matrizes biológicas mais estabelecidas no meio da toxicologia e comumente empregada para análises de compostos devido a sua disponibilidade e altos níveis de concentração das drogas e de seus respectivos produtos de biotransformação, oferecendo uma janela de detecção de horas a dias (ROUEN; DOLAN; KIMBER, 2001; TIAFT, 2012). É composto por um ultrafiltrado do sangue formado pelos rins e são constituídos por 99% de água e substâncias endógenas orgânicas e inorgânicas como ácido úrico, proteínas e íons sódio (BORDIN et al., 2015), sendo uma matriz menos complexa comparada ao sangue.

Quando uma droga é administrada via injeção ou fumada, a absorção é quase instantânea e a excreção na urina começa quase imediatamente. A absorção é menor quando uma droga é administrada por via oral e, conseqüentemente, a excreção pode se delongar em algumas horas. Normalmente, os metabólitos começam a ser detectados dentre 6 horas após a administração, sendo que a maioria das drogas de abuso são excretadas dentro de 48 horas, podendo se estender em alguns dias (DOLAN; ROUEN; KIMBER, 2004). Alguns estudos farmacocinéticos realizados nesta matriz estão dispostos na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Estudos farmacológicos realizados em amostras de urina coletadas de humanos sob administração controlada de MDMA

Dose mg kg ⁻¹	Compostos	Faixa de concentração ^a µg mL ⁻¹	Janela de detecção ^b h	LIQ µg mL ⁻¹	Referência
1,0 e 1,6	MDMA	5,44 – 48,9	1,17 – 95,5	0,025	(ABRAHAM et al., 2009)
	MDA	0,454 – 5,13	1,63 – 60,4		
	HMMA	5,70 – 36,5	1,17 – 131,1		
	HMA	0,270 – 3,22	2,17 – 76,3		
1,0 e 1,6	MDMA	5,84 – 54,7	0,6 – 167,1	0,019	(SCHWANINGER et al., 2011)
	MDA	0,358 – 3,87	1,0 – 95,2	0,018	
	HMMA	0,214 – 11,7	0,6 – 95,0	0,019	
	HMA	0,0181 – 0,0725	1,3 – 129,4	0,018	
1,5	MDMA	13,1 – 28,1	1,5 – 24	0,007	(HELMLIN et al., 1996)
	MDA	0,110 – 2,30		0,005	
	HMMA	24,6 – 35,1		0,015	
	HMA	1,20 – 2,30		0,015	

a. referente ao pico de concentração máximo. b. tempo entre a primeira e última detecção do composto no intervalo avaliado pelos autores. MDA: 3,4-metilenodioxianfetamina, MDMA: 3,4-metilenodioximetanfetamina, HMMA: 4-hidroxi-3-metóximetanfetamina e HMA: 4-hidroxi-3-metóxianfetamina

Segundo Abraham et al. (2009), a média das concentrações máximas do MDMA e HMMA na urina podem exceder $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ quando doses maiores do que $1,6 \text{ mg kg}^{-1}$ são administradas uma única vez, com picos ocorrendo entre 9 e 14 h após a dose oral. Do mesmo modo, seus metabólitos MDA e HMA apresentam concentrações médias máximas superiores a $0,70 \mu\text{g mL}^{-1}$ após um período de 13 a 23 h quando uma dose de MDMA de $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$ é ingerida. Esses valores são maiores ($> 10x$) do que aqueles resultados obtidos para o sangue/plasma. Em relação a janela de detecção da droga parental e de seus produtos de biotransformação, alguns puderam ser detectados em até 167,1 horas após a administração da maior dose ($1,6 \text{ mg kg}^{-1}$) (SCHWANINGER et al., 2011). Respostas similares foram observadas por Helmlin et al. (1996) para os níveis dessas drogas na urina. No entanto, os picos de máximo apresentaram-se diferentes, uma vez que apenas dois voluntários foram monitorados entre 1,5 e 24 h após uma dose de $1,5 \text{ mg/kg}$ de *ecstasy*.

2.3.2.2. Sangue

O sangue também é uma matriz tradicional em análises toxicológicas para fins de identificação e quantificação de drogas e produtos de biotransformação. Sua principal vantagem em relação às outras matrizes é que os níveis observados das substâncias no sangue podem ser melhor relacionados às respostas fisiológicas do organismo, sendo útil na predição de doses administradas e do período decorrido desde a exposição à droga (BORDIN et al., 2015). No entanto, possui janela de detecção geralmente menor se comparado com outras matrizes, requer pessoal capacitado para a coleta das amostras, é considerado invasivo e possui riscos de contaminação biológica (PETERS et al., 2017).

Constituído de água (80%), proteínas e enzimas, sais minerais, gorduras e células suspensas (BORDIN et al., 2015), o sangue requer procedimentos de preparo de amostras mais extensos do que a urina ou fluido oral. Pode ser analisado na forma de sangue total, plasma (obtido após centrifugação do sangue com adição de anticoagulante) ou soro (obtido da centrifugação do sangue total sem anticoagulante), sendo que a escolha dependerá do tipo de análise, uma vez que algumas drogas podem apresentar diferenças significativas em sua concentração no soro/plasma comparadas ao sangue. Como nem sempre se sabe o nível de afinidade das drogas pelas proteínas, a quantificação no sangue total é a mais indicada. Estudos farmacocinéticos (**Tabela 4**) têm mostrado que é possível a detecção e quantificação do MDMA e seus principais metabólitos nessa matriz. No entanto, técnicas de maior sensibilidade são requeridas devido à concentração média máxima dessas drogas se apresentar em baixas níveis.

Tabela 4 – Estudos farmacológicos realizados em amostras de sangue/plasma coletadas de humanos sob administração controlada de MDMA ou MDA

Dose	Compostos	Faixa de	Janela de	LIQ	Referência
		Concentração ^a	Deteccção ^b	$\mu\text{g mL}^{-1}$	
		$\mu\text{g mL}^{-1}$	h	$\mu\text{g mL}^{-1}$	
100 mg (plasma)	MDMA	0,135 – 0,223		0,006	(NAVARRO et al., 2001)
	MDA	< 0,010	1,5 – 24	0,001	
	HMMA	< 0,003		0,003	
1,0 e 1,6 mg kg ⁻¹ (plasma)	MDMA	0,132 – 0,387	0,5 – 47	0,005	(DESROSIERS et al., 2013)
	MDA	0,006 – 0,023	0,5 - 39		
100 mg (plasma)	MDMA	0,165 – 0,275		-	(FARRÉ et al., 2015)
	MDA	0,007 – 0,012		-	
	HMMA	0,180 – 0,471	4,0 – 24	-	
	HMA	0,004 – 0,009		-	
1,4 mg kg ⁻¹ (sangue)	MDA	0,190 – 0,268	1,0 – 30	0,001	(BAGGOTT et al., 2019)
	HMA	0,031 – 0,153		0,002	
1,0 e 1,6 mg kg ⁻¹ (plasma)	MDMA	0,115 – 0,465	0,5 – 47	0,002	(KOLBRICH et al., 2008)
	MDA	0,006 – 0,022	0,5 – 47	0,002	
	HMMA	0,037 – 0,318	0,5 – 71	0,001	
	HMA	0,003 – 0,006	1,0 - 23	0,002	
1,0 e 1,6 mg kg ⁻¹ (sangue)	MDMA	0,058 – 0,462	0,5 – 2,5	0,002	(HARTMAN et al., 2014)
	MDA	0,003 – 0,024	1,0 – 3,0	0,001	
	HMMA	0,002 – 0,231	0,5 – 2,0	0,002	
	HMA	≤ 0,003	2,5 – 3,0	0,002	
1,0 e 1,6 mg kg ⁻¹ (plasma)	MDMA	0,046 – 0,465	0,5 – 2,5	0,002	(HARTMAN et al., 2014)
	MDA	0,002 – 0,021	1,0 – 3,0	0,001	
	HMMA	0,020 – 0,305	0,5 – 2,0	0,002	
	HMA	≤ 0,003	2,5 – 3,0	0,002	

a. referente ao pico de concentração máximo. b. tempo entre a primeira e última deteção do composto no intervalo avaliado pelos autores. MDA: 3,4-metilenodioxianetamina, MDMA: 3,4-metilenodioximetanfetamina, HMMA: 4-hidroxi-3-metóximetanfetamina e HMA: 4-hidroxi-3-metóxianfetamina

De acordo com os trabalhos de Navarro et al. (2001), Kolbrich et al. (2008), Desrosiers et al. (2013) e Farré et al. (2015), as concentrações máximas de MDMA, MDA, HMMA e HMA encontradas no plasma foram de 0,465, 0,023, 0,471 e 0,006 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para indivíduos que administraram uma dose de 1,6 mg kg⁻¹ de MDMA. O tempo em que é possível detectar essas drogas pela última vez no plasma, considerando o limite de quantificação dos métodos e o

período monitorado, foi de 23 h para o HMA, 47 h para o MDMA e MDA e 71 h para o HMMA, respectivamente. Por outro lado, no sangue total, se MDA é administrado em substituição ao MDMA, concentrações de até 0,268 e 0,153 $\mu\text{g mL}^{-1}$ puderam ser observadas para a 3,4-metilenodioxianfetamina e seu metabólito HMA, respectivamente (BAGGOTT et al., 2019). Hartman et al. (2014), em seu trabalho, comparou ainda os níveis de concentração no sangue e plasma, e verificou uma tendência dos derivados 3,4-metilenodioxido estarem em maior concentração no sangue total enquanto os 4-hidróxi-3-métoxi no plasma, comportamento que corrobora com a polaridade e afinidade por proteínas desses compostos.

2.3.2.3. Fluido Oral

O fluido oral (*OF*) se trata da mistura de todos os componentes presentes na boca, desde a saliva até restos de comida e microrganismos. A saliva, por sua vez, refere-se à mistura de fluidos secretados dos três pares de glândulas salivares presentes na boca, sendo composta por um fluido aquoso (99% água) contendo eletrólitos, proteínas e mucina (ROUEN; DOLAN; KIMBER, 2001; MARGALHO et al., 2016). Análises nessa matriz já são consideradas uma alternativa válida nas áreas de toxicologia clínica e forense graças ao advento de novas tecnologias e dispositivos que facilitam a coleta desta de forma relativamente controlada (ROUEN; DOLAN; KIMBER, 2001; CAMELO et al., 2019). Ademais, por suprir as desvantagens de tempo, riscos de adulterações, ônus e condições de assepsia, e ser capaz de constituir uma medida para a concentração plasmática livre da droga, tem sido uma das principais matrizes alternativas para a toxicologia (DRUMMER; GEROSTAMOULOS, 2014). Contudo, a variabilidade entre indivíduos, possibilidade de contaminação por compostos exógenos (e. g., alimentos, medicamento ou hábitos de fumo) e baixa disponibilidade elevam o grau de dificuldade nas análises toxicológicas (ROUEN; DOLAN; KIMBER, 2001).

A incorporação das drogas na saliva é baseada nos fenômenos de transporte ativo (secreção), difusão passiva (gradiente) entre a membrana lipídica separando os dutos salivares dos capilares sanguíneos e difusão através dos poros da membrana (ROUEN; DOLAN; KIMBER, 2001). Esses fenômenos dependem, mas não se limitam à massa molecular, lipofilicidade e propriedades protolíticas ($\log P$, pK_a) (GALLARDO; QUEIROZ, 2008). Enquanto drogas de caráter ácido (e. g., barbitúricos e anti-inflamatórios não esteroidais) tendem a apresentar concentrações maiores no sangue, as básicas (e. g., cocaína, benzodiazepínicos e anfetaminas) tendem a estar presentes no fluido oral (NAVARRO et al., 2001; BORDIN et al., 2015; MERCOLINI; PROTTI, 2016) (**Tabela 5**).

Tabela 5 – Estudos farmacológicos realizados em amostras de fluido oral coletadas de humanos sob administração controlada de MDMA

Dose	Compostos	Faixa de	Janela de	LIQ	Referência
		concentração ^a	deteccção ^b	$\mu\text{g mL}^{-1}$	
		$\mu\text{g mL}^{-1}$	h	$\mu\text{g mL}^{-1}$	
100 mg	MDMA	1,73 – 6,51		0,006	(NAVARRO et al., 2001)
	MDA	< 0,050	1,5 – 24	0,001	
	HMMA	< 0,003		0,003	
1,0 mg kg ⁻¹	MDMA	1,16 – 3,38	0,2 – 47	0,005	(BARNES et al., 2011)
	MDA	0,023 – 0,151	0,8 – 34		
1,6 mg kg ⁻¹	MDMA	2,88 – 12,0	0,25 – 71	0,005	(DESROSIERS et al., 2013)
	MDA	0,050 – 0,403	0,5 – 47		
75 mg	MDMA	0,271 – 2,16	1,0 - 5,0	0,001	(SAMYN et al., 2002)

a. referente ao pico de concentração máximo. b. tempo entre a primeira e última deteção do composto no intervalo avaliado pelos autores. MDA: 3,4-metilenodioxianetamina, MDMA: 3,4-metilenodioximetanfetamina e HMMA: 4-hidróxi-3-metóximetanfetamina

No estudo de Navarro et al. (2001), os autores investigaram o perfil de excreção do MDMA e seus metabólitos em fluido oral de 8 voluntários nos tempos de 1,5, 4, 6, 10 e 24 h, e verificaram a presença da droga parental, do MDA e HMMA, este último relatado em concentrações inferiores a $0,003 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para uma dose única de 100 mg, os picos de concentração variaram entre 1,7 e $6,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ após 1,5 h da administração, com um decréscimo para $0,13 \mu\text{g mL}^{-1}$ em 24 h (último tempo monitorado no estudo). Concentrações médias máximas do MDA foram observadas entre 1,5 e 4 h, inferiores a $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$. No trabalho de Barnes et al. (2011), por outro lado, doses de $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de MDMA foram dadas a 29 voluntários com peso médio de $72,9 \pm 14,6 \text{ kg}$. Os resultados mostraram a deteção apenas do próprio MDMA e de MDA, com picos de concentração de até 3,4 e $0,15 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Com um limite de quantificação de $0,005 \mu\text{g mL}^{-1}$, o tempo para qual ambos os compostos foram detectados pela última vez foi de 47 e 34 h. A ausência de quaisquer um dos derivados 4-hidróxi-3-metóxi são coerentes com os trabalhos de Samyn et al. (2002) e Desrosiers et al. (2013). De modo comparativo, as concentrações das drogas MDA e MDA observadas foram aproximadamente 7-10 vezes maior daquelas encontradas no sangue/plasma. Por possuírem caráter básico, baixa massa molecular e baixa capacidade de ligação com proteínas plasmáticas, elas podem se difundir facilmente através de membranas celulares e camadas lipídicas e alcançar tecidos ou outras matrizes com o pH mais ácido do que o sangue, como é o caso do fluido oral (NAVARRO et al., 2001).

2.3.3. Métodos instrumentais baseados em cromatografia

Apesar das diversas opções de instrumentação que podem ser aplicadas à química e toxicologia forense, sendo essenciais para análises confirmatórias em uma abordagem sistemática, métodos instrumentais hifenizados contendo a cromatografia como técnica de separação são as que mais se destacam. Dentre os exemplos mais comuns para determinação de drogas de abuso em amostras biológicas e não-biológicas estão a cromatografia a gás ou líquida com detector de espectrometria de massas (*GC ou LC-MS ou -MS/MS*) e a cromatografia líquida com detecção baseada em radiação ultravioleta (*LC-UV/DAD*) (CIOBANU et al., 2015).

2.3.3.1. Cromatografia a Gás (GC-MS, GC-NPD e GC-FID)

A cromatografia a gás é um método exclusivamente de separação, onde o mecanismo de separação de compostos se baseia na diferença de volatilidade e interação com a fase estacionária (SMITH et al., 2007). O uso de colunas capilares com fase ligada no GC permite a análise cromatográfica de uma grande variedade de drogas, em especial àquelas de caráter neutro e fracamente básicas e ácidas, como as anfetaminas, cocaína e alguns benzodiazepínicos e opioides (DRUMMER; GEROSTAMOULOS, 2014). Suas aplicações se estendem principalmente para a separação de moléculas orgânicas voláteis e apolares com baixa massa molecular, ponto de ebulição de até 300 °C e que sejam termicamente estáveis. No entanto, quando se trata de compostos mais polares, etapas prévias de derivatização antes da extração dos analitos das matrizes geralmente são requeridas para aumentar a reprodutibilidade e poder de detecção, em especial quando aminas primárias e secundárias são analisadas (e. g., anfetaminas, benzoilecgonina e oxazepam) (SMITH et al., 2007; DRUMMER; GEROSTAMOULOS, 2014; JAMALI et al., 2016). Apesar de não ser um problema comum para análises em amostras apreendidas, essa é uma etapa que deve ser planejada em análises bioanalíticas, onde as concentrações dos analitos costumam estar na ordem nanogramas. Dentre os agentes derivatizantes, cloroformato de *N*-propila (PRCF) (SOUZA et al., 2011), cloroformato de etila (ECF) (MOHAMED, 2017), anidrido heptafluorobutírico (HFBA) (SCHEIDWEILER; HUESTIS, 2006), ácido heptafluorobutírico (HFBA) (BAHMANABADI et al., 2017) e *N*-*o*-bis-trifluoroacetamida (BSTFA) (UNODC, 2006) têm sido utilizados após o preparo de amostras para se obter limites de quantificação de até 2,5 ng mL⁻¹.

Acoplado ao GC, tem-se os detectores como o espectrômetro de massas (MS), de ionização de chama (FID) e o de nitrogênio-fósforo (NPD). Dentre esses, a espectrometria de massas é a técnica de confirmação amplamente utilizada para quantificar MDMA em amostras

apreendidas e biológicas (SMITH et al., 2007; TOGNI et al., 2015; PETERS et al., 2017; DECONINCK et al., 2019). Por possuir a capacidade de analisar virtualmente qualquer substância, a MS apresenta excelente seletividade devido aos padrões de fragmentação de cada composto, permitindo obter informações precisas sobre a massa molecular e íons fragmentados (HARPER; POWELL; PIJL, 2017). Para o MDMA e MDA, cuja diferença é apenas um grupo metila, os padrões de fragmentação obtidos pela ionização por impacto de elétrons são os íons de razão massa-carga (m/z) 58, 77 e 135 e os de 44, 135 e 136, respectivamente. O limite de detecção reportado para ambos os analitos alcança valores de até $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$ em amostras de fluido oral (ES'HAGHI et al., 2010; MENG; WANG, 2010). Em amostras de urina, cabelo e sangue, valores de LD de 0,03, 0,0005, $0,04 \text{ ng mL}^{-1}$ foram reportados para o MDMA com uso das técnicas de microextração em fase sólida (SPME), extração em fase sólida (SPE) e extração líquido-líquido (LLE) (SILVA et al., 2018), respectivamente.

O NPD, por sua vez, tem sido utilizado acoplado ao GC para determinação de muitas drogas em fluidos biológicos devido sua natureza seletiva (CODY, 2008; SILVA et al., 2018). Uma vez que anfetaminas e análogos possuem nitrogênio em sua estrutura, muitos potenciais interferentes que coeluem não são detectados e, portanto, não prejudicam a análise (CODY, 2008). Com esta técnica, limites de detecção de $1,6$ e 47 ng mL^{-1} foram obtidos para amostras de plasma e urina (ORTUÑO et al., 1999), respectivamente, utilizando a técnica de SPE. Quanto ao FID, de menor sensibilidade em relação ao MS e cujo princípio é baseado na detecção de íons formados pela combustão de compostos orgânicos, foi observado com valores de até 500 ng mL^{-1} na detecção de MDMA em comprimidos de *ecstasy* (MITREVSKI; ZDRAVKOVSKI, 2005), não sendo reportados trabalhos em fluido oral (SILVA et al., 2018). No entanto, limites de quantificação entre $0,5$ a 500 ng mL^{-1} foram alcançados empregando esta técnica para quantificar anfetaminas em urina (SILVA et al., 2018).

2.3.3.2. Cromatografia Líquida (LC-DAD, LC-FD e LC-MS)

A LC é umas das técnicas mais frequentes na toxicologia forense e representa aproximadamente 40% das técnicas utilizadas para determinação de MDMA e análogos em matrizes biológicas (SILVA et al., 2018). Em comparação com a GC, apresenta vantagens por ser capaz de analisar substâncias não voláteis, termicamente instáveis e de alto peso molecular, do qual podem ser analisadas em condições amenas e sem derivatização. Além da detecção por espectrometria de massas, encontra-se detectores baseados na radiação ultravioleta (UV ou DAD), de fluorescência (FD) e eletroquímicos (ECD) (SWARTZ, 2010).

Embora não seja tão sensível e específico quanto um *MS* ou *FD*, o *LC-DAD* é capaz de fornecer ótimos resultados em função do seu custo-benefício, principalmente para amostras apreendidas, cujos compostos geralmente estão em maiores concentrações. Além disso, é uma técnica não destrutiva, possui detecção quase universal em baixos comprimentos de onda e fornece o espectro *UV* dos picos que estão sendo analisados (SWARTZ, 2010). Embora não possuam alta absorvidade, as análises de MDMA e análogos geralmente são realizadas na faixa do ultravioleta, nos comprimentos de onda entre 210 e 285 nm (UNODC, 2006; CODY, 2008; JAMALI et al., 2016). Embora o *DAD* não forneça informações estruturais sobre o composto, é vantajoso pela sensibilidade (ruído < 0,01 mAU) e capacidade de auxiliar na identificação de compostos por meio do espectro *UV* e do tempo de retenção (SWARTZ, 2010).

No entanto, mesmo que esse é um dos fatores limitantes de seu uso dentro da toxicologia forense, sendo escasso o número de trabalhos em amostras biológicas, principalmente em relação a presença de metilendioxi-substituídos em fluido oral, onde nenhum trabalho foi observado na literatura nos últimos anos. Limites de detecção e de quantificação com este detector foram reportados e apresentam uma grande variabilidade dependendo do método de preparo de amostras, com níveis na ordem de 0,1 a 1000 ng mL⁻¹ para amostras de cabelo e amostras apreendidas, respectivamente (HEMLIN et al., 1996; ES'HAGHI et al., 2010).

Como o MDMA e seus derivados apresentam propriedades de fluorescência (comprimentos de onda de excitação e emissão em 285 e 320 nm, respectivamente), detectá-los por *FD* é mais comum do que por outros detectores. O *FD* é uma técnica de sensibilidade maior do que o *DAD* e similar ao *MS*, sendo empregue na bioanalítica (MANCINELLI et al., 1999; CONCHEIRO et al., 2005; SWARTZ, 2010; JAMALI et al., 2016) e na análise de amostras apreendidas (MANCINELLI et al., 1999; COSTA et al., 2009). Os limites de detecção e de quantificação relatados em amostras de fluido oral variam entre 2 e 10 e de 10 a 50 ng mL⁻¹, respectivamente, para o MDA, MDMA, MDEA e MBDB (MANCINELLI et al., 1999; CONCHEIRO et al., 2005), podendo alcançar níveis na ordem de 0,5 ng mL⁻¹ para amostras de sangue (TOMITA et al., 2006).

Por fim, a espectrometria de massas acoplados à *LC* é uma das melhores combinações analíticas uma vez que combina as vantagens da cromatografia líquida com a espectrometria de massas em suas diversas variações, permitindo alta sensibilidade e seletividade. No entanto, seu alto custo de aquisição e manutenção é limitado para laboratórios forenses que tenham orçamento compatível. Na literatura é possível encontrar diversos métodos desenvolvidos com o *MS*, ou *in tandem (MS/MS)* para determinação de MDMA, MDA, e estimulantes do tipo-anfetamina em amostras de fluido oral (CONCHEIRO et al., 2008; SERGI et al., 2009;

ROSITANO et al., 2016; JACQUES; DOS SANTOS; LIMBERGER, 2019; GORZIZA et al., 2020) e apreendidas (KHAJEAMIRI et al., 2011; COUCHMAN et al., 2019; TEÓFILO et al., 2020), com diversas variações no modo de preparo das amostras, desde simples diluições (*dilution-and-shoot*) a convencionais extrações líquido-líquido. Os limites de detecção e de quantificação reportados para ambos os analitos podem chegar a níveis na ordem de 0,2 e 0,5 ng mL⁻¹ no fluido oral (WOOD et al., 2003) e até 0,0001 ng mL⁻¹ para o cabelo.

2.3.4. Preparo de amostras

O preparo de amostras é realizado previamente à análise instrumental e tem como objetivo isolar os analitos de modo a minimizar ou eliminar componentes da matriz e tornar as amostras compatíveis com os métodos analíticos, sendo de suma importância (LI; JIAN; FU, 2019). Segundo o Comitê de Análises Sistemáticas, as recomendações envolvem o uso de padrões internos (PI) para corrigir erros das etapas de preparo de amostras, análise por *headspace* (HS) para substâncias voláteis, procedimentos de derivatização (se necessário) e técnicas de extração como a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE) (TIAFT, 2012).

2.3.4.1. Técnicas de extração em amostras apreendidas

Como as amostras apreendidas de *ecstasy* contendo MDMA, MDA e análogos geralmente são encontradas na forma de sais (cloreto, sulfato e fosfato), as extrações são realizadas majoritariamente por simples dissolução, centrifugação e filtração desses materiais. Diante disso, solventes e misturas extratoras como metanol (LAPACHINSKE; YONAMINE; MOREAU, 2004; COSTA et al., 2009; FIGUEIREDO et al., 2010; TOGNI et al., 2015; DECONINCK et al., 2019; TEÓFILO et al., 2020), metanol:água (COUCHMAN et al., 2019), etanol (DUARTE et al., 2020), água (KHAJEAMIRI et al., 2011; NAQI; HUSBANDS; BLAGBROUGH, 2019), clorofórmio:dietilamina (ALMEIDA et al., 2018) ou a própria fase móvel do sistema LC (modo reverso) (DI PIETRA et al., 2001; SCHNEIDER; KOVAR, 2003; MÜLLER; WINDBERG, 2005), foram reportados. Em todos os casos, a dissolução geralmente se deu com auxílio de banhos ultrassônicos ou por agitações mecânicas. A **Tabela 6** mostra em mais detalhes sobre as condições de extração do MDMA em amostras apreendidas de *ecstasy*.

Tabela 6 – Técnicas cromatográficas e condições de extração para determinação de MDMA em amostras apreendidas de *ecstasy*

Técnica	Condições do preparo de amostras	LIQ	LD	Referência
<i>GC-FID</i>	10 mg da amostra foi adicionada em solução contendo PI (dipentilftalato em clorofórmio:dietilamina 0,2%) e agitada até completa dissolução para posterior injeção.	20	3,4	(ALMEIDA et al., 2018)
<i>GC-MS</i>	Os comprimidos foram pulverizados e diluídos com metanol e PI (difenilamina), e a extração realizada com sonicador durante 3 min a 65 °C. Antes da injeção no sistema GC, a solução foi centrifugada, diluída e homogeneizada.	5,0	1,0	(TOGNI et al., 2015)
<i>GC-MS</i>	Soluções 1 mg mL ⁻¹ (metanol) foram preparadas com auxílio de sonicador. Antes da análise no GC, as soluções foram filtradas e diluídas 20x	-	-	(DECONINCK et al., 2019)
<i>LC-DAD</i>	10,0 mg das amostras foram pulverizadas e dissolvidas em 10,0 mL de etanol com auxílio de banho ultrassônico por 30 s. A solução foi diluída 4x antes de ser injetada no sistema LC	3,1	0,7	(DUARTE et al., 2020)
<i>LC-DAD</i>	Diluiu-se 50 mg da amostra em pó em 10 mL da fase móvel composta por 90% tampão fosfato (50 mmol L ⁻¹ , pH 3,2) e 10% acetonitrila. A solução foi agitada, centrifugada e diluída 20x	3,0	1,0	(MÜLLER; WINDBERG, 2005)
<i>LC-DAD</i>	10 mg do comprimido em 10 mL da solução com PI (metoclopramida em metanol). As soluções foram sonicadas e filtradas antes da injeção no LC	10	3,0	(MC FADDEN et al., 2006)
<i>LC-FD</i>	20 mg foi dissolvido em 10 mL de metanol. A solução foi diluída 100x em água ultrapura	0,2	-	(COSTA et al., 2009)
<i>LC-MS</i>	As amostras foram preparadas pela dissolução de 10 mg dos pós em 2 mL de água destilada. A solução foi filtrada e injetada no sistema.	-	-	(KHAJEAMIRI et al., 2011)
<i>LC-MS/MS</i>	10 mg foram diluídos em 100 mL de uma mistura de metanol:água ultrapura (50:50, v/v). 1 mL foi diluído 10x e em seguida diluída com PI (MDMA-d5) e ácido fórmico 0,1% v/v	0,5	-	(COUCHMAN et al., 2019)

DAD: detector por arranjo de diodos, *FID*: detector por ionização de chama, *GC*: cromatografia a gás, *LC*: cromatografia líquida, *LIQ*: limite de detecção, em µg mL⁻¹, *LD*: limite de detecção, em µg mL⁻¹, *MS*: espectrometria de massas

2.3.4.2. Técnicas de extração em amostras de fluido oral

Além das técnicas de extração recomendadas pela *The International Association for Forensic Toxicologists* (TIAFT), extrações utilizando a precipitação proteica (*PPT*), extração líquido-sólido (*LSE*) ou mesmo a diluição direta (*dilution-and-shoot*) das amostras podem ser realizadas para amostras biológicas. A **Tabela 7** mostra em mais detalhes sobre as condições de preparo e extração de MDMA em amostras de fluido oral utilizando estas técnicas.

2.3.4.2.1. Extração Líquido-Líquido

A clássica *LLE* se baseia no mecanismo de partição dos analitos entre duas fases imiscíveis, uma composta pela fase aquosa da qual consta a amostra biológica com os analitos, e outra pela fase orgânica, contendo o solvente extrator (PETERS et al., 2017), sendo recomendada para abordagens de triagem e extração de matrizes biológicas com baixo conteúdo proteico, como urina e fluido oral (TIAFT, 2012). Como o MDMA e MDA são drogas de caráter básico (pK_a próximo de 10), a *LLE* geralmente é acompanhada pela neutralização dos grupos amina com o aumento do pH da matriz para torná-los solúveis em solventes orgânicos. Nesse sentido, acetato de etila (MOHAMED, 2017), hexano (BAHMANABADI et al., 2017), acetato de etila:hexano (ZANCANARO et al., 2012), ciclohexano (PETERS et al., 2007) e cloreto de butila (DRUMMER et al., 2007) tem sido selecionados como solventes para *LLE* de MDMA e MDA. Acetonitrila (DI CORCIA et al., 2013) também foi utilizado como alternativa para a *LLE* com partição à baixa temperatura. Além do mais, *LLE* com *Toxitube® A* (indicado para drogas neutras e básicas) foi reportada para MDMA, MDA, MDEA e MBDB (CONCHEIRO et al., 2005). No final, Mohamed (2017) e Bahmanabadi et al. (2017) submeteram os analitos à derivatização com cloroformato de etila e ácido heptafluorobutírico, respectivamente. Meng e Wang (2010) desenvolveram a microextração em fase líquida (*LPME*) com ciclohexano para anfetamina, metanfetamina, MDA e MDMA com objetivo de diminuir a quantidade de solvente orgânico e reduzir as etapas do procedimento em relação à *LLE*, não sendo necessária a evaporação e ressuspensão. Desta forma, embora apresente vantagens como rapidez, simplicidade e alta disponibilidade de solventes e aditivos, a *LLE* apresenta problemas relacionados ao custo dos solventes, geração de resíduos tóxicos, além de limitações quanto à extração de moléculas polares e mistura de analitos de diferentes polaridades provenientes de uma mesma amostra (BORDIN et al., 2015; PETERS et al., 2017).

Tabela 7 – Técnicas cromatográficas e de extração para determinação de MDMA e análogos em amostras de fluido oral

Técnica	Extração	Condições da extração/separação	LIQ	LD	Referência
<i>GC-MS</i>	<i>HS-SPME</i>	Fibra PDMS imersa em uma solução aquosa contendo NaOH 30% e PI (MDPA). Extração com <i>headspace</i> a 70 °C. Separação com coluna capilar de fase (5% fenil)-metilpolisiloxano.	3,6	1,2	(GENTILI et al., 2002)
<i>LC-MS/MS</i>	<i>PPT</i>	Após centrifugação das amostras de OF, sobrenadante foi transferido para um tubo com solução de padrões interno deuterados (PID). A solução foi agitada com vórtex, centrifugada e o sobrenadante injetado para análise. Separação em coluna de fase octadecil (C18, apolar)	0,5	0,25	(WOOD et al., 2003)
<i>LC-FD</i>	<i>LLE</i>	OF e água (1:1 v/v) foi introduzido no Toxitube® A para extração. Na fase orgânica foram adicionados NaOH e Na ₂ SO ₄ anidro. Em seguida, adicionou-se metanol acidificado na fase orgânica previamente à evaporação e reconstituição na fase móvel. Separação em coluna de fase octil (C8)	10	2,0	(CONCHEIRO et al., 2005)
<i>LC-MS/MS</i>	<i>SPE</i>	1,0 mL OF:tampão (50:50 v/v) com PID foi introduzido no cartucho OASIS HLB (fase polar), do qual foram lavados e eluídos com água:metanol, água:metanol:NH ₄ OH, e diclorometano:isopropanol (75:25 v/v). Redissolução em ácido fórmico 0,1%:acetonitrila e separação em coluna octadecil	5,0	0,5	(CONCHEIRO et al., 2008)
<i>LC-MS/MS</i>	<i>PPT</i>	Amostras adicionados de PID e diluídas com metanol. A mistura foi sonicada e centrifugada antes do sobrenadante ser filtrado para análise. Separação em coluna analítica de fase octadecil	1,5	0,7	(SERGI et al., 2009)
<i>GC-MS</i>	<i>LPME</i>	Extração com ciclohexano em amostra de OF com PID e NaOH. Separação em coluna capilar de fase (5% fenil)-metilpolisiloxano	10	3,0	(MENG; WANG, 2010)
<i>LC-MS/MS</i>	<i>LLE</i>	Amostra foi saturada com bicarbonato de amônio (pH 9,3) e os analitos extraídos com acetato de etila:hexano (4:3 v/v). A fase orgânica foi evaporada com fluxo de N ₂ (50 °C) e reconstituída na fase móvel com PI (zolazepam, atropina e morfina). Separação em coluna analítica de fase octadecil	0,5	0,26	(ZANCANARO et al., 2012)

continua

Tabela 7 – Técnicas cromatográficas e de extração para determinação de MDMA e análogos em *amostras* de fluido oral

						<i>conclusão</i>
Técnica	Extração	Condições da extração/separação	LIQ	LD	Referência	
UHPLC-MS/MS	LLE-LTP	Amostras de OF preservadas com NaN ₃ com PID foram diluídas em acetonitrila e incubadas a -20 °C, seguidas da centrifugação e remoção da fase orgânica para injeção. Separação em coluna de fase octadecil	10	0,5	(DI CORCIA et al., 2013)	
LC-MS/MS	MEPS	OF foi diluído em solução metanólica de amônia com PID. Sorvente C18 condicionado com metanol e água:metanol (2:1 v/v), lavado com amônia em água:metanol (9:1 v/v) e os analitos eluídos com ácido fórmico 5 mmol L ⁻¹ em metanol. Separação em coluna core-shell de fase pentafluorofenil-propil	0,5	0,5	(MONTESANO et al., 2015)	
GC-MS	LLE	Amostras preservadas com ácido cítrico, obtidas do centrifugado do dispositivo coletor, foram adicionadas de PID e tiveram os analitos extraídos com bicarbonato de potássio, acetato de etila e derivatização com cloroformato de etila. Após evaporação, reconstituído em acetato de etila. Separação em coluna capilar de fase (5% fenil)-metilpolisiloxano	2,5	-	(MOHAMED, 2017)	
LC-MS	SLE	Amostras diluídas em solução de amônia 8% e transferidas para o suporte de fase reversa. Extração com éter metil- <i>terc</i> -butílico e ressuspensão em metanol. Separação realizada em coluna analítica de fase bifenil	5,0	-	(ROSITANO et al., 2016)	
UHPLC-MS/MS	Diluição	Amostras diluídas, centrifugadas e sobrenadante injetado no sistema. Separação em coluna de fase octadecil	1,5	0,4	(MALACA et al., 2019)	
LC-MS/MS	Diluição	Diluição (1:4, v/v) de amostras de OF previamente diluídas em tampão logo após a coleta com o dispositivo Quantisal [®] . Separação em coluna analítica de fase pentafluorofenil-propil	5	-	(BASSOTTI et al., 2020)	

DOFS: mancha seca de fluido oral, FD: detector de fluorescência, GC: cromatografia a gás, HFAA: anidrido do ácido heptafluorobutírico, HS: *headspace*, LC: cromatografia líquida, LLE: extração líquido-líquido, LOD: limite de detecção, em ng mL⁻¹, LOQ: limite de quantificação, em ng mL⁻¹, LPME: microextração em fase líquida, LSE: extração líquido-sólido, LTP: partição em baixa temperatura, MEPS: microextração em sorvente empacotado, MS: espectrometria de massas, NaOH: hidróxido de sódio, NaN₃: trinitreto de sódio, NH₄OH: hidróxido de amônio, OF: fluido oral, PI: padrão interno, PID: padrão interno deuterado, PPT: precipitação proteica, SLE: extração líquido suportada, SPE: extração em fase sólida, SPME: microextração em fase sólida, UHPLC: cromatografia líquida de ultra performance.

2.3.4.2.2. *Extração em Fase Sólida (SPE)*

De ampla aplicação a SPE consiste na interação dos analitos dissolvidos em um solvente com uma fase sólida inserida dentro de um cartucho, do qual solventes ou combinações desses são empregados para eluir interferentes e analitos em diferentes etapas (LI; JIAN; FU, 2019). As etapas incluem o condicionamento da fase estacionária, retenção dos analitos e interferentes, remoção de interferentes e a eluição dos analitos (BORDIN et al., 2015). Concheiro et al. (2008) trabalhou com MDMA, MDA e outras drogas em fluido oral utilizando SPE com cartucho OASIS® HLB (para analitos polares e metabólitos), de forma que a extração foi realizada com diclorometano:isopropanol. A tradicional SPE com cartucho C18, para analitos apolares e moderadamente polares, foi empregue por Scheidweiler e Huestis (2006). Extrações utilizando a microextração em fase sólida (SPME) foram relatados por Sergi et al. (2010), onde foi desenvolvido uma fibra de vidro funcionalizada com cadeias apolares de octadecilsilano em uma estrutura monolítica para extração de drogas ilícitas e por Souza et al. (2011), com uso da fibra PDMS (polidimetilsiloxano, para analitos apolares). Fucci, de Giovanni e Chiarotti (2003) utilizaram a fibra PDMS junto ao *headspace* (HS-SPME) e por imersão direta (DI-SPME) para quantificação de MDMA e drogas como cocaína e tetrahydrocannabinol. Diferente da SPE, a SPME baseia na adsorção dos analitos nestas fibras para posterior dessorção com ação térmica (GC) ou contato com a fase móvel (LC). De forma geral, apesar de suas vantagens incluírem o uso de menores (SPE) ou nenhum (SPME) volume de solventes, apresentam alto custo e requerem desenvolvimento mais elaborado para diferenciar analitos que tenham propriedades físico-químicas semelhantes (TIAFT, 2012; BORDIN et al., 2015; PETERS et al., 2017).

2.3.4.2.3. *Precipitação Proteica (PPT) e diluição-e-injeção*

A PPT é uma técnica de preparação para amostras biológicas com alto ou baixo teor de proteínas. Consiste na adição de agentes precipitantes (e. g., solventes orgânicos) ou alteração de condições de extração (e. g., temperatura, pH) no fluido de modo a desnaturar as proteínas e possibilitar a remoção destas após separação das camadas do precipitado e sobrenadante (BORDIN et al., 2015; LI; JIAN; FU, 2019). Metanol é o agente mais comum (WOOD et al., 2003; SERGI et al., 2009). Outra técnica é a *dilution-and-shoot*, onde injeções diretas das amostras após simples diluição com o solvente são realizadas (MANCINELLI et al., 1999; MALACA et al., 2019; BASSOTTI et al., 2020). As maiores desvantagens desses dois tipos de preparo de amostras é o efeito matriz, que pode levar à supressão ou ampliação de sinais devido a interferência de compostos endógenos (e. g., metabólitos e proteínas).

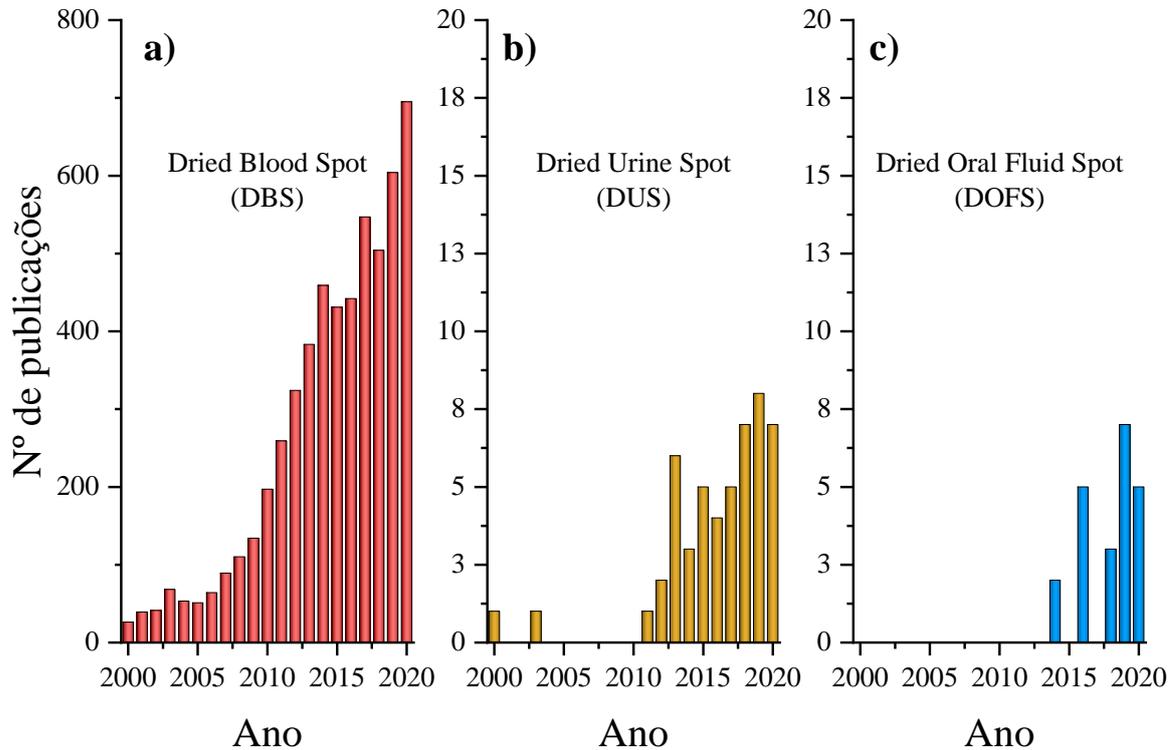
2.4. Dried Matrix Spots (DMS)

A técnica de amostragem por mancha de matriz seca (*DMS*) é realizada através da aplicação de uma pequena quantidade de amostra biológica sobre um papel até completa secagem para formação da mancha, sendo posteriormente armazenada. Assim, como os compostos presentes no fluido serão adsorvidos na superfície da matriz, a extração é realizada (AYRE et al., 2018). A *DMS* é uma técnica de amostragem que tem se impulsionado somente nos últimos anos dentro da toxicologia forense, mesmo que seja uma abordagem já estabelecida em estudos clínicos desde 1960, quando o sangue foi utilizado como matriz para diagnóstico de fenilcetonúria em recém-nascidos através dos níveis de fenilalanina (RESANO et al., 2018). Desde então, esta forma de amostragem passou a ser conhecida como *dried blood spot (DBS)*.

O grande interesse pela *DMS* (termo genérico para qualquer matriz seca em papel) é que esta amostragem oferece simplicidade de coleta, requer baixos volumes da amostra, sendo de fácil transporte e armazenamento devido ao seu pequeno tamanho, e permite a estabilização da maioria dos analitos se comparado com as amostras líquidas congeladas (MEESTERS; HOOFF, 2013), já que a matriz seca inibe as reações de hidrólise química e enzimática (D'ARIENZO et al., 2010). Aliado a estas vantagens, o aparecimento de técnicas instrumentais mais sensíveis tem tornado a amostragem por *DMS* uma opção no desenvolvimento de novos procedimentos analíticos. A bioanálise dos compostos de interesse a partir da *DMS* pode ser realizado através de várias técnicas analíticas, em especial aquelas de maior sensibilidade como as baseadas em espectrometria de massas (*GC-MS* ou *LC-MS*, ou *in tandem*) (ABDEL-REHIM; ABDEL-REHIM, 2014; AMBACH et al., 2014; STOYKOVA et al., 2016; SIMÕES; CASTAÑERA AJENJO; DIAS, 2018; JACQUES; DOS SANTOS; LIMBERGER, 2019; RIBEIRO et al., 2019; RICHEVAL et al., 2019). Em menor proporção, procedimentos com uso de detectores como o arranjo de diodos (*CE-DAD* ou *LC-DAD*) (GREEN; MOUNT; NETTEY, 2002; LEJEUNE et al., 2007; SARACINO et al., 2015; CARVALHO et al., 2019) e o de fluorescência (*LC-FD*) também já foram reportados (MERCOLINI et al., 2010; RAO; BOMPELLI; MAURYA, 2011).

O número de analitos investigados por *DBS* aumentou significativamente, principalmente devido suas aplicações que se estenderam para estudos farmacocinéticos, de monitoramento terapêutico de drogas, diagnóstico de doenças e estudos toxicológicos (ZIMMER et al., 2013; AYRE et al., 2018; RESANO et al., 2018). A **Figura 7** retrata um aumento no número de publicações com este tema para as matrizes de sangue (*DBS*), urina (*DUS*) e fluido oral (*DOFS* ou *DSS*) entre o período de janeiro/2000 a novembro/2020.

Figura 7 – Número de publicações com os termos (a) dried blood spot, (b) dried urine spot e (c) dried oral fluid spot ou dried saliva spot



Fonte: Do Autor, baseado no banco de dados da Scopus (acesso em 05 dez 2020).

Em todos esses casos, ao se comparar os resultados de 2020 com os de 10 anos, por exemplo, o número de trabalhos publicados é quase o dobro. Segundo Zimmer et al. (2013), matrizes além do sangue só começaram a ser utilizadas extensivamente a partir de 2011, onde se observa um aumento expressivo nas **Figura 7b** e **Figura 7c**. A *DOFS*, por exemplo, foi reportada pela primeira vez em 2014 por Abdel-Rehim como uma técnica de amostragem para extrair lidocaína, um anestésico usado no tratamento da arritmia cardíaca e da dor local (ABDEL-REHIM; ABDEL-REHIM, 2014). Embora não tenham demonstrado dados completos para uma validação bioanalítica, demonstraram as vantagens e possibilidades em termos de amostragem, armazenamento, transporte e estabilidade. Adicionalmente, a *DOFS* foi reportada em estudos de monitoramento terapêutico para a avaliação da atividade enzimática da MMP1 em casos de câncer oral (HSIAO et al., 2020), dos níveis da droga candidata BMS-927711 no tratamento de enxaqueca (ZHENG et al., 2016), no diagnóstico de diabetes mellitus pelo monitoramento dos níveis de ácido lático em pacientes saudáveis, diabéticos e pré-diabéticos (NUMAKO et al., 2016), e no isolamento de drogas antipsicóticas (CAMELO et al., 2019), antiepiléticas (CARVALHO et al., 2019) e anti-inflamatórias não esteroidais (TARTAGLIA et al., 2020). No que tange à toxicologia forense, entretanto, o número de trabalhos publicados é limitado. De acordo com um levantamento realizado nas bases de dados

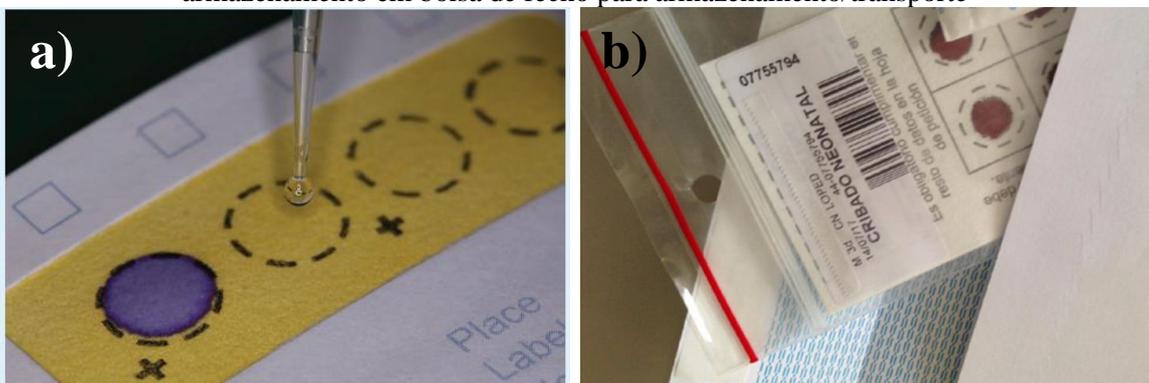
da Scopus, apenas cinco trabalhos envolvendo a determinação de drogas de abuso em fluido oral foram descritas entre janeiro/2010 e novembro/2020 (STOYKOVA et al., 2016; JACQUES; DOS SANTOS; LIMBERGER, 2019; RIBEIRO et al., 2019; RICHEVAL et al., 2019; GORZIZA et al., 2020).

2.4.1. Dried Oral Fluid Spot (DOFS)

2.4.1.1. Coleta, armazenamento e transporte

A amostragem *DOFS* é baseada na tradicional *DBS* e consiste em coletar um pequeno volume de fluido oral (simples expectoração ou com a utilização de dispositivos coletores) e, com auxílio de uma micropipeta, aplicar a matriz no papel filtro para formação da mancha. Ao contrário das amostras convencionais (forma líquida), a *DOFS* geralmente não requer uso de estabilizantes e não precisam ser centrifugadas, refrigeradas ou mesmo congeladas imediatamente após a coleta (SIMÕES, 2016). Uma vez que o fluido oral é coletado do indivíduo, as manchas são formadas pela secagem do fluido oral aplicado sobre o papel em temperatura ambiente por um período mínimo de 2 a 3 horas dependendo do tipo de papel e volume de fluido oral empregados. Nesse momento os papéis com o fluido oral, e dependendo do analito, devem ser protegidos da exposição direta da luz solar e calor, de condições de alta umidade e do contato com outras amostras *DOFS* ou superfícies (MALSAGOVA et al., 2020). Em seguida, as manchas devem ser armazenadas em sacos plásticos de fecho ou em recipientes hermeticamente fechados (**Figura 8**).

Figura 8 – (a) Amostragem de fluido biológico em papel com indicador de cor e (b) processo de armazenamento em bolsa de fecho para armazenamento/transporte



Fonte: (a) Zimmer et al. (2013) e (b) Resano et al. (2018)

Dependendo do analito, estes podem ser armazenados em temperatura ambiente ou em condições de refrigeração ou até mesmo congeladas até análise. Caso as condições do local de amostragem não tenham equipamentos necessários para a determinação dos analitos, as amostras

DOFS após acondicionados podem ser enviadas em segurança para outros laboratórios que tenham a infraestrutura adequada. Uma vez que amostras *DOFS* são secas, o risco de contaminação por agentes patogênicos é reduzido, podendo até mesmo ser facilmente enviadas através por sistemas de correio caso o analito apresente estabilidade para tal (SIMÕES, 2016). Como possui pequeno tamanho, seu envio para os laboratórios é menos dispendioso em comparação com a logística necessária para as tradicionais amostras de fluido oral.

2.4.1.2. Procedimentos de extração

A extração dos analitos nas amostras *DOFS* geralmente é realizada de forma manual. A primeira etapa consiste no recorte ou perfuração dos papéis filtro retirando toda a mancha formada, ou de uma dimensão específica dentro da área da mancha (LI; TSE, 2010; ZIMMER et al., 2013; RESANO et al., 2018). A segunda abordagem, entretanto, pode levar a uma das desvantagens dos métodos por *DMS*, que tem relação com as diferentes concentrações dos analitos nas diferentes partes do papel devido a difusão por capilaridade (LI; TSE, 2010; RESANO et al., 2018). Após obter a mancha seca de *OF*, os pedaços são transferidos para um tubo ou vial para se realizar a extração com solvente aquoso, orgânico ou uma mistura de ambos, do qual normalmente se adiciona o padrão interno. Aqui se ressalta a importância do solvente extrator de modo que ele seja capaz de romper as interações dos analitos e proteínas da matriz ou com a estrutura do papel filtro (celulose e outros componentes presentes) (MEESTERS; HOOFF, 2013). Essa dessorção dos compostos de interesse normalmente é obtida com etapas de agitação mecânica, sonicação, centrifugação e/ou aquecimento, para posterior injeção do extrato do *DOFS* no sistema cromatográfico. Em alguns casos, a *DOFS* pode ser utilizada em combinação com as técnicas de *LLE*, *SPE*, *PPT* e evaporação do solvente extrator para reconstituição em outro solvente para as análises no LC ou GC (MEESTERS; HOOFF, 2013; ZHENG et al., 2016). Embora estas etapas sejam eficientes, ainda demandam muito tempo para seu desenvolvimento. Para mostrar a variedade de opções e alternativas, a **Tabela 8** mostra alguns trabalhos envolvendo *DBS*, *DOFS* e *DUS* na determinação de compostos de interesse forense, em especial aqueles que tenham MDMA e/ou MDA como analito ou substâncias que sejam de caráter básico.

Tabela 8 – Técnicas instrumentais e condições de extração das amostras DMS contendo analitos de interesse para a toxicologia forense

Analitos	Técnica	DMS	Condições de extração	Referência
AM, MA, MDMA, THC, COC, MOR, MTD	GC-MS	DOFS	Manchas de 26 mm foram formadas após 2 h de secagem de 250 µL de OF a temperatura ambiente. Tratamento com 2 mL de metanol:HCl (1:1, v/v) e sonicação, do qual se adicionou PI (lidocaína) e NaOH. Extração com 3 mL acetato de etila seguido de evaporação/reconstituição em acetato de etila	(STOYKOVA et al., 2016)
COC, BZE, CET, AM, MDMA	LC-MS	DOFS	50 µL aplicados em papel Whatman® 903 de 16 mm de diâmetro. Depois de secas, 10 mm foram recortadas a partir do centro e a extração realizada adicionando PID ao solvente de extração (200 µL, acetonitrila, tampão acetato de amônio 14 mmol L ⁻¹ e metanol (55:35:10, v/v) com auxílio de sonicador	(JACQUES; DOS SANTOS; LIMBERGER, 2019)
MTD e EDDP	GC-MS/MS	DOFS	Após secagem de 50 µL de OF durante a noite (<i>overnight</i>), os analitos foram extraídos com 1 mL isopropanol e PID com uso de agitação. Após centrifugação a 4 °C por 15 min o sobrenadante foi coletado e evaporado com fluxo de nitrogênio. O resíduo foi reconstituído em metanol.	(RIBEIRO et al., 2019)
AM, MA, KET, BZE e mitraginina	LC-MS/MS	DOFS	Papel Whatman® 903 com 16 mm diâmetro foi extraído com 1 mL de metanol:acetonitrila 50:50 v/v. A mistura foi sonicada, centrifugada e o sobrenadante seco a 37 °C. Extrato dissolvido em solução de metanol e PID	(GORZIZA et al., 2020)
NPSs, MDMA, THC e COC	LC-HRMS	DOFS	Da amostra obtida pelo coletor Drugwipe-5S®, metanol foi utilizado para extração por uma hora a temperatura ambiente. Após centrifugação, adicionou-se PI (metil-clonazepam e hidroxietilteofilina). A solução foi evaporada e reconstituída em uma mistura de metanol:ácido fórmico 0,1% (80:20 v/v)	(RICHEVAL et al., 2019)

continua

Tabela 8 – Técnicas instrumentais e condições de extração das amostras DMS contendo analitos de interesse para a toxicologia forense*continuação*

Analitos	Técnica	DMS	Condições de extração	Referência
Lidocaína	LC-MS	DOFS	50 µL de saliva foram aplicados em papel filtro, de onde foi seco. O papel foi perfurado a partir do meio do papel filtro e transferido para um vial onde a extração foi realizada com acetonitrila e PI (penticaína).	(ABDEL-REHIM; ABDEL-REHIM, 2014)
Antipsicóticos	GC-MS/MS	DOFS	50 µL de OF foram aplicados no papel Whatman® 903 e deixados secar por 1 h a 36 °C. Os papeis foram recortados e extraídos com 2 mL metanol (pH = 5,0) e solução de PID. A mistura foi agitada, centrifugada e o sobrenadante evaporado. Resíduo derivatizado com MSTFA:TMCS 5% em micro-ondas	(CARAMELO et al., 2019)
Antiepilépticos	LC-DAD	DOFS	Alíquotas de 50 µL no papel Whatman® 903 foram suspensas em metanol com ácido fórmico (pH 5,5). O PI (cetoprofeno) foi adicionado ao solvente extrator. A mistura foi homogeneizada, centrifugada e o sobrenadante evaporado para pré-concentrar os analitos. O extrato seco foi reconstituído na fase móvel constituída de 35% acetonitrila e 65% água:metanol:TEA (pH 6,5)	(CARVALHO et al., 2019)
MOR, codeína, 6-MAM, AM, MDA, MDMA, BZE, COC, EDDP, MTD	UPLC-MS/MS	DBS	Em papel Whatman® BFC 180, 50 µL de OF foram secos <i>overnight</i> a temperatura ambiente. A extração dos analitos nos discos obtidos com perfuração dos papéis foi realizado com metanol:acetonitrila (3:1, v/v) e PID. Depois da homogeneização e sonicação, os extratos após secagem a 35 °C foram reconstituídos na fase móvel: acetonitrila/formato de amônio e formato de amônio/acetonitrila (10:90, v/v)	(SIMÕES; CASTAÑERA AJENJO; DIAS, 2018)

continua

Tabela 8 – Técnicas instrumentais e condições de extração das amostras DMS contendo analitos de interesse para a toxicologia forense*continuação*

Analitos	Técnica	DMS	Condições de extração	Referência
64 NPS incluindo MDA e MDMA	LC-MS/MS	DBS	10 µL de sangue pipetados no centro do papel PerkinElmer 226 e deixados secar por 3 h em temperatura ambiente. Um diâmetro de 1 cm foi perfurado e coletado para extração com 500 µL de metanol e PID com agitação em vórtex. A solução foi transferida para um vial contendo 0,25% ácido clorídrico em metanol, evaporada e o extrato redissolvido em água:ácido fórmico (99,9:0,1, v/v)	(AMBACH et al., 2014)
AM, MA, MDA, MDMA, MOR, Codeína, BZE, COC, ME	LC-MS/MS	DBS	DBSs em papel TFN Sample Carrier foram extraídos com 2 mL de NaOH, 2 mL de acetato de etila:metanol (1:1, v/v) e PID. A mistura foi sonicada, centrifugada e as amostras acidificadas com metanol:ácido clorídrico. Sobrenadante evaporado a 40 °C e os resíduos reconstituídos em metanol	(KACARGIL; DAGLIOGLU; GOREN, 2020)
COC, BZE, CET	LC-FD	DBS	10 µL de sangue foram pipetados no papel Whatman® 903 e deixados secar sob proteção de luz por 2 horas. Um diâmetro de 10 mm foi recortado e a extração realizada com metanol. Evaporado o solvente, o extrato foi redissolvido na fase móvel (acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 (15:85, v/v))	(MERCOLINI et al., 2010)
MDA e MDMA	LC-MS/MS	DBS	Em papel Whatman® 903, a mancha foi formada com 100 µL após secagem em <i>overnight</i> . Com disco de 18 mm, a extração foi realizada com NaOH seguido da adição de 1,5 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi acidificada com metanol:ácido clorídrico (49:1, v/v), evaporado a 40 °C e reconstituído em fase móvel (acetato de amônio pH 3,2:metanol:acetonitrila, 60:8:32 v/v)	(JANTOS et al., 2011)

continua

Tabela 8 – Técnicas instrumentais e condições de extração das amostras DMS contendo analitos de interesse para a toxicologia forense

conclusão

Analitos	Técnica	DMS	Condições de extração	Referência
MOR, codeína, COC, EME, BZE, AM, MA, MDA e MDMA	LC-MS/MS	DBS-SPE	Com a mancha no papel Whatman® 903 formado por 30 µL de sangue, um diâmetro de 3 mm foi recortado do centro da área usando perfurador e suspenso em 150 µL de água contendo PID.	(SAUSSEREAU et al., 2012)
Opioides, metadona, fentanil, cocaína, anfetaminas,	UPLC-MS/MS	DBS	Em papel Bond Elut®, 3 mm de três manchas de 30 µL de uma solução com 10 e 100 µL de PID e sangue, respectivamente, foram extraídos com metanol/ácido fórmico 0,1% enquanto submersos por 1 h na solução.	(ODOARDI; ANZILLOTTI; STRANO-ROSSI, 2014)
Benzodiazepínicos	GC-NPD	DUS	20 µL de urina foram aplicados no papel Whatman® 903. Após completa secagem em <i>overnight</i> , os analitos foram extraídos de quatro DUS com 3,2 mm de diâmetro em 1 mL de água deionizada a 37 °C em banho maria por 24 h.	(JAIN et al., 2017)
GHB	CE-DAD	DUS-SPE	100 µL foram pipetados no papel Whatman® FTA. Os DUS foram cortados e os analitos extraídos com metanol e PI em banho ultrassônico. A solução foi introduzida no cartucho Oasis HLB pré-condicionado com metanol e os analitos eluídos com metanol. O eluato foi seco e reconstituído em água ultrapura.	(SARACINO et al., 2015)

6-MAM: 6-monoacetilmorfina, AM: anfetamina, BZE: benzoilecgonina, CE: eletroforese capilar, CET: cocaetileno, COC: cocaína, DAD: detector por arranjo de diodos, DMS: *dried matrix spot*, DBS: *dried blood spot*, DOFS: *dried oral fluid spot*, DUS: *dried urine spot*, EDDP: metabólito da metadona, EME: ecgonina metil éster, FD: detector de fluorescência, GC: cromatografia a gás, GHB: ácido γ -hidroxibutírico, HRMS: espectrometria de massas de alta resolução, KET: ketamina, LC: cromatografia líquida, MA: metanfetamina, MDA: 3,4-metilenodioxianfetamina, MDMA: 3,4-metilenodioximetanfetamina, ME: metilecgonina, MOR: morfina, MS: espectrometria de massas, MSTFA;TMCS: N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida com trimetilclorossilano, MTD: metadona, NaOH: hidróxido de sódio, NPD: detector de nitrogênio-fósforo, NPS: novas substâncias psicoativas, OF: fluido oral, PI: padrão interno, PID: padrão interno deuterado, SPE: extração em fase sólida, TEA: trietilamina, THC: d9-tetrahydrocannabinol, UPLC: cromatografia líquida de ultra performance.

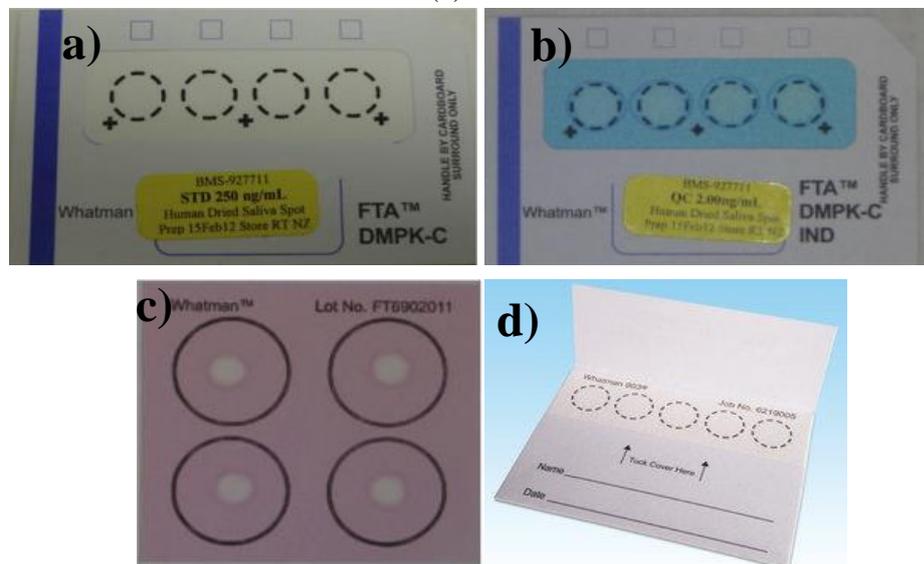
2.4.1.3. Limitações da DOFS

Embora a DMS tenha alcançado êxito na bioanálise de forma geral, ela possui limitações que devem ser mencionadas. São elas: impossibilidade de se analisar analitos voláteis ou que sejam sensíveis ao ar, desenvolvimento demorado para se atingir uma condição ótima devido às diversas variáveis e etapas que podem e devem ser estudadas e a necessidade de métodos instrumentais mais sensíveis devido o volume reduzido de amostra (se utilizado os papéis filtro comercialmente disponibilizados para este propósito). Além disso, existem vários fatores que devem ser investigados, uma vez que podem interferir de forma significativa na exatidão e precisão dos resultados em uma análise quantitativa de amostras *DOFS* (SIMÕES, 2016). Entre esses fatores estão a homogeneidade da amostra no papel (efeito cromatográfico), o volume da amostra, o tipo de papel, o momento de adição do padrão interno e a estabilidade dos analitos no papel filtro (MEESTERS; HOOFF, 2013; JAGER et al., 2014; MALSAGOVA et al., 2020).

- Efeito cromatográfico: Diferente das amostras líquidas, para a qual a homogeneidade pode ser garantida com uso de agitação, os analitos em *DOFS* se difundem logo após sua aplicação no papel e não podem ser homogeneizadas novamente. Quando a área retirada para análise é parcial em vez da totalidade da mancha, faz-se importante que os analitos na amostra de fluido oral estejam distribuídos uniforme e reprodutivamente no papel. Embora este efeito pareça ser dependente do tipo de papel e do analito, existem alguns trabalhos descrevendo a diferença entre os papéis removidos a partir do centro e da parte periférica da *DMS* (LI; TSE, 2010; JAGER et al., 2014). Uma solução seria o uso de perfuradores maiores ou utilização da mesma área para as análises. No entanto, a utilização de toda a área em que a amostra está presente é a abordagem mais indicada (JAGER et al., 2014).
- Volume da mancha: O volume de *OF* para produzir as *DOFS* varia na ordem de microlitros, tipicamente na ordem 5 a 100 μL , mas pode variar se o método instrumental é mais sensível ou não em termos da detecção e quantificação dos analitos. Stoykova et al. (2016), por exemplo, aplicou 250 μL de fluido oral no papel para análise de MDMA e cocaína em *GC-MS*, o qual rendeu valores de limite de detecção (LD) de 100 ng mL^{-1} . Por outro lado, utilizando-se de um sistema *LC-MS/MS*, apenas 10 μL de sangue foram necessários para se atingir LD de até 2,5 ng mL^{-1} (AMBACH et al., 2014). De toda forma, o volume dependerá de fatores como finalidade da análise e nível de sensibilidade necessária, do tipo de papel e instrumento empregado, e da disponibilidade das amostras.

- Tipo de papel: Em relação ao papel filtro nas análises por *DMS*, os mais comuns são os tradicionais papéis utilizados na triagem de doenças em recém-nascidos, como é o caso do papel Whatman® 903, reconhecido para esta abordagem bioanalítica pelas agências norte-americanas *Food and Drug Administration (FDA)* e *Center for Disease Control and Prevention (CDC)*. O Whatman® 903 são produzidos de acordo com os padrões de qualidade exigidos por laboratórios clínicos e oferece vantagens como pureza e consistência (SIMÕES, 2016; GORZIZA et al., 2020) a um custo relativamente baixo. Variações deste são o Whatman® FTA DMPK-A, B ou C, e o FTA *Elute*, menos observados (**Figura 9**). Enquanto este último é indicado para coleta de DNA, os cartões FTA DMPK são utilizados para estudos farmacocinéticos e apresentam compostos que desnaturam as proteínas das matrizes, inativam patógenos e previnem o crescimento de bactérias e outros microrganismos, sendo uma alternativa para estabilidade dos analitos. Todos esses papéis possuem em sua composição 100% fibras de algodão, o que confere máxima absorção, durabilidade e resistência ao longo do tempo.

Figura 9 – Papéis filtro (a) FTA DMPK-C, (b) FTA DMPK-C com indicador, (c) FTA clássico com indicador de cor e (d) Whatman® 903



Fonte: (a-c) Zheng et al. (2016) e (d) Sigma-Aldrich (<https://www.sigmaaldrich.com/>)

- Estabilidade dos analitos: Durante o armazenamento os analitos podem sofrer modificações devido a presença de enzimas ou outros componentes presente na amostra ou papel, mesmo que normalmente a *DOFS* já reduza a taxa de degradação se comparado com as amostras

líquidas. A estabilidade pode ser influenciada pelo tipo de papel utilizado, temperatura de armazenamento e transporte, humidade e pelo próprio analito (SIMÕES, 2016).

- Adição de padrão interno: O padrão interno (PI) é uma substância que deve ter propriedades físico-químicas semelhantes ao analito, sendo o isótopo estável (equivalente deuterado) o mais recomendado. Sua função é compensar quaisquer variações durante o preparo de amostra e ensaios experimentais de forma geral, melhorando a precisão e exatidão do método. Em *DOFS*, o padrão interno também pode compensar qualquer degradação devido às condições de transporte e armazenamento se adicionado antes da amostragem (ZIMMER et al., 2013). No entanto, trabalhos onde a adição do PI ocorre diretamente na mancha seca, no solvente extrator, no papel antes da matriz biológica ou mesmo nas amostras líquidas antes de aplicá-las ao papel foram reportadas (ABU-RABIE et al., 2011). Em relação ao método mais utilizado, que é o de adição do PI ao solvente extrator (MEESTERS; HOOFF, 2013; ZIMMER et al., 2013; JAGER et al., 2014), o PI não permite corrigir as variações na recuperação dos analitos do papel de filtro. Neste caso, é importante investigar o comportamento dos analitos e do PI para verificar se há diferenças significativas que possam alterar a exatidão das análises (SIMÕES, 2016).

3. OBJETIVOS

Considerando abordar um procedimento menor custo e de maior acessibilidade a laboratórios de baixo orçamento, e levando em conta as vantagens já mencionadas para a amostragem por DOFS, definiu-se como objetivos principais:

1. Desenvolver e otimizar um método em cromatografia líquida acoplada ao arranjo de diodos (*LC-DAD*) para a separação de MDMA e de seu metabólito MDA;
2. Desenvolver e otimizar as variáveis que possam afetar a amostragem e extração de MDMA e MDA com a técnica da mancha seca em amostras de fluido oral (*DOFS*);
3. Validar o método bioanalítico desenvolvido avaliando-se parâmetros como seletividade, efeito residual, linearidade, precisão e exatidão, limites de detecção e de quantificação, além dos indicadores de recuperação, efeito matriz e eficiência do processo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Equipamentos e consumíveis

4.1.1. Padrões, reagentes e solventes

As Substâncias Químicas de Referência (SQR) (\pm)-3,4-Metilenodioxianfetamina (MDA) e (\pm)-3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), ambos na concentração $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$, foram adquiridas da Cerilliant (Round Rock, EUA). Lidocaína (p.a.), utilizada como padrão interno (PI), foi fornecida pela Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). As SQR (\pm)-metanfetamina $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$, cocaína $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ (LGC Standards; Luckenwalde, Alemanha), (\pm)-3,4-metilenodioxietanfetamina (MDEA) $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ (Round Rock, EUA), e os padrões cafeína, teobromina, levamisol, procaína e fenacetina (Sigma-Aldrich; St. Louis, EUA) foram utilizados para o ensaio de seletividade. Ácido acetilsalicílico (500 mg, Novamed; Manaus, Brasil), citrato de tadalafil (20 mg, Medley; Campinas, Brasil), citrato de sildenafil (50 mg, Medley; Campinas, Brasil), acetaminofeno (500 mg, Prati-Donaduzzi; Toledo, Brasil) e metamizol (500 mg, Prati-Donaduzzi; Toledo, Brasil) foram adquiridos como medicamentos genéricos. Outros 12 SQRs (cloreto de efedrina, ketamina $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, atenolol, metoprolol $420 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, propranolol, ibuprofeno, midazolam $171 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, citalopram, omeprazol, clonazepam $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, bromazepam $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ e diazepam $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira para o ensaio de seletividade.

Da Honeywell (Charlotte, EUA), adquiriu-se acetonitrila, etanol, metanol e clorofórmio, todos grau HPLC. A água ultrapura, com resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ ($25 \text{ }^\circ\text{C}$), foi obtida do sistema de purificação de água Direct-Q3 da Millipore (Bellerica, EUA). Os aditivos ácido fórmico (88-91%), ácido fosfórico (85%) e perclórico (70-72%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), enquanto o trifluoroacético ($\geq 99\%$) da ChemCruz (Huissen, Holanda). Ácido nítrico (65%) foi obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Por fim, a hexilamina ($\geq 99,0$) foi adquirida na Merck (Darmstadt, Alemanha) e os sais fosfato de potássio dibásico e monobásico pela J T Baker (Center Valley, EUA).

4.1.2. Materiais e equipamentos

A etapa de preparo e extração das amostras envolveu a utilização de papéis de matriz celulósica. São eles: papel filtro quantitativo (gramatura de 80 g m^{-2} , J Prolab; São José dos Pinhais, Brasil), papel sulfite (90 g m^{-2} , Chamex; Memphis, EUA), cartolina (180 g m^{-2}) e bloco aquarela (300 g m^{-2} , Canson; Annonay, França). Para o procedimento cromatográfico, as amostras, soluções e fases móveis foram filtradas empregando-se ou membrana lisa de teflon

hidrofílico da Nova Analítica (São Paulo, Brasil) ou filtro de membrana PTFE para seringa, da GVS Filter Technology (Stanford, EUA), ambos com poros de 0,45 μm .

Durante o preparo de amostras e desenvolvimento do método foram utilizados a balança analítica modelo HPB1245Di da Bel Engineering (Monza, Itália), banho ultrassônico modelo 97043-960 da VWR International (Radnor, EUA), mini centrífuga SPROUT da Fisher Scientific (Illinois, EUA), mini vórtex Vortamix da Argos Technologies (Illinois, EUA), medidor portátil de pH modelo HI98129 da Hanna Instruments (Barueri, Brasil), estufa modelo E51017 da Olidef CZ (Ribeirão Preto/SP, Brasil), equipamento portátil de luz UV com os comprimentos de onda 254 e 365 nm modelo ENF-280C, da Spectroline (Westbury, EUA) e micropipetas modelo Pipetman Classic P100 (10 – 100 μL) e P1000 (100 a 1000 μL) da Gilson (França) e EP3123 (0,5 – 10 μL) da Eppendorf Research (Hamburgo, Alemanha).

4.1.3. Instrumentação analítica

Sistema LC modelo Dionex UltiMate 3000 equipado com uma bomba quaternária (LPG-3400 SD) com degaseificador à vácuo integrado, autoamostrador (WPS-3000 TBSL) e um compartimento termostaticado para colunas (TCC-3000) com um detector de Arranjo de Diodos (DAD-3000), da Thermo Fisher Scientific (Germering, Alemanha). Foram utilizadas colunas analíticas (250 x 4,6 mm; 5 μm) de fase reversa octadecil (C18) e fenil (PH), com *carbon load* de 18 e 9,5%, respectivamente. Ambas possuem capeamento (*endcapped*), área superficial de 300 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ e poros de 100 Å. A coluna C18 foi adquirida da Nano Separation Technologies (NST; São Carlos, Brasil) e a PH da Advanced Chromatography Technologies (ACE; Aberdeen, Escócia). Adicionalmente, para ensaio de robustez, empregou-se um outro sistema LC, da Shimadzu (Kyoto, Japão), equipado com duas bombas (LC-10AD), degaseificador (DGU-20A3), auto injetor (SIL-20A HT), forno para coluna (CTO-10A VP), detector por arranjo de fotodiodos (PDA; SPD-M20A) e controladora (CBM-20A).

Para identificação confirmatória, empregou-se um cromatógrafo a gás com um espectrômetro de massas de quadrupolo único (*GC-MS*) modelo GCMS QP2010 SE operando no modo de ionização por elétrons (EI) a 70 eV, da Shimadzu (Kyoto, Japão). Os espectros de massas foram analisados pela comparação com a base de dados da biblioteca fornecida pela *Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs (SWGDRUG)* e *National Institute of Standards and Technology (NIST)*, versões 3.7 e 11, respectivamente. Para isso, utilizou-se a coluna capilar de média polaridade OPTIMA-35 MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 μm) obtida da Macherey-Nagel (Düren, Alemanha), com fase (35% fenil)-metilpolisiloxano.

4.1.4. Soluções e amostras

4.1.4.1. Amostras de fluido oral (OF)

Amostras branco (sem a presença do analito) de fluido oral, obtidas de voluntários dentro do próprio grupo de pesquisa, foram coletadas por simples expectoração pelo participante em tubos de polietileno de 15 mL. Logo após a coleta, as amostras de fluido oral foram centrifugadas a 6000 rpm por 5 min e o sobrenadante transferido para outro tubo a ser armazenado no congelador até momento das análises. Os voluntários foram informados quanto ao objetivo do trabalho e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (vide APÊNDICE A) aprovado pela Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (CEP FFCLRP-USP), sob o parecer 4.048.932 (ANEXO A).

4.1.4.2. Soluções estoque

As soluções estoque (SE, $200 \mu\text{g mL}^{-1}$) de MDA e MDMA foram preparadas separadamente em metanol através da diluição do conteúdo da ampola do SQR em balões volumétricos de 5,0 mL. Da mesma forma, a solução estoque de lidocaína (PI, $585 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi obtida pela dissolução de 5,85 mg de lidocaína em balão de 10,0 mL. Para as demais substâncias, foram preparadas soluções estoque na concentração de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$. Essas soluções foram envoltas por papel alumínio e armazenadas no congelador até momento de uso.

4.1.4.3. Soluções trabalho

Com as soluções estoque do MDA e MDMA, preparou-se duas soluções de trabalho a $10,0$ e $6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ contendo a mistura de ambos os analitos, os quais foram posteriormente diluídos com ácido trifluoroacético 0,05 % v/v (amostras não matrizadas) e/ou no *pool* de fluido oral (amostras matrizadas) para resultar em soluções a serem empregues na construção das curvas analíticas (níveis de concentração a $0,0125$, $0,312$, $0,625$, $1,25$, $2,50$ e $5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$) e como controles de qualidade de baixa (CQB, $0,0375 \mu\text{g mL}^{-1}$), média (CQM, $2,50 \mu\text{g mL}^{-1}$) e alta (CQA, $4,00 \mu\text{g mL}^{-1}$) concentração, além do controle de diluição (CQD, $25,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). O *pool* de fluido oral foi preparado através da mistura de amostras negativas provenientes de seis diferentes voluntários. A solução de MDA e MDMA a $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, em metanol, foi utilizada durante o desenvolvimento e otimização do método.

4.2. Procedimento experimental

4.2.1. Dried oral fluid spot (DOFS)

4.2.1.1. Papel utilizado como suporte

A fim de verificar as condições da amostragem, foram investigados vários parâmetros que já são conhecidos por influenciar os resultados quantitativos (JAGER et al., 2014). Assim, investigações a respeito do tipo de papel como suporte para o fluido oral (papéis filtro, sulfite, cartolina e aquarela), o tempo necessário para a formação das manchas, o volume de fluido oral (50, 100, 150 e 200 μL) aplicado ao papel e a necessidade de pré-tratamento dos papéis, a qual foi avaliado com ácido nítrico (1,0, 5,0 e 10,0 %) e etanol:clorofórmio em diferentes proporções (80:20, 60:40 e 50:50 v/v), foram realizadas.

4.2.1.2. Investigação do método de extração

A extração foi avaliada através do parâmetro de recuperação, onde a resposta instrumental (área) do analito na amostra DOFS fortificada antes da extração é comparada com a resposta relacionada à amostra DOFS branco fortificada após a extração. O tempo de extração em banho ultrassônico (5, 10, 15 e 30 min) e o volume do extrator, além da necessidade de etapas de pré-concentração foram verificados. Quanto à eficiência de extração, o melhor solvente ou mistura extratora foi definido através de um delineamento de misturas do tipo simplex-axial com três componentes (acetonitrila, metanol e ácido trifluoroacético), no qual a proporção em volume de cada componente, totalizando 600 μL , foram avaliadas a partir de 10 experimentos realizados em duplicata ($k = 2$) (Tabela 9).

Tabela 9 – Proporções em volume (total de 600 μL) de acetonitrila, metanol e ácido trifluoroacético 0,05% v/v da mistura extratora para realização do experimento do delineamento simplex-axial

Ponto	Acetonitrila / μL	Metanol / μL	TFA 0,05% / μL	Total / μL
1	600	-	-	600
2	-	600	-	600
3	-	-	600	600
4	300	300	-	600
5	-	300	300	600
6	300	-	300	600
7	400	100	100	600
8	100	400	100	600
9	100	100	400	600
10	200	200	200	600

4.2.1.3. Procedimento geral

Depois de descongelar a temperatura ambiente as amostras de fluido oral, as amostras *DOFS* foram preparadas aplicando fluido oral (branco ou fortificado) com uma micropipeta no papel escolhido. Após a secagem, as manchas visualizadas com uso de luz UV (254 nm), delimitadas com um lápis e cortadas com uma tesoura, a extração dos analitos foi realizada com auxílio de banho ultrassônico e adição do PI ao solvente extrator.

4.2.2. Cromatografia líquida/arranjo de diodos (LC-DAD)

Partindo-se dos métodos reportados pela literatura e de observações experimentais, modificações foram realizadas até se alcançar a uma condição que permitisse a separação, detecção e quantificação dos analitos em tempo hábil. Para o desenvolvimento, foram avaliados a composição da fase móvel através de três modificadores (acetonitrila, metanol e etanol), uso de tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ em seis diferentes valores de pH (2,1, 3,0, 4,0, 5,0, 6,2 e 7,2), quatro aditivos ácidos a 10 mmol L⁻¹ (fórmico, trifluoroacético, perclórico e fosfórico) e a necessidade de reagente de pareamento iônico (hexilamina). Variáveis como a proporção do modificador (15, 20, 25 e 30%), concentração do aditivo (1,0, 10 e 20 mmol L⁻¹), fluxo da fase móvel (0,6 – 1,2 mL min⁻¹, a cada 0,2 mL min⁻¹), temperatura da coluna (20, 30 e 35 °C) e diferentes comprimentos de onda para detecção, baseado nos picos de máxima absorção obtido a partir do espectro ultravioleta na faixa de 195 a 300 nm, também foram avaliados.

4.2.3. Cromatografia a gás/espectrometria de massas (GC-MS)

Para análise confirmatório, utilizou-se um método *GC-MS* previamente otimizado e validado para quantificação de MDMA em amostras de *ecstasy* (DUARTE et al., 2020). De forma breve, utilizou-se a coluna de média polaridade OPTIMA 35 MS como fase estacionária e hélio como gás de arraste a 2,0 mL min⁻¹, com o GC operando no modo *splitless* de injeção. A temperatura do injetor, fonte de ionização e interface foram mantidos a 260 °C e a programação do forno consistiu em uma temperatura inicial de 60 °C seguindo-se de um gradiente térmico de 20 °C min⁻¹ até 260 °C, onde manteve-se por 2 min. O espectrômetro de massas foi utilizado no modo *full scan*, com varrimento entre as razões de massa carga (*m/z*) de 40 e 400 u.m.a., com o atraso de solvente e fluxo da purga configurados para 3 min e 10 mL min⁻¹, respectivamente. O volume de injeção foi de 1,0 µL.

4.2.4. Performance analítica

O método *LC-DAD* desenvolvido foi validado com base nos guia da *Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX)* e nas resoluções RDC 27/2012 e 166/2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012, 2017; SWGTOX, 2013). Os parâmetros avaliados foram: linearidade, limites de detecção e de quantificação, seletividade, efeito matriz, precisão, exatidão, recuperação, efeito residual, estabilidade e robustez. Adicionalmente, a conformidade do sistema (*system suitability*) também foi avaliada.

4.2.4.1. Seletividade

A seletividade do procedimento analítico foi avaliada em duas etapas. No primeiro caso, comparou-se o cromatograma das amostras *DOFS* (branco e fortificada com MDMA e MDA a $0,0125 \mu\text{g mL}^{-1}$) submetidas à extração. A segunda forma, por sua vez, consistiu em avaliar o extrato do papel (obtido através da extração com metanol) e os compostos passíveis de serem coadministrados. Um total de 25 substâncias, semelhantes e passíveis de interferir na resposta analítica do MDMA e MDA, foram solubilizadas e diluídas em metanol para perfazer soluções de concentração $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo injetadas separadamente no *LC-DAD* (**Tabela 10**).

Tabela 10 – Compostos utilizados para avaliar a seletividade do método *LC-DAD*

Função	Compostos avaliados
Estimulantes do SNC	MDEA, metanfetamina, cocaína, cafeína e efedrina
Anestésicos	Lidocaína, procaína e ketamina
Analgésicos e antipiréticos	Ácido acetilsalicílico, metamizol (dipirona), acetaminofeno (paracetamol) e fenacetina
Anti-hipertensivo	Atenolol e metoprolol
Analgésico e estupefaciente	Propranolol
Anti-inflamatório não esteroide	Ibuprofeno
Ansiolíticos	Bromazepam, diazepam e midazolam
Antiepiléptico e anticonvulsante	Clonazepam
Antidepressivo	Citalopram
Antiácido e antiulceroso	Omeprazol
Outros	Tadalafil, sildenafil, ácido salicílico e teobromina

Em ambas as situações, a seletividade foi verificada pela ausência de picos interferentes no mesmo tempo de retenção dos analitos e padrão (ANVISA, 2012; SWGTOX, 2013), e através dos cálculos de resolução entre os picos adjacentes (EPSHTEIN, 2020). Neste caso, a recomendação é que $R_s \geq 1,5$ se os picos apresentarem fator de assimetria adequada ($A_s \leq 1,5$).

4.2.4.2. Efeito residual

A presença do efeito residual no método *LC-DAD* foi avaliada pela injeção da fase móvel, amostra não matrizada ($20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e fase móvel (2x), nesta ordem, e através da análise de duas *DOFS* branco imediatamente após injeção da *DOFS* preparada no limite superior de quantificação do método (LSQ, $5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$), para ambos os analitos. Nos dois casos, os cromatogramas branco analisados após injeção da amostra fortificada foram avaliados quanto a presença de picos no tempo de retenção dos analitos que pudessem ser oriundas da injeção anterior ou da contaminação cruzada. Experimental, as *DOFS* branco foram recortadas logo após as *DOFS* no LSQ utilizando a mesma tesoura, sem limpá-la entre os cortes. Considerou-se livre de *carryover* se a resposta do pico interferente, em caso positivo, fosse inferior a 20 e 5% das respostas dos analito no limite inferior de quantificação (LIQ, $0,0125 \mu\text{g mL}^{-1}$) e do PI.

4.2.4.3. Linearidade

Através do método de padronização interna (lidocaína, $2,50 \mu\text{g mL}^{-1}$), uma curva analítica com seis níveis de concentração ($0,0125, 0,312, 0,625, 1,25, 2,50$ e $5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$) preparados de acordo com o procedimento desenvolvido foi construída para ambos os analitos, em quintuplicata. A linearidade da curva foi avaliada entre os limites inferior ($0,0125 \mu\text{g mL}^{-1}$) e superior ($5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$) de quantificação com o método de regressão linear ponderada, plotando-se a razão entre a área do pico do analito e a área do padrão interno em função da concentração do analito. Para aceitação da linearidade, considerou-se $r \geq 0,990$, que a curva deveria melhor se ajustar a um modelo linear pelo teste de Mandel, que o coeficiente angular apresentasse diferença significativa de zero e que o valor zero estivesse dentro do intervalo de confiança de 95 % para o intercepto (SWGTOX, 2013; ANVISA, 2017). Em razão destes critérios, testes estatísticos como a ANOVA, para verificar a validade do modelo linear sobre os dados experimentais, o teste de Brown-Forsythe, para investigar a homocedasticidade (variância entre as replicatas nos diferentes níveis de concentração), e o teste *t-ratio*, para verificar a significância dos coeficientes angular e linear, foram aplicados aos dados obtidos.

Em caso de heterocedasticidade, utilizou-se do procedimento adotado por Almeida, Castel-Branco e Falcão (2002), em que fatores empíricos (w) como $1/x, 1/x^{0,5}, 1/x^2, 1/y, 1/y^{0,5}$ e $1/y^2$, sendo x a concentração dos analitos e y a resposta instrumental, são aplicados para selecionar o melhor modelo. De acordo com a ANVISA (2012), esse é selecionado com base no menor valor do somatório do erro relativo percentual ($\sum\text{EPR}\%$) dos valores nominais das amostras matrizadas em relação aos valores obtidos pela equação da curva analítica.

4.2.4.4. Precisão e exatidão

4.2.4.4.1. Exatidão (*bias*)

Os ensaios de exatidão foram realizados com as amostras *DOFS* ($k = 5$) obtidas a partir das amostras controle ao longo de quatro dias diferentes, cujas concentrações são 0,0125 (LIQ), 0,0375 (CQB), 2,50 (CQM) e 4,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (CQA). O *bias* de cada nível de concentração foi expresso como o erro padrão relativo percentual (EPR%) das medidas, conforme Equação 1:

$$EPR\% = \frac{C_E - C_T}{C_E} \cdot 100\% \quad \text{Equação 1}$$

Onde C_E é a média das concentrações experimentais obtidas para as quintuplicatas ao longo dos quatro dias ($N = 20$) e C_T a concentração teórica para aquele nível. Os resultados de até 15% foram considerados adequados, com exceção do LIQ, o qual se considerou 20%.

4.2.4.4.2. Repetitividade e precisão intermediária

A repetibilidade (precisão intradia) e a precisão intermediária (precisão interdia) foram avaliadas simultaneamente aos ensaios de exatidão através das mesmas amostras *DOFS*. A repetibilidade foi determinada através da injeção de cinco amostras ($k = 5$) para cada nível de concentração no mesmo dia, enquanto a precisão intermediária em quatro dias diferentes. A precisão foi interpretada como o desvio padrão relativo percentual (DPR%) das respostas obtidas nas corridas cromatográficas, e calculadas de acordo com a Equação 2 e Equação 3:

$$DPR\%_{intradia} = \frac{S_r}{C_{média}} \cdot 100\% \quad \text{Equação 2}$$

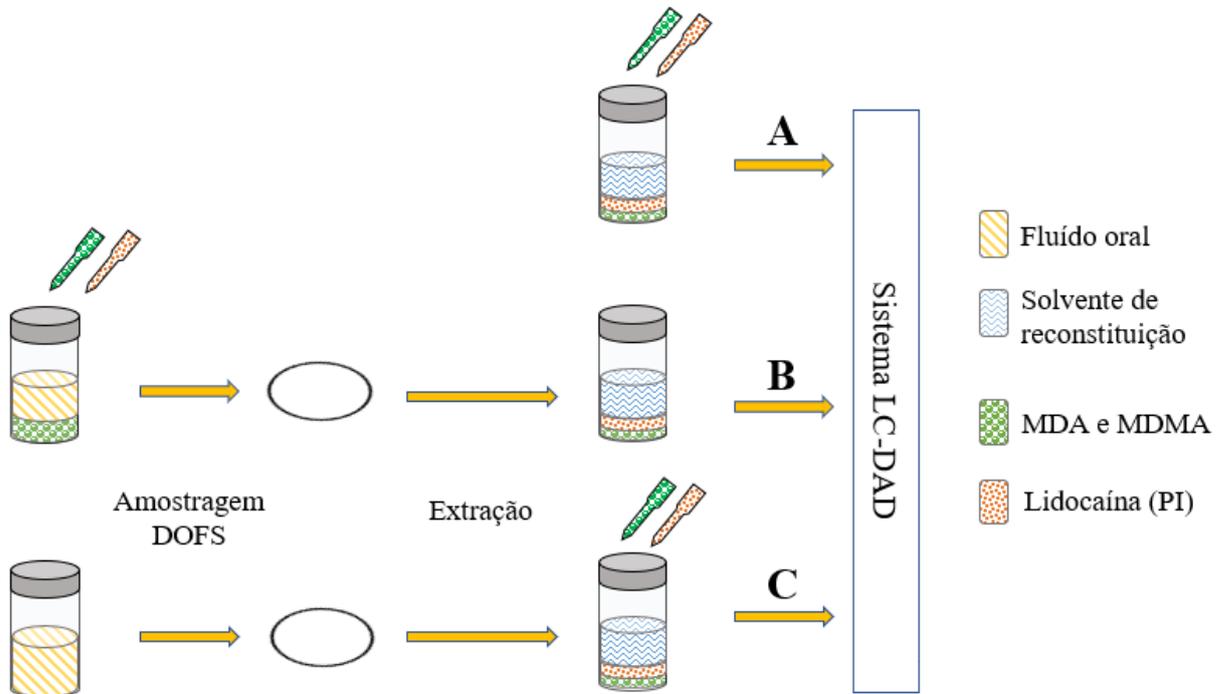
$$DPR\%_{interdia} = \frac{S_{rw}}{C_{média}} \cdot 100\% \quad \text{Equação 3}$$

Onde S_r e S_{rw} são os desvios padrão obtidos para as quintuplicatas de cada nível no mesmo dia e ao longo dos quatro dias, respectivamente, e $C_{média}$ a concentração média experimental para o respectivo conjunto de respostas. O critério de aceitabilidade foi o mesmo adotado para o ensaio de precisão (20 e 15% para o LIQ e demais níveis, respectivamente).

4.2.4.5. Recuperação, efeito matriz e eficiência do processo

A recuperação (R%), efeito matriz (EM%) e eficiência do processo (EP%) foram determinados segundo procedimento adotado por Matuszewski e colaboradores (2003). Assim, três conjuntos de amostras contendo MDA e MDMA em quatro diferentes concentrações ($0,0125, 0,0375, 2,50$ e $4,00 \mu\text{g mL}^{-1}$, $k = 3$) foram preparadas separadamente para perfazer as amostras não matrizadas (no solvente, conjunto A); amostras *DOFS* fortificadas com os padrões e PI na matriz antes do preparo de amostras (conjunto B) e as amostras *DOFS* fortificadas com os padrões e PI após extração (conjunto C), conforme esquema da **Figura 10**.

Figura 10 – Esquema para realização dos ensaios de recuperação, efeito matriz e eficiência do processo no processo de performance analítica



Fonte: Do Autor.

Os parâmetros de recuperação (R%), eficiência do processo (EP%) e efeito matriz (EM%) foram determinados com base nesses três conjuntos através das equações a seguir:

$$R\% = \frac{B}{C} \cdot 100\% \quad \text{Equação 4}$$

$$EP\% = \frac{B}{A} \cdot 100\% \quad \text{Equação 5}$$

$$EM\% = \left(\frac{C}{A} \right) \cdot 100\% \quad \text{Equação 6}$$

4.2.4.6. Robustez

A robustez foi avaliada por meio do teste de Youden, em que a resposta de sete parâmetros (**Tabela 11**) foram combinados em oito ensaios e realizados de forma aleatória, sendo que a cada mudança de condição, 20 min foram utilizados para estabilização dos sistemas LC. Utilizou-se para este ensaio amostras *DOFS* no nível CQM ($2,50 \mu\text{g mL}^{-1}$), em quadruplicata ($k = 4$). Através da combinação das variações A/a, B/b, C/c, D/d, E/e, F/f e G/g e dos resultados dados por *C1*, *C2*, *C3*, *C4*, *C5*, *C6*, *C7* e *C8*, o efeito sobre a área e resolução foram estimadas.

Tabela 11 – Combinação fatorial de oito parâmetros para avaliação da robustez

Parâmetro analítico		Combinação fatorial							
		1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	Modelo cromatográfico	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	Concentração de TFA / mmol L^{-1}	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	Porcentagem modificador / %	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	Fluxo da fase móvel / mL min^{-1}	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	Volume de Injeção / μL	E	e	E	e	e	E	E	e
F/f	Temperatura da Coluna / $^{\circ}\text{C}$	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	Comprimento de Onda / nm	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado ($k = 4$)		<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3*</i>	<i>C4</i>	<i>C5</i>	<i>C6</i>	<i>C7*</i>	<i>C8</i>

* em triplicata ($k = 3$), devido problemas com a corrida cromatográfica. Letras maiúsculas: condição original, letras minúsculas: condição de variação, A: Thermo, a: Shimadzu, B: 10 mmol L^{-1} , b: $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$, C: 25%, c: 26%, D: $1,2 \text{ mL min}^{-1}$, d: $1,1 \text{ mL min}^{-1}$, E: $25 \mu\text{L}$ e e: $26 \mu\text{L}$, F: $35 ^{\circ}\text{C}$, f: $40 ^{\circ}\text{C}$, G: 285 nm, g: 282 nm.

Os efeitos da variação em cada um dos parâmetros foram expressos em termos de erro padrão relativo da média das respostas entre a condição de variação (letras minúsculas) com a média da condição de referência (maiúsculas), conforme as Equação 7:

$$EPR\% = \frac{\text{Condições do nível baixo} - \text{Condições do nível alto}}{\text{Condições do nível alto}} \cdot 100\% \quad \text{Equação 7}$$

Considerou-se robusto o método caso apresentasse respostas de EPR% para a área dos picos inferiores a 15%, e resolução cromatográfica maior ou igual que 1,5 para os pares entre MDA, MDMA, lidocaína, cafeína e MDEA em todos os ensaios.

4.2.4.7. Estabilidade

A estabilidade das amostras matrizadas no papel foram determinadas com os controles CQB ($0,0375 \mu\text{g mL}^{-1}$) e CQA ($4,00 \mu\text{g mL}^{-1}$), em triplicata ($k = 3$). Na estabilidade de curta

duração, as amostras matrizadas foram processadas depois de serem pipetadas no papel e deixadas em repouso à temperatura ambiente por 24, 48 e 72 h. A estabilidade de longa duração, por sua vez, foi investigada através do processamento das amostras matrizadas em papel após armazenadas no congelador por 7, 15 e 30 dias. A estabilidade de pós-processamento foi avaliada armazenando-se as amostras processadas a 20 °C no autoamostrador por 12, 24 e 48 h, antes de serem injetadas no sistema LC, e a estabilidade de ciclos de congelamento e descongelamento foi obtida pelas análises das amostras após serem descongeladas em temperatura ambiente por três ciclos de 24 h. Para cada estudo, a condição de estabilidade foi aceita se a variação na concentração não fosse superior a $\pm 15\%$ em relação as concentrações iniciais (tempo zero) (ANVISA, 2012).

4.2.4.8. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LIQ)

O limite de quantificação (LIQ) foi considerado como sendo o primeiro ponto da curva analítica da qual representa a menor concentração medida com valores de precisão e exatidão dentro do limite de 20%. O limite de detecção (LD), por sua vez, foi estimado para a concentração cuja intensidade (altura) do pico fosse de pelo menos 3,0 vezes a amplitude do ruído na linha de base. Em ambos os casos, os limiares foram determinados pela análise das amostras matrizadas (em fluido oral) submetidas à extração. O limite de detecção instrumental (LDI) e de quantificação instrumental (LQI), por sua vez, foram definidos ou multiplicando o LD e LQ pelo respectivo fator de pré-concentração (enriquecimento) ou de diluição, conforme mostra a Equação 8 e Equação 9:

$$\text{LDI} = \text{LD} \cdot F_c \quad \text{Equação 8}$$

$$\text{LQI} = \text{LIQ} \cdot F_c \quad \text{Equação 9}$$

Onde F_c é a razão entre o volume de fluido oral e o volume final utilizado na extração antes de se injetar no sistema LC-DAD.

4.2.4.9. Integridade de diluição

Amostras matrizadas ($k = 5$) fortificadas com MDA e MDMA em concentrações equivalentes a cinco vezes o limite superior de quantificação (CQD, $25 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram diluídas nas proporções 1:5 e 1:10 em fluido oral branco para alcançar concentrações dentro da faixa

compreendida pela curva analítica ($5,00$ e $2,50 \mu\text{g mL}^{-1}$). Esses controles foram processados e analisados de acordo com o procedimento de amostragem e preparo de amostras, onde pipetou-se as amostras de fluido oral no papel para secagem por 4 h. A precisão e exatidão foram determinadas com o DPR% e EPR%. De acordo com os critérios de aceitabilidade, considerou-se adequado valores de até 15%.

4.2.4.10. Performance do sistema (System suitability)

O teste conhecido por *system suitability* é empregue para verificar se um método analítico é adequado para o qual ele está sendo proposto, sendo essencial para garantir a qualidade do método em termos de exatidão e precisão. A partir dos cromatogramas obtido para uma solução fortificada no nível CQM ($2,50 \mu\text{g mL}^{-1}$), os parâmetros de fator de assimetria (A_s) e eficiência (N) foram determinados (equações vide APÊNDICE B).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Cromatografia líquida / arranjo de diodos (LC-DAD)

5.1.1. Desenvolvimento do método

A fim de alcançar as melhores condições de separação, detecção e quantificação do MDA e MDMA, estudos da composição da fase móvel sobre o comportamento dos compostos foram avaliados por meio do fator de assimetria (A_s), resolução (R_s) e eficiência (N) (APÊNDICE B). Vale mencionar que, neste trabalho, somado à similaridade estrutural de ambos os metilenodioxo-substituídos (diferença apenas pelo grupo metil), os analitos possuem caráter básico devido os grupos amina e se encontram protonados em regiões de pH inferiores a 10. Essas características fazem com que o MDA e MDMA interajam com os grupos octadecil e com os silanóis residuais do processo de empacotamento das colunas analíticas de fase reversa para a cromatografia líquida, originando elevados fatores de assimetria, baixa eficiência (número de pratos teóricos) e resolução inadequada (MCCALLEY, 2010). Para isso, existem diversas recomendações para contornar estes problemas, sendo uma delas aumentar a força iônica da fase móvel de modo a tentar deslocar o equilíbrio químico da reação química $\text{Analito}^+\text{B}^- + \text{M}^+\text{SiO}^- \rightleftharpoons \text{Analito}^+\text{SiO}^- + \text{MB}$ para a esquerda, de modo que o cátion (M) e o ânion (B) provenientes do tampão possam impedir a interação direta dos analitos protonados com os silanóis residuais SiO^- da coluna. No entanto, adicionar o tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ (pH 7,00) no lugar da água em uma fase móvel com 15% acetonitrila, aumentando a força iônica do meio, não mostrou resultados satisfatórios em termos de tempo de retenção ($t_R > 22$ min para MDMA) e fator de assimetria ($A_s > 2,0$). Como o equipamento já operava em pressões próximas ao limite, concentrações maiores do tampão não foram avaliadas devido riscos de precipitação de seus sais no LC-DAD.

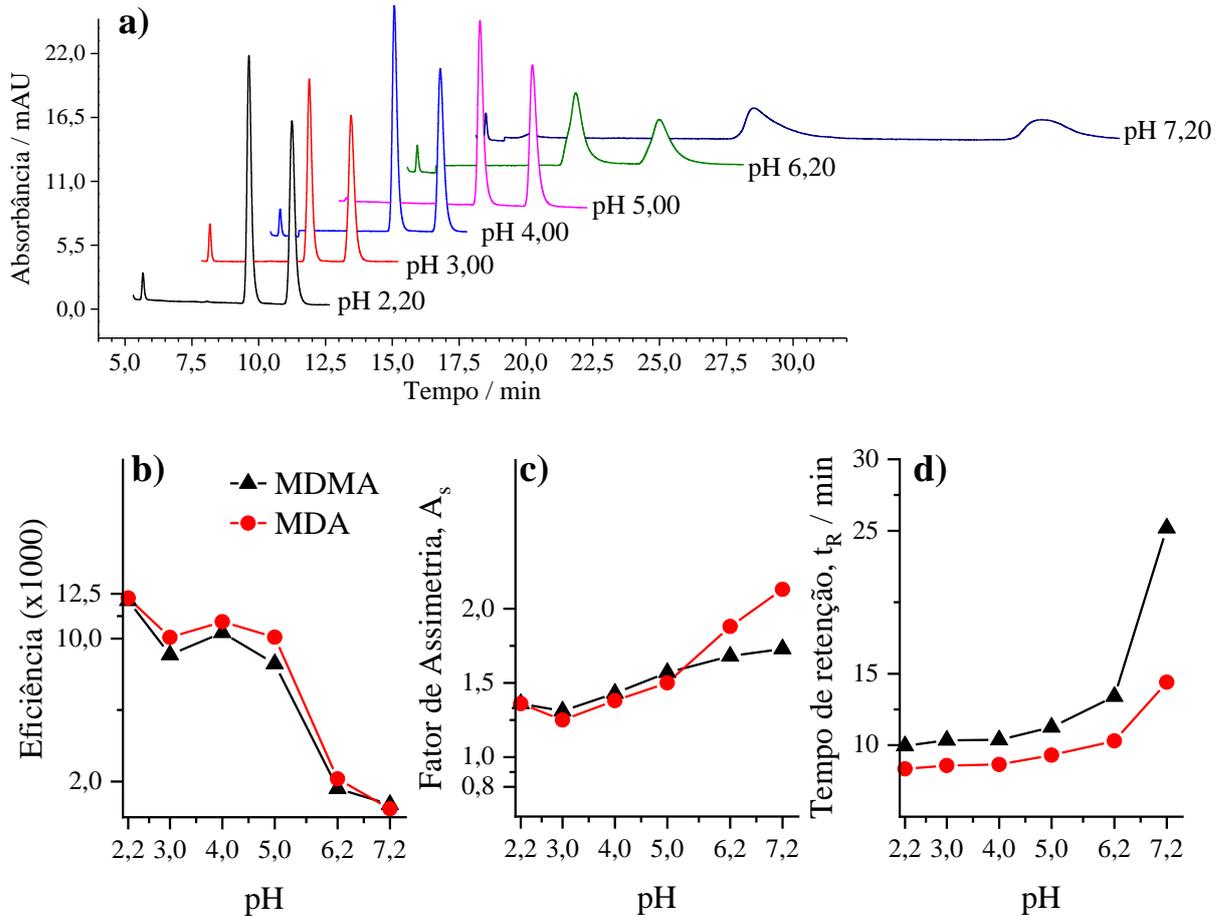
Quando os analitos são ionizáveis, uma outra opção é alterar o pH da fase móvel para valores maiores ou menores do que o pK_a dos compostos analisados (MCCALLEY, 2010). A primeira alternativa foi considerada inviável para ambos os analitos MDA e MDMA, já que estes possuem pK_a próximo de 10 e as colunas utilizadas neste trabalho, com suporte de sílica, suportam valores de pH entre 2,0 e 8,0. A segunda abordagem, entretanto, é comumente utilizada na resolução destes problemas. A UNODC (2006), por exemplo, sugere que o procedimento envolva a utilização de colunas analíticas C8 ou C18, e tenha em sua fase móvel tampão fosfato com valor de pH entre 2,0 e 3,2, na proporção entre 80 e 98% em relação ao modificador orgânico (acetonitrila ou metanol). Desta forma, o procedimento foi configurado para uma fase constituída de tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ (pH 3,00) e acetonitrila na proporção

de 85:15 v/v a um fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura da coluna C18 de $30 \text{ }^\circ\text{C}$, volume de injeção de $25 \text{ } \mu\text{L}$ e detecção a 210 nm . Partindo-se desta condição geral, fator de cauda, resolução e eficiência dos picos foram estudados.

5.1.1.1. Etapa 1: pH da fase tamponante

O controle do pH pode desempenhar significantes alterações na seletividade e performance cromatográfica (e. g., tempo de retenção e simetria dos picos) dos analitos de caráter básico, uma vez que a pouca retenção dos analitos e interações indesejadas com os grupo silanóis das fases estacionárias são dificuldades frequentes quando estes são separados por cromatografia em fase reversa (MCCALLEY, 2010). A **Figura 11** mostra os cromatogramas e resultados dos picos analíticos eluídos quando o pH da solução tamponante (medido na solução aquosa) é variado na faixa entre 2,20 e 7,20.

Figura 11 – (a) Cromatograma LC-DAD, (b) eficiência, (c) fator de assimetria e (d) tempo de retenção dos picos de MDA e MDMA quando o pH do tampão é variado entre 2,2 e 7,2



Condições: coluna C18 (25 cm x 4,6 mm, $5 \text{ } \mu\text{m}$), injeção de $25 \text{ } \mu\text{L}$ da solução $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, tampão fosfato 20 mmol L^{-1} e acetonitrila (85:15, v/v) a $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, coluna termostatizada a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e detecção a 290 nm . MDA sempre elui antes do MDMA. Fonte: Do Autor.

Baseado nos resultados, semelhanças na performance cromatográfica são observadas em regiões de pH baixo-moderado (2,20 – 5,00), com significativa variação quando com tampão fosfato a pH 6,20 e 7,20. Essa variação nos resultados de eficiência (**Figura 11b**), assimetria (**Figura 11c**) e tempo de retenção (**Figura 11d**) é descrita como sendo resultado do contraste entre a extensão da ionização dos analitos ($pK_a \approx 10$) e dos silanóis residuais ($pK_a \approx 4,5$) nas fases estacionárias, que se tornam pronunciadas em regiões de baixo e alto pH, respectivamente (FORNSTEDT; FORSSÉN; WESTERLUND, 2015). Nesse sentido, apesar de ambos o MDA e MDMA se encontrem na forma iônica em todos os valores de pH avaliados, os silanóis começam a ser desprotonados à medida que o pH da fase móvel se aproxima de 4,50 (BOCIAN; BUSZEWSKI, 2012) e, por estarem ionizados negativamente, exercem maior interação com os analitos devido as interações de troca iônica $\text{Analito}^+\text{SiO}^-$, o que eleva o tempo de eluição dos compostos da coluna analítica. Além disso, segundo Fornstedt, Forssén e Westerlund (2015) e García-Alvarez-Coque, Baeza-Baeza e Ramis-Ramos (2015), essas interações são fortes o suficiente para diminuir a cinética de adsorção-dessorção e prejudicar a difusão molecular dos analitos no interior da coluna. Além disso, o equilíbrio químico dos analitos tem como resposta seu deslocamento para as formas neutras à medida em que o pH da fase móvel aumenta, fazendo com que as interações hidrofóbicas se tornam cada vez mais significantes entre os grupos alquil e os derivados metilenodioxí. Combinados, o maior tempo de eluição reflete em efeitos deletérios na simetria e eficiência dos picos.

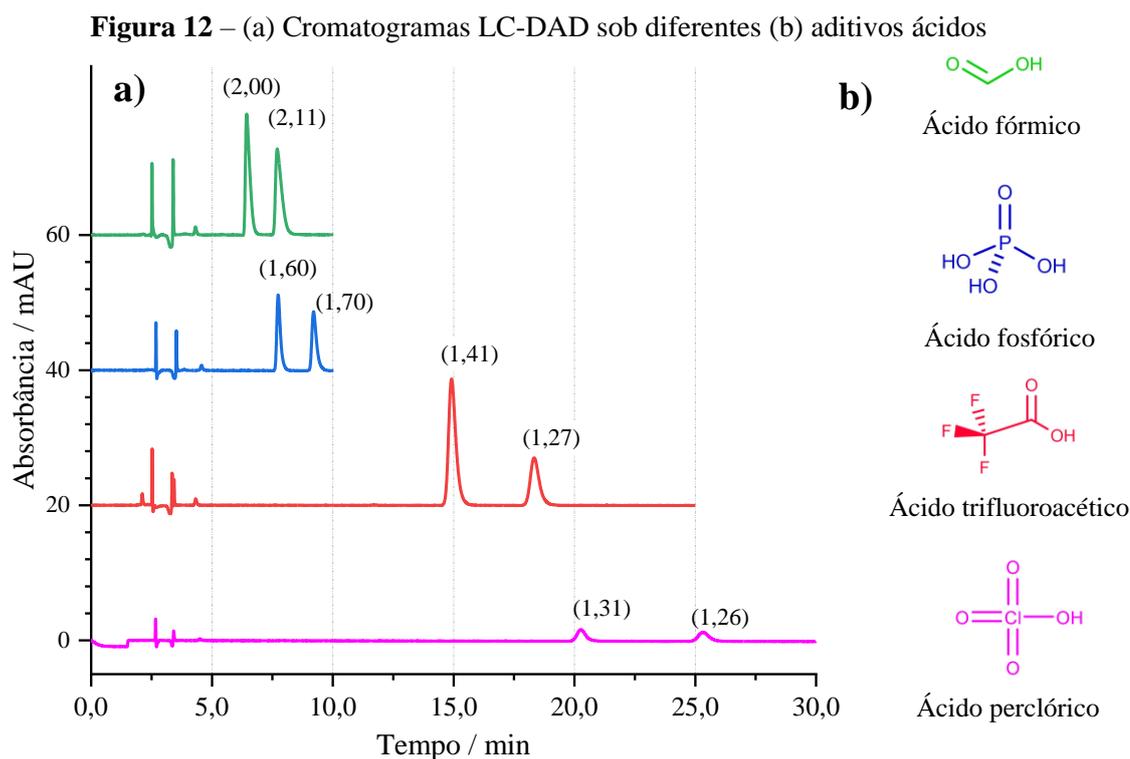
Assim, diante dos resultados apresentados, escolheu-se utilizar nos próximos estudos sistemas em que o pH estivesse entre 2,0 e 4,0. Nessa faixa, a performance da análise de analitos básicos é favorecida, uma vez que a ionização dos silanóis são suprimidas e as interações eletrostáticas dão lugar para interações mais fracas que favorecem a eluição dos analitos.

5.1.1.2. Etapa 2: Substituição do tampão por aditivos

Em seguida, como os resultados mostraram a contribuição do pH em regiões ácidas para os parâmetros cromatográficos, nas condições pré-estabelecidas, propôs-se avaliar se a simples adição de ácidos também apresentaria respostas adequadas. Desta forma, na etapa 2, foram utilizados quatro ácidos de diferentes forças de acidez: ácido fosfórico ($pK_a = 2,1$), ácido perclórico ($pK_a \approx -8,0$), ácido fórmico ($pK_a = 3,8$) e o ácido trifluoroacético ($pK_a = 0,3$). Os dois primeiros foram selecionados por serem compatíveis em sistemas de detecção por ultravioleta e similares, apresentando baixos limiares de corte (UV *cut-off*, $\lambda < 200$ nm),

enquanto os dois últimos pela compatibilidade com métodos baseados em espectrometria de massas, mostrando-se voláteis (DOLAN, 2012).

Ao se adicionar os ácidos na porção aquosa da fase móvel para perfazer soluções na concentração de 10 mmol L^{-1} , o pH foi medido com auxílio do pHmetro portátil. O valor encontrado para os aditivos foi de aproximadamente 2,00 para o TFA e ácido perclórico, de 2,20 para o ácido fosfórico e de 2,80 para o ácido fórmico, o qual, na verdade, demonstra que os dois ácidos de maior força ácida se encontram predominantemente como íons perclorato e trifluoroacetato em solução, enquanto o ácido fosfórico parcialmente ionizado em dihidrogenofosfato e ácido fórmico em sua forma neutra. Assim, a influência da presença do ácido protonado ou desprotonado na fase móvel sobre a separação foi investigada em função do tempo de retenção e da simetria dos picos e, através da **Figura 12a**, é possível observar o perfil cromatográfico obtido para cada um dos aditivos testados, no qual os ácidos fórmico e perclórico tiveram comportamentos extremos.



Condições: coluna C18 a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, injeção de $25 \text{ } \mu\text{L}$ da solução $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, aditivo 10 mmol L^{-1} e acetonitrila (85:15, v/v) a $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e detecção a 290 nm . Fatores de assimetria estão indicados em parênteses. Fonte: Do Autor.

Sob primeira inspeção da **Figura 12a** é possível notar que os ácidos fórmico e fosfórico possuem efeitos semelhantes sobre os analitos protonados em relação ao tempo de retenção e simetria, em oposição aos ácidos trifluoroacético e perclórico. Essa diferença de

comportamento está relacionada às propriedades estruturais dos aditivos (**Figura 12b**) e ao pH da fase móvel. Enquanto o ácido fórmico e a mistura ácido fosfórico/dihidrogenofosfato na fase móvel apresentaram tempo de retenção entre 6,0 e 10,0 min e assimetria superior a 1,6 nos dois casos, os íons perclorato e trifluoroacetato tiveram boa performance em termos de assimetria, com $A_s \leq 1,41$ (MDMA) e $A_s \leq 1,27$ (MDMA), apesar do maior tempo de corrida, podendo chegar a 26 min para o MDMA eluir completamente quando o ácido perclórico é utilizado.

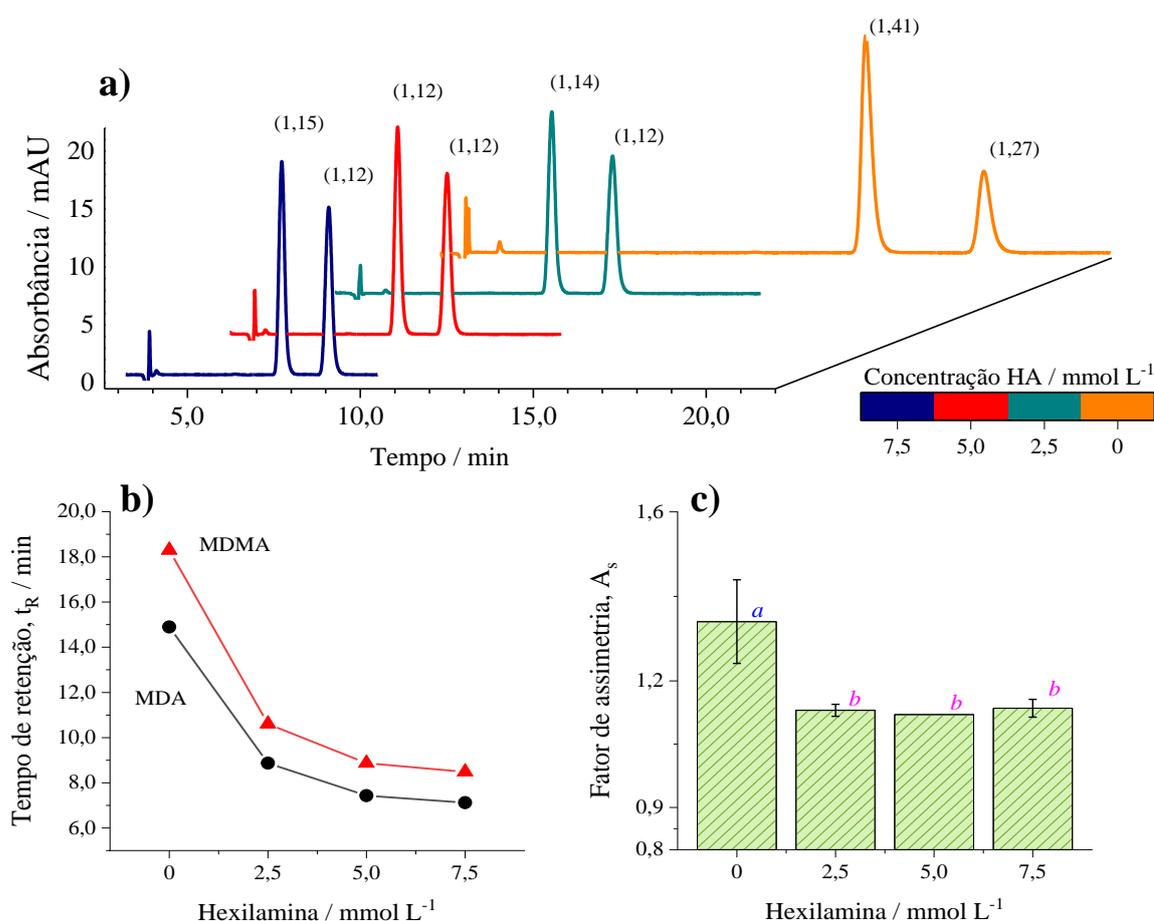
A explicação para estas observações está embasada em uma terceira abordagem para análise de analitos de caráter básico: a simples adição de substâncias que possuem a capacidade de bloquear a interação iônica entre o analito básico e o silanol residual (MCCALLEY, 2010). Um dos exemplos é o caso dos compostos como os íons perclorato, trifluoroacetato e, dependendo das condições de pH da fase móvel e pK_a dos analitos, dos íons dihidrogenofosfato ($pH > 2,20$) e formiato ($pH > 3,8$) (DAI; CARR, 2009; MCCALLEY, 2010). Estes ânions de ácidos são capazes de interagir com o grupo amina protonado dos analitos formando pares iônicos neutros na fase móvel, o que permite a retenção desse complexo neutro na fase estacionária por interações hidrofóbicas (HORVATH et al., 1977; LOBRUTTO et al., 2001). Na região de pH de que cada um dos ácidos avaliados, a concentração de seus respectivos ânions segue a tendência perclorato > trifluoroacetato > fosfato > formiato. Em pH 2,8 e 2,2, apenas 10 e 60% dos ácidos fórmico e fosfórico estão desprotonados, respectivamente, o que limita a capacidade de ambos formarem pares iônicos com os analitos. A respeito da diferença entre os ácidos perclórico e trifluoroacético, totalmente ionizados em solução, deve-se mencionar que o trifluoroacetato apresenta maior raio molecular e maior hidrofobicidade em comparação ao íon perclorato. Isso implica em uma menor eficiência na sua associação ao analito para formação do par iônico e, conseqüentemente, no menor tempo de eluição do MDA e MDMA quando ácido trifluoroacético é empregado na solução. Desta forma, baseando-se no equilíbrio entre simetria e tempo de retenção, o TFA foi utilizado para as próximas avaliações.

5.1.1.3. Etapa 3: Adição de reagente de supressão iônica

Dentre os aditivos ácidos, o TFA apresentou resultados desejados em termos de simetria e tempo de retenção ($A_s \leq 1,41$ e $t_R < 20$ min). No entanto, para melhorar esses parâmetros, em especial o tempo de análise, optou-se por avaliar o efeito do reagente de supressão iônica n-hexilamina ($pK_a = 10,6$) na fase móvel (etapa 3) sobre a simetria e tempo de retenção do MDA e MDMA. A supressão iônica é o segundo caso da abordagem para impedir a interação direta dos analitos catiônicos com a os grupos silanóis residuais (MCCALLEY, 2010). Aqui,

substâncias com grupo amino são empregues para bloquear o acesso dos analitos protonados aos silanóis residuais da fase estacionária e, em alguns casos, aumentar a velocidade de eluição dos compostos de interesse. Já que a n-hexilamina consegue adsorver na FE, tornando-a carregada positivamente, os compostos básicos protonados são repelidos, forçando tempos de eluição menores. Com a **Figura 13** é possível notar que a presença de 2,5 mmol L⁻¹ HA na fase móvel foi capaz de reduzir significativamente o tempo de retenção e o fator de assimetria dos picos (**Figura 13b-c**), com uma tendência de estabilização para as concentrações superiores. Em média, observou-se uma redução de 40 % no tempo de corrida e no fator de assimetria. Concentrações superiores a 2,5 mmol L⁻¹ de hexilamina não forneceram diferenças significantes ($\alpha = 0,05$) entre as médias do fator de assimetria, A_s .

Figura 13 – (a) Cromatogramas LC-DAD, (b) tempo de retenção e (c) média do fator de assimetria para diferentes concentrações de n-hexilamina (2,5, 5,0 e 7,5 mmol L⁻¹)



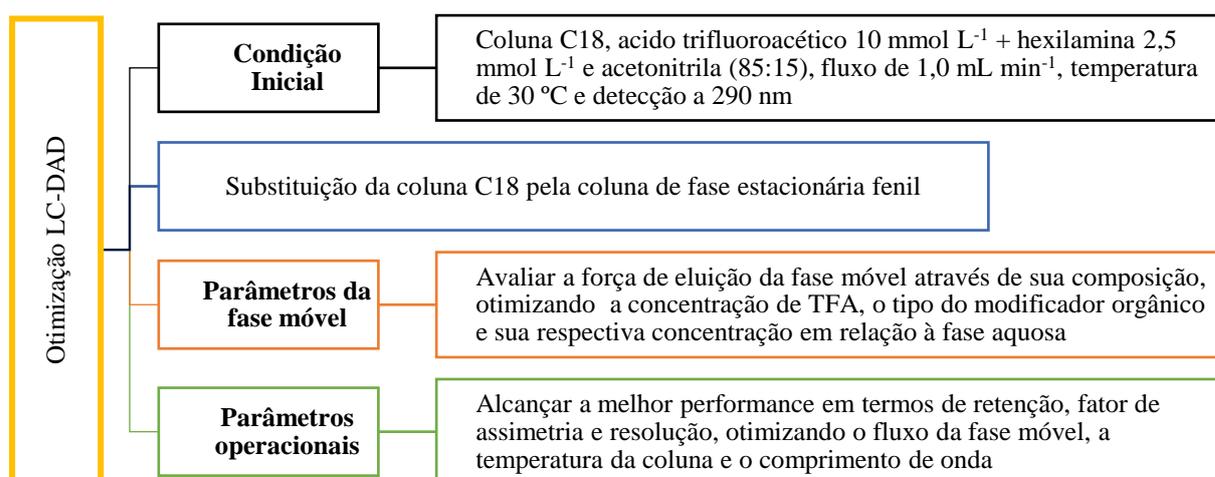
Condições: coluna C18 a 30 °C, injeção de 25 µL da solução 10 µg mL⁻¹, TFA 10 mmol L⁻¹ e acetonitrila (85:15, v/v) a 1,0 mL min⁻¹ e detecção a 290 nm. Em (a), fatores de assimetria estão indicados em parênteses, e em (c) letras diferentes indicam diferença significativa entre as médias ($k = 2$, $p < 0,05$) pelo teste de Tukey. Fonte: Do Autor.

Diversos estudos na literatura já avaliaram a efetividade de diferentes amins como agentes bloqueadores dos silanóis residuais, o que torna essa estratégia conhecida em procedimentos cromatográficos mesmo depois do desenvolvimento novas fases estacionárias. Calabuig-Hernández, García-Alvarez-Coque e Ruiz-Angel (2016) e Gasco-López (1997), por exemplo, estudaram diversos tipos de amins quanto a sua influência na diminuição dos valores de fator de cauda e tempo de retenção no perfil de compostos neutros, ácidos e básicos. Em ambos os estudos, a hexilamina apresentou bons resultados na redução da retenção e simetria dos picos dos analitos básicos. Não só isso, comparado aos outros bloqueadores de silanóis, seu efeito é alcançado em menores concentrações, fato que corrobora com os resultados deste trabalho, em que apenas 2,5 mmol L⁻¹ foram necessários. Assim, a hexilamina foi selecionada para prosseguir com a otimização do método.

5.1.2. Otimização dos parâmetros operacionais

Antes do processo de otimização do método LC-DAD, a coluna de fase octadecil previamente utilizada apresentou sinais de entupimento, com pressões superiores ao limite estabelecido do equipamento mesmo em baixos fluxos da fase móvel. Em razão disso, as condições cromatográficas anteriormente obtidas na coluna C18 tiveram de ser transpostas para um método baseado na fase estacionária fenil (PH) antes de se iniciar a avaliação dos parâmetros da fase móvel e do equipamento (**Figura 14**).

Figura 14 – Etapas realizadas durante a otimização do método por cromatografia líquida

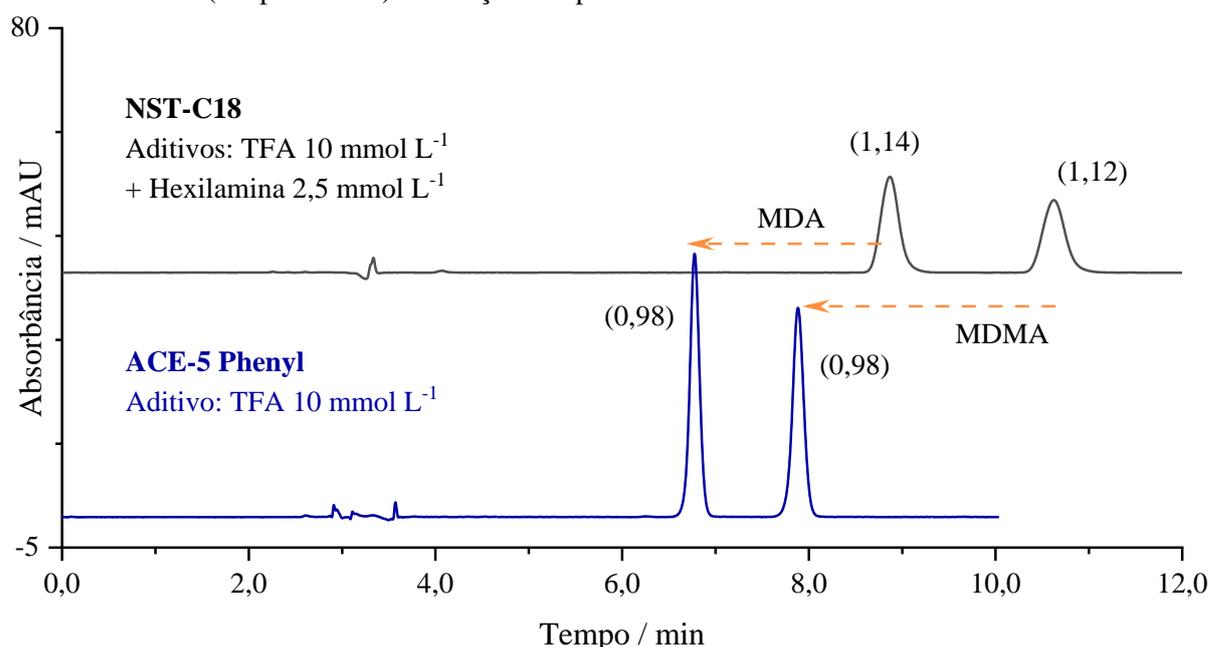


Fonte: Do Autor.

5.1.2.1. Substituição da coluna de fase estacionária C18 por fase fenil

Ao transpor o método, observou-se vantagens quanto ao tempo de retenção, reduzido em cerca de 1,3 vezes (25 %), e quanto à simetria dos picos, com valores se aproximando da unidade. Desta forma, desconsiderou-se a necessidade de reavaliar a adição de hexilamina na fase móvel. O resultado dessa mudança pode ser visualizado na **Figura 15**, em que os cromatogramas obtidos para os analitos nas colunas C18 e PH foram comparados.

Figura 15 – Cromatogramas LC-DAD da solução $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ mostrando a variação do fator de assimetria (em parênteses) e retenção dos picos entre as colunas de fase octadecil e fenil.

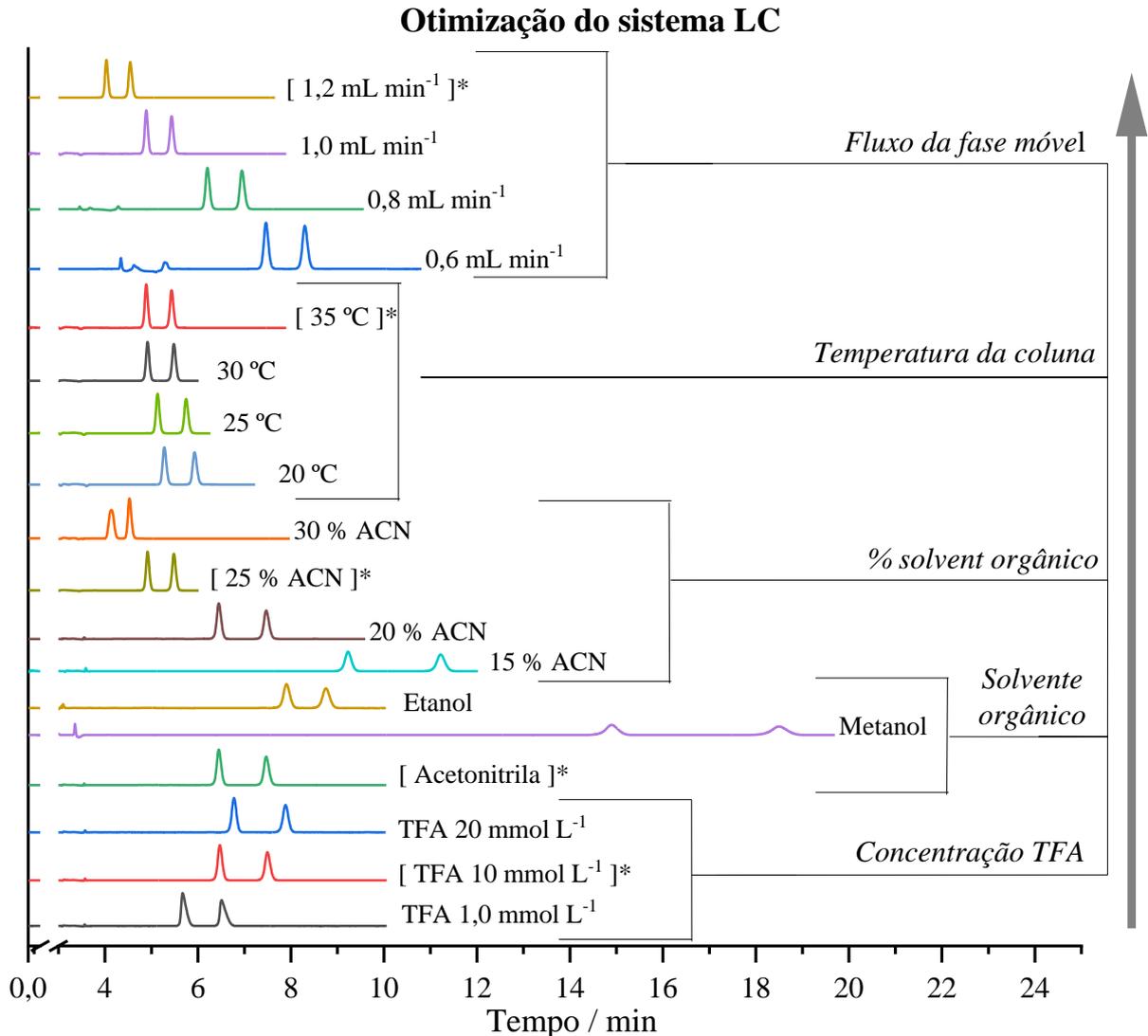


Condições: coluna analítica (25 cm x 4,6 mm, $5 \mu\text{m}$) a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, injeção de $25 \mu\text{L}$, água:acetonitrila (80:20, v/v), fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e detecção a 290 nm . Fonte: Do Autor.

5.1.2.2. Parâmetros LC e condições da fase móvel

A fim de avaliar os efeitos da composição da fase móvel e dos parâmetros operacionais sobre a análise dos dois metilenodioxo-substituídos, otimizou-se cindo diferentes variáveis de forma univariada, iniciando-se pela seguinte condição cromatográfica: MDA e MDMA foram separados em coluna fenil a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, utilizando TFA 10 mmol L^{-1} e acetonitrila (80:20, v/v) como fase móvel a $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Os cromatogramas foram estudados individualmente considerando a resolução, o fator de assimetria, eficiência dos picos e tempo de corrida. Os cromatogramas LC-DAD obtidos durante esta etapa, utilizando-se a concentração dos padrões e volume de injeção a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $25 \mu\text{L}$, respectivamente, estão apresentados na **Figura 16**. As condições selecionadas estão em colchetes e indicadas com asterisco.

Figura 16 – Cromatogramas LC-DAD durante a otimização com uma solução padrão contendo MDA e MDMA a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$



Condições: coluna fenil (25 cm x 4,6 mm, 5 μm) e detecção a 290 nm. A condição selecionada em cada etapa é indicada pelos colchetes e asterisco. Fonte: Do Autor.

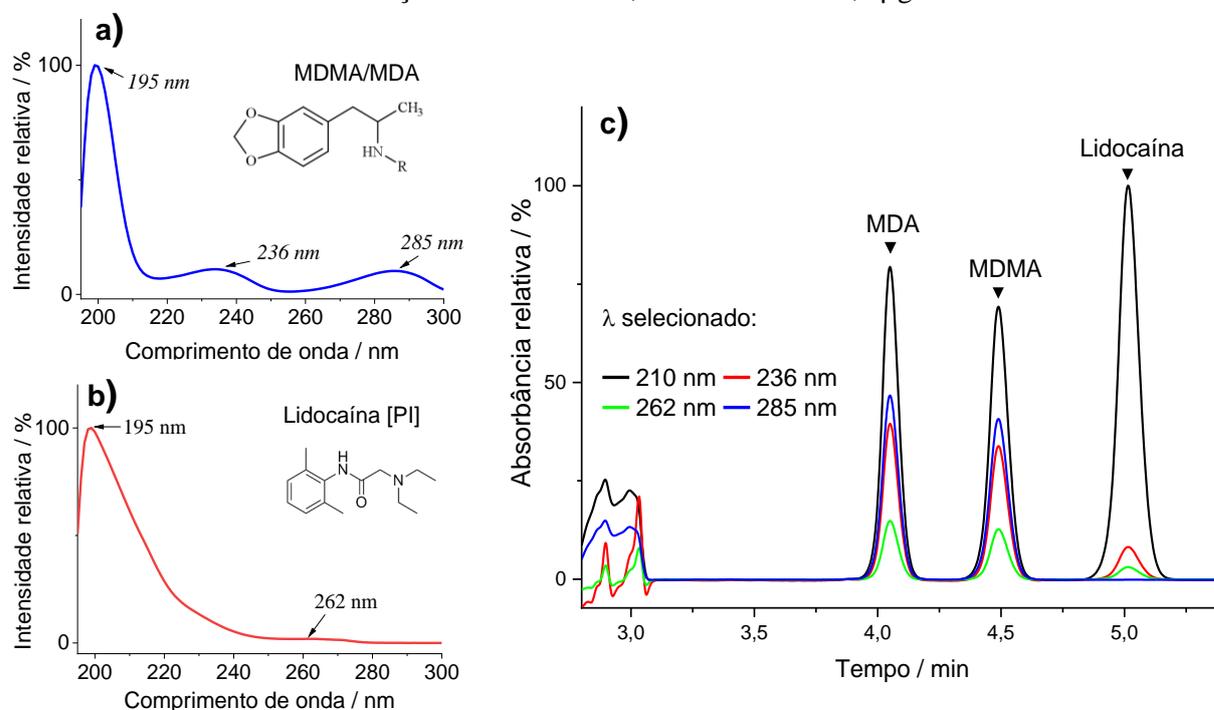
A partir dos resultados, foi verificado que o TFA na concentração final de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ não foi o suficiente para suprimir as interações silanofílicas pela formação do par iônico $\text{Analito}^+\text{TFA}^-$, o que resultou em $A_s \geq 1,6$. Por outro lado, não houve diferença significativa quando utilizou 20 mmol L^{-1} de TFA na solução aquosa, motivo pelo qual se optou por continuar utilizando o ácido na concentração de 10 mmol L^{-1} . Quanto aos solventes avaliados, menor pressão de trabalho, redução no tempo de retenção e picos com maior eficiência foram observados com uso da acetonitrila como modificador orgânico. Com a adição de 30 % (v/v) de acetonitrila à fase móvel, picos menos simétricos foram observados. Em função da melhor resposta do tempo de eluição, eficiência e simetria, 25 % (v/v) de acetonitrila foi a proporção selecionada na otimização. Em relação à temperatura, a performance cromatográfica foi

superior em 35 °C. Fluxos inferiores e superiores a 1,0 mL min⁻¹ resultaram em picos mais alargados e com menor número de pratos teóricos, respectivamente, mas sem diferenças significativas para o fator de cauda entre as condições avaliadas. Em prol do menor tempo de corrida, definiu-se o fluxo como 1,2 mL min⁻¹. Assim, um bom compromisso entre a menor pressão de trabalho e a melhor performance cromatográfica foi obtida com a fase móvel TFA 10 mmol L⁻¹:acetonitrila (75:25, v/v), em modo isocrático de eluição a 1,2 mL min⁻¹; e fase estacionária fenil, mantida a 35 °C. O tempo de corrida foi de aproximadamente 5,5 min.

5.1.2.3. Parâmetro DAD: comprimento de onda

A escolha do comprimento de onda a ser monitorado durante as análises foi baseado no espectro ultravioleta dos analitos (**Figura 17a**) e da lidocaína (PI, **Figura 17b**), registrado entre 195 e 300 nm. Partindo-se dos comprimentos de onda de máxima absorção, indicados pelas setas na **Figura 17a-b**, observou-se que a sensibilidade de detecção no cromatograma do MDA e MDMA seguiu a ordem 210 > 285 > 236 > 262 nm (**Figura 17c**). Para a lidocaína, a tendência encontrada foi de 210 > 236 > 262 > 285 nm.

Figura 17 – Espectros UV dos (a) analitos e do (b) padrão interno (lidocaína), e (c) cromatograma LC de uma solução contendo MDA, MDMA e PI a 10,0 µg mL⁻¹



Condições: coluna fenil (25 cm x 4,6 mm, 5 µm) a 35 °C, injeção de 25 µL, TFA 10 mmol L⁻¹ e acetonitrila (75:25, v/v) a 1,2 mL min⁻¹. Fonte: Do Autor.

Apesar de uma alta sensibilidade (capacidade de detectar/quantificar baixas concentrações dos analitos) ser preferível, comprimentos de onda na faixa de 195 a 210 nm são facilmente passíveis de interferência, uma vez que diversos grupos químicos absorvem nesta mesma região (e. g., aminas, bissulfetos, cetonas, aldeídos, carboxilas, ésteres e benzenos) (SWARTZ, 2010). Em trabalhos com amostras biológicas, cuja composição endógena inclui proteínas, enzimas e outras substâncias orgânicas em menor quantidade, essa nem sempre é a melhor opção. Desta forma, como comprimentos de ondas maiores tendem a ser mais seletivos e possuem menor interferência de ruídos, 285 nm foi selecionado para o MDA e MDMA. Para a lidocaína, que possui baixa absorção em $\lambda > 280$ nm, selecionou-se $\lambda_{\text{máx}} = 262$ nm.

5.1.3. Considerações sobre a LC-DAD

Por meio do método desenvolvido e otimizado, a separação entre MDA, MDMA e lidocaína (PI) se mostrou adequada por *LC-DAD* quando conduzida em coluna analítica fenil (250 x 4,6 mm, 5 μm) termostaticada a 35 °C. A eluição em modo isocrático a 1,2 mL min⁻¹ e a fase móvel, composta de ácido trifluoroacético 10 mmol L⁻¹ em água ultrapura e acetonitrila (75:25, v/v), permitiu que todos os compostos de interesse fossem detectados dentro de uma corrida cromatográfica de apenas 5,5 min. As condições de detecção, obtida a partir do espectro ultravioleta fornecido pelo arranjo de diodos, permitiu selecionar os melhores comprimentos de onda (285 e 262 nm) em termos de sensibilidade e seletividade para todos os compostos.

Comparando com outros trabalhos na literatura (**Tabela 12**) que empregam cromatografia líquida, é possível observar diferenças principalmente na coluna, na composição da fase móvel e, conseqüentemente, no tempo de análise. Em relação a dimensão da coluna, a deste trabalho tem a maior dimensão geral (250 x 4,6 mm, 5 μm), o que pode acarretar desvantagens como maior consumo de solvente e tempo de análise. Apesar de colunas de menor dimensão com partículas menores contribuírem para tempos de análise mais rápidos e em maior redução do consumo de solvente, essa opção leva a maiores pressões de trabalho que podem ser superadas apenas por sistemas mais avançados como a cromatografia líquida de ultra eficiência (*UHPLC*), que não é o caso do sistema LC empregado neste trabalho e nem do objetivo de tornar o método acessível para laboratórios que não possuem deste orçamento. Embora esse ponto tenha de ser mencionado, o tempo de corrida ainda foi comparável em relação a alguns trabalhos. Por exemplo, para Naqi e colaboradores (2019), que utilizaram uma coluna de comprimento 4x menor (2,1 mm d.i., 1,7 μm) e TFA na fase móvel, o tempo de corrida para o MDMA foi de 8,0 min, não apresentando grande diferença em relação ao trabalho desenvolvido (5,5 min).

Quanto a fase estacionária, colunas de fase reversa com ligantes fenil, pentafluorofenil, octadecil e octil, e aquelas com apenas sílica foram observados (CONCHEIRO et al., 2005; CHAN; RAMLI, 2018; JACQUES; DOS SANTOS; LIMBERGER, 2019; DUARTE et al., 2020). Enquanto a C18 e C8 mostram fortes/moderadas interações hidrofóbicas e são utilizadas em diferentes aplicações (considerada “universal”), as baseadas em fenil adicionam ainda as interações π - π e dipolo-dipolo, e podem fornecer seletividade adicional para as separações. Nesse sentido, como grande parte das substâncias de interesse forense apresentam estruturas com grupos aromáticos, colunas fenil se tornam adequadas para estas aplicações.

A composição da fase móvel é de extrema importância para o método desenvolvido. No que diz respeito ao MDMA e drogas básicas de forma geral, a maioria dos trabalhos que utilizam o *DAD* e *FD* como detectores incluem o uso de ácidos inorgânicos, fase móveis com alta concentração da fase aquosa, agentes de pareamento iônico e tampões não voláteis (UNODC, 2006; LURIE; LI, 2009; CHAN; RAMLI, 2018; DUARTE et al., 2020). Em todos esses casos, embora o perfil cromatográfico possa melhorar, a vida útil da coluna tende a ser diminuída. Substâncias podem se ligar fortemente a fase estacionária (e. g., trietilamina e hexilamina), alto conteúdo de água pode levar ao colapso da estrutura do leito da coluna (em especial para fases octil e octadecil tradicionais) e tampões fornecem riscos de precipitação de seus sais dentro do sistema *LC*. Apesar de a fase móvel desenvolvida neste trabalho apresentar um ácido forte (TFA 10 mmol L⁻¹), ele está em baixas concentrações o suficiente para fornecer bons parâmetros cromatográficos em termos de retenção e simetria dos picos. Adicionalmente, por ser volátil, o TFA oferece uma grande vantagem de ser compatível também com os procedimentos *LC* baseados em espectrometria de massas, permitindo que aqueles laboratórios que possuem *LC-MS* ou *LC-MS/MS* possam transpor o método sem maiores dificuldades.

Em contraste ao métodos baseados em *MS*, que ainda não são uma realidade para muitos laboratórios de baixo orçamento devido seu alto custo operacional, o detector por arranjo de diodos é relativamente barato, apresenta boa performance e reprodutibilidade e possibilita o registro do espectro UV das substâncias analisadas para análises qualitativas (DUARTE et al., 2020). Sua grande limitação, entretanto, está no fato de os compostos precisarem apresentar em sua estrutura grupos que absorvam a radiação eletromagnética (grupos cromóforos).

Tabela 12 – Comparação das condições cromatográficas de trabalhos que empregam cromatografia líquida para determinação de MDMA e/ou MDA

Detector	Fase estacionária	Fase móvel (% solvente)	Fluxo	T	$\lambda_{\text{máx}}$	t	Referência
			mL min ⁻¹	°C	nm	min	
DAD	Fenil (250 x 4,6 mm, 5,0 μm)	A: Ácido trifluoroacético 10 mmol L ⁻¹ (75 %) B: acetonitrila (25 %)	1,2	35	285 262	5,5	Este trabalho
DAD	Fenil (250 x 4,6 mm, 5,0 μm)	A: Ácido fórmico 0,1 % + NH ₄ OH, pH 5,0 (85 %) B: etanol (15 %)	1,0	40	210	9,0	(DUARTE et al., 2020)
FD	Octadecil (100 x 2,1 mm, 2,6 μm)	A: Água ultrapura (94-0 %) B: Metanol (6-100 %)	0,3	42	283 324	14	(CABAL et al., 2019)
DAD	Pentafluorofenil (150 x 4,6 mm, 5,0 μm)	A: Ácido fosfórico 0,5% + hexilamina 0,3 % (93 %) B: Acetonitrila (7,0 %)	1,0	35	192	12	(CHAN; RAMLI, 2018)
DAD	Octadecil (50 x 2,1 mm, 1,8 μm)	A: Tampão fosfato 100 mmol L ⁻¹ , pH 1,8 (97-5 %) B: Acetonitrila (3-95 %)	0,8	95	210	3,0	(LURIE; LI, 2009)
MS	Sílica (150 x 4,6 mm, 2,6 μm)	A: Acetonitrila (55 %) B: Tampão acetato de amônio 14 mmol L ⁻¹ (35 %) C: Metanol (10 %)	0,6	30	-	8,0	(JACQUES; DOS SANTOS; LIMBERGER, 2019)
MS/MS	Sílica (100 x 2,1 mm, 1,8 μm)	A: Acetonitrila + NH ₄ HCO ₂ 2 mmol L ⁻¹ 95:5 v/v (10-95 %) B: NH ₄ HCO ₂ 2 mmol L ⁻¹ + acetonitrila 95:5 v/v (90-5 %)	0,4	35	-	3,0	(SIMÕES; CASTAÑERA AJENJO; DIAS, 2018)
MS	Octadecil (50 x 2,1 mm, 1,7 μm)	A: Ácido trifluoroacético 0,1 % v/v (1-100 %) B: Acetonitrila + TFA 0,1 % v/v (99-0 %)	0,3	25	-	8,0	(NAQI; HUSBANDS; BLAGBROUGH, 2019)

DAD: detector por arranjo de diodos, FD: detector de fluorescência, MS: espectrometria de massas, NH₄OH: hidróxido de amônio, NH₄HCO₂: formiato de amônio, A, B e C: solventes para fase móvel, TFA: ácido trifluoroacético

5.2. Dried Oral Fluid Spot (DOFS)

Através das condições cromatográficas estabelecidas para a separação dos derivados metilenodioxido, iniciou-se o desenvolvimento do procedimento envolvendo o preparo e extração de amostras por *dried oral fluid spots*. Em *DOFS*, há diversos fatores que podem contribuir para a remoção dos analitos do papel, sendo os mais comuns o tipo de papel utilizado para as manchas de fluido oral, as propriedades físico-químicas dos analitos, a técnica extrativa utilizada para remoção dos analitos (e. g., *LSE*, *SPE*, *LLE* ou *PPT*) e suas condições de extração. Desta forma, a estratégia foi avaliar diferentes papéis obtidos de papelaria, que não são desenvolvidas para este propósito, diferentes solventes e/ou misturas de solventes, e o tempo de extração, em função da recuperação do MDA e MDMA. Vale mencionar, portanto, que o procedimento inicial para a formação da mancha e as etapas subsequentes de extração foram baseadas no trabalho de Abdel-Rehim e Abdel-Rehim (2014), em que 50 µL de *OF* contendo lidocaína foi pipetado sobre o papel filtro e deixado secar completamente para posterior extração orgânica com acetonitrila e análise por LC-MS. Neste trabalho, entretanto, após o fluido oral contendo os analitos e a solução de lidocaína ser acondicionado no papel, o mesmo foi seco em temperatura ambiente, cortado e transferido para um *vial* contendo metanol. A alteração do solvente extrator foi baseada na solubilidade dos analitos.

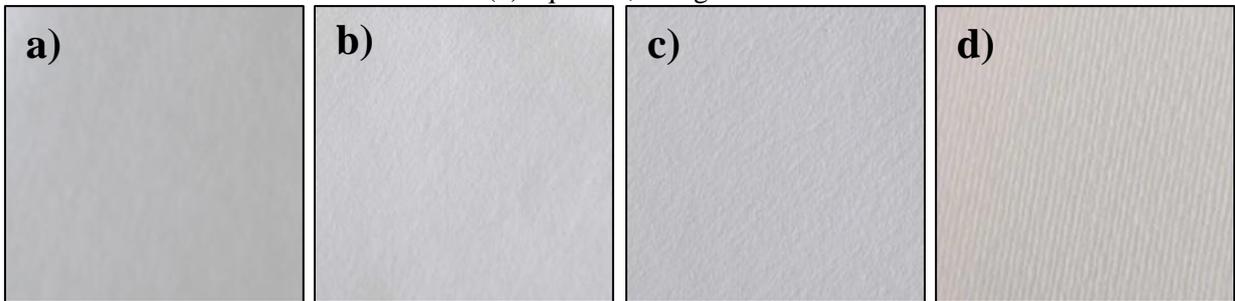
5.2.1. Seleção do papel

As matrizes de papel empregues para a formação de manchas secas geralmente são baseadas em uma composição de celulose e possuem dimensões específicas para o tamanho do poro e espessura (AYRE et al., 2018). Sendo assim, esses papéis filtro são comercialmente disponibilizados sob diferentes formas para atender as várias propostas, desde técnicas de triagem até métodos quantitativos. Diversos trabalhos na literatura (Tabela 8) utilizam o papel Whatman® 903 como suporte para a determinação de drogas de abuso por *dried matrix spotting*. Essa escolha se dá, entre outros motivos, pelo menor custo¹ (100 unidades por aproximadamente R\$ 1115,00) em relação aos outros modelos de papel como o DMPK (mesma quantidade por R\$ 4552,00), que possuem em sua composição agentes desnaturantes capazes de inibir a ação de enzimas e proteínas na matriz biológica, e, portanto, aumentar a estabilidade dos analitos em métodos bioanalíticos (AYRE et al., 2018).

¹ Valores de acordo com as informações disponíveis no site da Sigma-Aldrich (www.sigmaaldrich.com/). Acesso em 20 nov 2020.

Objetivando diminuir o custo, optou-se por utilizar matrizes celulósicas obtidas de papelerias e avaliá-las como suporte para o fluido oral. Para isso, foram utilizados quatro papéis baseados em celulose de diferentes gramaturas, sendo eles o papel filtro (de 80 g m^{-2}), papel sulfite (90 g m^{-2}), cartolina (180 g m^{-2}) e o papel aquarela (300 g m^{-2}) (**Figura 18**). O papel filtro é composto por 100% fibra de algodão, enquanto os papéis sulfite, cartolina e aquarela, de 100% fibra de madeiras folhosas. À medida que a espessura aumenta, a resistência à água é maior. O papel aquarela, específico para desenhos em tinta acrílica e aquarela, não se deforma em contato com a água e apresenta pH neutro.

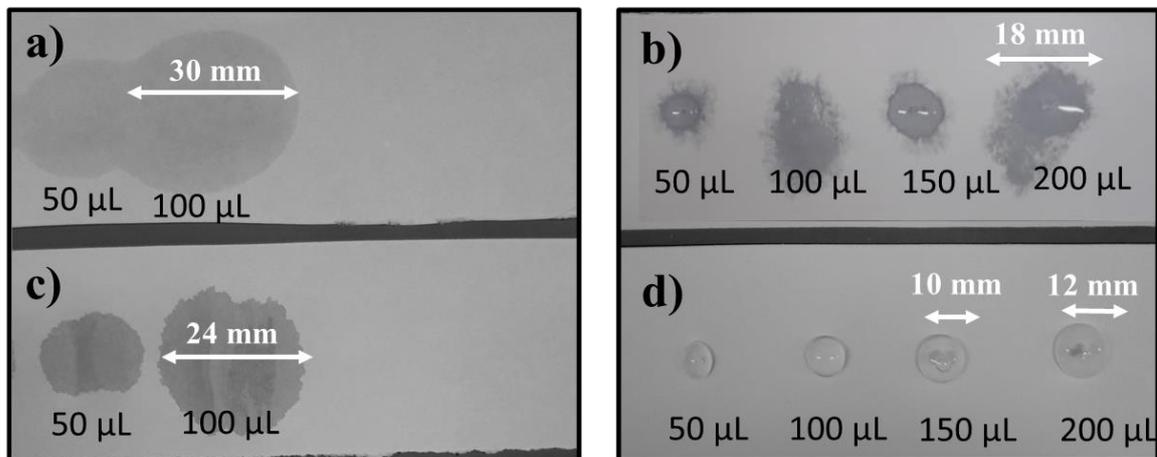
Figura 18 – Representação dos papéis (a) filtro, 80 g m^{-2} , (b) sulfite, 90 g m^{-2} , (c) cartolina, 180 g m^{-2} e (d) aquarela, 300 g m^{-2}



Fonte: Canson (<https://pt.canson.com/>)

Utilizando-se destes papéis, investigou-se o volume máximo de fluido oral (*OF*) depositado sobre o papel sem que houvesse um excesso dela ou abrangesse uma área acima do limite que seria viável para as análises em um *vial*. A **Figura 19** mostra o resultado obtido com a pipetagem de diferentes volumes (50, 100, 150 e 200 μL) do fluido oral nos papéis anteriormente citados, e a dimensão aproximada das manchas formadas.

Figura 19 – Dimensão da mancha de fluido oral quando diferentes volumes de fluido oral são aplicados aos papéis (a) filtro, (b) cartolina, (c) sulfite e (d) aquarela

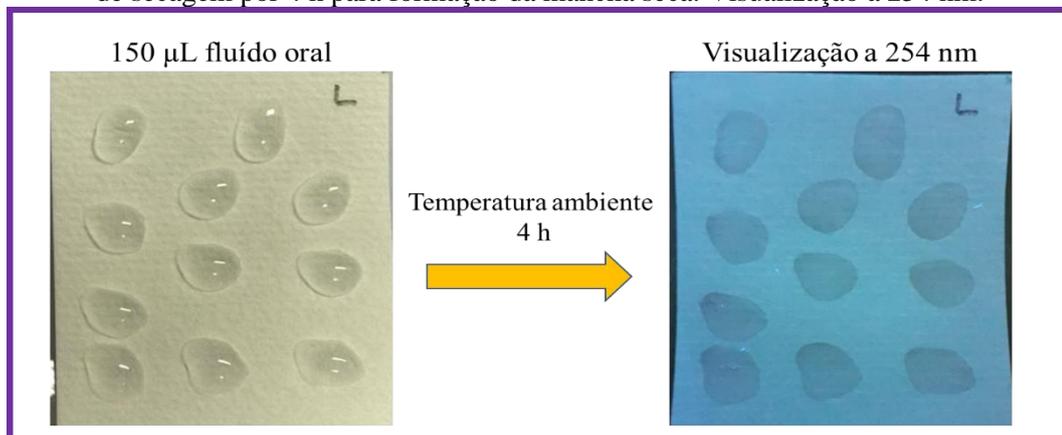


Fonte: Do Autor.

Após a secagem, o diâmetro alcançado pela matriz biológica nos papéis 80, 90 e 180 g foi superior 18 mm para 200 μL e 24 mm para 100 μL , considerado, à primeira vista, inviável para extrações que demandam miniaturização e pouco solvente orgânico, uma vez que seu manuseio e acondicionamento dentro dos *vials* seria dificultado. Isso ocorre porque, além da espessura, o arranjo estrutural de suas fibras quando em contato com o fluido oral permite que este seja rapidamente absorvido, espalhando-se pelo papel. Nestes casos, uma alternativa seria o recorte de uma dimensão específica dentro da área formada pela mancha de fluido oral seca (MERCOLINI et al., 2010; SAUSSEREAU et al., 2012; JAIN et al., 2017). No entanto, esta abordagem pode levar a uma das desvantagens dos métodos por DMS, que está relacionada com a dispersão da amostra, por capilaridade, ao longo da área delimitada no papel, fazendo com que diferentes concentrações dos compostos sejam encontradas entre a parte central e periférica, podendo levar a valores de quantificação pouco precisos (LI; TSE, 2010).

Em razão disso, ao se escolher o tipo de papel, optou-se por aquele capaz de abranger toda a área do fluido oral depositado, garantindo a homogeneidade na concentração. Neste sentido, o papel de gramatura 300 g m^{-2} foi o que apresentou os melhores resultados em termos de menor dimensão do papel e maior volume de matriz, com 12 mm sendo o diâmetro obtido para 200 μL de fluido oral depois de seco. Baseando-se no equilíbrio entre a quantidade de matriz empregada na análise, na menor dimensão da mancha seca, do volume de injeção no LC (25 μL) e dos limiares analíticos do método, optou-se por pipetar 150 μL do fluido no papel 300 g m^{-2} ($d = 10 \text{ mm}$). A **Figura 20** mostra as gotas de 150 μL de OF quando pipetadas no papel aquarela. Como não são rapidamente absorvidas por capilaridade, a gota permanece quase que em formato de meia esfera até a formação da mancha. A visualização foi feita com o comprimento de onda fixo de 254 nm do equipamento UV portátil.

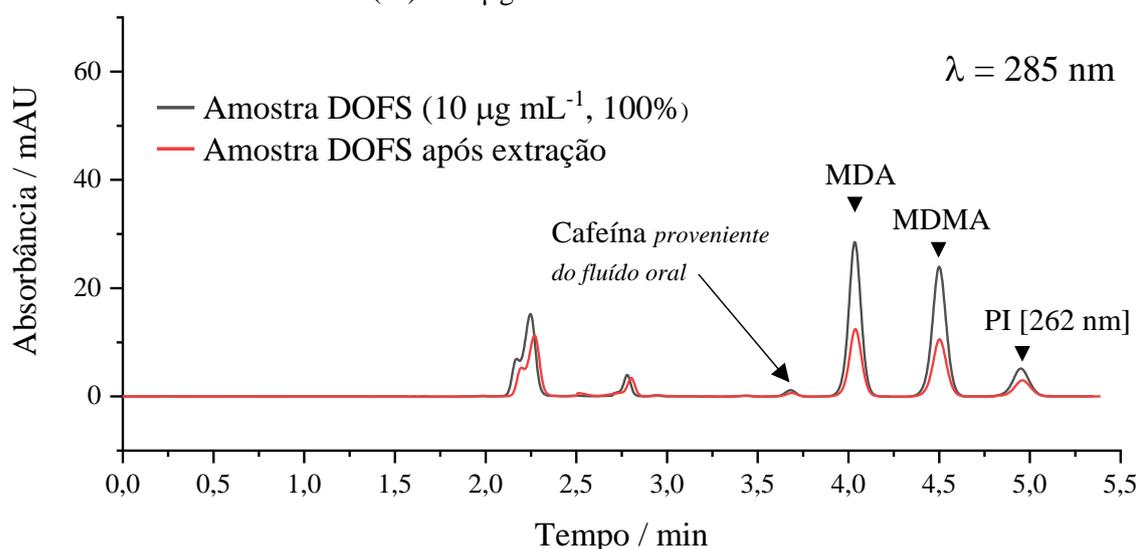
Figura 20 – Pipetagem de 150 μL de fluido oral sobre papel de aquarela e subsequente procedimento de secagem por 4 h para formação da mancha seca. Visualização a 254 nm.



Fonte: Do Autor.

Selecionado o volume de fluido oral e o papel a ser empregue na amostragem por *DOFS*, um teste preliminar de recuperação foi realizado. As condições não-otimizadas de extração envolveram uma amostra *DOFS* (150 μL) fortificada com MDA, MDMA e lidocaína (PI) a $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ em 300 μL de metanol. A mistura foi submetida a banho ultrassônico por 10 min e a solução resultante diretamente injetada no sistema *LC-DAD*. A **Figura 21** mostra o cromatograma representativo para este ensaio inicial, onde se comparou o cromatograma da amostra *DOFS* submetida à extração com o cromatograma de outra amostra *DOFS* fortificada com os analitos e PI após a extração (representando 100 %).

Figura 21 – Cromatogramas LC-DAD mostrando a recuperação da amostra *DOFS* contendo MDA, MDMA e lidocaína (PI) a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ usando metanol como solvente extrator



Condições: Coluna fenil (25 cm x 4,6 mm, 5 μm) a 35 $^{\circ}\text{C}$, injeção de 25 μL , fase móvel composta por TFA 10 mmol L^{-1} e acetonitrila (75:25, v/v) a 1,2 mL min^{-1} . Extração da *DOFS* contendo 150 μL de fluido oral em 300 μL de metanol. Fonte: Do Autor.

Comparando a área de pico dos cromatogramas ($k = 3$) foi possível observar que a média da eficiência de extração absoluta foi de 43,8, 45,3 e 57,0 % para o MDA, MDMA e lidocaína, respectivamente. Por outro lado, considerando a recuperação normalizada², em que a resposta é dada pela razão entre a área dos analitos e a do padrão interno, a eficiência de extração foi de 76,9 (MDA) e 79,4 % (MDMA). O valor da recuperação absoluta é inferior para alguns trabalhos encontrados na literatura. Versace et al. (2013), por exemplo, obtiveram valores de 74 % para o MDMA com a utilização de acetonitrila: NH_4OH :metanol (55:35:10 v/v). Sob primeira inspeção, essa diferença de recuperação absoluta provavelmente se deveu ao papel utilizado. Enquanto esse trabalho emprega o papel Whatman® 903, que é fabricado

² A partir deste ponto, a menos que seja especificado no próprio texto, o termo recuperação se refere à recuperação normalizada, determinada junto a resposta do padrão interno.

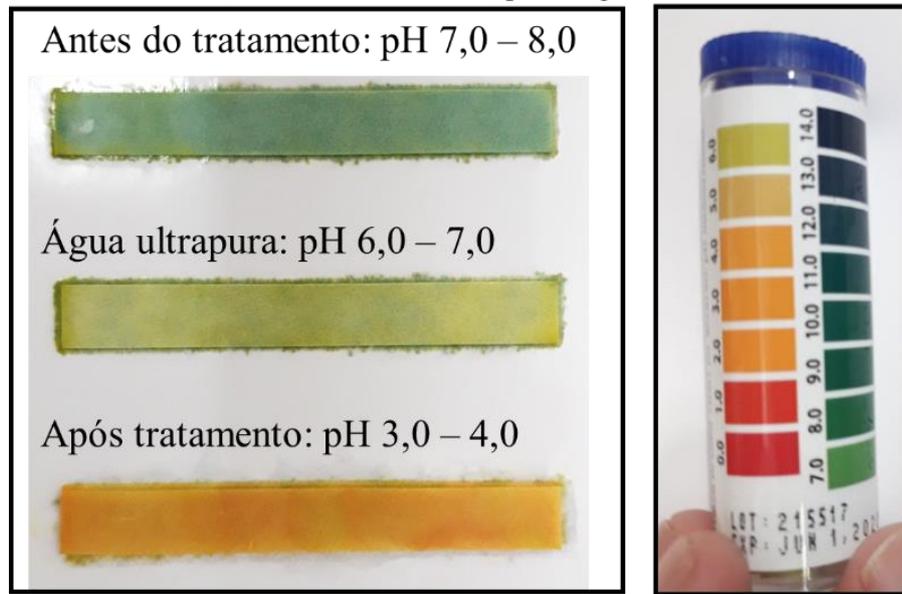
cuidadosamente para garantir a composição homogênea do papel, o papel aquarela não passa por estes procedimentos. Outro motivo seria pelas interações entre o analito e os componentes do papel (ZHENG et al., 2016). Além das estruturas de celulose e hemicelulose, o papel de aquarela deve conter impurezas capazes de interagir fortemente com os analitos, diminuindo a eficiência de extração. A maior recuperação do padrão interno, por sua vez, pode ser resultado da diferença de polaridade com os derivados metilenodioxo-substituídos, que têm valores de logP entre 1,64 e 1,86. A lidocaína, mais lipofílica (logP 2,44), apresenta grupos amida e amina terciária em sua estrutura que interagem menos fortemente com a celulose (grupos hidroxila) ou outros componentes polares presente no papel, retornando resultados de extração ligeiramente maiores que para o MDA e MDMA. Assim, com o objetivo de diminuir a interação dos compostos de interesse para com o papel e favorecer suas transferências para a solução extratora, investigou-se a necessidade de um tratamento prévio no papel aquarela.

5.2.2. Tratamento *in-house* dos papéis para amostragem

Nesta etapa, o papel aquarela foi previamente tratado com soluções de ácido nítrico e de uma mistura orgânica de etanol:clorofórmio, em diferente concentrações e proporções. Como a intenção é diminuir a interação analito-papel, o ácido nítrico foi empregado para diminuir o pH do papel de modo a favorecer a forma iônica do MDA e MDMA, melhorando a extração, e para ocasionar a hidrólise da celulose e hemicelulose (RAMOS, 2003), diminuindo as interações de hidrogênio e aumentando a repulsão entre analito e celulose protonados. A mistura etanol:clorofórmio, por sua vez, foi utilizada para remover possíveis impurezas orgânicas. A escolha se deveu ao compromisso entre pureza do extrato e capacidade de extração de substâncias apolares e moderadamente polares, em especial ao clorofórmio (PRAGST, 2008).

Para verificar qual a melhor combinação para realizar o procedimento de preparo do papel antes da DOFS, este foi submerso na mistura de etanol e clorofórmio nas proporções 80:20, 60:40 ou 50:50 (v/v) e posteriormente em solução aquosa de ácido nítrico 1, 5 ou 10 %, nesta ordem, por 15 min cada em banho ultrassônico. Os dados experimentais mostraram que o melhor resultado foi observado para o ácido nítrico 1,0 % v/v e proporção de 80:20 v/v para a mistura. Concentrações superiores de clorofórmio ou ácido nítrico foram descartadas devido a estrutura do papel ter se tornado quebradiça a ponto de se dissolver parcialmente durante a extração com metanol. A mudança de pH foi verificada com papel indicador de pH, medido com uma pequena quantidade do papel macerado em água ultrapura (**Figura 22**).

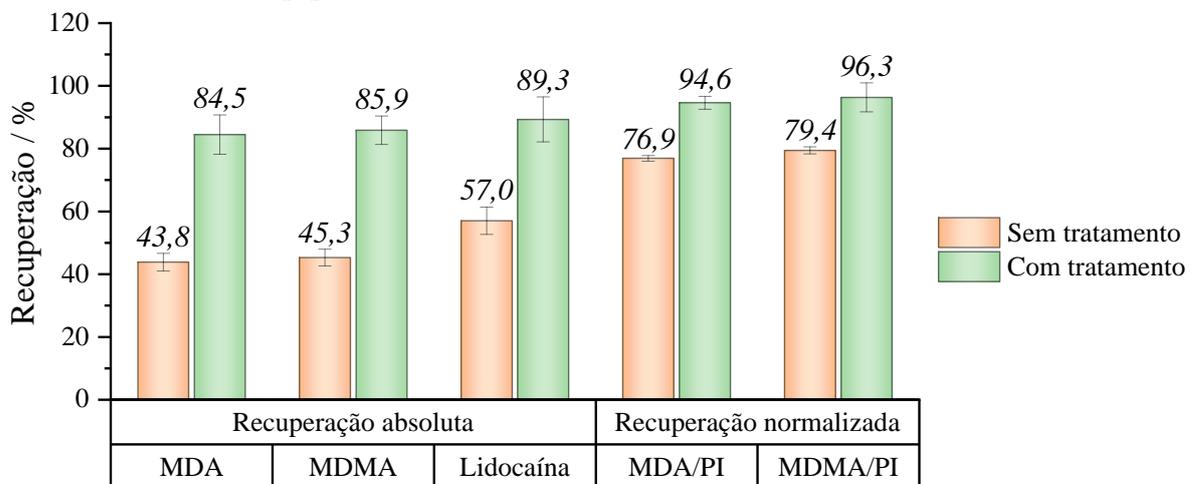
Figura 22 – Avaliação do pH do papel antes e após o tratamento com etanol:clorofórmico (80:20 v/v) e ácido nítrico 1,0 %. Como referência, pH da água destilada (no centro).



Fonte: Do Autor.

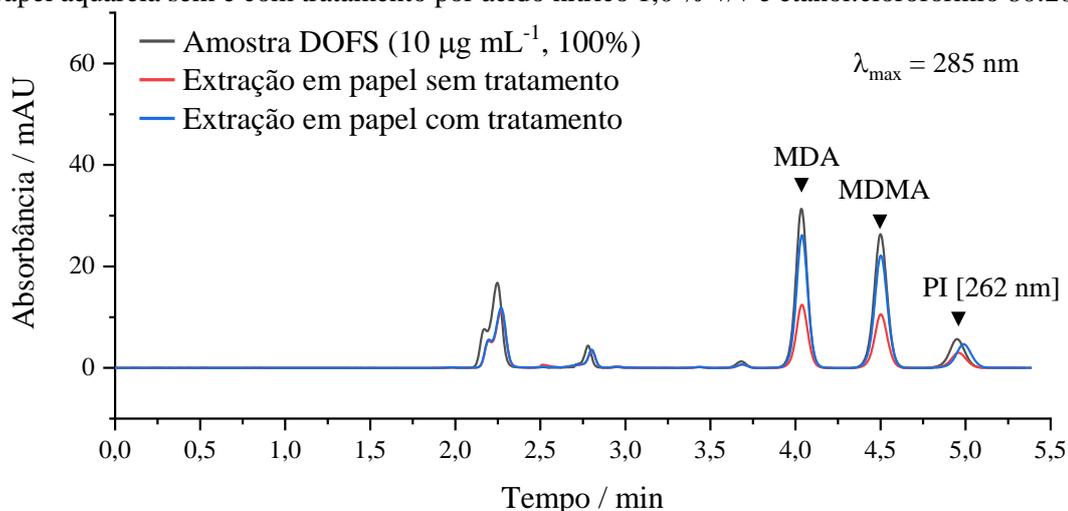
Terminado esta etapa, a significância do tratamento foi avaliada pela comparação dos resultados de recuperação dos analitos no papel sem e com tratamento. Os valores médios de recuperação estão na **Figura 23**, em que resultados significativos ($p < 0,05$) foram observadas após o tratamento realizado. Os cromatogramas referentes a essas extrações estão apresentados na **Figura 24**, resultando em valores de recuperação absoluta, considerando a normalização com PI, entre 84,5 e 89,3 % e de 94,6 a 96,3 % para o MDA e MDMA, respectivamente.

Figura 23 – Recuperação de MDA, MDMA e lidocaína (PI) em *dried spot* antes e depois do tratamento do papel com ácido nítrico 1,0% e etanol:clorofórmio 80:20 v/v ($k = 3$).



Extração da DOFS contendo 150 μL de fluido oral em 300 μL de metanol. Fonte: Do Autor.

Figura 24 – Cromatogramas LC-DAD representando a comparação entre as recuperações obtidas com papel aquarela sem e com tratamento por ácido nítrico 1,0 % v/v e etanol:clorofórmio 80:20 v/v



Condições: Coluna fenil (25 cm x 4,6 mm, 5 µm) a 35 °C, injeção de 25 µL, fase móvel composta por TFA 10 mmol L⁻¹ e acetonitrila (75:25, v/v) a 1,2 mL min⁻¹. Extração da DOFS contendo 150 µL de fluido oral em 300 µL de metanol. Fonte: Do Autor.

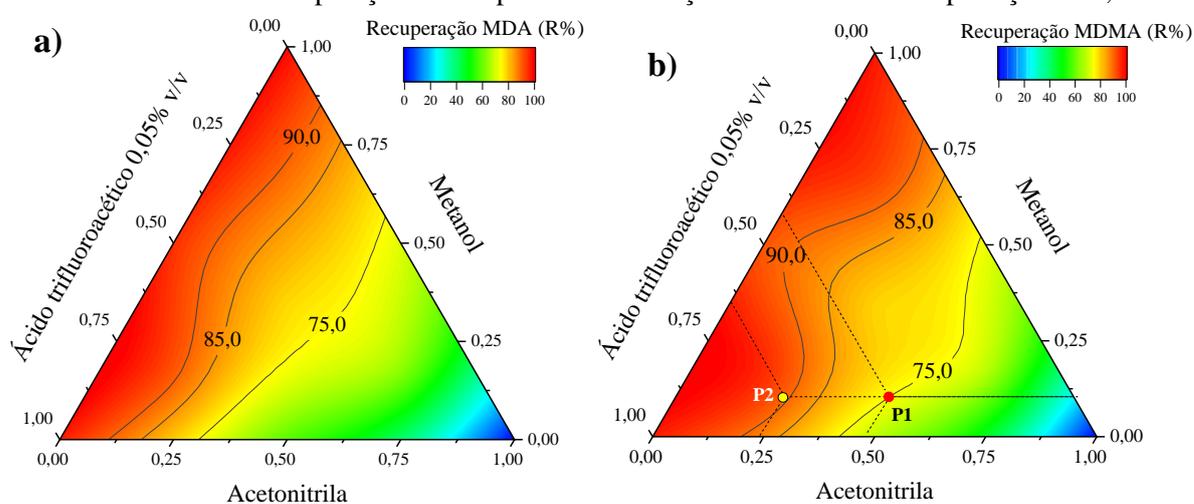
Explicações para essa diferença na eficiência de extração absoluta (30 – 40 %) são baseadas no fato de que os analitos ou podem estar fortemente associados com proteínas presentes no fluido oral ou ligados fortemente com a celulose proveniente do papel. Inicialmente, em ambos os casos, a recuperação é prejudicada já que os analitos não eluem facilmente da mancha para o solvente extrator (ZHENG et al., 2016). Com a adição da solução aquosa de ácido nítrico, reações intermoleculares podem ter ocorrido e facilitado a remoção dos analitos, propiciando melhor recuperação. Com a protonação dos grupo hidroxí da celulose e amina dos analitos, a interação entre ambos é enfraquecida (D'ARIENZO et al., 2010; LEE; LEE; KANG, 2019). Outra hipótese é de que as proteínas do OF podem ter sofrido a dissociação analito-proteína devido à desnaturação proteica quando em contato com o papel ácido, favorecendo a partição do analitos e padrão interno do papel para o solvente. No fim, como o tratamento do papel apresentou resultados de recuperação superiores àqueles obtidos sem tratamento, considerou-se esta etapa essencial para o processo de pré-amostragem.

5.2.3. Otimização de misturas: solvente/solução extratora

Embora o metanol tenha apresentado bons resultados de extração, optou-se em realizar um delineamento de misturas do tipo simplex-axial com três componentes (acetonitrila, metanol e ácido trifluoroacético 0,05 % v/v) para avaliar a recuperação. A escolha desses três foi baseada em suas polaridades e capacidade precipitante, sendo comumente empregados para análises bioanalíticas que envolvem a técnica de precipitação proteica (PETERS et al., 2017;

LI; JIAN; FU, 2019). Uma consideração adicional é que o ácido trifluoroacético também foi escolhido devido sua maior semelhança e menor força de eluição quando comparado com a fase móvel. A extração orgânica, portanto, foi avaliada através da resposta obtida pela recuperação de cada analito para cada proporção, em volume, gerada pelo delineamento experimental. Os resultados estão representados graficamente na **Figura 25**. Neste ensaio foram realizadas duas extrações ($k = 2$) das amostras *DOFS* fortificadas com $2,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de MDA e MDMA, com adição do padrão interno, gerando um total de 20 experimentos.

Figura 25 – Gráfico de contorno para a otimização do tipo simplex-axial envolvendo acetonitrila, ácido trifluoroacético e metanol para extração de (a) MDA e (b) MDMA. As linhas de contorno indicam o valor de recuperação obtido para dada condição mínima. Valor de predição de 0,981.



Fonte: Do Autor.

Os gráficos de contorno da **Figura 25a** e **Figura 25b** ilustram as variações dos solventes acetonitrila, metanol e TFA na recuperação do MDA e MDMA, no qual as condições que forneceram maiores valores experimentais para a recuperação são aquelas indicadas em vermelho, sendo a cor azul representando o inverso, ou seja, as condições no qual a eficiência de extração não foi satisfatória. Um ponto interessante a se mencionar é que a acetonitrila, um solvente aprótico de menor polaridade entre os três, não foi capaz de extrair os analitos do papel, sendo necessário proporções maiores dos outros dois solventes para que a extração tornasse mais adequada. Como exemplo, a **Figura 25b** mostra que, com a redução de acetonitrila e aumento de TFA do ponto P1 (acetonitrila:metanol:TFA na proporção 50:12:38 v/v) para o P2 (25:12:63 v/v), o rendimento da extração elevou de 75 para 90 %. Esses resultados são coerentes com a polaridade dos analitos e a maior afinidade entre as aminas protonadas com os solventes próticos, devido às interações de hidrogênio. A condição considerada ótima foi obtida com a utilização de metanol ou de ácido trifluoroacético 0,05 % v/v. Como não houve diferenças

estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre seus valores de recuperação, selecionou-se o metanol como solvente extrator.

5.2.4. Otimização das condições de extração

5.2.4.1. Volume do extrator

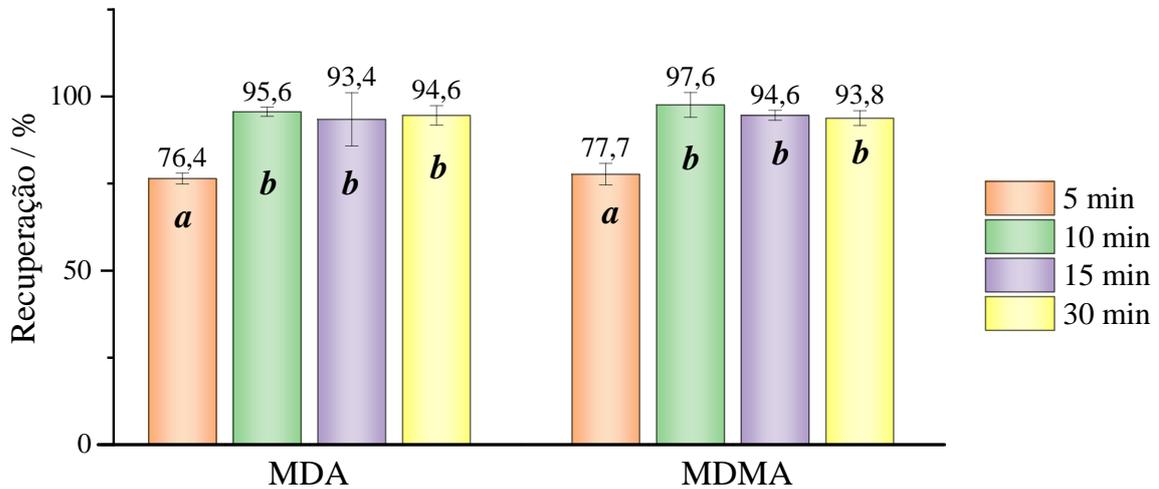
Com base em observações feitas ao longo do desenvolvimento da extração da *DOFS*, verificou-se dois aspectos em relação ao procedimento de extração e da sensibilidade do método. O primeiro é em relação ao fato de que volumes maiores de extrator, comparado ao de fluido oral aplicado no *DOFS*, implicam na diluição dos analitos. Embora esse seja o procedimento mais utilizado por agilizar o processo de extração, traz como consequência o aumento dos limites de detecção e quantificação obtidos, podendo tornar o método incompatível com a proposta se existe a necessidade de limiares menores, principalmente quando detectores menos sensíveis como o arranjo de diodos são empregues. Quanto ao segundo aspecto, observou-se uma diminuição do volume do solvente extrator após submeter as manchas em banho ultrassônico. Dos 300 μL , aproximadamente 200 a 220 μL eram recuperados para serem transferidos ao insert de injeção, indicando que 80 a 100 μL estavam sendo absorvidos pelo próprio papel. Esse fator implica que volumes menores do que 150 μL resultaria na falta de disponibilidade do solvente para extrair os analitos e injetar no sistema. Portanto, em razão dessas considerações, a condição de extração foi readaptada para utilização de duas amostras *DOFS* na extração com 600 μL de metanol. Em seguida, com 400 μL da solução resultante, realizou-se a pré-concentração da amostra por meio evaporação do solvente em fluxo de nitrogênio e subsequente ressuspensão em 50 μL de ácido trifluoroacético 0,05%, que apresenta maior semelhança com a fase do sistema de cromatografia líquida.

5.2.4.2. Tempo de extração

Com a condição readaptada, testou-se a possibilidade de extração por meio da agitação em vórtex por 30 e 120 s. Como não se obteve êxito, a avaliação do tempo de extração foi realizada submetendo três replicatas ($k = 3$) das amostras *DOFS* fortificada com MDA, MDMA e lidocaína a 2,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em diferentes tempos de banho ultrassônico (5, 10, 15 e 30 min), com 600 μL metanol. Os resultados da recuperação média estão dispostos na **Figura 26**, onde é possível verificar que a eficiência de extração de ambos os analitos foram próximos a 100 % em tempos de sonicação igual ou maiores a 10 min, e que diferenças significativas ($p < 0,01$)

foram observadas apenas entre o tempo de 5 min com os de tempos maiores. Assim, selecionou-se 10 min como sendo o tempo de sonicação.

Figura 26 – Recuperação de MDA e MDMA sob diferentes tempos de sonicação ($k = 3$)

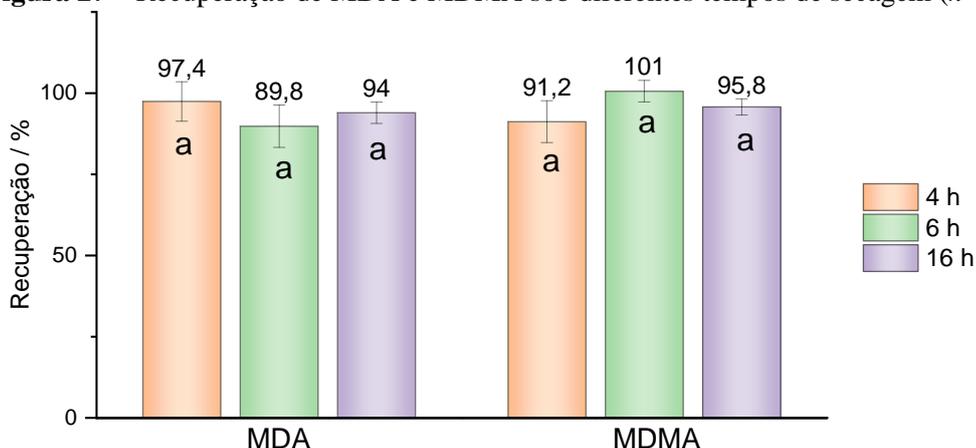


Extração de duas *DOFS* contendo 150 μL de fluido oral cada em 600 μL de metanol. Letras diferentes indicam diferença ($p < 0,01$) de acordo com o teste de Tukey. Fonte: Do Autor.

5.2.4.3. Tempo de secagem

A última variável estudada foi o tempo de formação das manchas secas de fluido oral. As manchas foram preparadas com 150 μL de fluido oral fortificada com ambos MDA e MDMA a 2,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,64 μL da solução estoque de PI, e deixadas secar durante 4, 6 e 16 h antes de se proceder com o procedimento de extração. Os resultados estão na **Figura 27** e o teste de Tukey mostra que não houve diferença significativa entre a média de recuperação entre os tempos de secagem avaliados para o MDA ou MDMA. Portanto, selecionou-se 4 h como o tempo necessário para formação da mancha seca antes da extração.

Figura 27 – Recuperação de MDA e MDMA sob diferentes tempos de secagem ($k = 3$)



Letras diferentes indicam diferença ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey. Fonte: Do Autor.

5.2.5. Condições DOFS deste trabalho

Após descongelar as amostras de fluido oral em temperatura ambiente, as *DOFS* foram preparadas pela aplicação de 150 μL de fluido oral e 0,64 μL da solução estoque de lidocaína com uma micropipeta em papel aquarela (300 g m^{-2}), previamente tratado com solução aquosa de ácido nítrico 1,0% v/v e com clorofórmio:etanol (20:80, v/v). As amostras DOFS foram secas a temperatura ambiente por pelo menos 4 h e as manchas formadas, visualizadas, delimitadas e cortadas com uso de luz UV fixada a 254 nm, lápis e tesoura, respectivamente. A extração foi realizada adicionando duas *DOFS* (totalizando 300 μL de *OF* e 1,28 μL da solução de lidocaína) em um vial com 600 μL de metanol, sob auxílio de um banho ultrassônico por 10 min. Por fim, uma alíquota de 400 μL do sobrenadante foi evaporado em chapa aquecedora a 40 - 50 °C sob fluxo de nitrogênio e o extrato ressuspendido em 50 μL de TFA 0,05% v/v. A solução foi transferida para um insert de 250 μL no autoamostrador, do qual se injetou 25 μL .

5.2.6. Considerações sobre a DOFS

De acordo com as pesquisas feitas na literatura (**Tabela 13**), este trabalho parece ser o primeiro a empregar um papel comum para a proposta de DMS, dispensando altos custos em relação aos papéis filtros fabricados essencial para este fim, e com uma economia entre 5 e 20x em relação aos papéis Whatman® 903 e DMPK, respectivamente. Ao adotar essa abordagem, entretanto, houve a necessidade de tratar o papel de modo que ele pudesse fornecer as condições ideais de pH e polaridade para que os analitos pudessem ser extraídos eficientemente. Embora alguns autores também empreguem procedimentos de tratamento prévio, estes são realizados de forma mais branda. Stoykova et al. (2016), por exemplo, fizeram o tratamento diretamente sobre os discos de papel utilizando metanol acidificado com ácido clorídrico imediatamente antes da extração com acetato de etila e NaOH. Liu et al. (2011), por sua vez, adotaram um sistema semelhante para estabilização de uma droga instável que necessita de baixo pH, com uso de ácido cítrico sobre a gota de sangue ainda fresca no papel. A extração dos analitos de interesse geralmente são extraídos com solventes polares próticos como o metanol (AMBACH et al., 2014; ODOARDI; ANZILLOTTI; STRANO-ROSSI, 2014; SIMÕES; CASTAÑERA AJENJO; DIAS, 2018), o mesmo utilizado neste trabalho, ou água (SAUSSEREAU et al., 2012), mas solventes menos polares como acetonitrila e acetato de etila também são utilizados (JANTOS et al., 2011; STOYKOVA et al., 2016; KACARGIL; DAGLIOGLU; GOREN, 2020). O tempo de amostragem do DOFS antes da injeção no sistema cromatográfico foi de 4 h, que está dentre o período observado nos trabalhos (entre 1,0 e 16 h) disponíveis na literatura.

Tabela 13 – Condições da extração das amostras DOFS para quantificação de MDMA e/ou MDA em diferentes matrizes biológicas

Matriz	Volume μL	Papel	Secagem h	Solvente de extração	F_C	Referência
Fluido oral	300 (150x2)	Bloco Aquarela Canson®, com tratamento prévio	4,0	Metanol	4,0	Este trabalho
Fluido oral	250	Não especificado	2,0	Acetato de etila e NaOH 1 mol L ⁻¹	5,0	(STOYKOVA et al., 2016)
Fluido oral	50	Whatman® 903	2,5	Acetonitrila, NH ₄ OAc 14 mmol L ⁻¹ e metanol (55:35:10, v/v)	0,25	(JACQUES; DOS SANTOS; LIMBERGER, 2019)
Sangue	10	PerkinElmer® 226–1004 Bioanalysis6	3,0	Metanol	0,10	(AMBACH et al., 2014)
Sangue	90 (30x3)	Agilent® Bond Elut	1,0	Metanol e ácido fórmico 0,1%	0,90	(ODOARDI; ANZILLOTTI; STRANO-ROSSI, 2014)
Sangue	50	Whatman® BFC 180	<i>overnight</i>	Metanol e acetonitrila (3:1, v/v)	0,50	(SIMÕES; CASTAÑERA AJENJO; DIAS, 2018)
Sangue	30	Whatman® 903	<i>overnigh</i>	Água ultrapura	0,20	(SAUSSEREAU et al., 2012)
Sangue	100	Sartorius Stedim Biotech® Sample Carrier	<i>overnight</i> (16 h)	Acetato de etila e metanol (1:1, v/v), e NaOH 1 mol L ⁻¹	1,0	(KACARGIL; DAGLIOGLU; GOREN, 2020)
Sangue	100	Whatman® 903	<i>overnigh</i>	NaOH 0,01 mol L ⁻¹ e acetato de etila	2,0	(JANTOS et al., 2011)'

F_C: fator de pré-concentração, obtido pela razão entre o volume de matriz aplicado sobre o papel e o volume do solvente de reconstituição ($V_{Inicial}/V_{Final}$), NaOH: hidróxido de sódio, NH₄OAc: acetato de amônio

5.3. Performance analítica

A validação analítica é uma etapa de importância após a escolha do método analítico e subsequentes etapas de desenvolvimento e otimização, pois implica em avaliar a significância dos parâmetros operacionais e garantir a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados.

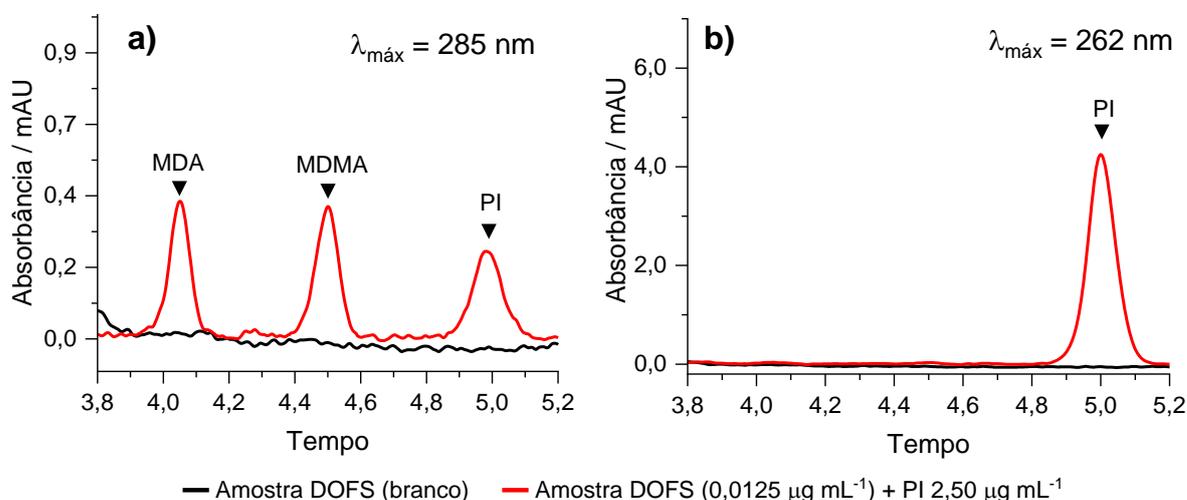
5.3.1. Método LC-DAD

5.3.1.1. Seletividade

A seletividade está relacionada à capacidade em diferenciar e quantificar o analito e padrão interno na presença de interferentes, tais como excipientes, compostos endógenos da matriz e análogos que podem ser esperados estar presentes na amostra (GONZÁLEZ; ALONSO, 2020). Em razão disso, a abordagem para demonstrar a seletividade foi baseada na injeção de amostras branco e de padrões analíticos, onde se verificou a falta ou não de resposta de compostos endógenos ou exógenos no mesmo tempo de retenção dos compostos de interesse.

Com o método otimizado, a **Figura 28** apresenta a região do cromatograma em que o MDMA, MDA e lidocaína eluem. Dado que os cromatogramas da **Figura 28a** se referem às amostras DOFS de fluido oral (branco e fortificada) analisadas a 285 nm, e os da **Figura 28b**, às mesmas amostras em 262 nm, substâncias interferentes não foram encontradas no tempo de retenção dos analitos e padrão interno. Em razão disso, considerou-se que, baseado no *pool* das amostras, este método foi seletivo para componentes endógenos do fluido oral.

Figura 28 – Cromatogramas LC-DAD das DOFS branco e fortificado com MDA e MDMA a 0,0125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e lidocaína (PI) a 2,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ monitorados em (a) 285 e (b) 262 nm



Condições: coluna fenil (250 x 4,6 mm, 5 μm) a 35 $^{\circ}\text{C}$, injeção de 25 μL , TFA 10 mmol L^{-1} e acetonitrila (75:25, v/v) a 1,2 mL min^{-1} . Extração com metanol em banho ultrassônico por 10 min e reconstituição do extrato em ácido trifluoroacético 0,05% v/v. Fonte: Do Autor.

Quanto aos compostos exógenos, 25 substâncias, incluindo aquelas com propriedades ansiolíticas, anestésicas, estimulantes e anti-inflamatórias, foram investigadas pela injeção direta da solução padrão $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol no LC-DAD. A escolha desses compostos foi baseada em cinco fatores: frequência em serem encontrados como adulterantes em amostras apreendidas (e. g., cafeína e metanfetamina), fármacos comumente administrados sem necessidade de prescrição médica (e. g., ácido acetilsalicílico, acetaminofeno e metamizol), possibilidade de coadministração (e. g., tadalafil e sildenafil), drogas ilícitas com propriedades estimulantes (e. g., cocaína, MDEA) (TOGNI et al., 2015; COUCHMAN et al., 2019; DECONINCK et al., 2019) e, por último, disponibilidade dos padrões no laboratório e dos padrões doados. A **Tabela 14** lista as substâncias testadas e seus respectivos tempos de retenção e comprimentos de onda de máxima absorção, esta última disposta na ordem decrescente da intensidade. Os cromatogramas e respectivos espectros UV dos estão no APÊNDICE C.

Tabela 14 – Tempo de retenção (t_R) dos analitos, PI e dos 25 compostos avaliados para o ensaio de seletividade, todos a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, e seus respectivos comprimentos de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$)

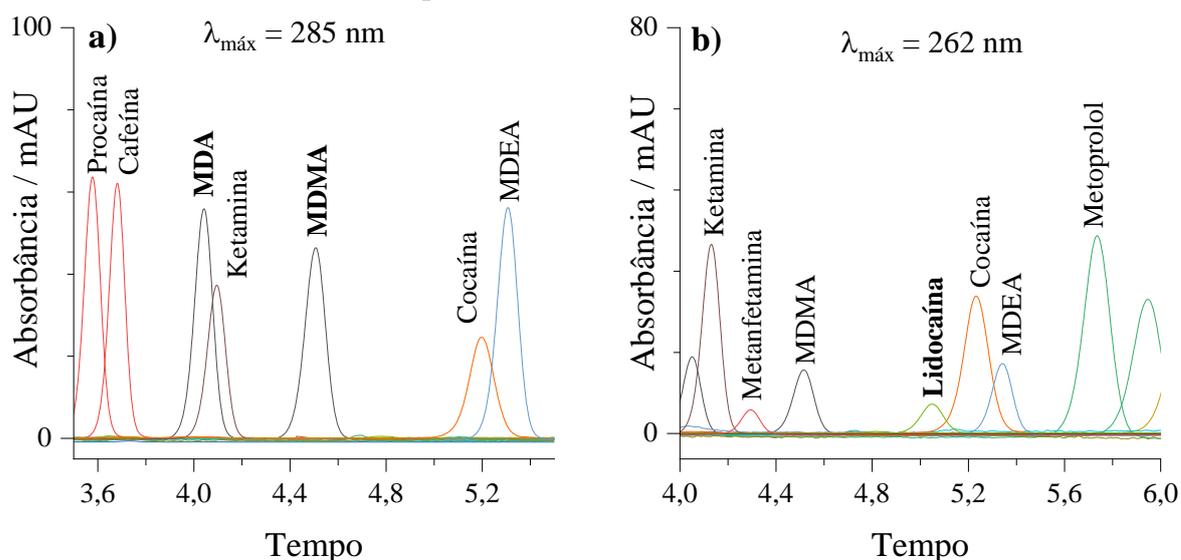
Composto	t_R / min	$\lambda_{\text{máx}} / \text{nm}$	Composto	t_R / min	$\lambda_{\text{máx}} / \text{nm}$
Teobromina	2,91	201, 272	Metoprolol	5,74	197, 222, 274
Atenolol	2,98	199, 224, 273	Omeprazol	5,95	200, 278
Metamizol	3,17	199, 260, 241	Bromazepam	6,18	201, 236
Acetaminofeno	3,20	199, 245	Ácido acetilsalicílico	6,31	198, 227, 276
Efedrina ^a	3,50	205, 256	Fenacetina	7,61	200, 245
Procaína	3,62	294, 199, 222	Ácido salicílico	8,10	203, 236
Cafeína	3,70	204, 273	Ibuprofeno	11,1	200, 239, 284
MDA	4,05	199, 285, 236	Propranolol	14,2	214, 228, 291
Ketamina ^b	4,10	199, 246	Midazolam	17,0	218, 200
Metanfetamina ^a	4,30	205, 257	Diazepam	17,7	201, 238, 284
MDMA	4,50	199, 285, 236	Sildenafil	19,9	222, 294
Lidocaína [PI]	5,06	199, 262	Citalopram	25,2	200, 238, 284
Cocaína ^b	5,23	232, 273	Clonazepam	25,5	199, 215, 252
MDEA	5,34	199, 285, 236	Tadalafil	25,6	215, 285

a. UV *cut-off* de 275 nm. b. Substância interferente para o MDA ou lidocaína

A **Figura 29** evidencia a região do cromatograma em que algumas substâncias eluem próximas do MDA, MDMA e da lidocaína. De forma geral, a análise da região dos cromatogramas *LC-DAD* demonstrou que a ketamina coeluiu com o MDA em ambos os

comprimentos de onda de detecção (285 e 262 nm), que a metanfetamina é um possível interferente para os metilenodioxido-substituídos quando $\lambda = 262$ nm, uma vez que seu tempo de eluição se encontra entre o MDA e MDMA, e que a cocaína e MDEA eluem em tempos de retenção próximos à lidocaína (PI).

Figura 29 – Cromatogramas LC-DAD dos padrões preparados em metanol a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e analisados sob os comprimentos de onda (a) 285 e (b) 262 nm.



Condições: coluna fenil (250 x 4,6 mm, 5 μm) a 35 $^{\circ}\text{C}$, injeção de 25 μL , TFA 10 mmol L^{-1} e acetonitrila (75:25, v/v) a 1,2 mL min^{-1} . Fonte: Do Autor.

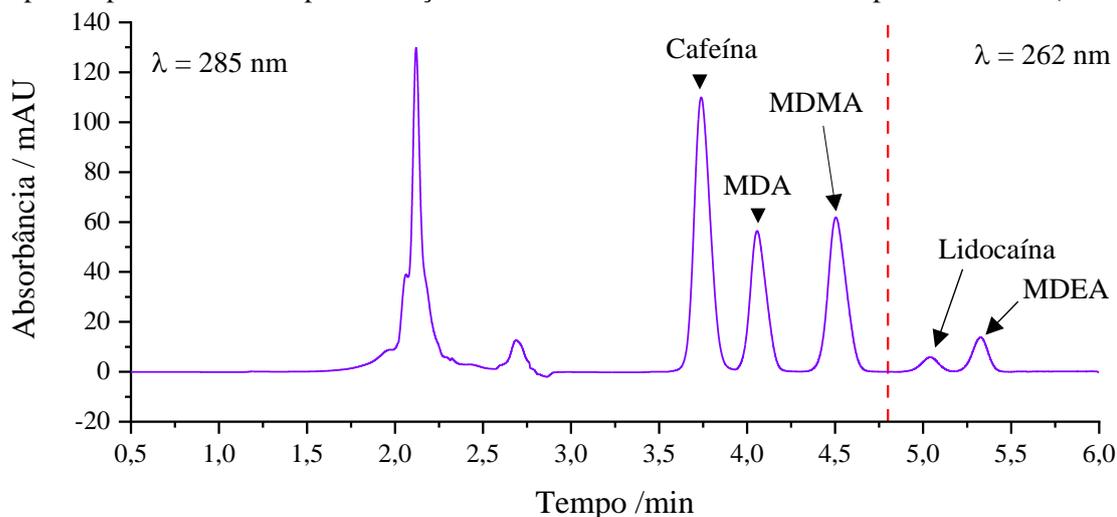
Ainda que a metanfetamina, ketamina, MDEA e cocaína sejam críticos na separação, vale ressaltar que o MDA e MDMA são monitorados a 285 nm e o padrão interno a 262 nm. De acordo com a resolução (EPSHTEIN, 2020), os resultados na **Tabela 15** mostram a separação entre os pares cafeína/MDA e MDA/MDMA ($R_s \geq 1,8$) e entre MDMA/lidocaína e lidocaína/MDEA ($R_s \geq 1,6$). A **Figura 30** mostra o cromatograma LC-DAD de uma amostra DOFS contendo apenas os componentes críticos (analitos, PI, cafeína e MDEA) a $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 15 – Resolução entre os picos do MDA, MDMA e lidocaína no LC-DAD

Substâncias adjacentes	Resolução cromatográfica, R_s^a	
	$\lambda = 285$ nm	$\lambda = 262$ nm
Cafeína/MDA	1,8	
Ketamina/MDA	< 1,5	
MDA/MDMA	2,4	
MDMA/lidocaína	2,8	2,8
Lidocaína/cocaína		< 1,5
Lidocaína/MDEA		1,6

a. $R_s = 1,18 (t_{R2} - t_{R1}) / (W_{b1;0,5h} - W_{b2;0,5h})$, onde t_R é o tempo de retenção, W_b a largura do pico a 50% da altura e os índices 1 e 2 os picos 1 e 2, respectivamente.

Figura 30 – Cromatograma LC-DAD de uma amostra DOFS a $2,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ contendo apenas os compostos próximos ao tempo de eluição dos analitos MDA e MDMA e do padrão interno (lidocaína)



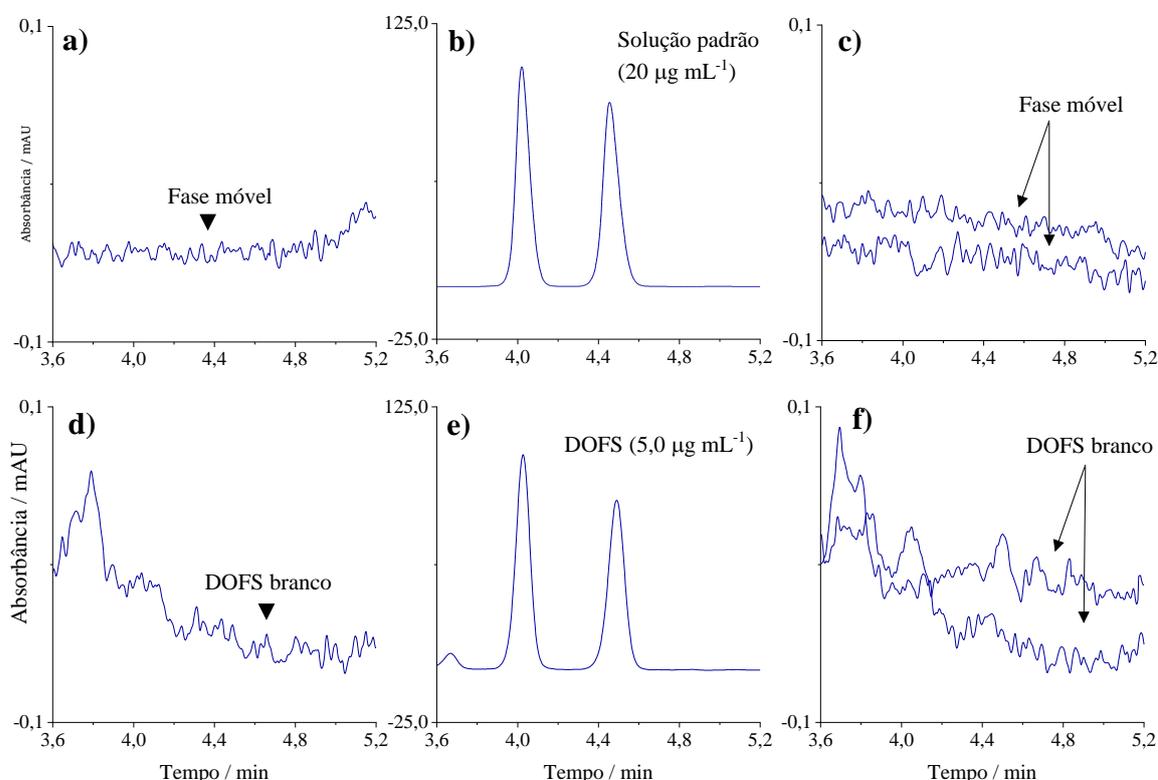
Condições: coluna fenil (250 x 4,6 mm, 5 μm) a 35 °C, injeção de 25 μL , TFA 10 mmol L^{-1} e acetonitrila (75:25, v/v) a 1,2 mL min^{-1} . Fonte: Do Autor.

Desta forma, é possível dizer que o método LC-DAD alcançou um bom nível de seletividade entre os analitos e PI com 23 dos 25 compostos avaliados, incluindo a metanfetamina e MDEA. A respeito da não separação entre os pares MDA/ketamina e lidocaína/cocaína, menciona-se que a frequência de ambas as substâncias em amostras apreendidas de *ecstasy* é baixa (WOOD et al., 2011; TOGNI et al., 2015; COUCHMAN et al., 2019). Dentre os trabalhos reportados na literatura que objetivam identificar diferentes tipos de adulterantes, a média de detecção desses compostos não passa de 3 % das amostras analisadas.

5.3.1.2. Efeito residual

O efeito residual, conhecido por *carryover*, é o fenômeno em que a resposta analítica dos analitos ou padrão interno é amplificada após a injeção, geralmente causada por quantidades residuais desses compostos no sistema ou da contaminação cruzada durante o preparo de amostras (FACHI et al., 2017; GONZÁLEZ; ALONSO, 2020). Por afetar a exatidão e precisão do método, principalmente em baixas concentrações, este parâmetro foi verificado de duas formas. A primeira foi pela análise da fase móvel imediatamente após a injeção da solução padrão 20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de MDA e MDMA (**Figura 31a-c**), e a segunda por injeção de uma amostra branco (DOFS) imediatamente após a injeção da amostra no limite superior de quantificação (5,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (**Figura 31d-f**), utilizando-se da mesma tesoura.

Figura 31 – Efeito residual do (a-c) método LC-DAD pela injeção imediata da fase móvel após análise da solução $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ em TFA $0,05 \%$ v/v e da (d-f) extração por meio da injeção imediata da solução da amostra DOFS branco após análise da DOFS a $5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$.



Condições: coluna fenil ($250 \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) a $35 \text{ }^\circ\text{C}$, injeção de $25 \mu\text{L}$, TFA 10 mmol L^{-1} e acetonitrila ($75:25$, v/v) a $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. Fonte: Do Autor.

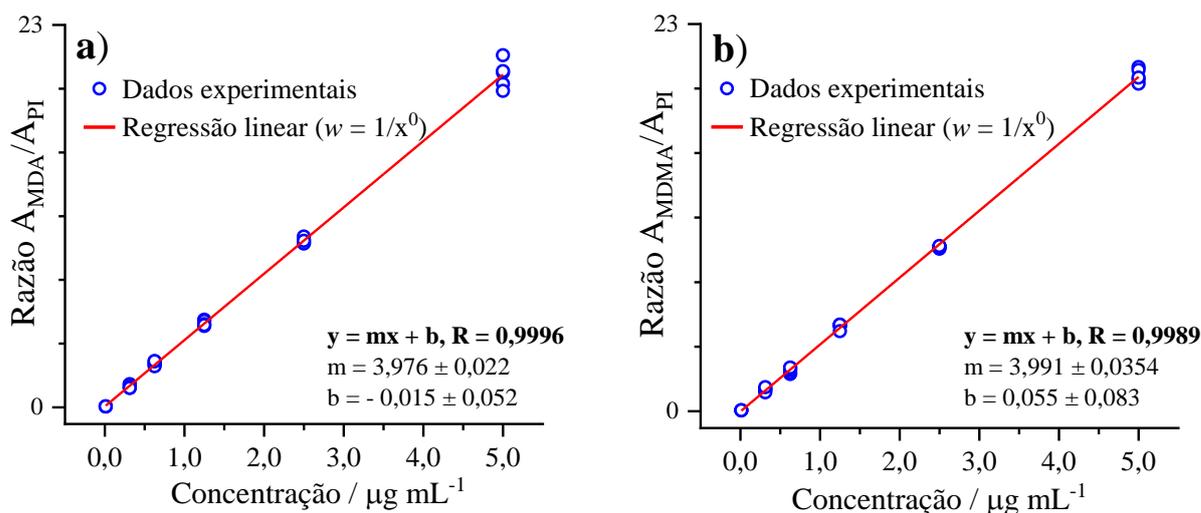
O primeiro ensaio teve como objetivo verificar se ambos os analitos no LSQ em solução padrão ficariam retidos ou no injetor ou na coluna analítica, e o segundo, por sua vez, avaliar a possibilidade de contaminação cruzada entre os *dried spots* utilizando a mesma tesoura sem qualquer procedimento de limpeza entre os cortes. Como não se observou qualquer interferência proveniente da análise anteriores nos cromatogramas da **Figura 31c** e **Figura 31f**, considerou-se que o método é livre destes efeitos residuais, nestas condições.

5.3.1.3. Linearidade

A linearidade se trata da capacidade do método em obter respostas analíticas que são diretamente proporcionais à concentração do analito, e é de extrema importância para métodos quantitativos (KRUBE et al., 2015). Desta forma, neste trabalho, as curvas analíticas das anfetaminas metilenodioxo-substituídas (MDA e MDMA) foram construídas a partir do método da padronização interna, plotando-se a razão das áreas de pico das amostras DOFS fortificadas com os analitos e lidocaína ($A_{\text{analito}}/A_{\text{PI}}$) em função a concentração dos analitos ($0,0125$ $0,312$,

0,625, 1,25, 2,50, e 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). As curvas estão apresentadas na **Figura 32a** e **Figura 32b** e englobam toda a faixa em que os níveis de MDMA foram encontrados em estudos farmacocinéticos. Para o MDA, optou-se por utilizar a mesma faixa de trabalho uma vez que esse composto pode vir de uma fonte primária de administração.

Figura 32 – Curvas analíticas obtidas para o (a) MDA e (b) MDMA em DOFS na faixa de concentração entre 0,0125 e 5,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$



Fonte: Do Autor

Com os dados experimentais, os modelos lineares inicialmente foram obtidos com a regressão linear simples utilizando as amostras DOFS em quintuplicata para cada nível de concentração. Com base nas curvas analíticas e suas respectivas equações da reta e valores de coeficiente de correlação (r), indícios de linearidade para ambos os analitos são observados, uma vez que $r > 0,990$ tanto para o MDA quanto para o MDMA (ANVISA, 2017). No entanto, como a confirmação da linearidade não pode ser obtida apenas pelos parâmetros de regressão ou pela sua representação gráfica, testes estatísticos foram realizados a fim de confirmar este comportamento, sendo eles o teste de Mandel para avaliar se os dados melhor se adequariam a modelos de regressão linear ou não linear (quadrático), análise de variância (ANOVA) para verificar a significância da regressão linear e da falta de ajuste (*LOF*), teste de homogeneidade de variância pelo método de Brown-Forsythe, com intuito de verificar se há diferenças significativas entre as variâncias dos diferentes níveis de concentração, e o teste t para determinar a significância dos coeficientes linear e angular. O procedimento para realização de cada um desses testes estão dispostos nos artigos de Almeida, Castel-Branco e Falcão (2002) e Raposo (2016). De forma resumida, os resultados destes testes estão indicados na **Tabela 16**.

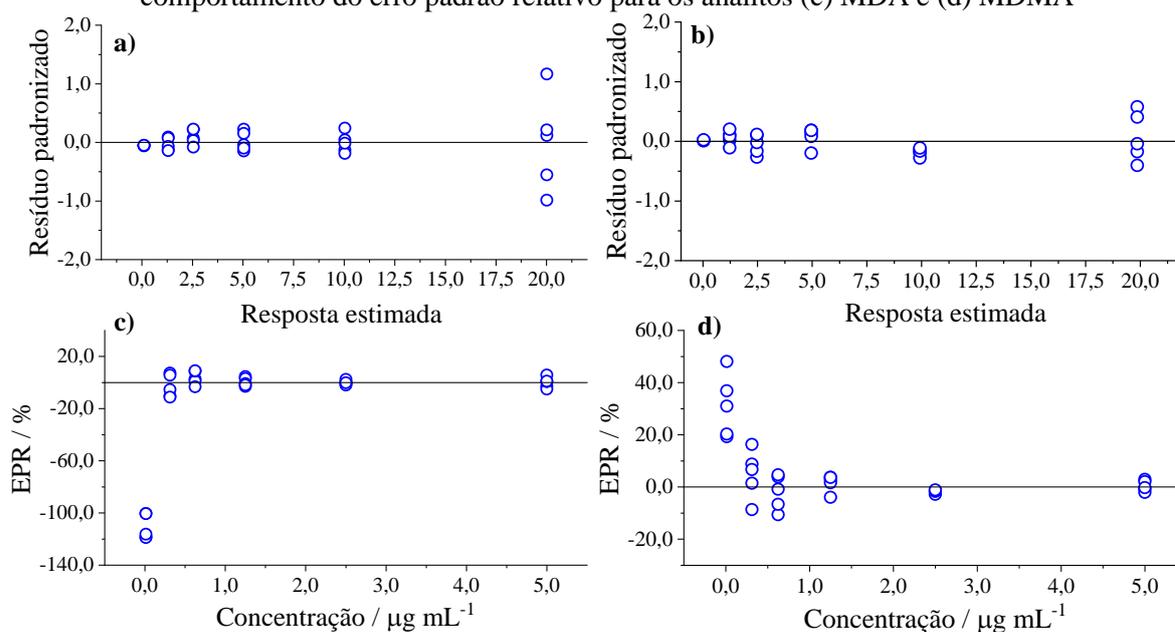
Tabela 16 – Resultado dos testes estatísticos para avaliação da linearidade das curvas de MDA e MDMA usando o modelo de regressão linear simples

	MDA	MDMA	Critério de decisão ($\alpha = 0,05$)	Resultado
Significância dos coeficientes				
Linear	0,660	0,299	$t \leq 2,05 t_c$	b não difere estatisticamente de zero
Angular	112,6	180,4	$t \geq 2,05 t_c$	m estatisticamente diferente de zero
ANOVA				
Regressão	12668	32560	$F \geq 4,20 F_c$	Modelo linear significativo
Falta de ajuste	0,13	1,58	$F \leq 2,78 F_c$	Modelo preditivo
Testes				
Mandel	0,06	2,43	$F \leq 9,12 F_M$	Modelo linear adequado
Brown-Forsythe	3,59	3,63	$F \leq 2,62 F_{BF}$	Modelo heterocedástico

t_c : (α ; N-2), F_c : (α ; p - 1; N - n), F_M : (α ; n - 2; n - 2) e F_{BF} : (α ; n - 1; N - n), onde n é o número de níveis da curva analítica, N é o número de ensaios, p o número de coeficientes da equação e α o nível de significância.

Tal como se observa na **Tabela 16**, embora o modelo tenha apresentado comportamento linear para os testes de Mandel e ANOVA, com o valor zero dentro do intervalo de confiança de 95% para o intercepto e coeficiente angular diferente de zero, o modelo linear simples apresenta variâncias significativamente diferentes ao longo dos níveis de concentração. Este fenômeno de dispersão dos dados ao longo da curva geralmente leva à diminuição da exatidão e predição do método devido aos altos erros residuais, conforme mostra a **Figura 33**.

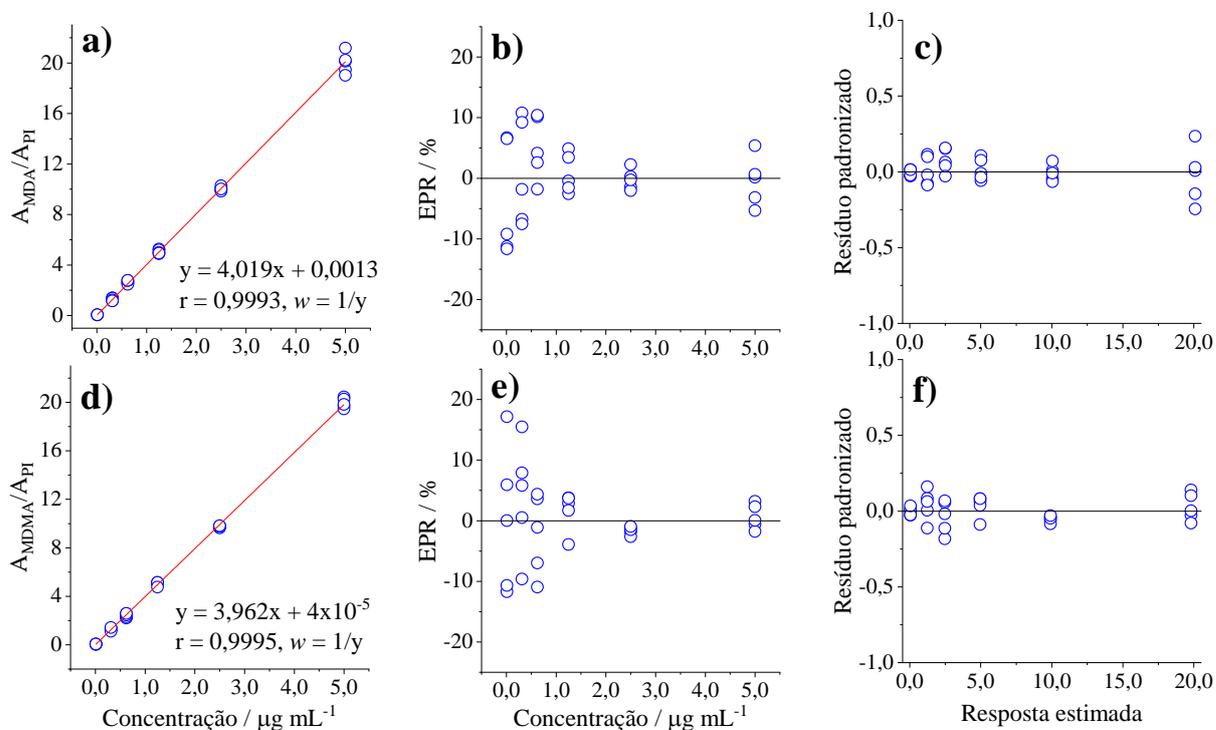
Figura 33 – Gráfico dos resíduos em função da resposta estimada para o (a) MDA e (b) MDMA e comportamento do erro padrão relativo para os analitos (c) MDA e (d) MDMA



Fonte: Do Autor.

Ao ajustar o modelo com a regressão linear simples, concentrações com erros de predição significantes foram obtidos quando próximos no LIQ. Enquanto as replicatas apresentaram EPR na faixa de -100 a -119% (**Figura 33c**) para o MDA, o MDMA retornou valores superestimados entre 19 e 48% em relação ao valor nominal (**Figura 33d**). Esses resultados são superiores ao limite de 20% imposto pelos guias de validação (ANVISA, 2012; SWGTOX, 2013), tornando a curva inadequada para propostas de quantificação. Embora a ANVISA e a SWGTOX mencionem a necessidade da regressão linear ponderada nestes casos, não oferecem detalhes de como devem ser determinadas e quais fatores devem ser aplicados (ANVISA, 2012; SWGTOX, 2013). Assim, avaliou-se seis fatores ($1/x$, $1/x^{0,5}$, $1/x^2$, $1/y$, $1/y^{0,5}$ e $1/y^2$) (ALMEIDA; CASTEL-BRANCO; FALCÃO, 2002; RAPOSO, 2016). O fator selecionado foi aquele que forneceu menor somatório para o erro padrão relativo (EPR%), que compara a concentração estimada com a concentração nominal. Desses, o modelo considerado mais adequado para as curvas analíticas do MDA e MDMA foi aquele de fator $1/y$, cujos gráficos das respostas instrumentais ($A_{\text{analito}}/A_{\text{PI}}$), erro padrão relativo (EPR%) e distribuição dos resíduos para ambos o MDA e MDMA estão na **Figura 34**.

Figura 34 – Representação gráfica da curva analítica, erro padrão relativo e resíduo padronizado em função das concentrações de (a-c) MDA e (d-f) MDMA quando o fator $w = 1/y$ é aplicado aos dados.



Fonte: Do Autor.

As curvas analíticas (**Figura 34a** e **Figura 34d**) analisadas demonstraram que $r > 0,990$, que o EPR de todas as replicatas preparadas a partir das amostras DOFS estão abaixo de 18% (**Figura 34b** e **Figura 34e**) e que a distribuição dos resíduos é homogênea e aleatória em torno do eixo horizontal (**Figura 34c** e **Figura 34f**). Sendo assim, as condições de linearidade satisfazem todos os requisitos (**Tabela 17**).

Tabela 17 – Resultado dos testes estatísticos para avaliação da linearidade das curvas de MDA e MDMA usando o modelo de regressão linear ponderada ($w = 1/y$)

	MDA	MDMA	Critério de decisão	Resultado
Coefficientes				
Linear	0,666	0,0257	$t \leq 2,05 t_c$	b não difere estatisticamente de zero
Angular	683	806	$t \geq 2,05 t_c$	m estatisticamente diferente de zero
ANOVA				
Regressão	148762	210675	$F \geq 4,20 F_c$	Modelo linear significativo
Falta de Ajuste	0,270	1,70	$F \leq 2,78 F_c$	Modelo preditivo
Testes				
Mandel	1,41	0,223	$F \leq 9,12 F_M$	Modelo linear adequado
Brown-Forsythe	1,96	1,60	$F \leq 2,62 F_{BF}$	Modelo homocedástico

t_c : (α ; $N-2$), F_c : (α ; $p - 1$; $N - n$), F_M : (α ; $n - 2$; $n - 2$) e F_{BF} : (α ; $n - 1$; $N - n$), onde n é o número de níveis da curva analítica, N é o número de ensaios, p o número de coeficientes da equação e α o nível de significância.

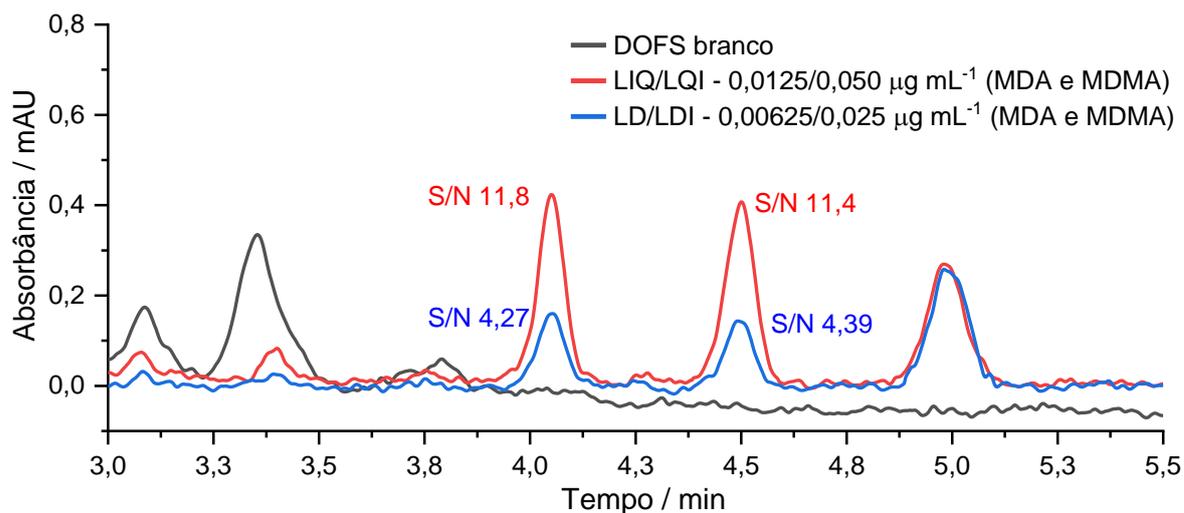
Essas respostas indicam que o modelo $1/y$ aplicado às curvas analíticas do MDA e MDMA, nestas condições, vai ao encontro de todos os requisitos exigidos para a linearidade (ANVISA, 2012, 2017; SWGTOX, 2013). Os resultados completos dos seis modelos aplicados às curvas analíticas estão dispostos no APÊNDICE D e englobam os parâmetros da regressão e os testes estatísticos, ao nível de 95% de confiança.

5.3.1.4. Limites de detecção e de quantificação

O limite de quantificação foi definido como a concentração do primeiro nível da curva analítica para ambos os analitos, com valores de DPR% e EPR% abaixo de 20,0 % e um sinal de pelo menos 10 vezes a resposta do branco (CASSIANO et al., 2009; ANVISA, 2012; SWGTOX, 2013). O limite de detecção, embora não mencionado nos guias, foi estimado com a concentração que retornasse a altura de pico de pelo menos três vezes a amplitude do ruído ($S/N \geq 3$) (CASSIANO et al., 2009). Assim, com precisão e exatidão de 10,4 e 15,3 % para o MDMA e 0,36 e 3,54 % para o MDA (seção 5.3.1.5), o LIQ foi fixado em $0,0125 \mu\text{g mL}^{-1}$. O LD, por sua vez, foi definido como $0,00625 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os valores de LIQ e LD foram os mesmos devido à similaridade estrutural e sensibilidade de ambos os compostos frente ao detector.

Agora, considerando os limites instrumentais, que consideram o fator de pré-concentração durante o preparo de amostras ($F_c = 4$), o LQI e LDI foram de $0,050$ e $0,025 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Os cromatogramas LC-DAD das amostras DOFS fortificadas com os analitos nestas concentrações estão na **Figura 35**.

Figura 35 – Cromatograma LC-DAD evidenciando a razão sinal-ruído (S/N) das DOFS a $0,0125$ (LIQ) e $0,00625 \mu\text{g mL}^{-1}$ (LD) de MDMA e MDA + PI $2,50 \mu\text{g mL}^{-1}$



Fonte: Do Autor.

5.3.1.5. Exatidão e precisão

A precisão e a exatidão são parâmetros essenciais para avaliar a qualidade de um método bioanalítico, uma vez que determinam os erros das medidas analíticas com base na proximidade dos resultados entre si e com o valor considerado verdadeiro (CASSIANO et al., 2009). A precisão, interpretada em termos do desvio padrão relativo (DPR%) nas condições de repetitividade e precisão intermediária, foi realizada em quintuplicata ($k = 5$) com os controles em quatro diferentes níveis de concentração ao longo do mesmo dia e durante quatro dias distintos, respectivamente. A exatidão (*bias*), avaliada como erro padrão relativo (EPR%), foi obtida utilizando os mesmos controles, número de replicatas e período daquele do ensaio de precisão intermediária. O padrão interno (lidocaína $2,50 \mu\text{g mL}^{-1}$) junto as amostras de fluido oral antes da amostragem para corrigir eventuais problemas relacionados à eficiência de extração e injeção das amostras. Os resultados se encontram na **Tabela 18** e mostram valores de desvio padrão relativo entre 1,68 e 15,3 % para o MDA e de 1,37 a 11,7 % para o MDMA, e de erro padrão relativo no intervalo compreendido em $\pm 4,91$ (MDA) e $\pm 4,64$ % (MDMA).

Tabela 18 - Precisão e exatidão (*bias*) do MDA e MDMA em *DOFS* por *LC-DAD*

Composto	Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$	Precisão (DPR%)		Exatidão (EPR%) N = 20
		Intradia (N = 5)	Interdia (N = 20)	
MDA	0,0125	9,85	15,3	3,54
	0,0375	5,31	9,69	1,72
	2,50	1,68	6,50	0,23
	4,00	5,53	7,87	4,91
MDMA	0,0125	8,96	10,4	2,07
	0,0375	7,35	9,83	4,64
	2,50	1,37	11,7	1,47
	4,00	4,84	5,78	2,13

Valores aceitos de EPR% e DPR% normalmente são aqueles de até 15% para todos os níveis de concentração estudados, excetuando-se pelo limite inferior de quantificação, o qual se permite desvio e erro padrão relativos de até 20% (ANVISA, 2012). No entanto, alguns guias, como a *SWGTOX*, mencionam o limite de exatidão e precisão de até 20% para qualquer nível de concentração (*SWGTOX*, 2013). Assim, partindo-se do fato de que este trabalho tem a temática de toxicologia forense, admitiu-se os níveis estabelecidos pela *SWGTOX*. Em razão disso, considerou-se que há evidências o suficiente para afirmar que o método é preciso e exato em suas medidas.

5.3.1.6. Robustez

A robustez, definida como a indicação da capacidade do método em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos, foi avaliado de acordo com o teste de *Youden*. Neste teste, os efeitos da variação de sete parâmetros sobre a resposta instrumental (área), fator de assimetria, eficiência e a resolução foram individualmente estimados com base em oito corridas, em quadruplicata ($k = 4$), utilizando-se soluções padrão a $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ contendo os analitos e apenas as substâncias com potencial para eluir no mesmo tempo de retenção do MDA, MDMA e lidocaína, sendo eles a cafeína e o MDEA. Cocaína e ketamina não foram avaliadas uma vez que o método não é seletivo para ambas. Os efeitos, expressos em EPR%, estão na **Tabela 19**. Os cromatogramas estão na **Figura 46** e os valores obtidos experimentalmente para a área, fator de assimetria, eficiência e resolução estão no APÊNDICE F.

Tabela 19 – Efeito da variação sobre a robustez do método *LC-DAD*

	MDA (EPR%)			MDMA (EPR%)			R _s (EPR%)
	A	A _s	N	A	A _s	N	
A/a	- 6,25	7,31	- 19,1	- 5,82	6,14	- 16,7	- 7,54
B/b	- 0,30	0,59	- 0,66	- 0,50	0,07	- 1,90	- 1,36
C/c	4,32	0,35	- 0,69	4,34	- 0,38	- 0,98	- 5,81
D/d	3,66	0,92	0,30	3,50	- 0,03	- 0,26	- 1,90
E/e	- 1,57	1,87	0,03	- 1,49	- 0,83	0,46	- 0,06
F/f	- 2,49	1,34	- 4,80	- 2,77	- 0,24	- 5,70	- 5,34
G/g	- 1,30	0,21	- 2,75	- 1,48	- 0,83	- 3,27	- 0,70

Letras maiúsculas: condição original, letras minúsculas: condição de variação, A: Thermo, a: Shimadzu, B: 10 mmol L⁻¹, b: 9,0 mmol L⁻¹, C: 25%, c: 26%, D: 1,2 mL min⁻¹, d: 1,1 mL min⁻¹, E: 25 µL e e: 26 µL, F: 35 °C, f: 40 °C, G: 285 nm, g: 282 nm.

Conforme mostra a **Tabela 19**, variar o modelo cromatográfico (A/a) da Thermo para a Shimadzu foi a condição que retornou maiores variações sobre as respostas investigadas, com valores próximos a 6,0% para a área de pico (razão entre as áreas do analito e padrão interno) e entre 6,1 e 7,3% para o fator de assimetria. Em relação a eficiência dos picos, variações superiores a - 15% foram observadas, indicando que há evidência de não robustez para essa resposta. Os resultados para o aumento da A_s provavelmente se deveram a variações relacionados à fase móvel, uma vez que ela foi armazenada em refrigeração por cerca de 24 h para ser reutilizada na análise do equipamento Shimadzu no dia seguinte. Em relação à diminuição do N, deduz-se que essa diferença se deveu às especificações entre os equipamentos, como diâmetro das tubulações, e o aumento do fator de assimetria. No entanto, mesmo com essas variações, a eficiência ainda se encontram cerca de 3x acima do mínimo recomendado para a conformidade do sistema, que é de N = 2000. Em relação ao aditivo na fase móvel (B/b), em que se alterou a concentração do ácido em -10% (relativo), os efeitos se mostraram negativos para a simetria dos picos (aumento do fator de assimetria), mas com nenhuma variação significativa para as respostas (EPR ± 5,0%). Quanto aos outros parâmetros, nenhuma resposta apresentou desvio superior a 5,0% do valor considerado verdadeiro (realizado sob as condições otimizadas). A resolução cromatográfica, por sua vez, apresentou valores maiores ou igual a 1,5 para todas as análises (**Tabela 27**, APÊNDICE F), com a condição crítica quando a porcentagem de acetonitrila na fase móvel e a temperatura da coluna estão a 26% e 40°C, respectivamente. Assim, sob essas condições, há evidências de que o procedimento analítico é robusto e adequado para análise de MDA e MDMA.

5.3.2. Método DOFS

5.3.2.1. Efeito matriz, recuperação e eficiência do processo

Dentre estes três parâmetros, apenas o efeito matriz é citado nos guias de validação bioanalítica da ANVISA e SWGTOX (ANVISA, 2012; SWGTOX, 2013). No entanto, como ambas a recuperação e a eficiência do processo são importantes estimativas para mostrar como o procedimento analítico se comporta frente à amostra utilizada (BIENVENU et al., 2017), estas também foram avaliadas. Com base nos procedimentos de Matuszewski, Constanzer e Chavez-Eng (2003) e Bienvenu et al. (2017), os resultados dos ensaios de efeito matriz (EM%), recuperação (R%) e eficiência do processo (EP%), obtidos pela comparação das razões de área dos picos entre os conjuntos de amostras A, B e C (seção 4.2.4.5, pg. 68) estão na **Tabela 20**. Todas as medidas apresentaram $DPR \leq 15\%$ e, portanto, estão dentro do valor aceitável.

Tabela 20 – Resultado do efeito matriz (EM%), recuperação (R%) e eficiência do processo (EP%) para o MDA e MDMA em DOFS, com padrão interno a $2,50 \mu\text{g mL}^{-1}$

Composto	Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$	Efeito matriz	Recuperação	Eficiência do
		(C/A) ^a (EM \pm DPR) %	(B/C) ^a (R \pm DPR) %	processo (B/A) ^a (EP \pm DPR) %
MDA	0,0125	93,7 \pm 6,8	96,0 \pm 7,2	89,9 \pm 7,2
	0,0375	90,2 \pm 4,3	91,4 \pm 7,5	82,3 \pm 5,2
	2,50	82,4 \pm 1,2	98,2 \pm 2,4	80,9 \pm 1,2
	4,00	84,2 \pm 4,0	95,1 \pm 7,2	79,9 \pm 4,7
MDMA	0,0125	105,7 \pm 9,9	84,2 \pm 11,0	88,4 \pm 4,2
	0,0375	100,0 \pm 5,9	97,6 \pm 8,4	97,7 \pm 11,0
	2,50	87,7 \pm 3,7	95,6 \pm 4,3	83,8 \pm 4,3
	4,00	83,8 \pm 6,0	95,4 \pm 10,8	79,8 \pm 8,3

a. Relação matemática entre a média dos conjuntos de amostras, em percentual.

O efeito matriz é uma consequência da seletividade, e tem como finalidade verificar se os componentes endógenos da matriz podem causar interferências na resposta analítica, seja pela sua diminuição/supressão ($EM\% < 100$) ou ampliação ($EM\% > 100$). Baseado nos conjuntos de amostras A e C (**Tabela 20**), observou-se que os valores do efeito matriz se encontram dentro do intervalo aceitável de 80 a 120% (SWGTOX, 2013), com variação entre - 82,4 a 93,7% para o MDA e de 83,8 a 105,7% para o MDMA. Isso indica que, apesar de os valores não indicarem a presença do efeito matriz, existe uma tendência da diminuição do sinal à medida que a concentração dos analitos aumenta (entre - 15,8 e - 16,2% para $4,00 \mu\text{g mL}^{-1}$). Esse comportamento significa que utilizar a técnica de amostragem DOFS afeta a medida analítica quando se comparado com uma injeção direta dos analitos diluídos em solvente puro.

A redução do sinal pode ser explicada através de alguns fatores como a interação dos analitos pelos centros de adsorção no papel, que tornam a dessorção desses mais difícil, ou devido as propriedades físico-químicas dos analitos, que podem permanecer na superfície em menores concentrações e permear a mancha em direção ao papel a altas concentrações, já que estarão melhor disponíveis e distribuídos sobre o suporte (LI; TSE, 2010; ZHENG et al., 2016).

Quanto ao ensaio de recuperação (R%), definido como a fração do analito “recuperado” após o procedimento de extração, retornou concentrações de MDA e MDMA na faixa de 91,4 a 98,2% e entre 84,2 e 97,2% quando as amostras DOFS do conjunto B e C foram extraídas com ácido trifluoroacético 0,05 v/v em banho ultrassônico por 10 min. Embora seja desejável recuperações próximas de 100%, não há um valor mínimo ou máximo definido e uniformizado. A aceitabilidade, entretanto, tem de se basear em resultados que apresentem consistência e precisão (CASSIANO et al., 2009). Os valores de DPR deste ensaio, por exemplo, variaram entre 2,4 e 7,5% para o MDA e de 4,3 a 11% para o MDMA. Por fim, a eficiência do processo, que combina a perda de analito durante a etapa de preparo de amostra com o efeito matriz, representa a diferença da resposta instrumental induzida pela matriz do analito em comparação com o analito preparado no solvente extrator (conjuntos B e A), (MATUSZEWSKI; CONSTANZER; CHAVEZ-ENG, 2003). O valor $(B/A \times 100\%)$, portanto, é uma medida que avalia a eficiência geral do procedimento analítico. Diferente da recuperação “verdadeira”, que é livre das contribuições da matriz, a eficiência do processo considera este efeito em seu cálculo. Os resultados na Tabela 20 demonstram que as respostas obtidas para este parâmetro variaram entre 79,9 e 89,9% para o MDA e de 79,8 e 97,7% para o MDMA.

5.3.2.2. Integridade de diluição

A partir da amostra matizada fortificada a $25 \mu\text{g mL}^{-1}$, alíquotas foram diluídas cinco (1:5) e dez (1:10) vezes para se atingir as concentrações de 5,00 e $2,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ antes de serem aplicados ao papel. Os resultados da precisão e exatidão das diluições nos controles foram inferiores 6,82% e 6,76% para os analitos (**Tabela 21**), respectivamente, estando as condições dentro dos limites aceitáveis de 15%.

Tabela 21 - Resultados para o ensaio de integridade de diluição das amostras de fluido oral fortificadas com MDA e MDMA a $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ antes do processo da amostragem

Controle de diluição	MDA		MDMA	
	EPR%	DPR%	EPR%	DPR%
1:5 v/v	5,14	1,36	0,58	3,72
1:10 v/v	6,76	2,61	3,22	6,82

5.3.2.3. Estabilidade

A estabilidade é um parâmetro a ser avaliado antes e durante a própria validação bioanalítica, uma vez que os analitos podem se decompor na matriz biológica durante o preparo de amostra ou durante o transporte e armazenamento. Sob essas circunstâncias, a ANVISA e SWGTOX recomendam investigar a estabilidade dos analitos em diferentes situações, tais como estabilidades após ciclos de congelamento e descongelamento, de pós-processamento, estabilidade dos analitos e padrão interno em solução, e estabilidades de curta e longa duração (ANVISA, 2012; SWGTOX, 2013). Em razão disso, a estabilidade dos analitos e PI em DOFS foram verificadas e interpretados como uma medida da exatidão dos resultados em relação à concentração do tempo zero (T_0) (**Tabela 22**), sendo considerado estável se a precisão e exatidão foram inferiores a 15%.

Tabela 22 – Valores de EPR% (em relação ao T_0) e DPR% para a estabilidade ($k = 3$) das DOFS a 0,0375 (CQB) e 4,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (CQA) sob diferentes condições

Estabilidade	MDA				MDMA			
	CQB		CQA		CQB		CQA	
	EPR%	DPR%	EPR%	DPR%	EPR%	DPR%	EPR%	DPR%
Curta duração (temperatura ambiente)								
4 h (T_0)		3,80		1,48		7,97		0,77
12 h	- 10,4	9,68	- 2,56	6,24	1,53	4,26	2,83	4,77
24 h	7,76	8,53	- 10,2	7,26	- 8,34	13,1	- 8,80	7,36
48 h	10,6	9,36	- 6,05	3,50	- 0,560	12,0	- 4,68	3,73
72 h	- 6,50	13,5	- 0,750	7,59	- 0,355	6,26	0,890	7,02
Longa duração (-6 °C)								
Dia 1 (T_0)		2,38		6,42		6,71		0,77
Dia 7	- 12,9	13,3	2,82	3,71	- 3,75	8,02	0,01	3,89
Dia 15	- 5,70	13,4	- 8,09	14,6	3,02	6,01	10,7	12,3
Dia 30	- 1,78	5,27	- 10,9	13,3	0,495	5,22	- 3,71	14,4
Ciclo congelamento e descongelamento								
4 (T_0)		11,5		7,64		3,07		6,45
12 h	1,24	6,49	5,33	6,47	5,67	11,2	5,57	5,13
24 h	- 3,34	2,54	4,72	2,38	8,39	10,7	6,43	2,67
48 h	- 12,5	12,6	4,26	11,1	6,30	6,96	14,1	1,15
Pós-processamento (20 °C)								
4 (T_0)		3,09		1,94	- 1,43	9,38		1,71
12 h	- 0,0420	10,3	- 1,66	6,55	- 6,46	9,97	- 8,81	7,07
24 h	0,143	0,655	0,400	3,38	- 8,17	4,48	0,590	3,30
48 h	0,0141	10,2	- 1,79	2,44	- 5,02	7,30	- 4,25	2,61

A estabilidade de curta duração foi determinada com amostras matrizadas armazenadas à temperatura ambiente antes de serem processadas, registrando-se suas concentrações nos tempos 4 (T_0), 24, 48 e 72 h. Os resultados mostraram que ambos os analitos foram estáveis, com valores de DPR $\leq 13,5\%$ e EPR $\pm 10,6\%$ para o MDA e de até 13,1 e - 8,80% para o MDMA, quando comparados com as amostras preparadas no tempo zero. A respeito da estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, amostras DOFS em triplicata foram sujeitas a três ciclos de congelamento a $-6\text{ }^\circ\text{C}$ e descongelamento à temperatura ambiente antes de serem processadas. Com as análises realizadas nos tempos 4 (T_0), 12, 24 e 48 h, valores de DPR $\leq 12,6\%$ e EPR $\pm 12,5\%$ e de 11,2 e 14,1% foram observados para o MDA e MDMA, respectivamente. Com relação à estabilidade de longa duração, as amostras DOFS foram armazenadas no congelador a $-6\text{ }^\circ\text{C}$ por um período de 30 dias e analisadas nos dias 0 (T_0), 7, 15 e 30. Os resultados de desvio padrão relativo e erro padrão relativo foram inferiores a 14,4% e dentro de $\pm 10,9\%$ para os compostos de interesse. Por fim, a estabilidade de pós-processamento, ou do amostrador, avaliado submetendo as soluções da extração (no *vial*) no carrossel do autoamostrador a $20\text{ }^\circ\text{C}$, foram analisadas depois de 12, 24 e 48 h. Comparando o valor médio obtido com o àquele do tempo zero ($T_0 = 4\text{ h}$), desvios e erros padrão relativo retornaram resultados entre 0,65 e 10,3% e de -1,79 a 0,40% para o MDA e de 1,71 a 9,97% e entre -8,81 e 0,59% para o MDMA. Assim, existem evidências da estabilidade de ambos os analitos e padrão interno nas condições de armazenamento avaliadas neste trabalho, sendo de pelo menos 72 h em temperatura ambiente e de 30 dias em condições de $-6\text{ }^\circ\text{C}$.

5.3.3. Considerações sobre a performance do método

Em relação aos limiares analíticos, Stoykova et al. (2016) desenvolveu um método qualitativo por *GC-MS* para algumas drogas de abuso, incluindo o MDMA. Neste estudo, em que 250 μL de fluido oral foram transferidos para um papel filtro não especificado e, em seguida, tratados previamente com metanol acidificado antes da extração com acetato de etila, observou-se recuperações superiores a 70% para os estimulantes anfetamínicos, com um limite de detecção de 100 ng mL^{-1} . Jacques e colaboradores (2019), por sua vez, empregaram um sistema *LC-MS* para quantificar cinco drogas de abuso e obtiveram um LD de 40 ng mL^{-1} para o MDMA. Para isso, antes da extração em banho ultrassônico, os autores deixaram os discos contendo 50 μL de *OF* imersos por 5 min na mistura extratora de metanol:acetato de amônio:metanol (55:35:10, v/v). Richeval et al. (2019) utilizou um sistema *LC-HRMS* como técnica de confirmação após amostras de *OF* serem coletadas com o dispositivo Drugwipe-5S

(*cut off* de 100 ng mL^{-1}), sendo os analitos extraídos com metanol. Outros trabalhos em *DOFS* são os de Gorziza et al. (2020) e Ribeiro et al. (2019). Ambos utilizam métodos baseados em *MS/MS* e possuem LDs tão baixos quanto $0,2 \text{ ng mL}^{-1}$ para $50 \mu\text{L}$ de fluido oral. Em relação às amostragens por DBS, limites de detecção variaram de $0,5$ a $7,2 \text{ ng mL}^{-1}$ (**Tabela 23**). Algumas agências e projetos definem os valores mínimos de detecção das drogas de abuso em fluido oral. Enquanto a *Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA)* e a *Roadside Testing Assessment (ROSITA)* requerem um *cut off* de confirmação de 25 ng mL^{-1} (WOLFF et al., 2016; SAMHSA, 2019), a *European Workplace Drug Testing Society (EWDTs)* recomenda um valor máximo de 15 ng mL^{-1} (BRCAK et al., 2018) e a *Driving Under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines in Europe (DRUID)* reporta valores de 220 e 280 ng mL^{-1} para o MDA e MDMA, respectivamente (SCHULZE et al., 2012). Assim, comparando-se os trabalhos, os limiares de $6,25$ (LD) e $12,5$ (LIQ) ng mL^{-1} obtidos para ambos os analitos se fazem adequados para a quantificação em amostras de fluido oral.

Considerando os diferentes métodos de extração das manchas secas de fluido oral, diferentes valores de recuperação foram descritos na literatura, variando entre 22,0 (ODOARDI; ANZILLOTTI; STRANO-ROSSI, 2014) a 122% (SAUSSEREAU et al., 2012) para MDA e de 26% (ODOARDI; ANZILLOTTI; STRANO-ROSSI, 2014) a 108% (KACARGIL; DAGLIOGLU; GOREN, 2020) para o MDMA (**Tabela 23**). O estudo desenvolvido apresenta uma média de $95,2 \pm 2,83$ e $93,2 \pm 6,08$ % para o MDA e MDMA, respectivamente, quando extraídos com metanol, apresentando-se satisfatório para o qual se fez proposto. Quanto ao efeito matriz, usualmente determinado em métodos baseados em espectrometria de massas, também foi calculado para *LC-DAD*. Nesse sentido, fraca supressão (82,4 – 106%) foi observada para o MDA e MDMA nas maiores concentrações da curva analítica. Comportamentos semelhantes foram observados para outras publicações (JACQUES; DOS SANTOS; LIMBERGER, 2019). A combinação do efeito de supressão com a recuperação resultou em uma eficiência do processo variando entre 80 e 98%, indicando boa performance.

Quanto a estabilidade das amostras, a abordagem *DOFS* apresentou excelente estabilidade para as condições estudadas. Diversos estudos usando *DMS* (fluido oral sangue) reportaram estabilidade variando entre três dias a oito meses para o MDMA e MDA quando armazenados a temperatura ambiente, entre 2 e 8 °C, e em temperaturas entre - 10 e - 20°C (**Tabela 23**). Neste trabalho, a estabilidade avaliada em temperatura ambiente por 3 dias, congelador a - 6 °C por 30 dias, autoamostrador a 20 °C depois do pós-processamento e após ciclos de congelamento e descongelamento, resultaram em variações inferiores a 15% da concentração nominal, evidenciando a estabilidade dos compostos.

Tabela 23 – Performance analítica para trabalhos que envolvem determinação de MDA e/ou MDMA em matrizes biológicas por *dried matrix spot*

Composto	Técnica	Técnica	Recuperação	Efeito matriz	Ensaio de estabilidade	LD	LIQ	Referência
			%	%		ng mL ⁻¹		
MDA MDMA	<i>DOFS</i>	<i>LC-DAD</i>	91,4 – 98,2 84,2 – 97,6	82,4 – 93,7 83,8 – 106	t.a. (3 dias), - 6° C (1 mês), cong./descong. (2 dias), autoamostrador (20 °C, 2 dias)	6,25	12,5	Este trabalho
MDMA	<i>DOFS</i>	<i>GC-MS</i>	> 70	-	-	-	100	(STOYKOVA et al., 2016)
MDMA	<i>DOFS</i>	<i>LC-MS</i>	-	> 75	t.a. (3 dias), autoamostrador (12 h)	-	40,0	(JACQUES; DOS SANTOS; LIMBERGER, 2019)
MDA MDMA	<i>DBS</i>	<i>UPLC- MS/MS</i>	83,0 – 85,0 84,0 – 86,0	104 – 106 90,0 – 91,0	t.a. (≥ 6 meses), 2 – 8 °C e - 10 °C (8 meses)	2,00 0,50	2,00 1,00	(SIMÕES; CASTAÑERA AJENJO; DIAS, 2018)
MDA MDMA	<i>DBS</i>	<i>LC-MS/MS</i>	87,6 96,4	- -	t.a. (14 dias), 4 °C (14 dias)	2,50 2,50	- -	(AMBACH et al., 2014)
MDA MDMA	<i>DBS</i>	<i>UPLC- MS/MS</i>	22,0 – 47,0 26,0 – 54,0	72,0 – 79,0 67,0 – 77,0	-	0,50 0,50	2,00 2,00	(ODOARDI; ANZILLOTTI; STRANO-ROSSI, 2014)
MDA MDMA	<i>DBS</i>	<i>LC-MS/MS</i>	101 – 105 90,4 - 108	93,0 – 107 86,0 - 119	t.a., 4 °C e -20 °C (3 meses)	2,37 2,09	7,18 6,33	(KACARGIL; DAGLIOGLU; GOREN, 2020)
MDMA	<i>DBS</i>	<i>LC-MS/MS</i>	74,0	72,0	-	1,0	-	(VERSACE et al., 2013)
MDA MDMA	<i>DBS</i>	<i>LC-MS/MS</i>	122 102	106 96,5	4 °C (< 6 meses), - 20 °C (6 meses)	1,0 1,0	5,0 5,0	(SAUSSEREAU et al., 2012)

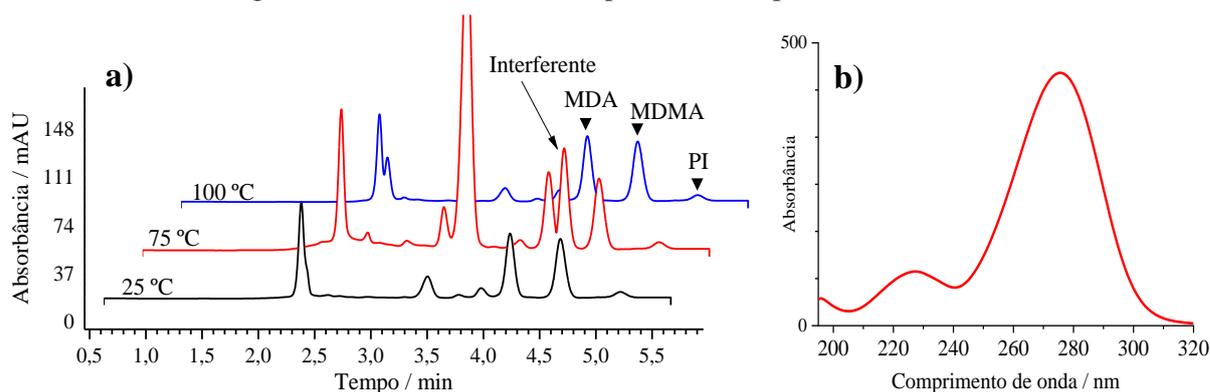
DAD: detector de arranjo de diodos, DOFS: *dried oral fluid spot*, DBS: *dried blood spot*, GC: cromatografia a gás, LC: cromatografia líquida, LD: limite de detecção, LIQ: limite inferior de quantificação, MS: espectrometria de massas, t.a.: temperatura ambiente, UPLC: cromatografia líquida de ultra performance,

5.4. Abordagem DOFS alternativa: estudos preliminares

5.4.1. Tempo e temperatura de secagem

O tempo e temperatura de secagem são parâmetros essenciais para a formação da *DOFS*, sendo considerados cruciais para a estabilidade dos analitos e, conseqüentemente, para a possibilidade de armazenamento ou transporte. Como este parâmetro depende do volume de amostra aplicado, da temperatura e do tipo de papel, considerou-se realizar alguns estudos preliminares para essas variáveis. Sendo 4 h o tempo médio para uma alíquota de 150 μL de OF secar em temperatura ambiente, uma tentativa de diminuir esse período foi avaliado por meio da verificação do tempo necessário para a completa secagem das gotas de fluido oral sobre o papel em mais duas temperaturas em estufa, nomeadamente 75 e 100°C. Nesse sentido, o tempo para formação da mancha seca foi de aproximadamente 40 e 25 min, respectivamente, o que reflete em reduções de até 90% no tempo de secagem. No entanto, um ponto que deve ser considerado quando temperaturas maiores são utilizadas é a estabilidade dos analitos e da matriz de papel, que pode conter substâncias ou impurezas capazes de se degradar termicamente. Quando se analisou algumas *DOFS* por *LC-DAD* nas temperaturas acima mencionadas, verificou-se um pico interferente no tempo de retenção entre os do MDA e MDMA quando submetido a 75 °C, conforme pode ser observado nos cromatogramas da **Figura 36a**. O espectro UV desta substância obtido pelo arranjo de diodos está na **Figura 36b**.

Figura 36 – (a) Cromatogramas LC-DAD das amostras *DOFS* submetidas a diferentes temperaturas de secagem (25, 75 e 100 °C) e (b) espectro UV do pico interferente a 75 °C

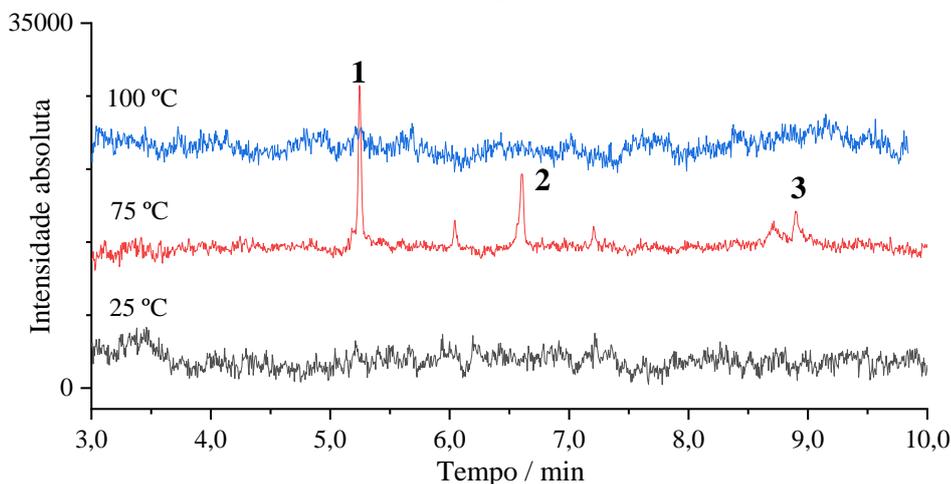


Condições: Coluna fenil (25 cm x 4,6 mm, 5 μm) a 35 °C, injeção de 25 μL , fase móvel composta por TFA 10 mmol L^{-1} e acetonitrila (75:25, v/v) a 1,2 mL min^{-1} . Extração de duas *DOFS* sem analito ou fluido oral em 600 μL de metanol e reconstituição em TFA 0,05% v/v. Fonte: Do Autor.

Com esse resultado, papéis brancos (sem fluido oral, analitos e PI) foram extraídos com metanol puro e analisados por GC-MS de modo a verificar a presença ou ausência de possíveis interferentes que poderia vir do tratamento térmico desses papéis. A troca de solvente foi

realizado devido a incompatibilidade da solução TFA 0,05% v/v com o detector de massas. Os cromatogramas GC-MS experimentais da extração da matriz celulósica à 25, 75 e 100 °C estão representados na **Figura 37**, na qual três picos foram observados.

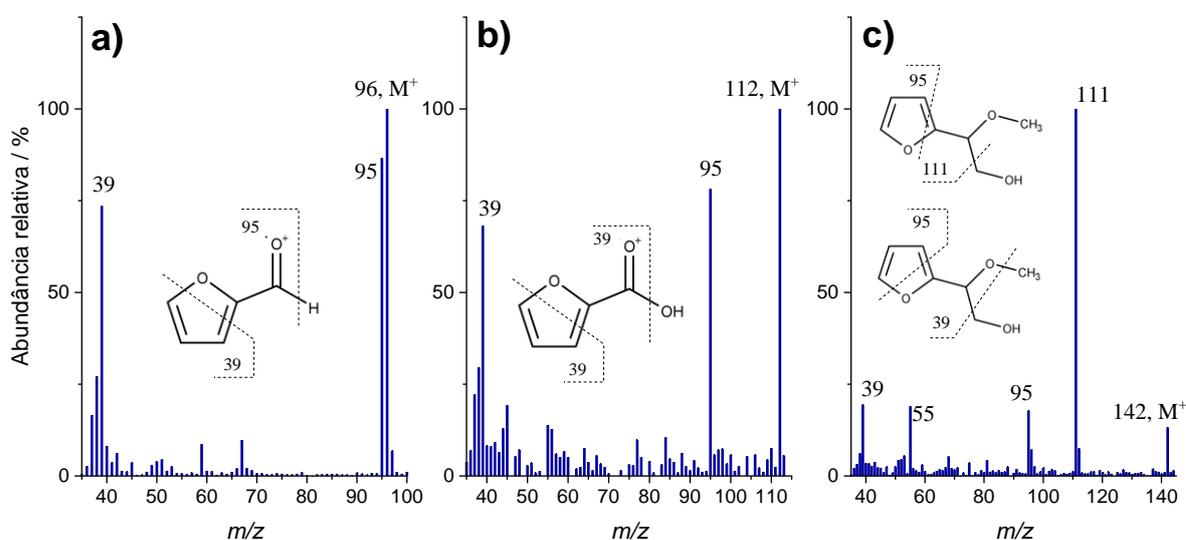
Figura 37 – Cromatograma GC-MS dos papéis branco submetidos a 25, 75 e 100 °C



Condições: Coluna OPTIMA 35 MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 μm), injeção de 1,0 μL e hélio como fase móvel a 2,0 mL min^{-1} . Temperaturas do injetor, MS e interface a 260 °C, com programação de 60 a 260 °C (2 min) a 20 °C min^{-1} e análise no modo *full scan*. Fonte: Do Autor.

Conforme se observa nos cromatogramas, esse pico não apareceu quando os papéis foram deixados secar a 25 ou a 100 °C, indicando possível formação de composto volátil na temperatura intermediária. Assim, com a intenção de identificá-los, empregou-se o espectro de massas fornecido (**Figura 38**), comparando-o com a base de dados da biblioteca do NIST.

Figura 38 – Espectro MS dos picos encontrados no papel submetido a secagem a 75 °C. Os picos referem-se ao (a) furfural, (b) ácido furancarboxílico e (c) hidroximetoxietilfurano



Fonte: Do Autor.

Os resultados do MS indicaram presença de furfural (pico 1, $match \geq 95\%$), 2-hidroxi-metoxietilfurano (2, 83%) e ácido 2-furanocarboxílico (3, 74), componentes comuns na composição de papéis quando esses são submetidos a tratamentos ácidos ou térmicos (SLADKEVICH et al., 2016). Após verificação com o MS e comparação do espectro UV com o trabalho de Ortu e Caboni (2018), há evidências de que o pico interferente obtido no LC era devido ao furfural. No entanto, o ponto de ebulição do furfural é de aproximadamente 162 °C, o que não condiz com as temperaturas trabalhadas. Para isso, há duas hipóteses: o furfural teve sua degradação forçada devido ao aumento da temperatura na presença de ácido nítrico (presente no papel), oxidando-o para ácido furanocarboxílico e posteriormente se degradando em furano, que é extremamente volátil (31 °C), fazendo com que estes compostos não sejam encontrados a 100 °C, ou oxidado a ácido furanocarboxílico (ebulição a 230 °C) e retido no papel. A presença na temperatura de 75 e ausência na de 100 °C seria relativo ao tempo necessário para completa conversão do aldeído a ácido carboxílico, muito mais rápido na maior temperatura. Com a conversão incompleta, a detecção de tais substâncias seria possível. Em 100 °C, com a oxidação completa, o ácido furanocarboxílico não teria afinidade pelo solvente extrator que está em torno de pH 2,0 e, portanto, não seria extraído (RAMOS, 2003; SLADKEVICH et al., 2016; DELATOUR et al., 2020). Assim, dentre as três temperaturas avaliadas, a temperatura de 100 °C poderia ter sido utilizada, mas isso acarretaria avaliar a estabilidade dos analitos nesta temperatura, assim como dos interferentes.

5.4.2. Estabilidade

Seguido da escolha da temperatura, a estabilidade do MDA e MDMA foram ensaiadas. Amostras DOFS contendo os analitos nos níveis 0,0375 e 4,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em triplicata ($k = 3$), foram submetidas a temperatura de 25 e 100 °C, e os resultados preliminares, em termos de erro padrão relativo e desvio padrão relativo, estão sumarizados na **Tabela 24**, em que os valores indicam que não houve diferenças significativas sobre a concentração ($EPR \pm 9,2\%$) e precisão ($DPR = \leq 11,9$) entre as amostras nas duas temperaturas. Este estudo, portanto, mostra o potencial de se utilizar maiores temperaturas para acelerar o tempo de secagem das DOFS.

Tabela 24 – Estabilidade do MDA e MDMA nas temperaturas de 25 e 100 °C ($k = 3$)

Temperatura	MDA		MDMA	
	CQB	CQA	CQB	CQA
25 °C	0,36 ± 7,14	- 4,58 ± 7,30	- 9,19 ± 13,3	- 4,16 ± 6,92
100 °C	0,88 ± 10,2	0,88 ± 6,84	- 0,36 ± 11,9	0,06 ± 6,98

Valores são dados como ($EPR \pm DPR$) %

6. CONCLUSÃO

Como mostrado neste trabalho, utilizar a amostragem por DOFS representa um procedimento relativamente simples e de baixo custo para determinação de MDMA e MDA em amostras de fluido oral, sendo de importância principalmente para a toxicologia forense. Embora apresente diversas vantagens como já mencionado, o número de publicações voltados aos compostos de interesse forense ainda é limitado.

O método LC-DAD não necessita de etapas prévias de derivatização como no caso da técnica por GC-MS e é mais econômico do que um LC-MS ou LC-MS/MS, sendo viável e exequível em laboratórios de menor orçamento. Além do mais, vale mencionar que a fase móvel constituída por ácido trifluoroacético e acetonitrila é volátil e, portanto, compatível com métodos baseados em MS, sendo possível transpor o método se necessário. Outros pontos fortes para o procedimento estabelecido é que ele foi seletivo para 23 substâncias passíveis de serem encontradas em amostras de *ecstasy* ou coadministradas, incluindo drogas ilícitas, prescritas e aquelas que não necessitam de receita médica, e permitiu boa separação entre os analitos e PI, com a vantagem de uma rápida corrida cromatográfica mesmo com a coluna analítica proposta, de maior dimensão em relação as outras utilizadas em trabalhos recentes. Quanto aos limiares analíticos do método, os valores de LD e LIQ foram de 6 a 12x maiores para aqueles comumente obtidos por espectrometria de massas, mas abaixo do valor de corte definido pelas agências SAMHSA e ROSITA, indicando a adequada sensibilidade do método e sua coerência com a faixa de concentração esperada para o MDA e MDMA em amostras reais de fluido oral, mesmo o sistema DAD sendo uma técnica de menor sensibilidade e seletividade. Nesses casos, é recomendado a detecção de compostos com fracos grupos cromóforos por técnicas adicionais (e. g., baseadas em MS) para identificação confirmatória.

O método DOFS se apresentou eficiente e reproduzível para extração dos analitos (MDA e MDMA) e do padrão interno. Observou-se que, realizando o tratamento prévio nos papéis comuns (de papelaria) para alteração do pH e remoção de impurezas, foi possível desenvolver um método com eficiência do processo entre 79,8 e 97,7 % para o MDA e MDMA, de modo que ambas os metilenodioxi-substituídas puderam ser extraídos satisfatoriamente de forma fácil, prática e reduzindo custos (5 a 20x), se comparado com as tradicionais matrizes de DMS disponíveis no mercado. Além do mais, o processo de tratamento dos papéis seguido da secagem das amostras de fluido oral depositadas sobre o papel provavelmente permitiram a maior estabilidade do MDA, MDMA e lidocaína, uma vez que nenhuma variação superior a 20% em relação à concentração nominal dos compostos foi verificada por pelo menos 2 dias

quando armazenadas em temperatura ambiente (+ 25 °C), no congelador (- 6 °C) ou no autoamostrador após serem processadas (+ 20 °C), tornando-se uma alternativa para o armazenamento e transporte de amostras. Ademais, a DOFS necessita de um volume menor de amostra (150 µL) e de solventes se comparado com outras técnicas como a convencional extração líquido-líquido, mas ao mesmo tempo requer uso de técnicas instrumentais sensíveis como o LC-MS. Nesse sentido, apesar do arranjo de diodos não possuir a mesma sensibilidade que um espectrômetro de massas, etapas adicionais foram realizadas de modo a contornar esse problema, como a pré-concentração (4x) dos analitos nas amostras através da evaporação/reconstituição do extrato em menor volume de solvente. No entanto, mesmo com as etapas de amostragem, extração e pré-concentração, o ensaio de precisão e exatidão revelou valores dentro dos critérios mínimos estabelecidos pelos guias de validação da SWGTOX e ANVISA, mostrando a adequabilidade do procedimento DOFS/LC-DAD em aplicações qualitativas e quantitativas, confirmando sua performance analítica. Sua maior desvantagem está relacionada a necessidade de pré-tratamento do papel aquarela e a ao tempo de secagem das amostras (4 h em t.a. ou 20 min em estufa), que dificultaria seu uso em casos de teste rápidos em abordagens de rua. Nessa situação, seria recomendável matrizes de papel com maior capacidade de absorção para que a formação da mancha seca pudesse ocorrer em menor tempo ou estudos envolvendo procedimentos mais brandos e rápidos de pré-tratamento ou papéis

Assim, com base no desenvolvimento realizado nesse presente trabalho, afirma-se que o método desenvolvido no presente trabalho evidencia o potencial da amostragem por DOFS e da análise por cromatografia líquida/arranjo de diodos em amostras de fluido oral para o propósito forense, com procedimento relativamente simples, de baixo custo e reprodutível para determinação de MDA, MDMA e lidocaína, podendo ser útil se expandida como técnica de triagem e quantificação para outras drogas de maior prevalência na toxicologia forense.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-REHIM, A.; ABDEL-REHIM, M. Dried saliva spot as a sampling technique for saliva samples. **Biomedical Chromatography**, v. 28, n. 6, p. 875–877, 2014.
- ABRAHAM, T. T. et al. Urinary MDMA, MDA, HMMA, and HMA excretion following controlled MDMA administration to humans. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 33, n. 8, p. 439–446, 2009.
- ABU-RABIE, P. et al. Method of applying internal standard to dried matrix spot samples for use in quantitative bioanalysis. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 22, p. 8779–8786, 2011.
- ALMEIDA, A. M.; CASTEL-BRANCO, M. M.; FALCÃO, A. C. Linear regression for calibration lines revisited: Weighting schemes for bioanalytical methods. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 774, n. 2, p. 215–222, 2002.
- ALMEIDA, N. S. et al. A validated NMR approach for MDMA quantification in ecstasy tablets. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 9, p. 1944–1950, 2018.
- ALVES, E. A. et al. Chemical Profile and Toxicological Features of Ecstasy Tablets Seized in Rio De Janeiro, Brazil. **Journal of Forensic Toxicology and Pharmacology**, v. 2, n. 2, 2013.
- ALVES, E. A.; SABINO, B. D. Chemical Profile of Ecstasy Tablets – a Review. **Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics**, v. 2, n. 2, p. 165–178, 2013.
- AMBACH, L. et al. Rapid and simple LC-MS/MS screening of 64 novel psychoactive substances using dried blood spots. **Drug Testing and Analysis**, v. 6, n. 4, p. 367–375, 2014.
- ANVISA. Resolução RDC 27, de 17 de maio de 2012 - Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2012.
- ANVISA. Resolução RDC 166, de 24 de julho de 2017 - Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2017.
- ANVISA. Resolução RDC 404, de 21 de julho de 2020 - Dispõe sobre a atualização do Anexo I (Listas de Substâncias Entorpecentes, Psicotrópicas, Precursoras e Outras sob Controle Especial) da Portaria SVS/MS nº 344, de 12 de maio de 1998, e dá outras providências. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2020.
- AYRE, A. P. et al. Dried Matrix Spotting - An innovative sample preparation tool in Bionalysis. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 9, n. 9, p. 3597–3607, 2018.
- BAGGOTT, M. et al. Chemical analysis of ecstasy pills. **Journal of the American Medical Association**, v. 284, n. 17, p. 2190, 2000.
- BAGGOTT, M. J. et al. Effects of the Psychedelic Amphetamine MDA (3,4-Methylenedioxyamphetamine) in Healthy Volunteers. **Journal of Psychoactive Drugs**, v. 51,

n. 2, p. 93–97, 2019.

BAHMANABADI, L. et al. Quantitative determination of methamphetamine in oral fluid by liquid-liquid extraction and gas chromatography/mass spectrometry. **Human and Experimental Toxicology**, v. 36, n. 2, p. 195–202, 2017.

BARNES, A. J. et al. MDMA and metabolite disposition in expectorated oral fluid after controlled oral MDMA administration. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 33, n. 5, p. 602–608, 2011.

BASSOTTI, E. et al. A new LC-MS/MS confirmation method for the determination of 17 drugs of abuse in oral fluid and its application to real samples. **Forensic Science International**, v. 312, 2020.

BASTOS, F. I. P. M. et al. **III Levantamento Nacional sobre o Uso de Drogas pela População Brasileira**. Rio de Janeiro, Brasil: Fundação Oswaldo Cruz e Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde, 2017.

BIENVENU, J. F. et al. Standardized Procedure for the Simultaneous Determination of the Matrix Effect, Recovery, Process Efficiency, and Internal Standard Association. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 14, p. 7560–7568, 2017.

BOCIAN, S.; BUSZEWSKI, B. Residual silanols at reversed-phase silica in HPLC - A contribution for a better understanding. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 10–11, p. 1191–200, 2012.

BORDIN, D. C. M. et al. Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 2, p. 125–143, 2015.

BRCAK, M. et al. European guidelines for workplace drug testing in oral fluid. **Drug Testing and Analysis**, v. 10, n. 3, p. 402–415, 2018.

CABAL, L. F. R. et al. Determination of ring-substituted amphetamines through automated online hollow fiber liquid-phase microextraction-liquid chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 411, p. 7889–7897, 2019.

CALABUIG-HERNÁNDEZ, S.; GARCÍA-ALVAREZ-COQUE, M. C.; RUIZ-ANGEL, M. J. Performance of amines as silanol suppressors in reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1465, p. 98–106, 2016.

CARAMELO, D. et al. Determination of antipsychotic drugs in oral fluid using dried saliva spots by gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 411, n. 23, p. 6141–6153, 2019.

CARVALHO, J. et al. Determination of antiepileptic drugs using dried saliva spots. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 43, n. 1, p. 61–71, 2019.

CASON, T. A. D. An Evaluation of the Potential for Clandestine Manufacture of 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDA) Analogs and Homologs. **Journal of Forensic Sciences**, v. 35, n. 3, p. 675–697, 1990.

CASSIANO, N. M. et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021–1030, 2009.

CHAN, K. W.; RAMLI, S. H. Development of an in-house HPLC method for the analysis of ecstasy-laced beverages. **Egyptian Journal of Forensic Sciences**, v. 8, n. 18, 2018.

CHENG, W.-C.; POON, N.-L.; CHAN, M.-F. Chemical Profiling of 3,4 Methylendioxyamphetamine (MDMA) Tablets Seized in Hong Kong. **Journal of Forensic Sciences**, v. 48, n. 6, p. 1249–1259, 2003.

CIOBANU, A. M. et al. Toxicological analysis of some drugs of abuse in biological samples. **Journal of Mind and Medical Sciences**, v. 2, n. 2, p. 108–127, 2015.

CODY, J. T. Amphetamines. In: BOGUSZ, M. J. (Ed.). **Handbook of Analytical Separations**. 1st. ed. Amsterdam: Elsevier, 2008. 6, p. 121–174.

COLE, J. C. et al. The content of ecstasy tablets: Implications for the study of their long-term effects. **Addiction**, v. 97, n. 12, p. 1531–1536, 2002.

CONCHEIRO, M. et al. Determination of MDMA, MDA, MDEA and MBDB in oral fluid using high performance liquid chromatography with native fluorescence detection. **Forensic Science International**, v. 150, n. 2–3, p. 221–226, 2005.

CONCHEIRO, M. et al. Determination of illicit and medicinal drugs and their metabolites in oral fluid and preserved oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 6, p. 2329–2338, 2008.

COSTA, J. L. da et al. Determinação de 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) em comprimidos de Ecstasy por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (CLAE-DF). **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 965–969, 2009.

COUCHMAN, L. et al. Variability in content and dissolution profiles of MDMA tablets collected in the UK between 2001 and 2018 – A potential risk to users? **Drug Testing and Analysis**, v. 11, n. 8, p. 1172–1182, 2019.

D'ARIENZO, C. J. et al. DBS sampling can be used to stabilize prodrugs in drug discovery rodent studies without the addition of esterase inhibitors. **Bioanalysis**, v. 2, n. 8, p. 1415–1422, 2010.

DAI, J.; CARR, P. W. Effect of mobile phase anionic additives on selectivity, efficiency, and sample loading capacity of cationic drugs in reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 39, p. 6695–6705, 2009.

DE LA TORRE, R. et al. Human Pharmacology of MDMA: Pharmacokinetics, Metabolism, and Disposition. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 26, n. 2, p. 137–144, 2004.

DECONINCK, E. et al. Combining attenuated total reflectance-infrared spectroscopy and chemometrics for the identification and the dosage estimation of MDMA tablets. **Talanta**, v. 195, p. 142–151, 2019.

DELATOUR, T. et al. Thermal degradation of 2-furoic acid and furfuryl alcohol as pathways in the formation of furan and 2-methylfuran in food. **Food Chemistry**, v. 303, 2020.

DESROSIERS, N. A. et al. Oral fluid and plasma 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and metabolite correlation after controlled oral MDMA administration. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 12, p. 4067–4076, 2013.

DI CORCIA, D. et al. Determination of pharmaceutical and illicit drugs in oral fluid by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 927, p. 133–141, 2013.

DI PIETRA, A. M. et al. Analysis of amphetamine and congeners in illicit samples by liquid chromatography and capillary electrophoresis. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 25, n. 2, p. 99–105, 2001.

DOLAN, J. **A Guide to HPLC and LC-MS Buffer Selection**. Aberdeen, Scotland: Advanced Chromatography Technologies, 2012.

DOLAN, K.; ROUEN, D.; KIMBER, J. An overview of the use of urine, hair, sweat and saliva to detect drug use. **Drug and Alcohol Review**, v. 23, n. 2, p. 213–217, 2004.

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

DRUMMER, O. H.; GEROSTAMOULOS, D. Forensic drug analysis. **Future Medicine**, p. 2–9, 2013.

DRUMMER, O. H.; GEROSTAMOULOS, D. Toxicological Analysis: Drug Screening and Confirmation. In: MADEA, B. (Ed.). **Handbook of Forensic Medicine**. 1st. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2014. p. 866–872.

DUARTE, L. O. et al. Validated green phenyl reversed-phase LC method using ethanol to determine MDMA in seized ecstasy tablets. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, 2020.

EMCDDA. European Drug Report 2020: Trends and development. **European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction**, p. 88, 2020.

EPSHTEIN, N. A. System Suitability Requirements for Liquid Chromatography Methods: Controlled Parameters and their Recommended Values (Review). **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 54, n. 5, p. 518–525, 2020.

EROWID CENTER. **Erowid's anonymous drug analysis program (EcstasyData)**. Disponível em: <<https://www.drugsdata.org/>>. Acesso em: 30 nov. 2020.

ES'HAGHI, Z. et al. The measurement of ecstasy in human hair by triple phase directly suspended droplet microextraction prior to HPLC-DAD analysis. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 878, n. 11–12, p. 903–908, 2010.

FACHI, M. M. et al. A systematic and critical review on bioanalytical method validation using the example of simultaneous quantitation of antidiabetic agents in blood. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1055–1056, p. 61–71, 2017.

FARRÉ, M. et al. Human pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy) after repeated doses taken 4h apart Human pharmacology of MDMA after repeated doses taken 4h apart. **European Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 10, p. 1637–1649, 2015.

FIGUEIREDO, N. B. de et al. Determination of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in Confiscated Tablets by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) with Diode Array Detector. **Journal of Forensic Research**, v. 1, n. 2, 2010.

FORNSTEDT, T.; FORSSÉN, P.; WESTERLUND, D. Basic HPLC Theory and Definitions: Retention, Thermodynamics, Selectivity, Zone Spreading, Kinetics, and Resolution. In: ANDERSON, J. L. et al. (Ed.). **Analytical Separation Science**. 1st. ed. Weinheim: John Wiley & Sons, 2015. p. 1–24.

FUCCI, N.; DE GIOVANNI, N.; CHIAROTTI, M. Simultaneous detection of some drugs of abuse in saliva samples by SPME technique. **Forensic Science International**, v. 134, n. 1, p. 40–45, 2003.

GALLARDO, E.; QUEIROZ, J. A. The role of alternative specimens in toxicological analysis. **Biomedical Chromatography**, v. 22, n. 8, p. 795–821, 2008.

GARCÍA-ALVAREZ-COQUE, M. C.; BAEZA-BAEZA, J. J.; RAMIS-RAMOS, G. Reverse-Phase Liquid Chromatography. In: ANDERSON, J. L. et al. (Ed.). **Analytical Separation Science**. 1st. ed. Weinheim: John Wiley & Sons, 2015. p. 159–197.

GASCO-LÓPEZ, A. I.; SANTOS-MONTES, A.; IZQUIERDO-HORNILLOS, R. The Effect of Different Amines Added to Eluents as Silanol Masking Agents on the Chromatographic Behavior of Some Diuretics in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography Using C18 Packings. **Journal of Chromatographic Science**, v. 35, n. 11, p. 525–535, 1997.

GENTILI, S. et al. Simultaneous detection of amphetamine-like drugs with headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 780, n. 1, p. 183–192, 2002.

GHAFAARI, R. et al. HPLC Measurement of MDMA Content in Ecstasy Tablets Available in the Black Market of West Azerbaijan Province, Northwestern Iran. **Asia Pacific Journal of Medical Toxicology**, v. 3, p. 163–168, 2014.

GIMENO, P. et al. A contribution to the chemical profiling of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) tablets. **Forensic Science International**, v. 127, n. 1–2, p. 1–44, 2002.

GIMENO, P. et al. A study of impurities in intermediates and 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) samples produced via reductive amination

routes. **Forensic Science International**, v. 155, n. 2–3, p. 141–157, 2005.

GONZÁLEZ, O.; ALONSO, R. M. Validation of bioanalytical chromatographic methods for the quantification of drugs in biological fluids. In: HEMPEL, G. (Ed.). **Handbook of Analytical Separations**. 1st. ed. Amsterdam: Elsevier, 2020. 7, p. 115–134.

GORZIZA, R. et al. Extraction of dried oral fluid spots (DOFS) for the identification of drugs of abuse using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Forensic Chemistry**, 2020.

GREEN, M. D.; MOUNT, D. L.; NETTEY, H. High-performance liquid chromatographic assay for the simultaneous determination of sulfadoxine and pyrimethamine from whole blood dried onto filter paper. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 767, n. 1, p. 159–162, 2002.

HARPER, L.; POWELL, J.; PIJL, E. M. An overview of forensic drug testing methods and their suitability for harm reduction point-of-care services. **Harm Reduction Journal**, v. 14, n. 52, 2017.

HARTMAN, R. L. et al. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and metabolites disposition in blood and plasma following controlled oral administration. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 2, p. 587–599, 2014.

HELMMLIN, H. J. et al. Analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and its metabolites in plasma and urine by HPLC-DAD and GC-MS. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 20, n. 6, p. 432–440, 1996.

HORVATH, C. et al. Enhancement of Retention by Ion-Pair Formation in Liquid Chromatography with Nonpolar Stationary Phases. **Analytical Chemistry**, v. 49, n. 14, p. 2295–2305, 1977.

HSIAO, Y. C. et al. An immuno-MALDI mass spectrometry assay for the oral cancer biomarker, matrix metalloproteinase-1, in dried saliva spot samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 1100, p. 118–130, 2020.

JACQUES, A. L. B.; DOS SANTOS, M. K.; LIMBERGER, R. P. Development and Validation of a Method Using Dried Oral Fluid Spot to Determine Drugs of Abuse. **Journal of Forensic Sciences**, v. 64, n. 6, p. 1906–1912, 2019.

JAGER, N. G. L. et al. Procedures and practices for the validation of bioanalytical methods using dried blood spots: A review. **Bioanalysis**, v. 6, n. 18, p. 2485–2514, 2014.

JAIN, R. et al. Dried urine spots for detection of benzodiazepines. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 49, n. 6, p. 465–469, 2017.

JAMALI, B. et al. Assays for MDMA and Its Metabolites. In: PREEDY, V. R. (Ed.). **Neuropathology of Drug Addictions and Substance Misuse**. 1st. ed. London: Elsevier, 2016. 2, p. 503–512.

JANTOS, R. et al. Analysis of 3,4-methylenedioxymetamphetamine: Whole blood versus

dried blood spots. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 35, n. 5, p. 269–273, 2011.

KACARGIL, C. U.; DAGLIOGLU, N.; GOREN, I. E. Determination of Illicit Drugs in Dried Blood Spots by LC–MS/MS Method: Validation and Application to Real Samples. **Chromatographia**, v. 83, p. 885–892, 2020.

KHAJEAMIRI, A. R. et al. Profiling of ecstasy tablets seized in iran. **Iranian journal of pharmaceutical research**, v. 10, n. 2, p. 211–220, 2011.

KOLBRICH, E. A. et al. Plasma Pharmacokinetics of 3,4-Methylenedioxymethamphetamine after Controlled Oral Administration to Young Adults. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 30, n. 3, p. 320–332, 2008.

KRUVE, A. et al. Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: Part II. **Analytica Chimica Acta**, v. 870, p. 8–28, 2015.

LAPACHINSKE, S. F.; YONAMINE, M.; MOREAU, R. L. de M. Validação de método para determinação de 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) em comprimidos de ecstasy por cromatografia em fase gasosa. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 1, p. 75–82, 2004.

LEE, Y. R.; LEE, J.; KANG, H. G. Presoaking dried blood spot with water improves efficiency for small-molecule analysis. **BioTechniques**, v. 67, n. 5, p. 219–228, 2019.

LEJEUNE, D. et al. Simultaneous determination of monodesethylchloroquine, chloroquine, cycloguanil and proguanil on dried blood spots by reverse-phase liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 4, p. 1106–1115, 2007.

LI, W.; JIAN, W.; FU, Y. Basic Sample Preparation Techniques in LC-MS Bioanalysis. In: LI, W.; JIAN, W.; FU, Y. (Ed.). **Current Sample Preparation Techniques in LC-MS Bioanalysis**. 1st. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2019. p. 1–30.

LI, W.; TSE, F. L. S. Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules. **Biomedical Chromatography**, v. 24, n. 1, p. 49–65, 2010.

LIU, G. et al. Approach to evaluating dried blood spot sample stability during drying process and discovery of a treated card to maintain analyte stability by rapid on-card pH modification. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 23, p. 9033–9038, 2011.

LOBRUTTO, R. et al. Effect of the eluent pH and acidic modifiers in high-performance liquid chromatography retention of basic analytes. **Journal of Chromatography A**, v. 913, n. 1–2, p. 173–187, 2001.

LURIE, I.; LI, L. Use of high-temperature liquid chromatography with sub-2m particle C18 columns for the analysis of seized drugs. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 32, n. 18, p. 2615–2626, 2009.

MALACA, S. et al. Dilute and shoot ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS) analysis of psychoactive drugs in oral fluid. **Journal of**

Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 170, p. 63–67, 2019.

MALSAGOVA, K. et al. Dried blood spot in laboratory: Directions and prospects. **Diagnostics**, v. 10, n. 4, 2020.

MANCINELLI, R. et al. Simple and reliable high-performance liquid chromatography fluorimetric procedure for the determination of amphetamine-derived designer drugs. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 735, n. 2, p. 243–253, 1999.

MARGALHO, C. et al. Salvia divinorum: Toxicological aspects and analysis in human biological specimens. **Bioanalysis**, v. 8, n. 13, p. 1415–1425, 2016.

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

MC FADDEN, K. et al. Development and application of a high-performance liquid chromatography method using monolithic columns for the analysis of ecstasy tablets. **Journal of Chromatography A**, v. 1120, n. 1–2, p. 54–60, 2006.

MCCALLEY, D. V. The challenges of the analysis of basic compounds by high performance liquid chromatography: Some possible approaches for improved separations. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 2, p. 858–880, 2010.

MEESTERS, R. J. W.; HOOFF, G. P. State-of-the-art dried blood spot analysis: An overview of recent advances and future trends. **Bioanalysis**, v. 5, n. 17, p. 2187–2208, 2013.

MENG, P.; WANG, Y. Small volume liquid extraction of amphetamines in saliva. **Forensic Science International**, v. 197, n. 1–3, p. 80–84, 2010.

MERCOLINI, L. et al. Analysis of cocaine and two metabolites in dried blood spots by liquid chromatography with fluorescence detection: A novel test for cocaine and alcohol intake. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 46, p. 7242–7248, 2010.

MERCOLINI, L.; PROTTI, M. Biosampling strategies for emerging drugs of abuse: towards the future of toxicological and forensic analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 130, p. 202–219, 2016.

MITREVSKI, B.; ZDRAVKOVSKI, Z. Rapid and simple method for direct determination of several amphetamines in seized tablets by GC-FID. **Forensic Science International**, v. 152, n. 2–3, p. 199–203, 2005.

MOHAMED, K. One-step derivatization-extraction method for rapid analysis of eleven amphetamines and cathinones in oral fluid by GC-MS. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 41, n. 7, p. 639–645, 2017.

MONTESANO, C. et al. Determination of illicit drugs and metabolites in oral fluid by microextraction on packed sorbent coupled with LC-MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 13, p. 3647–3658, 2015.

- MOREIRA, R. V. et al. Accessing the chemical profile of ecstasy tablets seized in São Paulo (Brazil) by FT-Raman Spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 87, p. 104–110, 2016.
- MÜLLER, I. B.; WINDBERG, C. N. Validation of an HPLC method for quantitation of MDMA in tablets. **Journal of Chromatographic Science**, v. 43, n. 8, p. 434–437, 2005.
- NAQI, H. A.; HUSBANDS, S. M.; BLAGBROUGH, I. S. ¹H quantitative NMR and UHPLC-MS analysis of seized MDMA/NPS mixtures and tablets from night-club venues. **Analytical Methods**, v. 11, n. 37, p. 4795–4807, 2019.
- NAVARRO, M. et al. Usefulness of saliva for measurement of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and its metabolites: Correlation with plasma drug concentrations and effect of salivary pH. **Clinical Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 1788–1795, 2001.
- NUMAKO, M. et al. Dried Saliva Spot (DSS) as a Convenient and Reliable Sampling for Bioanalysis: An Application for the Diagnosis of Diabetes Mellitus. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 1, p. 635–639, 2016.
- ODOARDI, S.; ANZILLOTTI, L.; STRANO-ROSSI, S. Simplifying sample pretreatment: Application of dried blood spot (DBS) method to blood samples, including postmortem, for UHPLC-MS/MS analysis of drugs of abuse. **Forensic Science International**, v. 243, p. 61–67, 2014.
- ORTU, E.; CABONI, P. Levels of 5-hydroxymethylfurfural, furfural, 2-furoic acid in sapa syrup, Marsala wine and bakery products. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. sup3, p. S2543–S2551, 2017.
- ORTUÑO, J. et al. Quantification of 3,4-methylenedioxymetamphetamine and its metabolites in plasma and urine by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 723, n. 1–2, p. 221–232, 1999.
- PETERS, F. T. et al. Negative-ion chemical ionization gas chromatography-mass spectrometry assay for enantioselective measurement of amphetamines in oral fluid: Application to a controlled study with MDMA and driving under the influence cases. **Clinical Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 702–710, 2007.
- PETERS, F. T. et al. Method Development in Forensic Toxicology. **Current Pharmaceutical Design**, v. 23, n. 36, p. 5455–5467, 2017.
- PRAGST, F. High performance liquid chromatography in forensic toxicological analysis. In: BOGUSZ, M. J. (Ed.). **Handbook of Analytical Separations**. 1st. ed. Amsterdam: Elsevier, 2008. 6, p. 447–489.
- RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Quimica Nova**, v. 26, n. 6, p. 863–871, 2003.
- RAO, R. N.; BOMPELLI, S.; MAURYA, P. K. High-performance liquid chromatographic determination of anti-hypertensive drugs on dried blood spots using a fluorescence detector -

method development and validation. **Biomedical Chromatography**, v. 25, n. 11, p. 1252–1259, 2011.

RAPOSO, F. Evaluation of analytical calibration based on least-squares linear regression for instrumental techniques: A tutorial review. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 77, p. 167–185, 2016.

RESANO, M. et al. Dried matrix spots and clinical elemental analysis. Current status, difficulties, and opportunities. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 99, p. 75–87, 2018.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

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

RICHEVAL, C. et al. New psychoactive substances in oral fluid of drivers around a music festival in south-west France in 2017. **Forensic Science International**, v. 297, p. 265–269, 2019.

ROSITANO, J. et al. Supported liquid extraction (SLE) for the analysis of methylamphetamine, methylenedioxymethylamphetamine and delta-9-tetrahydrocannabinol in oral fluid and blood of drivers. **Forensic Science International**, v. 265, p. 125–130, 2016.

ROUEN, D.; DOLAN, K.; KIMBER, J. **Technical report No. 120 - A Review of Drug Detection Testing and an Examination of Urine, Hair, Saliva and Sweat**. Sydney, Australia: National Drug and Alcohol Research Centre, 2001.

SAMHSA. 84 FR 57554 - Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programas in Oral Fluid. **Substance Abuse and Mental Health Services Administration - Department of Health and Human Services**, 2019.

SAMYN, N. et al. Plasma, oral fluid and sweat wipe ecstasy concentrations in controlled and real life conditions. **Forensic Science International**, v. 128, n. 1–2, p. 90–97, 2002.

SARACINO, M. A. et al. Analysis of γ -hydroxy butyrate by combining capillary electrophoresis-indirect detection and wall dynamic coating: Application to dried matrices. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, p. 8893–8901, 2015.

SAUSSEREAU, E. et al. On-line liquid chromatography/tandem mass spectrometry simultaneous determination of opiates, cocaine and amphetamines in dried blood spots. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 885–886, p. 1–7, 2012.

SCHEIDWEILER, K. B.; HUESTIS, M. A. A validated gas chromatographic-electron impact ionization mass spectrometric method for methylenedioxymethamphetamine (MDMA), methamphetamine and metabolites in oral fluid. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 835, n. 1–2, p. 90–99, 2006.

SCHNEIDER, R. C.; KOVAR, K. A. Analysis of ecstasy with a monolithic reversed-phase column. **Chromatographia**, v. 57, p. 287–291, 2003.

SCHULZE, H. et al. Driving Under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines in Europe - findings from the DRUID project. **European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction**, p. 1–58, 2012.

SCHWANINGER, A. E. et al. Urinary excretion kinetics of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy) and its phase I and phase II metabolites in humans following controlled MDMA administration. **Clinical Chemistry**, v. 57, n. 12, p. 1748–1756, 2011.

SERGI, M. et al. Multiclass analysis of illicit drugs in plasma and oral fluids by LC-MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, p. 709–718, 2009.

SERGI, M. et al. Micro-solid phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of stimulants, hallucinogens, ketamine and phencyclidine in oral fluids. **Analytica Chimica Acta**, v. 675, n. 2, p. 132–137, 2010.

SHERLOCK, K. et al. Analysis of illicit ecstasy tablets: Implications for clinical management in the accident and emergency department. **Journal of Accident and Emergency Medicine**, v. 16, n. 3, p. 194–197, 1999.

SHULGIN, A. T. The background and chemistry of MDMA. **Journal of Psychoactive Drugs**, v. 18, n. 4, p. 291–304, 1986.

SILVA, A. T. M. d. et al. Bioanalytical methods for determining ecstasy components in biological matrices: A review. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 108, p. 323–346, 2018.

SIMÕES, S. M. S. S. **DBS – “Dried Blood Spots” : estudo sobre a sua aplicação na área da Toxicologia Forense**. 2016. Dissertação de Mestrado (Medicina Legal e Ciências Forenses), Universidade de Lisboa, 2016.

SIMÕES, S. S.; CASTAÑERA AJENJO, A.; DIAS, M. J. Dried blood spots combined to an UPLC–MS/MS method for the simultaneous determination of drugs of abuse in forensic toxicology. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 634–644, 2018.

SLADKEVICH, S. et al. Understanding paper degradation: identification of products of cellulosic paper decomposition at the wet-dry “tideline” interface using GC-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, p. 8133–8147, 2016.

SMITH, M. L. et al. Modern instrumental methods in forensic toxicology. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 31, n. 5, p. 237–253, 2007.

SOUZA, D. Z. et al. Determination of amphetamine-type stimulants in oral fluid by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 696, n. 1–2, p. 67–76, 2011.

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

SVS/MS. Portaria 344, de 12 de maio de 1998 - Aprova o regulamento técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial. **Serviço de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde - SVS/MS**, 1998.

SWARTZ, M. HPLC detectors: A brief review. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 33, n. 9–12, p. 1130–1150, 2010.

SWGTOX. (Scientific working group for forensic toxicology - SWGTOX). Standard practices for method validation in forensic toxicology. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 37, n. 7, p. 452–474, 2013.

ŚWIST, M.; WILAMOWSKI, J.; PARCZEWSKI, A. Determination of synthesis method of ecstasy based on the basic impurities. **Forensic Science International**, v. 152, n. 2–3, p. 175–184, 2005.

TARTAGLIA, A. et al. Fast off-line FPSE-HPLC-PDA determination of six NSAIDs in saliva samples. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1144, 2020.

TEÓFILO, K. R. et al. Electrochemical detection of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) using a boron-doped diamond electrode with differential pulse voltammetry: Simple and fast screening method for application in forensic analysis. **Microchemical Journal**, v. 157, 2020.

TIAFT. Bulletin XLI Number 2 - Recommendations on Sample Preparation of Biological Specimens for Systematic Toxicological Analysis. **Bulletin of The International Association Of Forensic Toxicologists**, p. 11, 2012. Disponível em: <<http://www.tiaft.org/tiaft-guidelines.html>>.

TOGNI, L. R. et al. The Variability of Ecstasy Tablets Composition in Brazil. **Journal of Forensic Sciences**, v. 60, n. 1, p. 147–151, 2015.

TOMITA, M. et al. A simple and sensitive HPLC-fluorescence method for quantification of MDMA and MDA in blood with 4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl)benzoyl chloride (DIB-CI) as a label. **Biomedical Chromatography**, v. 20, n. 12, p. 1380–1385, 2006.

UNODC. (United Nations Office on Drugs and Crime). Recommended methods for the identification and analysis of amphetamine, methamphetamine and their ring-substituted analogues in seized materials: manual for use by national drug testing laboratories. **United Nations (ST/NAR/34)**, p. 77, 2006.

UNODC. World Drug Report 2020. **United Nations Office on Drugs and Crime**, 2020a. Disponível em: <<https://wdr.unodc.org/wdr2020/>>.

UNODC. Global Synthetic Drugs Assessment 2020 (E.20.XI.9). **United Nations Office on Drugs and Crime**, p. 55, 2020b.

VERSACE, F. et al. Automated DBS extraction prior to HILIC/RP LC-MS/MS target screening of drugs. **Chromatographia**, v. 76, p. 1281–1293, 2013.

WADDELL-SMITH, R. J. H. A review of recent advances in impurity profiling of illicit MDMA samples. **Journal of Forensic Sciences**, v. 52, n. 6, p. 1297–1304, 2007.

WOLFF, K. et al. Different Approaches to Setting Limits for Drugs and Alcohol Use When Driving. In: WOLFF, K.; WHITE, J.; KARCH, S. (Ed.). **The SAGE Handbook of Drug & Alcohol Studies**. 1st. ed. London: SAGE, 2016. p. 434–445.

WOOD, D. M. et al. Variability in the 3,4-methylenedioxymethamphetamine content of “ecstasy” tablets in the UK. **Emergency Medicine Journal**, v. 28, n. 9, p. 764–765, 2011.

WOOD, M. et al. Development of a rapid and sensitive method for the quantitation of amphetamines in human plasma and oral fluid by LC-MS-MS. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 27, n. 2, p. 78–87, 2003.

WYMAN, J. F. Principles and procedures in forensic toxicology. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 32, n. 3, p. 493–507, 2012.

XAVIER, C. A. C. et al. Êxtase (MDMA): Efeitos farmacológicos e tóxicos, mecanismo de ação e abordagem clínica. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 35, n. 3, p. 96–103, 2008.

ZANCANARO, I. et al. Prescription and illicit psychoactive drugs in oral fluid-LC-MS/MS method development and analysis of samples from Brazilian drivers. **Forensic Science International**, v. 223, n. 1–3, p. 208–216, 2012.

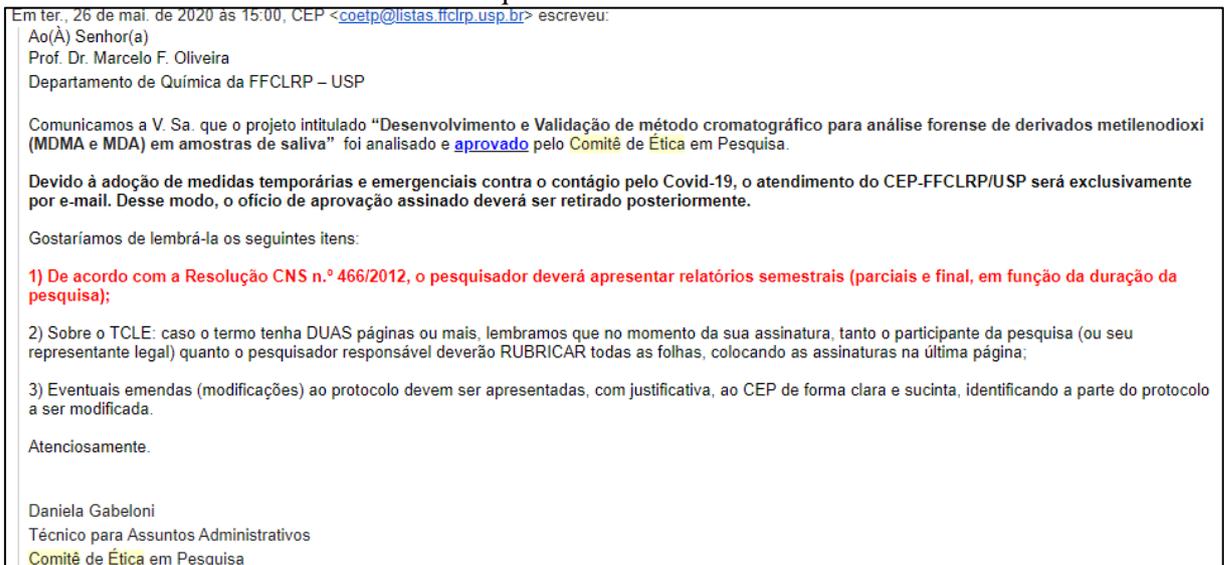
ZHENG, N. et al. Bioanalysis of dried saliva spot (DSS) samples using detergent-assisted sample extraction with UHPLC-MS/MS detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 934, p. 170–179, 2016.

ZIMMER, J. S. D. et al. Recent advances in the bioanalytical applications of dried matrix spotting for the analysis of drugs and their metabolites. **Bioanalysis**, v. 5, n. 20, p. 2581–2588, 2013.

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

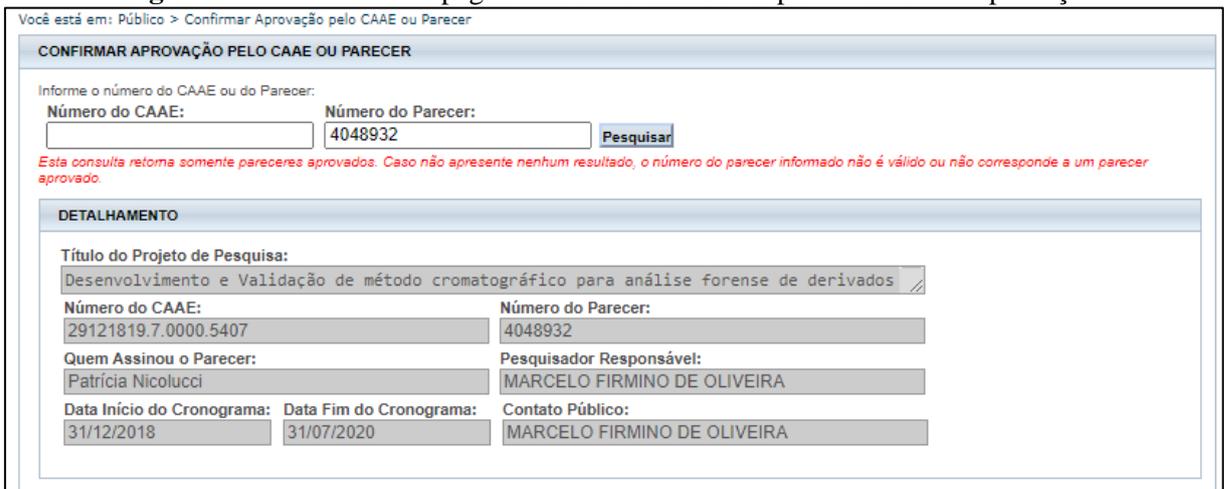
Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP/USP), e aprovado sob o Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (CAAE) 29121819.7.0000.5407 e Parecer 4.048.932. A confirmação pode ser realizada no website da Plataforma Brasil (<http://plataformabrasil.saude.gov.br/login.jsf>).

Figura 39 – E-mail de informação sobre a aprovação do projeto submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da FFCLRP/USP



Fonte: Do Autor.

Figura 40 - Screenshot da página da Plataforma Brasil para consulta da aprovação



Fonte: Do Autor.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

O Sr(a) está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a) da pesquisa: “Desenvolvimento de método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência na análise forense de 3,4-MDMA e 3,4-MDA em amostras de fluido oral”.

A justificativa, os objetivos e os procedimentos: O sangue é comumente utilizado para se realizar as análises de substâncias que possam estar presentes no organismo humano. No entanto, uma alternativa mais viável é a utilização da saliva, considerada não invasiva e não necessita de procedimentos mais elaborados e não oferece desconforto ou dor em função da punção. Desta forma, o objetivo desta pesquisa é coletar amostras de fluido oral isentas do analito (amostras branco) e verificar a possibilidade de detecção das substâncias MDMA e MDA por meio da adição de padrões dos analitos na saliva e através da técnica de mancha seca, onde uma pequena quantidade da amostra biológica é colocada em um papel e deixada secar para posterior análise, de forma rápida e sem complicações. Para isso serão necessários que o participante esteja de jejum total (sem comida ou água) por pelo menos 4 horas e que a quantidade doada seja de pelo menos 1 mL, o qual será obtida por simples expectoração em tubo coletor, previamente fornecido pelo pesquisador. Os materiais biológicos não serão utilizados para outras finalidades a não ser aquelas expostas neste termo. Todas as amostras permanecerão armazenadas em freezer até momento das análises, o qual serão descartadas após término dos estudos. Os dados serão utilizados somente para fins científicos, sempre preservando a manutenção do sigilo e privacidade dos participantes.

Desconfortos, riscos e benefícios: Durante o procedimento de coleta não há qualquer risco previsível para o participante, não havendo nenhum benefício direto. Desconfortos associados à coleta de saliva podem surgir (timidez, por exemplo); neste caso será dada privacidade ao participante.

Case o Sr(a). aceite participar desta pesquisa, flico claro: A) Que para a realização dos testes laboratoriais serão coletadas amostras de fluido oral. B) Que haverá riscos mínimos à saúde do participante. C) Que poderá consultar os pesquisadores responsáveis em qualquer época pessoalmente ou por telefone, para esclarecimento de qualquer dúvida. D) Que está livre para, a qualquer momento e sem prejuízos, deixar de participar dessa pesquisa, e que não precisará apresentar quaisquer justificativas para isso. E) Que todas as informações pelo(a) Sr(a). fornecidas e/ou resultados obtidos serão mantidos em sigilo e que serão somente utilizados sem a devida identificação. F) Que não haverá quaisquer benefícios e/ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. G) Que não terá que arcar com nenhum custo proveniente desta pesquisa e H) Que haverá reembolso caso tenha algum gasto relacionado a esta pesquisa. Em caso de dúvidas ou necessidade de maiores esclarecimentos, o(a) Sr(a). poderá entrar em contato com o pesquisador responsável _____, podendo contatá-lo no telefone _____.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo também poderá ser consultado para dúvidas/denúncias relacionadas à Ética da Pesquisa e localiza-se na Avenida Bandeirantes, 3900 - Bloco 23 - Casa 37 - 14040-901 - Ribeirão Preto – SP, telefone, (16) 3315-4811, e-mail coetp@ffclrp.usp.br, que tem a função de implementar as normas e diretrizes regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, aprovadas pelo Conselho. Assinei duas vias deste termo de consentimento livre e esclarecido, o qual também foi assinado pelo pesquisador que me fez o convite e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas. Este termo apresenta duas vias, uma destinada ao participante ou seu representante legal e a outra, ao pesquisador.

Nome do(a) participante

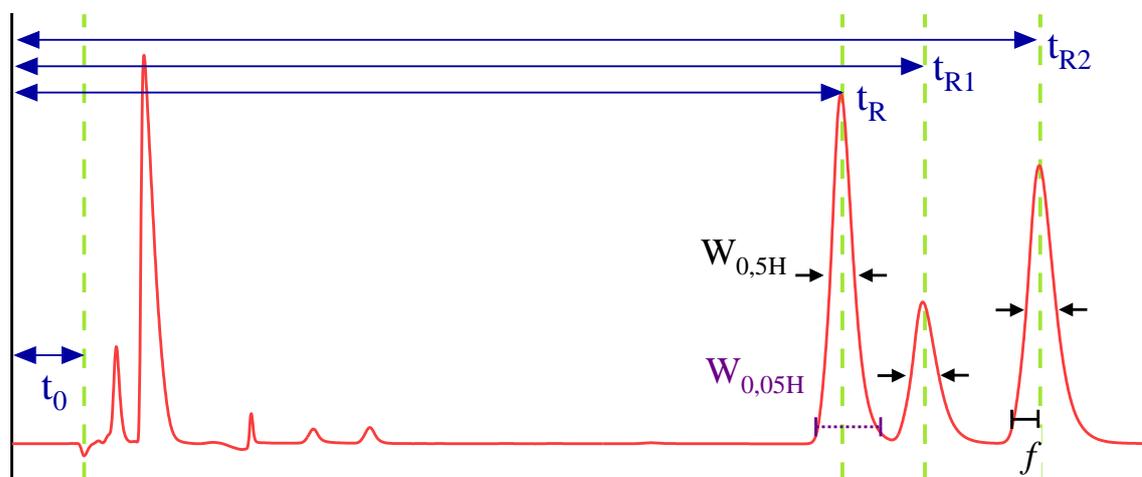
Nome do pesquisador

Data: ___/___/___20

APÊNDICE B - Performance do sistema (*System Suitability*)

O ensaio de *system suitability* é uma condição de controle de qualidade em métodos por cromatografia e sua necessidade provém dos vários fatores do sistema (e. g., irregularidade do fluxo, não reprodutibilidade da injeção e problemas com a bomba do sistema) que podem afetar os resultados analíticos. Assim, requisitos para os parâmetros dentro da SS do sistema são introduzidos com o objetivo de minimizar os riscos destes efeitos no método. Dentre esses parâmetros estão aqueles empregues para o controle da resolução cromatográfica, combinada junto ao ensaio de seletividade para garantir a separação dos analitos, do formato do pico analisado, que fornece condições para separação adequada e reprodutibilidade dos picos, e para o controle da área de pico (ou altura) e do tempo de retenção, indicando a precisão do método e avaliando a identidade de um composto, respectivamente (EPSHTEIN, 2020). Desta forma, os parâmetros avaliados neste trabalho foram a resolução cromatográfica, o fator de assimetria e a eficiência dos picos. As variáveis estão exemplificadas através da **Figura 41**.

Figura 41 – Cromatograma LC-DAD exemplo para o cálculo da resolução, fator de assimetria e eficiência dos picos analisados através das variáveis tempo de retenção e largura do pico



Fonte: Do Autor.

- **Resolução cromatográfica (R_s):** Mede quão bem dois picos adjacentes estão separados, sendo geralmente determinada pela seguinte equação:

$$R_s = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{W_{1,05H} + W_{2,05H}} \quad \text{Equação 10}$$

Onde t_R é o tempo de retenção, $W_{0,5H}$ a largura do pico à meia altura e os índices 1 e 2 os picos 1 e 2, respectivamente. Esta fórmula fornece valores reprodutíveis mesmo que os picos não estejam totalmente resolvidos ou que tenham elevados fatores de assimetria. A recomendação é que $R_s \geq 1,5$ para picos visualmente simétricos ou que se sobreponham levemente próximo a linha de base. Contudo, $R_s \geq 2,0$ é mais confiável se os picos adjacentes apresentam diferentes significativas entre suas alturas ou se sobreponham acima da linha de base (EPSHTEIN, 2020).

- Eficiência (ou número de pratos teóricos, N): Caracterizada pela largura dos picos, é uma estimativa da eficiência da fase estacionária, podendo fornecer o histórico para determinar se a coluna precisa ser substituída. A equação a seguir é comumente utilizada:

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{0,5H}} \right)^2 \quad \text{Equação 11}$$

Onde t_R é o tempo de retenção e $W_{0,5H}$ é a largura do pico a 50% de sua altura. A recomendação geral é que $N > 2000$. No entanto, em alguns casos, o requisito $N \geq N_{exp}$, pode ser observado, onde N_{exp} é o menor valor experimental da eficiência para qual a condição de $S/N \geq 10$ é alcançada (EPSHTEIN, 2020).

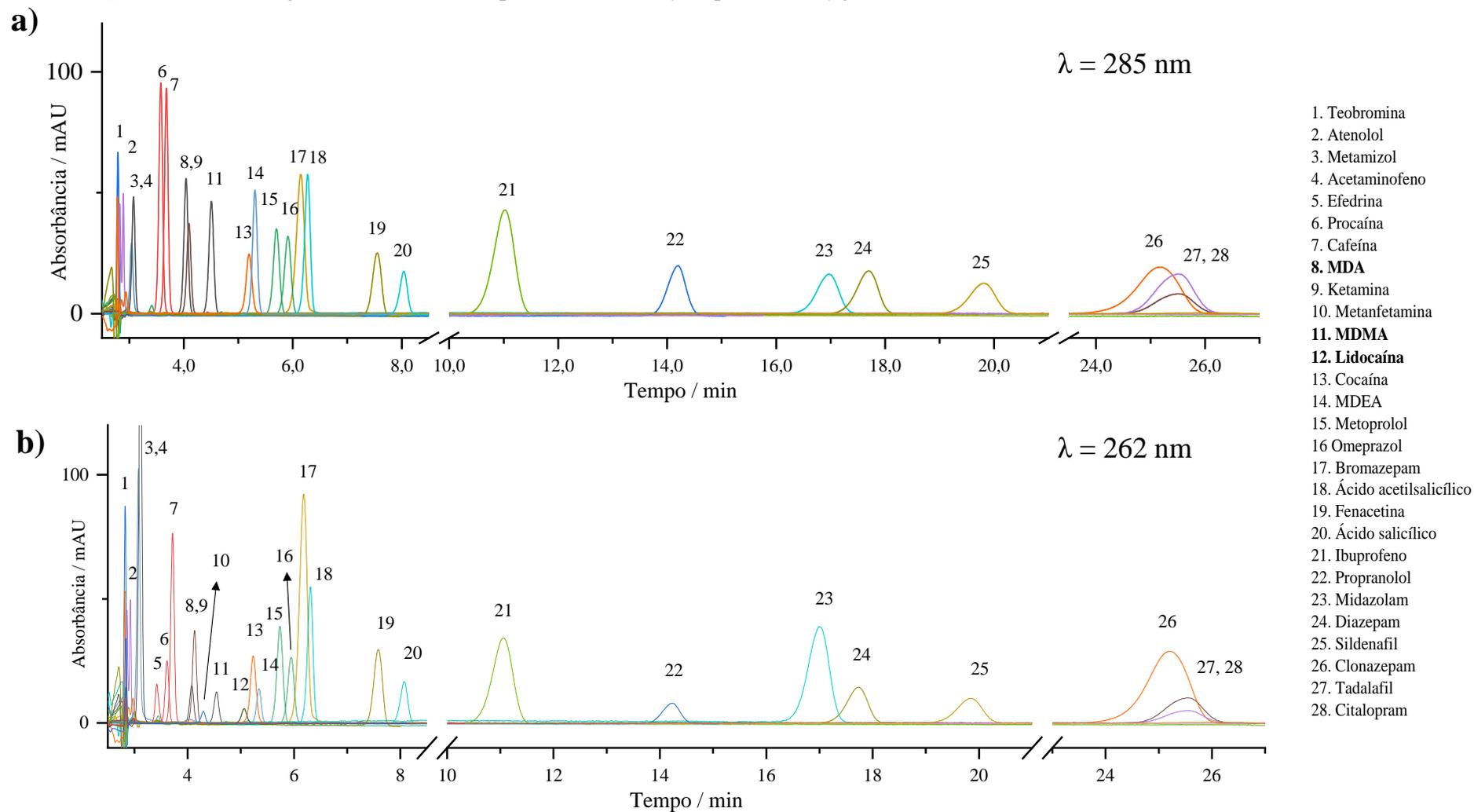
- Fator de assimetria (A_s): É uma estimativa da condição da fase estacionária e mede a simetria do pico, sendo que, quanto maior este valor menos preciso é a integração dos picos. Este parâmetro tem um impacto sobre a performance quantitativa do método, especialmente em baixas concentrações dos analitos. A fórmula para sua determinação é:

$$A_s = \frac{W_{0,05H}}{2f} \quad \text{Equação 12}$$

Onde $W_{0,05H}$ é a largura do pico a 5% de sua altura e f a largura do fronte medida em relação a 5% de sua altura. Quando $A_s < 1$ e $A_s > 1$ o pico apresenta assimetria frontal e caudal, respectivamente. A farmacopeia recomenda que o valor de A_s deve estar no intervalo entre 0,8 e 1,5, com limite máximo de 2,0 (EPSHTEIN, 2020).

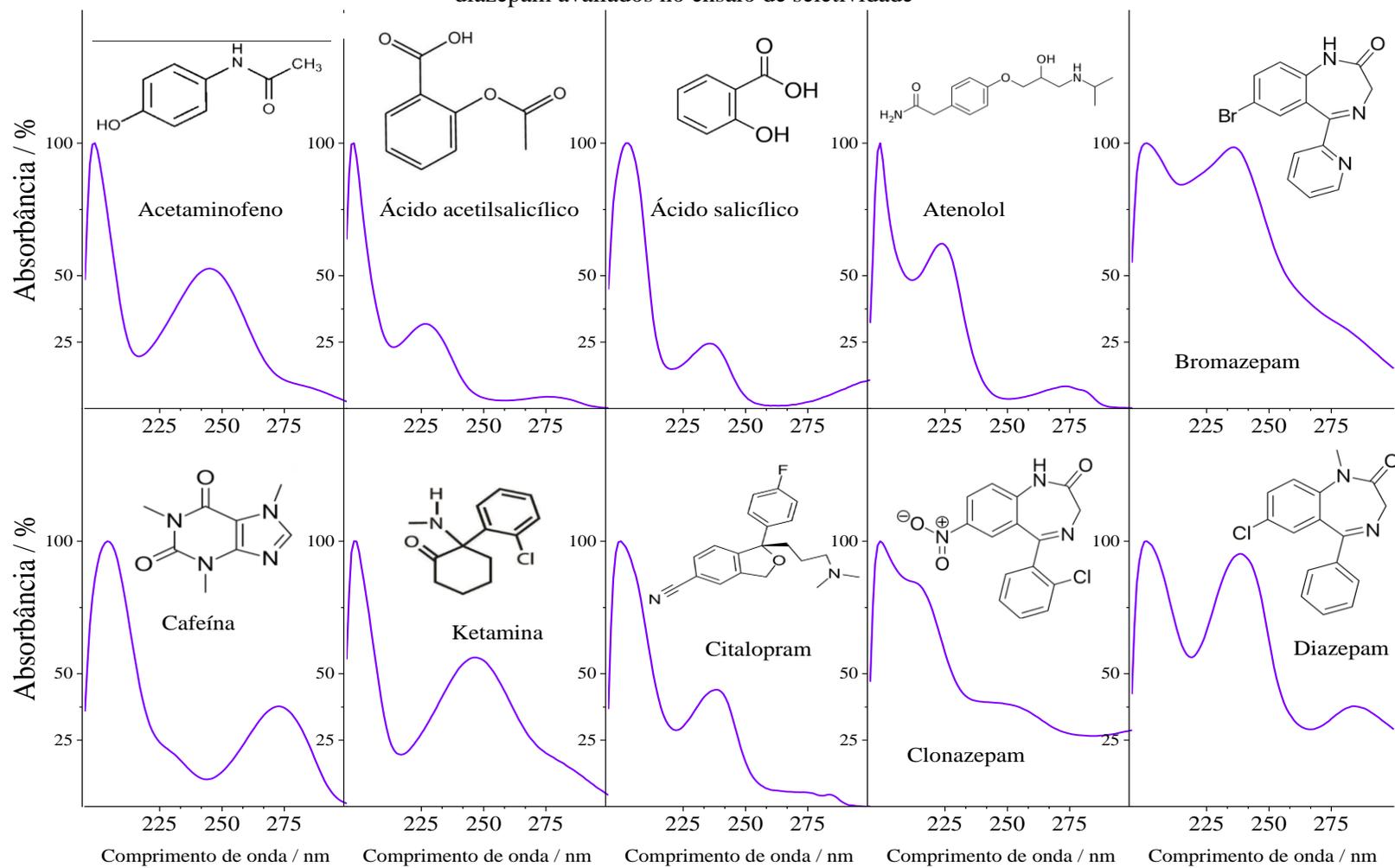
APÊNDICE C - Ensaio de seletividade: cromatogramas e espectros ultravioletas

Figura 42 – Cromatogramas LC-DAD sobrepostos das 28 soluções padrão a 10 µg mL⁻¹ avaliadas no ensaio de seletividade a (a) 285 e (b) 262 nm



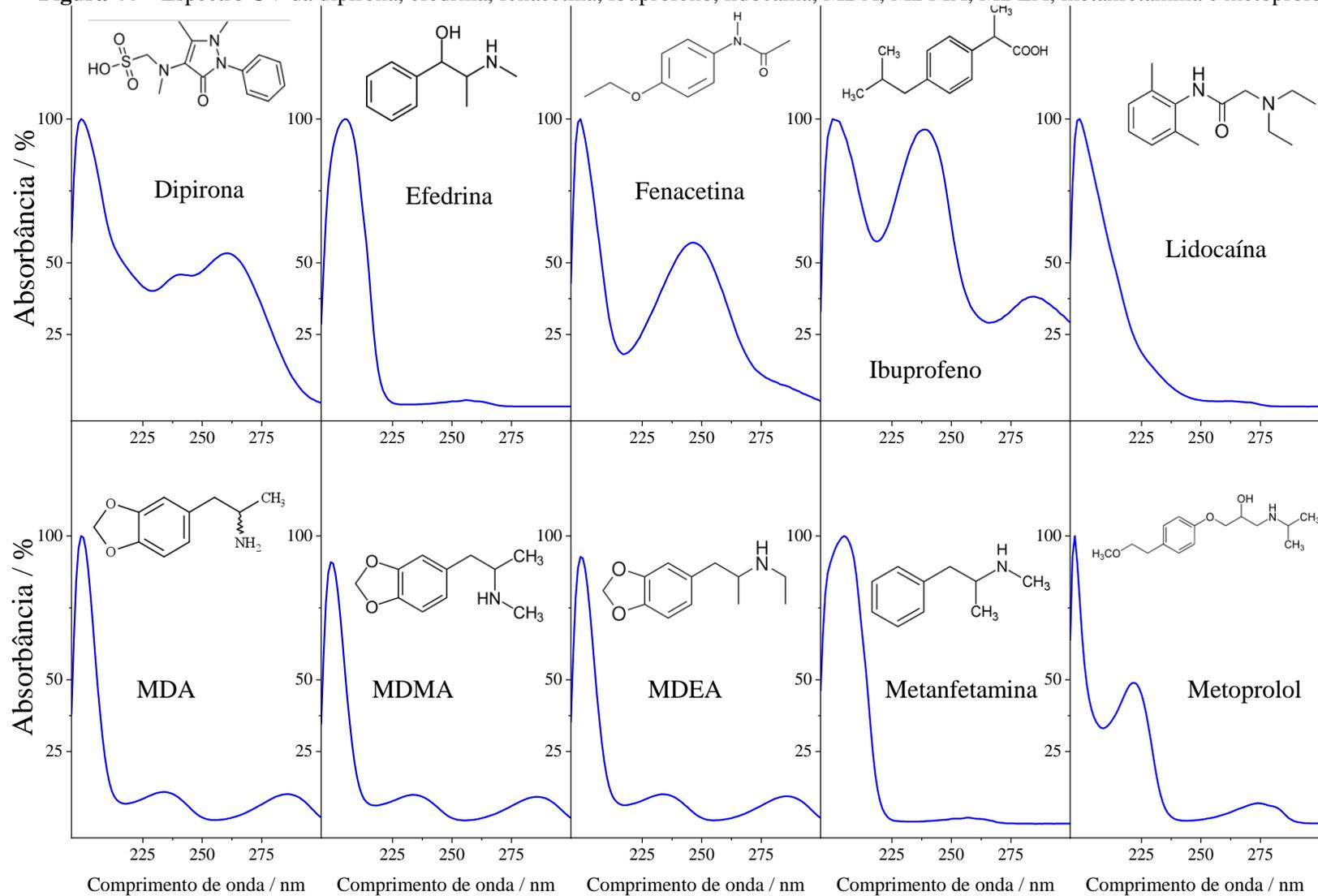
Fonte: Do Autor.

Figura 43 – Espectro UV do acetaminofeno, ácido acetilsalicílico, ácido salicílico, atenolol, bromazepam, cafeína, ketamina, citalopram, clonazepam e diazepam avaliados no ensaio de seletividade



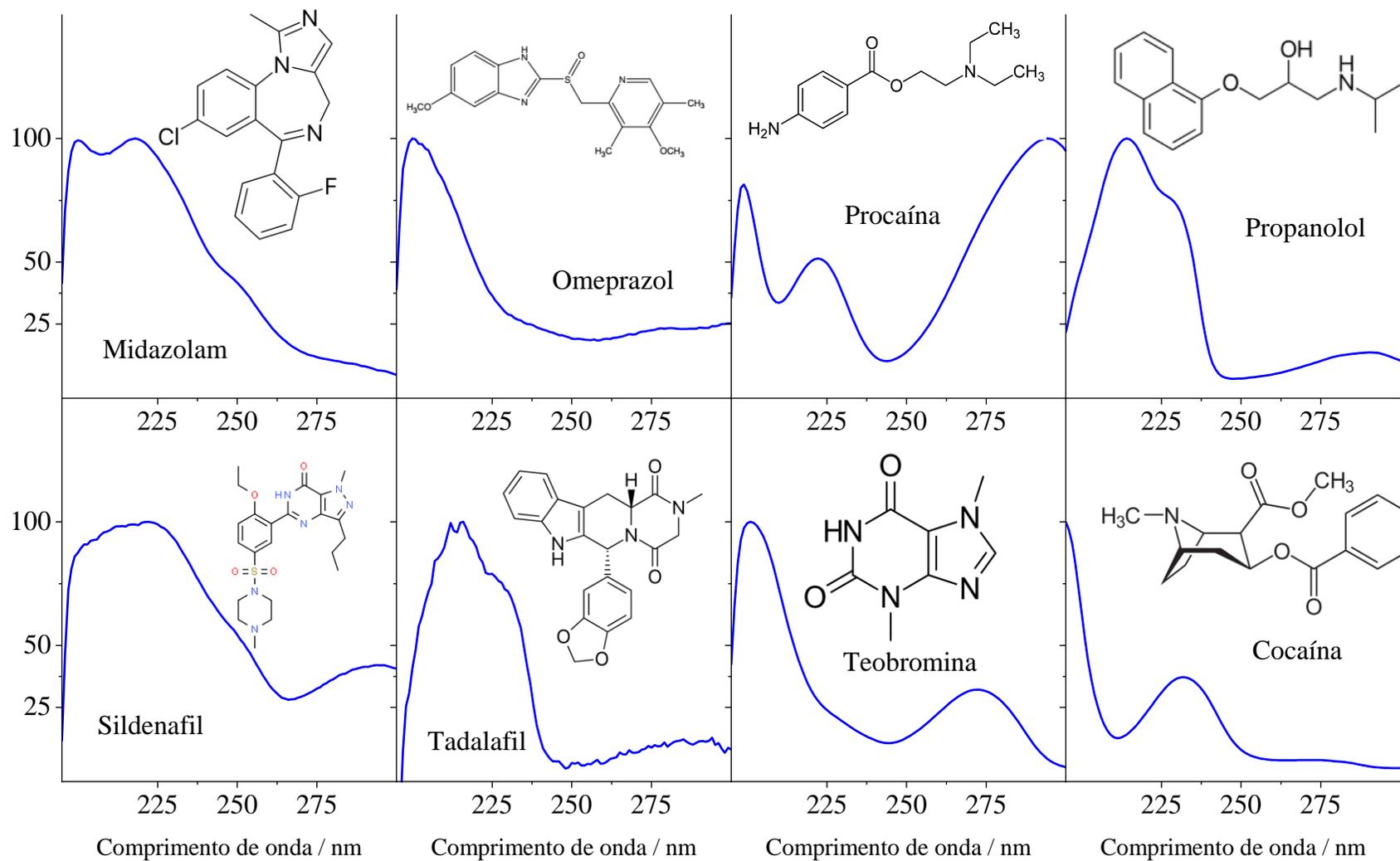
Fonte: Do Autor.

Figura 44 – Espectro UV da dipirona, efedrina, fenacetina, ibuprofeno, lidocaína, MDA, MDMA, MDEA, metanfetamina e metoprolol



Fonte: Do Autor.

Figura 45 – Espectro UV do midazolam, omeprazol, procaína, propranolol, sildenafil, tadalafil, teobromina e cocaína



Fonte: Do Autor

APÊNDICE D - Ensaio da linearidade: resultados da Regressão Linear Ponderada

Tabela 25 – Parâmetros da equação da reta obtidos por regressão linear simples ($w = 1/x^0$) e ponderada, e seus respectivos resultados de probabilidade dos testes estatísticos (p -valores, teste- t para significância dos coeficientes, teste de Brown-Forsythe e Falta de ajuste)

Composto	Modelo	Equação			$\sum EPR\%$	Testes estatísticos (p -valor) ^a			
		$y = mx + b$	r	S_{yx}		$m = 0$	$b = 0$	BF	LOF
MDA	$1/x^0$	$y = 3,9915x - 0,0551$	0,9989	0,3326	654,1	< 0,001	0,515	0,014	0,97
	$1/x^{0,5}$	$y = 4,0077x + 0,0164$	0,9993	0,2436	267,6	< 0,001	0,442	0,038	0,94
	$1/x$	$y = 4,0244x + 0,0019$	0,9993	0,1970	145,4	< 0,001	0,349	0,128	0,86
	$1/x^2$	$y = 4,0692x - 0,0012$	0,9980	0,2402	142,9	< 0,001	< 0,001	0,231	0,24
	$1/y^{0,5}$	$y = 4,0057x + 0,0155$	0,9993	0,1715	258,9	< 0,001	0,463	0,037	0,95
	$1/y$	$y = 4,0193x + 0,0013$	0,9993	0,0972	144,4	< 0,001	0,511	0,121	0,89
	$1/y^2$	$y = 4,0503x - 0,0017$	0,9980	0,0581	139,8	< 0,001	< 0,001	0,187	0,52
MDMA	$1/x^0$	$y = 3,9758x - 0,0155$	0,9996	0,2068	257,0	< 0,001	0,767	0,014	0,21
	$1/x^{0,5}$	$y = 3,9676x + 0,0009$	0,9996	0,1214	145,3	< 0,001	0,954	0,072	0,20
	$1/x$	$y = 3,9656x + 0,0010$	0,9995	0,0816	145,5	< 0,001	0,555	0,189	0,19
	$1/x^2$	$y = 3,9808x - 0,0001$	0,9974	0,2693	143,8	< 0,001	0,014	0,020	0,18
	$1/y^{0,5}$	$y = 3,9669x - 0,0005$	0,9996	0,1212	144,8	< 0,001	0,974	0,074	0,20
	$1/y$	$y = 3,9623x + 0,0000$	0,9995	0,0813	143,9	< 0,001	0,980	0,198	0,18
	$1/y^2$	$y = 3,9598x - 0,0009$	0,9974	0,0667	146,3	< 0,001	< 0,001	0,025	0,17

a. Para os coeficientes m e b , p -valor < 0,05 indica que o coeficiente é diferente estatisticamente de zero. Para o teste de homogeneidade de variâncias de Brown-Forsythe (BF), p -valor > 0,05 indica que o método é homocedástico. Por fim, p -valor > 0,05 para o teste da falta de ajuste indica que o modelo é preditivo e, portanto, não há indícios da falta de ajuste. y é a resposta $A_{analito}/A_{PI}$ e x a concentração do analito; m é o coeficiente angular (inclinação), b o coeficiente linear (intercepto) e r o coeficiente de correlação. S_{yx} indica o desvio padrão residual da curva analítica e $\sum EPR\%$ a somatória do erro padrão relativo de todos os níveis de concentração.

APÊNDICE E - System Suitability

Apesar deste parâmetro não ser classificado como fundamental para a validação bioanalítica, sua avaliação pode ser capaz de demonstrar a performance do equipamento através da análise de um conjunto de amostras antes mesmo de uma corrida analítica definitiva, tornando-o uma ótima aliada para estimar as condições instrumentais (FACHI et al., 2017). Desta forma, amostras DOFS ($k = 3$), fortificadas nos níveis dos controles de baixa, média e alta concentração, foram utilizados para determinar conformidade do sistema em função do número de pratos teóricos (ou eficiência, N) e do fator de assimetria (A_s) (**Tabela 26**).

Tabela 26 – Conformidade do sistema em função do fator de assimetria (A_s) e eficiência (N) para amostras DOFS fortificadas com MDA e MDMA

	MDA			MDMA		
A_s	0,94 (3,78)	1,00 (2,32)	1,05 (8,57)	0,92 (2,56)	0,99 (4,21)	1,00 (14,2)
N	18648 (2,28)	18163 (1,42)	17453 (8,38)	18549 (3,27)	17587 (2,09)	16828 (12,2)

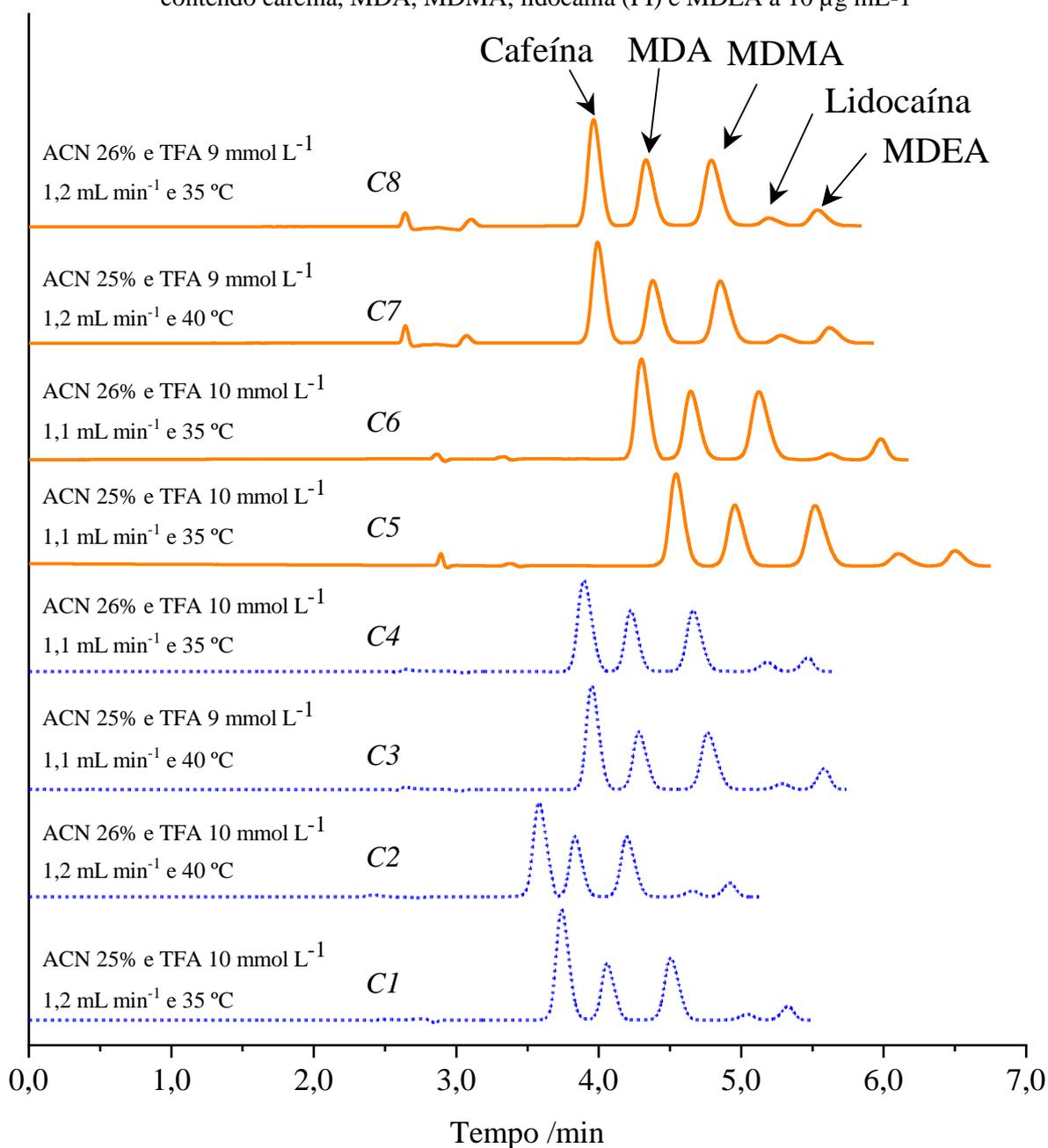
Valores em parênteses indicam o desvio padrão relativo (DPR%) das triplicatas.

A resolução, que se trata da medida da capacidade da coluna separar dois componentes, deve apresentar valores mínimos de $R_s \geq 1,5$, quando os picos são visualmente simétricos, ou de $R_s \geq 2,0$, se esses picos apresentam diferenças significativas em suas intensidades (mínimo de 10x) (EPSHTEIN, 2020). Quanto ao número de pratos teóricos e fator de assimetria, que funcionam como estimativas para a qualidade e eficiência da fase estacionária, permitindo quantificações mais precisas, os requisitos são de $N \geq 2000$ e $0,8 \leq A_s \leq 1,5$ (EPSHTEIN, 2020). Assim, com base nas observações da **Tabela 26**, podemos dizer que o número de pratos teóricos ($N \geq 16828$) e fator de assimetria (entre 0,92 e 1,05) se encontraram dentro dos requisitos para os três níveis de concentração. Como resultado, há evidências de que o método LC-DAD desenvolvido é adequado em termos desses parâmetros cromatográficos.

APÊNDICE F - Ensaio de robustez: cromatogramas e resultados

Os experimentos para determinação de robustez estão dispostos a seguir, em que é possível observar os resultados de temperatura, fluxo da fase móvel, concentração de ácido trifluoroacético, volume de injeção, comprimento de onda monitorado para os analitos e porcentagem de acetonitrila na fase móvel sobre os cromatogramas LC-DAD.

Figura 46 – Cromatogramas LC-DAD obtidos durante o ensaio de robustez com solução padrão contendo cafeína, MDA, MDMA, lidocaína (PI) e MDEA a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$



Fonte: Do Autor.

Tabela 27 – Resultados experimentais da área, fator de assimetria e número de pratos teóricos das corridas cromatográficas realizadas no ensaio de robustez

	MDA			MDMA		
	A	A _s	N	A	A _s	N
<i>C1</i>	10,1	1,13	9194	9,58	1,18	8797
<i>C2</i>	9,97	1,15	8515	9,43	1,15	8041
<i>C3</i>	10,5	1,16	8790	9,96	1,16	8240
<i>C4</i>	11,2	1,14	9361	10,6	1,16	8915
<i>C5</i>	10,0	1,22	7528	9,56	1,22	7459
<i>C6</i>	10,5	1,24	7296	9,98	1,23	7149
<i>C7</i>	8,99	1,24	7027	8,55	1,24	6804
<i>C8</i>	9,70	1,23	7141	9,22	1,24	6890

Tabela 28 – Resolução entres os pares críticos e analitos no ensaio de robustez

Resolução	Corridas cromatográficas							
	<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3</i>	<i>C4</i>	<i>C5</i>	<i>C6</i>	<i>C7</i>	<i>C8</i>
Cafeína/MDA	1,83	1,49	1,88	1,83	2,08	1,85	2,20	2,02
MDA/MDMA	2,45	2,07	2,48	2,35	2,47	2,20	2,30	2,27
MDMA/lidocaína	2,85	2,46	2,65	2,72	2,45	2,41	1,98	1,81
Lidocaína/MDEA	1,63	1,49	1,66	1,65	1,80	1,79	1,60	1,50