



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS



TAÍS BETONI RODRIGUES

ESTRATÉGIAS EMERGENTES DE PREPARO DE AMOSTRAS DE SANGUE  
PARA ANÁLISES TOXICOLÓGICAS *POSTMORTEM*

CAMPINAS

2022

TAÍS BETONI RODRIGUES

ESTRATÉGIAS EMERGENTES DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA ANÁLISES  
TOXICOLÓGICAS *POSTMORTEM*

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos  
exigidos para a obtenção do título de Doutora em Farmacologia

ORIENTADOR: PROFESSOR DOUTOR JOSÉ LUIZ DA COSTA

ESTE TRABALHO CORRESPONDE VERSÃO FINAL DA TESE  
DEFENDIDA PELA ALUNA TAÍS BETONI RODRIGUES,  
ORIENTADA PELO PROF. DR. JOSÉ LUIZ DA COSTA

CAMPINAS

2022

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

R618e Rodrigues, Taís Betoni, 1991-  
Estratégias emergentes de preparo de amostras de sangue para análises toxicológicas *postmortem* / Taís Betoni Rodrigues. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: José Luiz da Costa.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Toxicologia forense. 2. Substâncias psicoativas. 3. Métodos analíticos de preparação de amostras. 4. QuEChERS. 5. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (CL-EM-EM). I. Costa, José Luiz da, 1978-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Emerging blood sample preparation strategies for postmortem toxicological analysis

**Palavras-chave em inglês:**

Forensic toxicology

Psychoactive substances

Analytic sample preparation methods

QuEChERS

Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry

**Área de concentração:** Farmacologia

**Titulação:** Doutora em Farmacologia

**Banca examinadora:**

José Luiz da Costa [Orientador]

Fabiola Taufic Monica Iglesias

Paulo César Pires Rosa

Bruno Spinosa De Martinis

Tiago Franco de Oliveira

**Data de defesa:** 18-02-2022

**Programa de Pós-Graduação:** Farmacologia

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-8973-889>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/9813263967460250>

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

**TAÍS BETONI RODRIGUES**

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ LUIZ DA COSTA

MEMBROS:

1. Prof. Dr. José Luiz da Costa

2. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiola Taufic Monica Iglesias

3. Prof. Dr. Paulo Cesar Pires Rosa

4. Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis

5. Prof. Dr. Tiago Franco de Oliveira

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

**Data da Defesa: 18/02/2022**

## DEDICATÓRIA

Dedico esta Tese  
aos meus pais, Luís e Regina, por todo amor, carinho, dedicação e apoio  
aos meus irmãos, Vítor e Breno, por todo o companheirismo durante essa jornada  
ao Professor Doutor José Luiz, minha eterna gratidão

## EPÍGRAFE

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,  
mas pensar o que ninguém ainda pensou  
sobre aquilo que todo mundo vê”*

Arthur Schopenhauer (1788-1860)

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus familiares por todo o apoio, em especial aos meus pais por sempre priorizarem e incentivarem meus estudos

Ao Professor Doutor José Luiz da Costa, por seus ensinamentos, orientação, incentivo e confiança depositada durante todos esses anos. Desde o dia em que nos conhecemos você é uma grande inspiração para mim

Aos meus amigos, em especial a Dra. Damila e Ms. Thaís, pelo constante apoio e incentivo em nunca desistir dos meus objetivos, por mais árduo que seja o caminho

Ao João, por todo o carinho, companheirismo e apoio durante a maior parte dessa caminhada, meu eterno agradecimento

Ao meu grupo de pesquisa e aos funcionários do Centro de Informação e Assistência Toxicológica de Campinas, por tornarem a jornada um pouco mais leve

Ao Núcleo de Toxicologia Forense do Instituto Médico Legal de São Paulo, nas pessoas do Dr. Victor A. P. Gianvecchio e do Perito Criminal Ms. Elvis M. de Aquino, pela grande contribuição para a realização deste trabalho

Ao Instituto de Análises e Pesquisas Forenses da Polícia Técnica de Sergipe, na pessoa do Perito Criminal Dr. Ricardo Leal Cunha, por toda a colaboração e apoio

À Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, em especial à Profa. Dra. Fabíola Taufic Monica Iglesias, demais docentes e funcionários do Departamento de Farmacologia

A todos que contribuíram para a realização desta pesquisa

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

## RESUMO

O uso abusivo de substâncias psicoativas (SPA) acompanha o homem desde o início dos tempos e, a partir da segunda metade do século XX, passou a aumentar substancialmente. A taxa de óbitos causados pelo abuso de drogas e medicamentos continua a aumentar, justificando a necessidade do desenvolvimento de estratégias analíticas que permitam a identificação de SPA em amostras biológicas, principalmente diante do grande número de novas substâncias psicoativas que vem surgindo nos últimos anos. Sendo assim, há necessidade de desenvolvimento de métodos sensíveis, porém abrangentes, que utilizem reduzido volume de solventes orgânicos. Neste trabalho, foi possível realizar uma análise crítica e avaliar a viabilidade do uso de técnicas emergentes de preparo de amostras nas análises toxicológicas realizadas em sangue *postmortem*, através do desenvolvimento de 3 métodos analíticos. Os métodos desenvolvidos utilizaram baixo volume de amostras, menor volume de solventes extratores (e de menor toxicidade) e de preparo mais simples do que o métodos frequentemente utilizados em laboratórios de toxicologia forense. Métodos quantitativos foram desenvolvidos e validados para determinação 49 SPA de interesse forense, utilizando a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial como técnica instrumental. No trabalho I, foi desenvolvido e validado um método quantitativo para a análise de fentanil e seus análogos, através de extração por precipitação de proteínas, com linearidade avaliada de 1 a 500 ng/mL. Os valores obtidos para imprecisão e inexatidão foram melhores que 13,8% e -10,9%, respectivamente. Nos trabalhos II e III, uma miniaturização da técnica de QuEChERS foi aplicada no preparo de amostras para a análise de 37 SPA e 4 produtos de biotransformação. No segundo trabalho, o método desenvolvido envolveu a análise de 16 antidepressivos, 7 antipsicóticos e 3 produtos de biotransformação, sendo observada linearidade de 1 a 500 ng/mL, além de valores de imprecisão e inexatidão de 19,0% e 19,7%, respectivamente. No trabalho III, um método para análises de 11 benzodiazepínicos, 1 produto de biotransformação e 1 sedativo-hipnótico em sangue *postmortem* foi desenvolvido e validado, com linearidade de 10 a 2000 ng/mL, imprecisão e inexatidão de 18,2% e 17,4%, respectivamente. Não foram observados interferentes exógenos, endógenos ou contaminação cruzada (*carryover*) em nenhuma das validações. As vantagens observadas para o método miniaturizado são o pequeno volume de amostra (100 µL), preparo simples e eficaz, além de melhores valores para o parâmetro de recuperação. Todos os métodos foram aplicados em amostras reais cedidas pelo Núcleo de Toxicologia Forense do Instituto Médico Legal, Superintendência da Polícia Técnico-científica de São Paulo (NTF/IML/SPTC-SP) ou Instituto de Análises e Pesquisas Forenses de Sergipe (IAPF-SE), demonstrando a eficiência do protocolo.

**Palavras-chave:** Toxicologia forense; Substâncias psicoativas; Métodos analíticos de preparação de amostras; QuEChERS, Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM)

## ABSTRACT

The abusive use of psychoactive substances (PAS) has been with man since the beginning of time and, from the second half of the 20th century, began to increase rapidly. The death rate caused by pharmaceutical and drug abuse continues to rise, justifying the need for development of analytical strategies which allows the identification of PAS in biological samples, especially given the large number of new psychoactive substances that have been emerging in recent years. Therefore, there is a need for development of sensitive but comprehensive methods that use a reduced volume of organic solvents. In this work, through the development of 3 analytical methods, it was possible to perform a critical analysis and assess the feasibility of using emerging techniques of sample preparation for toxicological analyzes in *postmortem* blood. Quantitative methods were developed and validated for the determination of 49 PSA of forensic interest, using liquid chromatography-tandem mass spectrometry as instrumental technique. Work I, a method was developed and validated for quantitative analysis of fentanil and its analogues, by protein precipitation extraction, with linearity evaluated from 1 to 500 ng/mL. Value observed for imprecision and bias were better than 13.8% and -10.9%, respectively. Works II and III, a miniaturization of QuEChERS technique was applied to sample preparation for the analysis of 37 PSA and 4 metabolites. In the second work, the developed method involved the analysis of 16 antidepressants, 7 antipsychotics and 3 metabolites, being observed a linearity from 1 to 500 ng/mL, in addition to imprecision and inaccuracy values of 19.0% and 19.7%, respectively. In work III, a method for the analysis of 11 benzodiazepines, 1 metabolite and 1 hypnotic/sedative in *postmortem* blood was developed and validated, with linearity from 10 to 2000 ng/mL, imprecision and bias of 18.2% and 17.4%, respectively. No exogenous, endogenous or cross-contamination (carryover) interferences were observed in any of the validations. The advantages observed for the miniaturized method were low sample volume (100  $\mu$ L), simple and effective preparation, in addition to better values of recovery parameter. All methods were applied on authentic samples provided by the Forensic Toxicology Laboratory of the Institute of Legal Medicine, São Paulo State Police (NTF/IML/SPTC-SP) or the Institute of Forensic Analysis and Research of Sergipe (IAPF-SE), demonstrating the efficiency of the protocol.

**Keywords:** Forensic toxicology; Psychoactive substances; Analytic sample preparation methods; QuEChERS; Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química de exemplos de antidepressivos: fluoxetina (ISRS), venlafaxina (IRSN), amitriptilina (ADT), seleginina (IMAO) e bupropiona (atípico).....	17
Figura 2 - Esquema representando os locais de ação dos antidepressivos inibidores da monoaminaoxidase (IMAO), inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS), inibidores da recaptção de serotonina e norepinefrina (IRSN) e antidepressivos tricíclicos (ADT).....	19
Quadro 1 – Biodisponibilidade, meia-vida, metabólito-ativo e concentrações terapêutica, tóxica e fatal dos antidepressivos.....	20
Figura 3 - Estrutura química de exemplos de antipsicóticos: levomepromazina (típico) e risperidona (atípico).....	22
Figura 4 - Esquema representando os locais de ação dos antipsicóticos.....	22
Quadro 2 – Biodisponibilidade, tempo de meia-vida e concentrações terapêutica, tóxica e fatal dos antipsicóticos.....	23
Figura 5 - Estrutura química de exemplos de sedativo-hipnótico e benzodiazepínicos: zolpidem (sedativo-hipnótico), diazepam (BDZ) e clonazepam (BDZ).....	24
Figura 6 - Esquema representando o receptor de GABA e o local de ação dos benzodiazepínicos.....	25
Quadro 3 – Biodisponibilidade, meia-vida, metabólito-ativo e concentrações terapêutica, tóxica e fatal dos benzodiazepínicos.....	26
Figura 7 - Distribuição das novas substâncias psicoativas sintéticas reportadas até dezembro de 2020 à UNODC.....	27
Figura 8 - Estrutura química do fentanil e exemplo de 2 dos seus análogos: acetilfentanil e carfentanil.....	28
Figura 9 - Esquema representando os locais de ação dos opioides (OPI).....	29
Quadro 4 – Janela de detecção e exemplos de vantagens e desvantagens de alguns tipos de amostras biológicas utilizadas em análises toxicológicas.....	31

Quadro 5 - Fases extratoras tradicionalmente utilizadas para extração em fase sólida (SPE).....	35
Figura 10 - Solventes e sais utilizados nas etapas das três versões do método de QuEChERS.....	37
Quadro 6 – Grupos de soluções de trabalho utilizados na validação do método quantitativo para antidepressivos e antipsicóticos.....	40
Quadro 7 – Grupos de soluções de trabalho utilizados na validação do método quantitativo para benzodiazepínicos e sedativo-hipnótico.....	40
Figura 11 - Cromatogramas de íons extraídos de amostra de sangue <i>postmortem</i> adicionada dos analitos no limite de quantificação (10 ng/mL) e submetida ao preparo de amostras pelo método citado e análise por CL-EM/EM.....	81
Figura 12 - Cromatogramas de íons extraídos de uma amostra negativa de sangue <i>postmortem</i> , após extração pelo método citado e análise por CL-EM/EM.....	82
Figura 13 - Cromatograma de íons extraídos de uma amostra real de sangue <i>postmortem</i> (amostra 114, após extração pelo método citado e análise por CL-EM/EM, onde foram detectados oxazepam (11,3 ng/mL), nordiazepam (336,9 ng/mL), temazepam (18,0 ng/mL) e diazepam (113,6 ng/mL).....	85
Figura 14 - Biotransformação do diazepam, originando o nordiazepam, temazepam e oxazepam.....	86
Figura 15 - Cromatogramas de íons extraídos de amostra de sangue <i>postmortem</i> negativa adicionada dos analitos no limite de quantificação (1 ng/mL), e submetida ao preparo de amostras do método citado e análise por CL-EM/EM.....	88
Figura 16 - – Cromatogramas de íons extraídos obtidos de uma amostra negativa de sangue <i>postmortem</i> , após extração pelo método citado e análise por CL-EM/EM.....	89
Figura 17 - Cromatograma de íons extraídos de uma amostra real de sangue <i>postmortem</i> (amostra 79) analisada com o método proposto, onde foi detectada a presença de fentanil (4,4 ng/mL).....	92

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições otimizadas de MRM e tempos de retenção dos analitos de interesse para o método quantitativo para benzodiazepínicos e sedativo-hipnótico...	80
Tabela 2 - Resultados obtidos para os parâmetros de imprecisão, inexatidão, efeito de matriz e recuperação para o método quantitativo para benzodiazepínicos e sedativo-hipnótico.....	83
Tabela 3 - Resultados obtidos no estudo de estabilidade pós processamento, quando os extratos foram armazenados no amostrador automático a 10°C por 24h.....	84
Tabela 4 - Resultados obtidos das análises de amostras reais, além da concentração terapêutica e tóxica de cada substância.....	85
Tabela 5 - Condições otimizadas de MRM e tempos de retenção do fentanil, seus análogos e padrão interno para o método quantitativo por CL-EM/EM.....	87
Tabela 6 - Resultados de imprecisão, inexatidão, efeito de matriz e recuperação para o fentanil e 7 análogos.....	90
Tabela 7 - Resultados obtidos para o parâmetro de estabilidade após armazenamento por 24h e 72h no amostrador automático do CL-EM/EM.....	91

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	Serotonina
5-HTR	Receptor serotoninérgico
ADT	Antidepressivos tricíclicos
AMP <sub>c</sub>	Monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	Análise de variância
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
A <sub>2</sub> R	Receptor A <sub>2</sub> de adenosina
ATP	Adenosina trifosfato
BDZ	Benzodiazepínico
CCDV	Canais de cálcio dependente de voltagem
CDP	Canais de potássio
CE	<i>Collision energy</i>
CG	Cromatografia gasosa
CIATox	Centro de Informação e Assistência Toxicológica
CL	Cromatografia líquida
CL-EM/EM	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial
CYP	Enzima citocromo P450
D <sub>1</sub> R	Receptor D <sub>1</sub> de dopamina
D <sub>2</sub> R	Receptor D <sub>2</sub> de dopamina
D <sub>3</sub> R	Receptor D <sub>3</sub> de dopamina
DA	Dopamina
DAT	Transportador de dopamina
DI	Imersão direta
ELL	Extração líquido-líquido

EUA	Estados Unidos da América
FTIR-ATR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com reflectância total atenuada
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GABA <sub>A</sub>	Receptor de GABA do subtipo A
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
GTFCCh	<i>German Society of Toxicological and Forensic Chemistry</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HS	<i>Headspace</i>
IAPF	Instituto de Análises e Pesquisas Forenses
IMAO	Inibidores da monoaminaoxidase
IML	Instituto Médico Legal
ISRS	Inibidores seletivos da recaptção de serotonina
IRSN	Inibidores da recaptção de serotonina-norepinefrina
LC-QTOF	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
LSD	Dietilamida do ácido lisérgico
LSQ	Limite superior de quantificação
MAO	Monoaminaoxidase
MDMA	3,4-metilenodioximetanfetamina
ME	Membrana
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i>
MS	Ministério da Saúde

NE	Norepinefrina
NET	Transportador de norepinefrina
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartato
NTF	Núcleo de Toxicologia Forense
NSP	Novas substâncias psicoativas
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPI	Opioides
PSA	<i>Primary secondary amine</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
SERT	Transportador de serotonina
SNC	Sistema nervoso central
SPA	Substâncias psicoativas
SPE	Extração em fase sólida
SPME	Microextração em fase sólida
SPTC	Superintendência da Polícia Técnico-Científica
SVS	Secretária de Vigilância em Saúde
SWGTOX	<i>Scientific Working Group for Forensic Toxicologists</i>
UNODC	<i>United Nations Office on Drugs and Crime</i>

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	18
1.1. Substâncias psicoativas .....	18
1.1.1. Antidepressivos .....	18
1.1.2. Antipsicóticos.....	23
1.1.3. Benzodiazepínicos e sedativo-hipnóticos .....	25
1.1.4. Novas substâncias psicoativas .....	29
1.2. Amostras biológicas para análises toxicológicas .....	32
1.3. Métodos de preparo de amostras.....	35
2. OBJETIVO.....	40
2.1. Objetivo geral.....	40
2.2. Objetivos específicos .....	40
3. METODOLOGIA.....	41
3.1. Materiais e reagentes.....	41
3.2. Padrões analíticos e soluções.....	41
3.3. Instrumentação analítica .....	42
3.4. Amostras.....	44
3.5. Preparo das amostras .....	44
3.5.1. Extração por micro-QuEChERS .....	44
3.5.2. Extração por precipitação de proteínas .....	45
3.6. Validação do método analítico .....	45
3.6.1. Limites de detecção e quantificação .....	45
3.6.2. Linearidade.....	46
3.6.3. Exatidão e precisão .....	46
3.6.4. Contaminação cruzada.....	47
3.6.5. Estudos de interferentes.....	47
3.6.6. Estabilidade.....	48

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
4.1. Artigo publicado - Development and Validation of a Method for Quantification of 28 Psychotropic Drugs in <i>Postmortem</i> Blood Samples by Modified Micro-QuEChERS and LC-MS-MS .....	49
4.2. Desenvolvimento e validação de método analítico determinação de benzodiazepínicos e sedativo-hipnóticos em amostras de sangue <i>postmortem</i> por micro-QuEChERS e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas	82
4.2.1. Otimização e validação do método analítico .....	82
4.2.2. Aplicação do método na análise de amostras reais .....	86
4.3. Desenvolvimento e validação de método analítico quantitativo baseado em extração por precipitação de proteínas para análise fentanil e seus análogos em amostras de sangue <i>postmortem</i> .....	88
4.3.1. Otimização e validação do método analítico .....	88
4.3.2. Aplicação do método na análise de amostras reais .....	93
5. DISCUSSÃO GERAL .....	95
6. CONCLUSÃO .....	97
7. REFERÊNCIAS .....	98
8. APÊNDICES.....	105
8.1. Artigo publicado - Synthetic cannabinoid receptor agonists profile in infused papers seized in Brazilian prisons.....	105
9. ANEXOS .....	119
ANEXO 1: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp.....	119
ANEXO 2: Autorização da Editora ( <i>Journal of Analytical Toxicology</i> ) para a inclusão do artigo na tese .....	124
ANEXO 3: Autorização da Editora ( <i>Forensic Toxicology</i> ) para a inclusão do artigo na tese.....	125

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Substâncias psicoativas

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define “substâncias psicoativas” (SPA) como substâncias que, quando administradas em um sistema fisiológico, afetam processos mentais, de cognição ou afeto (1). O uso abusivo de SPA acompanha o homem desde o início dos tempos, porém é a partir da segunda metade século XX que o abusivo passou a aumentar vertiginosamente. De acordo com mais recente relatório do Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (em inglês, *United Nations Office on Drugs and Crime, UNODC*), 269 milhões de pessoas, ou 5,4% da população mundial com idade entre 15 e 64 anos utilizou alguma droga até o ano de 2018 (2).

As SPA possuem ação neurobiológica, cujo principal mecanismo da dependência envolve o lobo frontal e o sistema límbico, as alterações nos circuitos dessa região estabelece uma priorização dos estímulos relacionados ao uso de SPA frente aos demais. A partir disso, o indivíduo não identifica nenhuma atividade ou estímulo como tão prazerosa quanto o uso da SPA (3,4).

Dentre as diversas classes que são enquadradas como SPA, pode-se citar os antidepressivos, antipsicóticos, ansiolíticos, sedativos e hipnóticos, anestésicos, analgésicos, entre outros. Também fazem parte das SPA, as substâncias de abuso classificadas como lícitas ou ilícitas, popularmente conhecidas por “drogas de abuso”. Estas podem ser classificadas em estimulantes do sistema nervoso central (SNC) (cocaína, anfetamina, cafeína, nicotina), depressoras do SNC (álcool etílico, heroína, solventes), alucinógenas (LSD, mescalina), perturbadoras do SNC (canabinóides), drogas de ação mista ou entactógenas (MDMA) (5).

#### 1.1.1. Antidepressivos

A OMS estima que 280 milhões de pessoas (3,8% da população mundial) sofram de depressão, sendo 5,0% dos adultos e 5,7% para os indivíduos acima dos 60 anos. O Brasil é um dos principais países em prevalência de desordens depressivas, com quase nove milhões de casos no ano de 2019 (6).

A depressão é um transtorno mental caracterizado perda de prazer ou interesse em atividades, humor deprimido (tristeza, irritabilidade, vazio), falta de

concentração, culpa excessiva ou baixa autoestima, alterações no sono, apetite ou peso, podendo levar a pensamentos suicidas. Cerca de 800 mil pessoas morrem por suicídio a cada ano, sendo a segunda principal causa de morte de jovens entre 15 e 29 anos (7). Além disso, desordens depressivas estão entre as dez principais causas que impactam na qualidade e expectativa de vida de indivíduos entre 10 e 59 anos (8–12). Infelizmente, menos da metade das pessoas afetadas no mundo recebe tratamento e em alguns países esse índice é inferior a 10% (7).

O principal tratamento para essa comorbidade é através do uso de antidepressivos, fármacos que constam na lista C1 de substâncias sujeitas a controle especial da portaria SVS/MS Nº 344, de 12 de maio de 1998 (13). Essa classe pode ser dividida de acordo com a farmacodinâmica do medicamento: inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS), inibidores da recaptção de serotonina-norepinefrina (IRSN), antidepressivos tricíclicos (ADT), inibidores da monoaminaoxidase (IMAO) e antidepressivos atípicos.

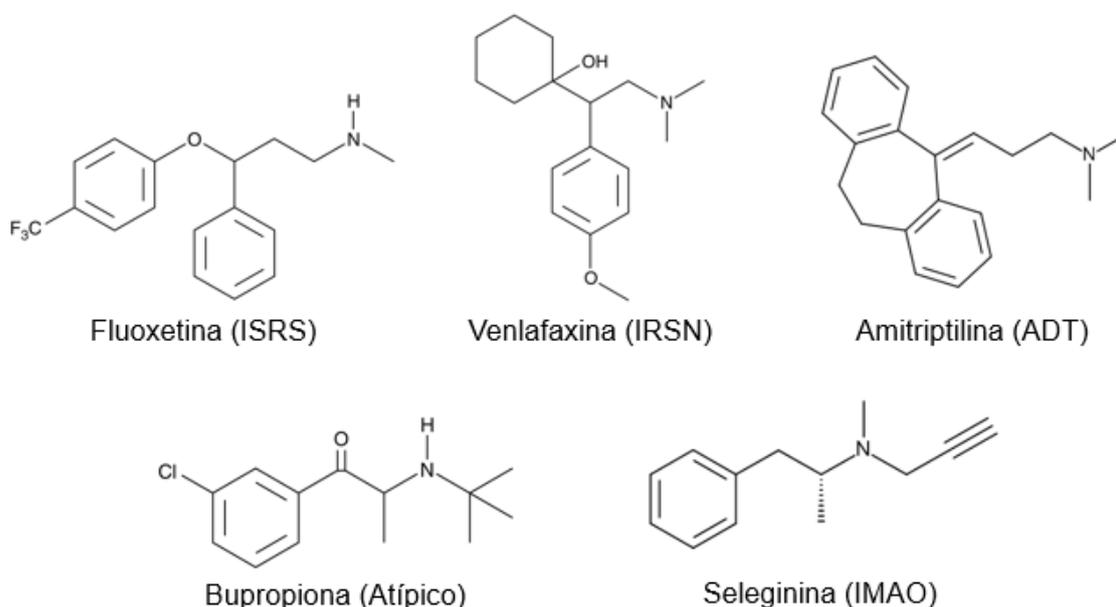


Figura 1 - Estrutura química de exemplos de antidepressivos: fluoxetina (ISRS), venlafaxina (IRSN), amitriptilina (ADT), seleginina (IMAO) e bupropiona (atípico).  
**Créditos à autora.**

Uma das primeiras classes de antidepressivos foram os IMAO, inibidores não seletivos e irreversíveis das monoaminaoxidases (MAO-A e MAO-B) responsáveis pela metabolização de serotonina (5-HT), norepinefrina (NE) e dopamina (DA), aumentando o armazenamento dos neurotransmissores nos grânulos secretores presentes nos neurônios pré-sinápticos (14).

Os ADT surgiram na década de 1950 com a descoberta da imipramina. Atualmente, não são mais utilizados como primeira opção para o tratamento da depressão devido a sua baixa tolerabilidade, sendo mais utilizados em casos de depressão maior e insônia, este último é tratado com doses baixas de ADT de amina terciária (amitriptilina, por exemplo) (15–18). O mecanismo de ação pode variar entre os fármacos desse grupo: inibição discreta e seletiva da NET (desipramina) ou ambos SERT e NET (amitriptilina), também atuam bloqueando receptores serotoninérgicos (5-HT<sub>2</sub>), adrenérgicos ( $\alpha_1$ ), histamínicos (H<sub>1</sub>) e muscarínicos (11,14,19,20).

Os ISRS surgiram na década de 1980 e, atualmente, são os antidepressivos mais comumente utilizado, juntamente com os IRSN (21). Seu mecanismo de ação consiste no aumento da neurotransmissão serotoninérgica através do bloqueio do transportador de 5-HT nos terminais pré-sinápticos (SERT). Com o aumento do tempo de permanência da 5-HT na fenda sináptica há estímulo de diversos receptores serotoninérgicos pós-sinápticos, bem como dos pré-sinápticos que regulam a liberação da serotonina (14).

Os IRSN, juntamente com os ISRS, são chamados de antidepressivos de segunda geração, possuindo maior eficácia e segurança em relação a outros antidepressivos (de primeira geração). Esses fármacos inibem tanto SERT quanto o transportador de NE nos terminais pré-sinápticos (NET), atuando positivamente na neurotransmissão serotoninérgica e/ou noradrenérgica, ou seja, aumentando o tempo de permanência da 5-HT e NE na fenda sináptica, os quais irão gerar em receptores serotoninérgicos e adrenérgicos (14).

Os antidepressivos atípicos incluem antagonistas de receptores serotoninérgicos e inibidores da recaptção, inibidores de recaptção combinados com bloqueadores do receptor ou inibidores da recaptção de dopamina e norepinefrina (IRDN) (21). Um exemplo é a bupropiona, fármaco inibidor da recaptção de dopamina e dopamina, além de aumentar a liberação desses neurotransmissores .

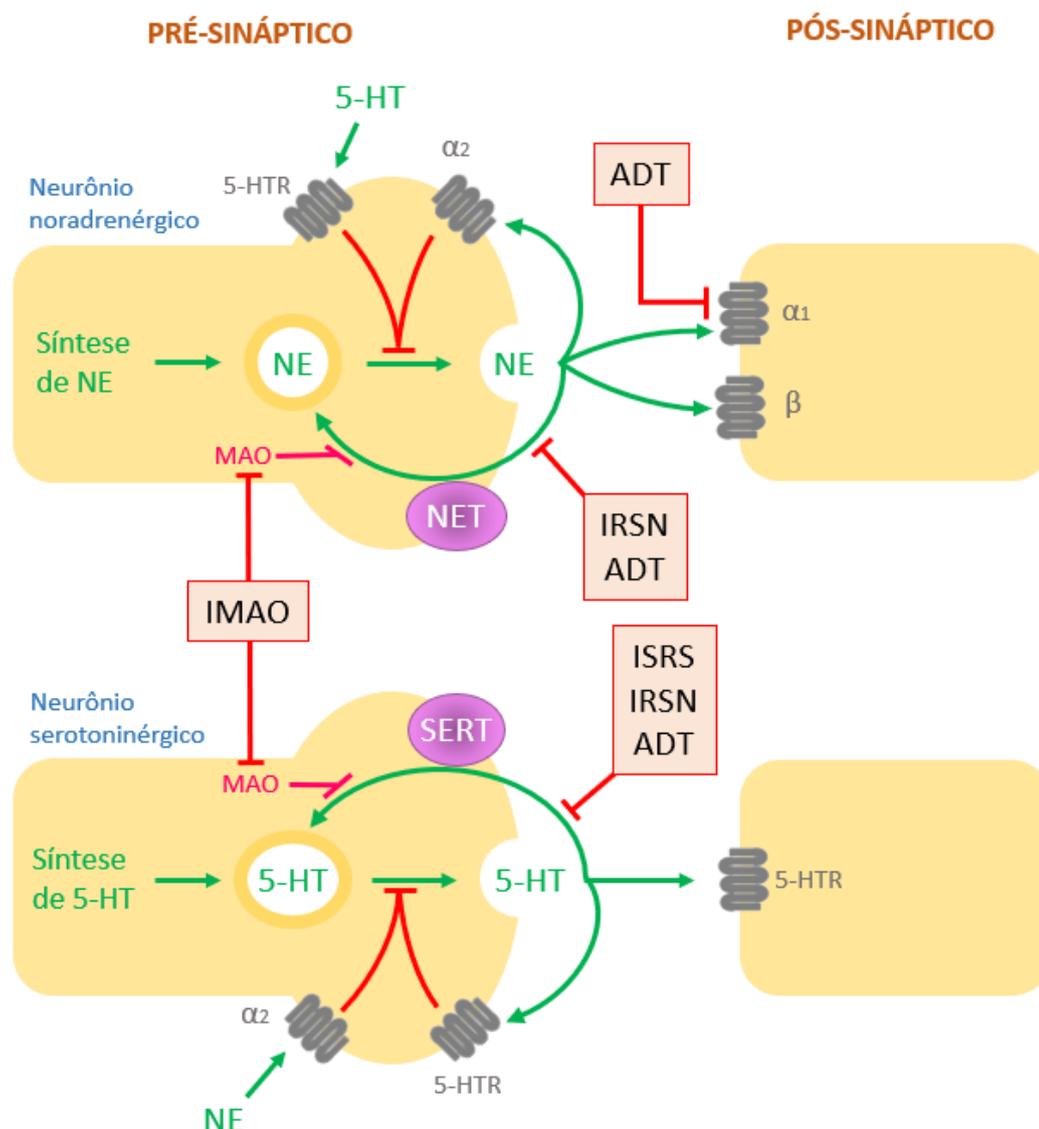


Figura 2 - Esquema representando os locais de ação dos antidepressivos inibidores da monoaminaoxidase (IMAO), inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS), inibidores da recaptção de serotonina e norepinefrina (IRSN) e antidepressivos tricíclicos (ADT). Ilustração baseada em Brunton et al (2012) (14).

Dados coletados entre 2013 e 2014 mostraram que os antidepressivos mais consumidos no Brasil são: fluoxetina (ISRS - 30,1%), amitriptilina (ADT - 22,8%), sertralina (ISRS - 11,9%) e citalopram (ISRS - 8,2%). Algumas características farmacocinéticas dessa classe de medicamentos, bem como as concentrações terapêutica, tóxica e fatal estão descritas no Quadro 1.

Quadro 2 – Biodisponibilidade, tempo de meia-vida, metabólito-ativo e concentrações terapêutica, tóxica e fatal dos antidepressivos (14,22–25).

Substância	Biodisponibilidade	Meia-vida (horas)	Metabólito ativo	Concentração no sangue-plasma (ng/mL)		
				Terapêutica	Tóxica (a partir de)	Fatal (a partir de)
Amitriptilina	30-60	16	Nortriptilina	50-300	500-600	1500-2000
Bupropiona	87	11±1	Radafaxina	75-100	1200-2000	4
Citalopram	80±13	33±4	Não	50-150	220	5000-6000
Clomipramina	50	32	N-desmetilclomipramina	90-250 (-400)	400-600	1000-2000
Desipramina	60-70	15-25	Não	125-300	500-1000	3000
Desmetilcitalopram	-	-	Não	-	-	-
Doxepina	30±10	18±5	Desmetildoxepina	10-200	500-1000	2000-4000
Duloxetina	42,8 (18,5-71,2)	9,3 (6,4-12)	Não	30-120	240	-
Fluoxetina	<90	53±41	Não	100-500	1000	6000
Hidroxi-bupropiona	-	-	Não	-	-	-
Imipramina	29-77	12	Desipramina	50-350	500-1000	1500-2000
Mirtazapina	50±10	16,3±4,6	Não	30-300	1000-2000	-
Norfluoxetina	-	240	Não	-	-	-
Norsertalina	-	66	Não	-	-	-
Nortriptilina	51±5	31±13	Não	20-150	300-500	1000-3000
o-desmetilvenlafaxina	-	-	Não	-	-	-
Paroxetina	30-60	17±3	Não	30-100	350-400	3700-4000
Sertralina	>44%	23	Não	50-250	290	1600
Trazodona	81±6	5,9±0,4	Não	700-1000	3000	12000
Trimipramina	41,4±4,4	16	Não	10-300	600	1700
Venlafaxina	10-45	4,9±2,4	Desvenlafaxina	100-400	1000-1500	6100

Os efeitos adversos causados por essa classe terapêutica incluem: perda de apetite e distúrbios gastrointestinais (ISRS), hipertensão (IRSN), constipação (ADT), perda de libido e falta de orgasmos (ISRS), xerostomia, hipotensão ortostática (ADT) e taquicardia (IRSN). A intoxicação aguda pode levar à excitação e delírio, convulsões, hepatotoxicidade grave (IMAO), depressão respiratória, disritmias cardíacas e coma. A interação fármaco-fármaco entre IMAO e ISRS pode levar à síndrome serotoninérgica, causando hipertermia, rigidez muscular, mioclonia, alterações do estado mental e sinais vitais. Inibidores da MAO podem causar síndrome simpatomimética, cujos sintomas incluem: agitação, agressividade, paranoia, midríase, sudorese, hipertermia, náusea, vômito e rabdomiólise. O tratamento é feito através do controle dos sintomas (14,26).

### **1.1.2. Antipsicóticos**

Os transtornos psicóticos podem ter diversas causas e, normalmente, incluem transtornos de humor, senso distorcido ou inexistente da realidade, delírio, esquizofrenia ou demência com características psicóticas. Os sintomas associados à esquizofrenia podem ser classificados em positivos ou negativos. O primeiro é caracterizado por delírios e alucinações e, o segundo, por dificuldade em expressar emoções e sentimentos (afeto embotado), motivação diminuída, experiência de prazer reduzida e quantidade reduzida de palavras faladas.

Os primeiros medicamentos para o tratamento da psicose (antipsicóticos típicos ou de primeira geração) surgiram da hipótese de que essa doença era causada por um antagonismo dos receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> pós-sinápticos. Seu mecanismo de ação consiste no bloqueio dos receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> pós-sinápticos, porém, isso leva a inúmeros efeitos colaterais, como: acatisia, discinesia tardia, distonia aguda, parkinsonismo, hiperprolactinemia e síndrome neuroléptica maligna (14,21).

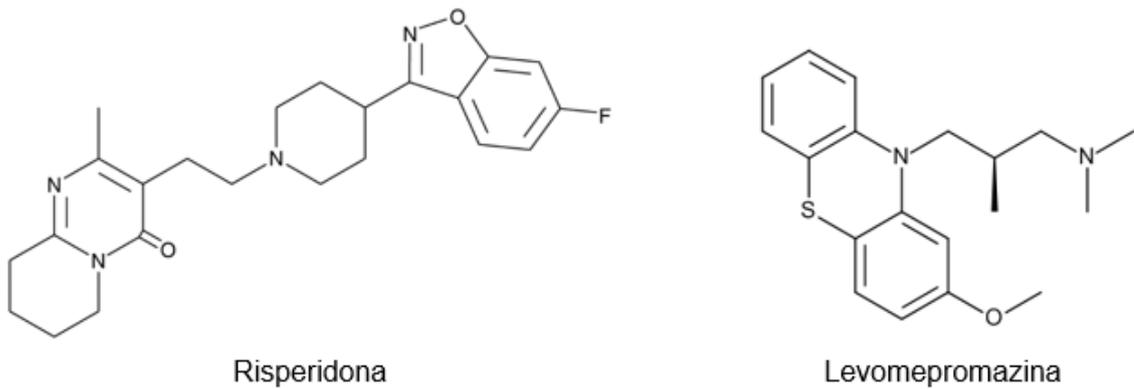


Figura 3 - Estrutura química de exemplos de antipsicóticos: levomepromazina (típico) e risperidona (atípico). **Créditos à autora.**

Os antipsicóticos atípicos (ou de segunda geração) surgiram para tratar sintomas negativos, os quais a hipótese da dopamina não explicava: déficits cognitivos relacionados à diminuição da sinalização da DA na região do córtex pré-frontal, efeitos psicomiméticos de agonistas de outras vias ou de antagonistas de receptores glutamato *N*-metil-D-aspartato (NMDA). A farmacodinâmica desse grupo consiste no antagonismo de receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2</sub> e bloqueio menos potente dos receptores D<sub>2</sub>, isso resultou em diminuição dos efeitos extrapiramidais causados pelos fármacos de primeira geração. Outros mecanismos relacionados a esses fármacos são: atuação em outros subtipos dos receptores serotoninérgicos e estimulação de receptores de glutamato ou muscarínicos (14,21,27).

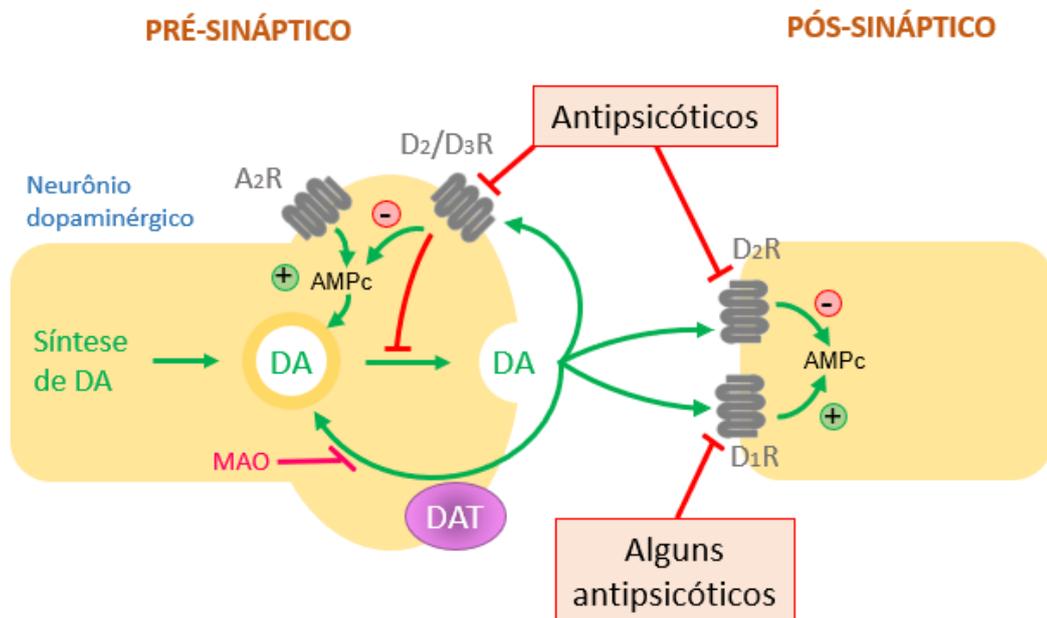


Figura 4 - Esquema representando os locais de ação dos antipsicóticos. Ilustração baseada em Brunton et al (2012) (14).

Algumas características farmacocinéticas dessas substâncias, bem como as concentrações terapêutica, tóxica e fatal estão descritas no Quadro 2.

Quadro 2 – Biodisponibilidade, tempo de meia-vida e concentrações terapêutica, tóxica e fatal dos antipsicóticos (14,22,25,28).

Substância	Biodisponibilidade	Meia-vida (horas)	Concentração no sangue-plasma (ng/mL)		
			Terapêutica	Tóxica (a partir de)	Fatal (a partir de)
Clozapina	55±12	12±4	350-600	600-1000	1-5,2
Haloperidol	60±18	18±5	5-20	50-500	500
Levomepromazina	50-60	15-30	5-200	400	500
Olanzapina	~60	33,1±10,3	20-80	150-200	250-1000
Quetiapina	9	6	100-500	1000-18000	1900
Risperidona	66±28	3,2±0,8	6-20	120	1800
Ziprasidona	59	2,9	50-200	400	-

Além de síndrome neuroléptica maligna, os antipsicóticos podem causar síndrome anticolinérgica, como resultado do bloqueio da transmissão de acetilcolina no sistema nervoso periférico e central, seus principais sintomas são: midríase, hipertermia, vasodilatação, taquicardia, anidrose, convulsões, delírio e alucinação. O tratamento requer acompanhamento da equipe de saúde, sendo o uso de inibidores de colinesterases (fisostigmina, por exemplo) somente em casos graves (29).

### 1.1.3. Benzodiazepínicos e sedativo-hipnóticos

O Brasil é o país com a maior taxa de pessoas com transtornos de ansiedade no mundo. Segundo estimativas da OMS, cerca de 18,6 milhões de brasileiros (ou 8,5% da população) sofrem de ansiedade, sendo a oitava principal causa que impacta na qualidade e expectativa de vida (8).

A ansiedade é uma emoção normal a todos os humanos, portanto, o transtorno de ansiedade é uma doença mental caracterizada pelo sentimento de medo ou temor fora de escala se comparado a situações consideradas normais ou habituais. Essa comorbidade inclui diversas doenças, como: transtorno de ansiedade generalizada, transtorno obsessivo-compulsivo, síndrome do pânico, estresse pós-traumático, transtorno de ansiedade de separação, fobia social, fobias específicas e estresse agudo (14,30). A insônia é uma disfunção frequentemente associada à ansiedade e depressão, podendo ser dividida em três categorias: insônia transitória, quando causada por algum estresse ambiental ou situacional e duração inferior a três dias; insônia de curto prazo, causada por estresse na vida pessoal e com duração

entre três dias e três semanas; e, insônia de longo prazo, quando possui duração superior a três semanas e não há como identificar a causa.

Os principais fármacos utilizados no tratamento da ansiedade e insônia são os antidepressivos e antipsicóticos, discutidos anteriormente, os benzodiazepínicos e os sedativo-hipnóticos. Os medicamentos destas duas últimas classes constam na lista B1 de substâncias psicoativas sujeitas a notificação de receita B, da portaria SVS/MS N° 344, de 12 de maio de 1998 (13).

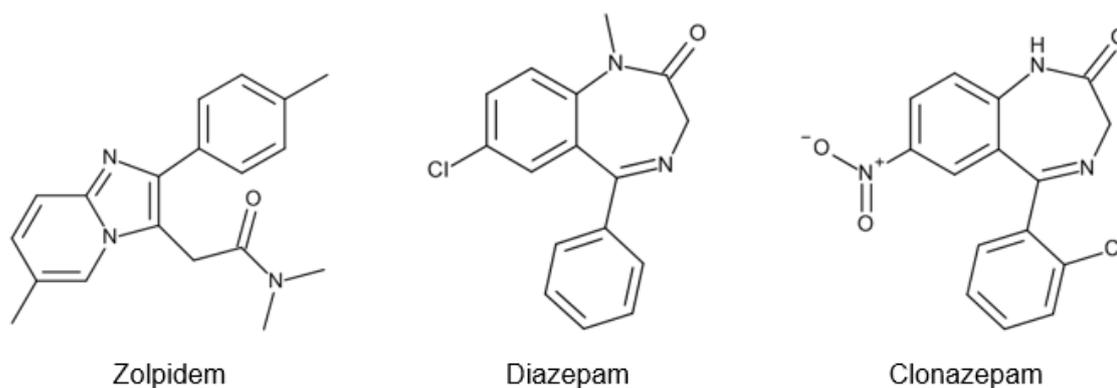


Figura 5 - Estrutura química de exemplos de sedativo-hipnótico e benzodiazepínicos: zolpidem (sedativo-hipnótico), diazepam (BDZ) e clonazepam (BDZ). **Créditos à autora.**

Os benzodiazepínicos (BDZs) foram introduzidos na prática clínica na década de 1960, com a utilização do clordiazepóxido. O mecanismo de ação desses fármacos ocorre através da promoção da ligação do neurotransmissor inibitório, o ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), aos receptores de GABA do subtipo GABA<sub>A</sub>, intensificando as correntes iônicas induzidas por esses canais de cloreto com múltiplas subunidades controlados por ligando. Devido à falta de seletividade dos benzodiazepínicos pelo subtipo A desses receptores, surgiram os chamados “compostos Z” (zolpidem, zopiclona e eszopiclona): compostos não-benzodiazepínicos com efeitos sedativo-hipnóticos que interagem apenas com um subconjunto dos locais de ligação dos receptores GABA (14,30–32) O zolpidem foi introduzido na prática clínica na década de 1980 na Europa e, apesar de efeitos adversos mais discretos que os BZDs, pode causar sonolência durante o dia, tontura, amnésia, dor de cabeça, náusea e alucinações (33).

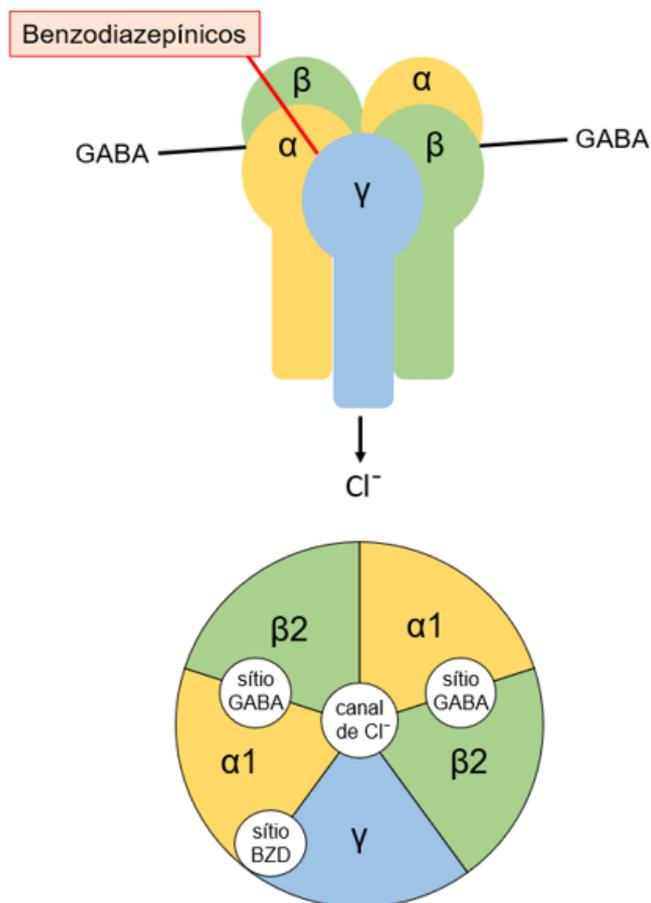


Figura 6 - Esquema representando o receptor de GABA e o local de ação dos benzodiazepínicos. Ilustração baseada em Chen et al (2019) (20).

Intoxicações por esses medicamentos podem causar agitação, tontura, amnésia e depressão neurológica, caracterizada por letargia, hipotensão, bradicardia, depressão respiratória, hipotermia e coma. O tratamento inclui suporte cardiorrespiratório do paciente e administração de flumazenil, um antagonista de receptor de benzodiazepínicos que se liga com alta afinidade ao receptor GABA<sub>A</sub>, antagonizando competitivamente a ligação dos benzodiazepínicos. A análise toxicológica é fundamental na diferenciação da causa desses sintomas, uma vez que os álcoois, opioides, antagonistas H<sub>1</sub> de histamina e monóxido de carbono também causam essa síndrome tóxica. Por exemplo, no caso de intoxicações por opioides o antídoto é naloxona, um antagonista destes receptores.

Algumas características farmacocinéticas dessas SPA, bem como as concentrações terapêutica, tóxica e fatal estão descritas no Quadro 3.

Quadro 3 – Biodisponibilidade, tempo de meia-vida, metabólito-ativo e concentrações terapêutica, tóxica e fatal dos benzodiazepínicos (14,22,25,34–36).

Substância	Biodisponibilidade	Meia-vida (horas)	Metabólito ativo	Concentração no sangue-plasma (ng/mL)		
				Terapêutica	Tóxica (a partir de)	Fatal (a partir de)
Alprazolam	88±16	12±2	α-hidroxiaprazolam	5-50	100-400	-
Bromazepam	84	8-22	3-hidroxibromazepam	50-200	300-400	1000-2000
Clonazepam	98±31	23±5	7-aminoclonazepam	4-80	100	-
Diazepam	100±14	43±13	Nordazepam Temazepam	100-2000	3000-5000	-
Etizolam	93	7-15	-	8-20	30	-
Flunitrazepam	85	10-20	N-desmetil-flunitrazepam	5-15	50	-
Lorazepam	93±10	14±5	Não	20-250	300-500	-
Midazolam	IM: 90 VO: 40-50	2-4	α-hidroxiimidazolam	40-100	1000-1500	-
Nitrazepam	53-94	16-40	Não	30-100	200-3000	5000
Nordazepam	50	60	Oxazepam	200-800	1500-2000	-
Oxazepam	92,8	8±2	Não	200-1500	2000	3000-5000
Temazepam	>90	8-12	Oxazepam	20-150 (-900)	1000	8000
Zolpidem	72±7	1,9±0,2	Não	80-200	500	2000-4000

### 1.1.4. Novas substâncias psicoativas

As novas substâncias psicoativas (NSP), são substâncias ou misturas de substâncias psicoativas produzidas em laboratórios clandestinos, por síntese química a partir de substâncias precursoras encontradas ou não na natureza. Podem ser sintetizadas ainda por pequenas modificações na estrutura de moléculas que possuam atividade biológica conhecida. O termo “novas” não se refere necessariamente a substâncias recém inventadas, uma vez que muitas delas foram sintetizadas pela primeira vez há mais de 40 anos. De acordo com a UNODC, são consideradas NSP aquelas substâncias psicoativas, em sua forma pura ou preparada com outras substâncias e excipientes, e que não são controladas pela Convenção Única de Entorpecentes (1961) ou pela Convenção de Substâncias Psicotrópicas (1971) (2,37). Essas substâncias são divididas em nove grupos: aminoindanos, fenetilaminas, piperazinas, substâncias do tipo fenciclidina, substâncias a base de plantas, canabinoides sintéticos, catinonas sintéticas, triptaminas e outras substâncias.

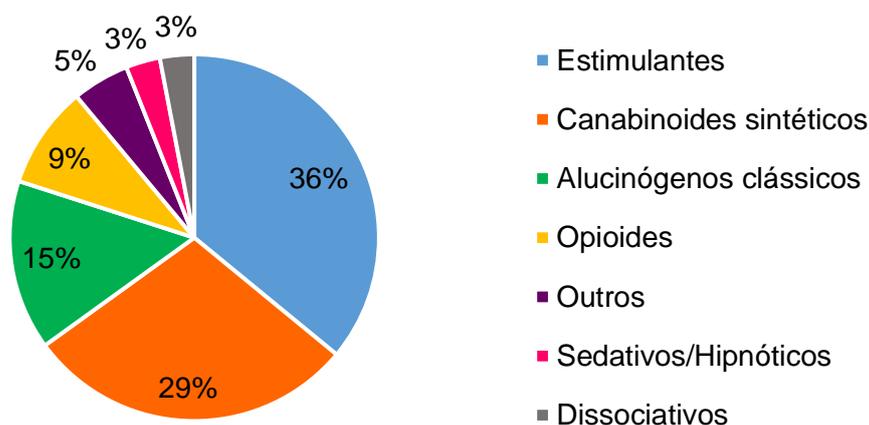


Figura 7 – Distribuição das novas substâncias psicoativas sintéticas reportadas até dezembro de 2020 à UNODC. Ilustração baseada em UNODC (2020) (38).

As NSP são conhecidas popularmente como *legal highs*, termo que delinea uma característica importante deste grupo de drogas: proporcionar ao usuário efeitos semelhantes aos produzidos pelas drogas de abuso “tradicionais”, porém sem a classificação de substância ilícita ou controladas internacionalmente, como a cocaína, metanfetamina, MDMA, LSD, etc (2).

O Relatório sobre Drogas Sintéticas elaborado pela Polícia Federal mostra que no Brasil há prevalência do grupo das fenetilaminas (46,2%), catinonas sintéticas

(30,8%), substâncias do tipo fenciclidina (7,7%) e canabinoides sintéticos (5,1%) (39). Apesar do pequeno número de laudos contendo fentanil e seus análogos, o Furanilfentanil foi identificado nos anos de 2016, 2017 e 2019. Em 2020, houve casos em que o Fentanil foi identificado, porém todos os laudos se referiam a medicamentos. Ademais, o próprio relatório indica a importância do constante monitoramento desse grupo de NSP em virtude do cenário internacional (39).

Um importante grupo é o dos opioides sintéticos, cujo crescente uso mundial tem levado a sérios problemas de saúde pública em diversos países, principalmente nos Estados Unidos da América (EUA). O aumento significativo do número de usuários e, conseqüentemente, de indivíduos que desenvolveram dependência, foram hospitalizados ou morreram por overdose fez com que a comunidade científica denominasse esse problema de “crise opioide” (*“opioid crisis”*, do inglês), justificando a necessidade do desenvolvimento de estratégias analíticas que permitam a identificação e quantificação desta classe de drogas no sistema humano.

Esse grupo inclui, entre outras substâncias, o fentanil e seus análogos (figura 8) (40). O fentanil é um agonista sintético de receptores de opioide do tipo  $\mu$  da classe de fenilpiperidinas que surgiu na década de 1960, utilizado como analgésico de uso restrito ao ambiente hospitalar para induzir e manter anestésias e sedações. Está disponível para administração oral, parenteral e dérmica (como adesivo transdérmico). É um fármaco de elevada potência, aproximadamente 100 vezes mais potente que a morfina (41,42).

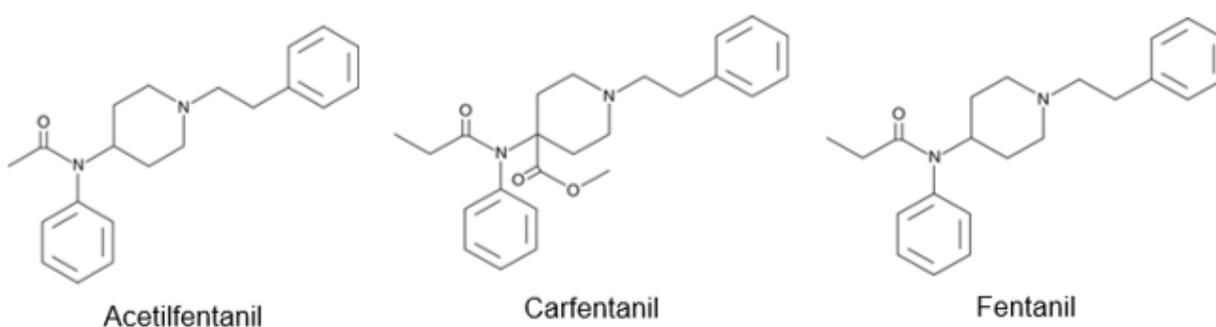


Figura 8 - Estrutura química do fentanil e exemplo de 2 dos seus análogos: acetilfentanil e carfentanil. Créditos à autora.

O efeito analgésico do fentanil ocorre principalmente através de sua ligação no receptor  $\mu_1$ , enquanto a depressão respiratória é mediada pelo receptor  $\mu_2$ , sendo que o surgimento destes efeitos é depende da dose, da tolerância dos pacientes aos

opioides e das concentrações séricas da substância. Seus efeitos tóxicos incluem complicações relacionadas à via de exposição (reações de hipersensibilidade), depressão respiratória, excitação neurológica e, em alguns casos, convulsão. A gravidade da depressão respiratória depende da resposta dos pacientes, resposta farmacocinética, ingestão de outros medicamentos sedativos e outras comorbidades que afetem a função pulmonar (14,43–45).

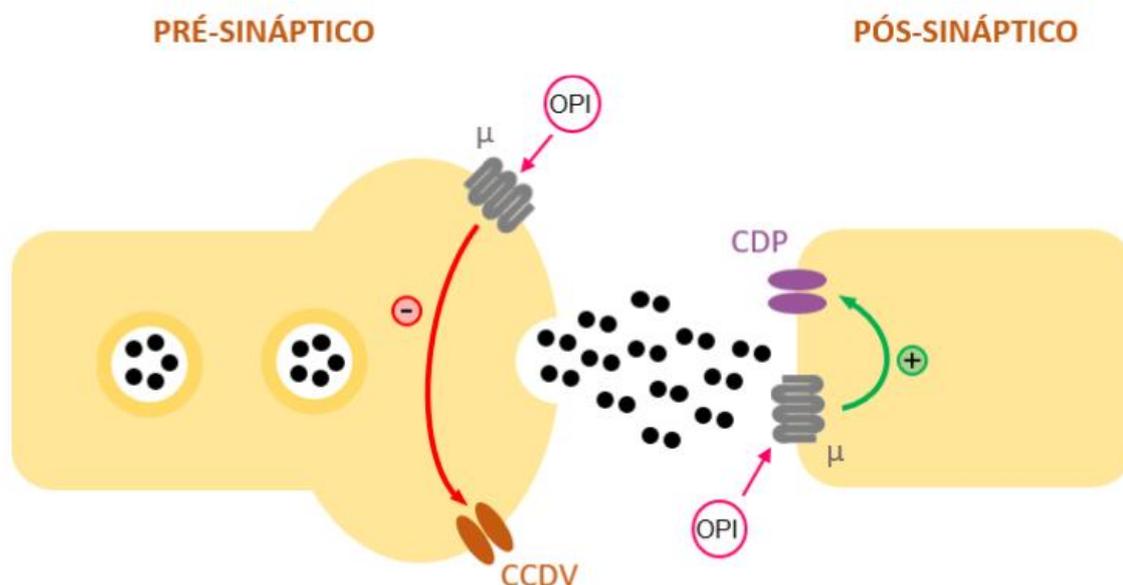


Figura 9 - Esquema representando os locais de ação dos opioides (OPI). Ilustração baseada em Gillis et al (2020) (46).

A farmacocinética do fentanil possui variabilidade, geralmente, após uma única dose intravenosa, a concentração sanguínea deste fármaco cai rapidamente devido ao efeito de primeira passagem no fígado, levando a uma alta taxa de eliminação pelos rins. Por ser altamente lipossolúvel, atravessa a barreira hematoencefálica, apesar disso, os níveis do plasma e no líquido cerebrospinal declinam rapidamente em consequência da redistribuição de tecidos mais perfundidos para outros locais, como músculos e gordura. O uso de medicamentos que também sejam metabolizados pela CYP3A4/5 pode levar a uma possível interação fármaco-fármaco contribuindo para causar quadros de intoxicação (42,47).

O fentanil pode ser misturado à heroína, com o objetivo de adulterar essa droga de abuso, aumentando seu volume, potência e, conseqüentemente, o lucro do traficante. A combinação dessas duas drogas apresenta graves conseqüências para o usuário, podendo ser fatal até mesmo para os usuários com certo nível de tolerância aos opioides. Vários casos de intoxicações e óbitos por fentanil e seus análogos foram descritos na literatura (40,48–54).

Além de novas moléculas, os derivados do fentanil que eram usados em outras áreas passaram a ser usados para fins recreativos. Um exemplo é o carfentanil (figura 8), substância com potência 10.000 vezes maior que a morfina, autorizada apenas para aplicações veterinárias (sedativos de grandes animais, como elefantes), tem sido usada como droga de abuso e causou inúmeras mortes (48,55–58). Recentemente, foram relatados casos de intoxicação após o uso de cocaína em Buenos Aires (Argentina), ao todo o caso teve 24 vítimas fatais e 99 pessoas intoxicadas (59,60). Os usuários deram entrada na emergência com sintomas como: miose, choque, depressão sensorial, desconforto respiratório (bradipneia), excitação psicomotora, convulsões e parada cardiorrespiratória. Diante desse quadro, o serviço de saúde suspeitou de intoxicação por opioides, administrando naloxona aos pacientes, os quais responderam bem ao tratamento (60). Peritos do laboratório da Promotoria de Munro e da Polícia Científica de Buenos Aires analisaram amostras da cocaína consumida, ambos confirmaram que a substância responsável pelas mortes era Carfentanil (59). Mesmo com a discussão mundial sobre a “crise dos opioides”, o Brasil não possui dados epidemiológicos sobre seu consumo, dependência ou intoxicação por esses agentes tóxicos.

## **1.2. Amostras biológicas para análises toxicológicas**

Análises toxicológicas ou toxicologia analítica é uma das três divisões da Toxicologia e tem como finalidade auxiliar no diagnóstico, prognóstico, tratamento e prevenção das intoxicações. Esse propósito é possível por meio da detecção, identificação e quantificação dos toxicantes e ou seus produtos de biotransformação, em amostras biológicas como sangue, urina, cabelo, fluido oral, humor vítreo, mecônio, entre outras (61).

Quadro 4 – Janela de detecção e exemplos de vantagens e desvantagens de alguns tipos de amostras biológicas utilizadas em análises toxicológicas.

Amostra	Vantagens	Desvantagens	Janela de detecção
Sangue	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Boa correlação entre concentração e efeitos tóxicos</li> <li>• Diferenciação entre intoxicação aguda e crônica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Afetado pela RPM</li> <li>• Viscosidade</li> <li>• Maior quantidade de interferentes endógenos</li> <li>• Coleta invasiva</li> </ul>	Minutos ou horas
Urina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Coleta não invasiva</li> <li>• Altas concentrações de substâncias</li> <li>• Presença da droga e de seus produtos de biotransformação</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pouca correlação</li> <li>• Afetada por hábitos e doenças</li> <li>• Presença de produtos de biotransformação comuns a mais de uma droga</li> <li>• Possibilidade de adulteração</li> </ul>	Dias ou semanas
Cabelo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fácil coleta, transporte e armazenamento</li> <li>• Estabilidade da matriz</li> <li>• Análise de exposição crônica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dependente da lipofilicidade da substância</li> <li>• Exposição a fatores naturais</li> <li>• Afetado por tratamentos cosméticos</li> </ul>	Semanas ou meses
Fluido oral	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Coleta não invasiva</li> <li>• Coleta supervisionada (difícil adulteração)</li> <li>• Detecção da fração livre da droga</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Volume limitado</li> <li>• Contaminação por drogas utilizadas VO</li> <li>• Influência do coletor</li> </ul>	Horas ou dias
Humor vítreo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Isolamento anatômico</li> <li>• Menos sujeito à RPM</li> <li>• Boa correlação com sangue</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dependente da lipofilicidade da substância</li> <li>• Amostra <i>postmortem</i></li> </ul>	Semanas ou meses
Mecônio	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Verificação de exposição fetal às substâncias</li> <li>• Facilidade de coleta</li> <li>• Boa estabilidade</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Amostra complexa</li> <li>• Exige um preparo de amostra mais laborioso</li> <li>• Possibilidade de contaminação cruzada com a urina</li> </ul>	Semanas ou meses

RPM: Redistribuição *postmortem*; VO: via oral. **Fonte:** (26,62–65).

A seleção da amostra biológica a ser utilizada depende da finalidade da análise, da toxicocinética e toxicodinâmica do xenobiótico que se pretende analisar. As principais diferenças relevantes entre as matrizes biológicas estão no tempo de detecção (ou janela de detecção) dos xenobióticos em cada matriz e na presença e quantidade de inalterados ou biotransformados (61,66).

Após a absorção ou administração sistêmica do xenobiótico, o sangue é responsável pela distribuição para os tecidos. Esse processo é influenciado tanto por fatores fisiológicos (débito cardíaco, permeabilidade capilar, volume tecidual) quanto por propriedades físico-químicas da substância (lipossolubilidade, pKa). O sangue (total, soro ou plasma) é a principal amostra de escolha para a quantificação dos toxicantes, pois geralmente possibilita a correlação com os efeitos tóxicos causados no paciente (26,66).

Apesar da vantagem, o sangue está sujeito à alterações decorrentes da morte do indivíduo, esse fenômeno é chamado redistribuição *postmortem*: algumas substâncias exibem concentrações que excedem àquelas ditas como terapêuticas em amostras *antemortem*. Os principais mecanismos envolvidos são: concentração nos chamados “órgãos reservatórios”, mudanças cadavéricas e propriedades físico-químicas e farmacocinéticas da droga.

O primeiro mecanismo ocorre através do acúmulo dos xenobióticos em órgãos ocos (partes do trato gastrointestinal) ou vísceras (fígado, pulmões ou miocárdio), com posterior redistribuição para tecidos vizinhos. Há dois mecanismos que explicam essa ocorrência: difusão através dos vasos sanguíneos ou transparietal para órgãos circundantes. Por exemplo, vestígios de drogas não absorvidas ou presentes no conteúdo gástrico podem sofrer difusão para câmaras cardíacas, bem como para o lóbulo inferior esquerdo do pulmão ou porção posterior esquerda do fígado. Além disso, a regurgitação da droga pode levar à contaminação das vias aéreas superiores e, conseqüentemente, para o sangue cardíaco, levando a um aumento da concentração do xenobiótico no sangue (67).

As chamadas “mudanças cadavéricas” se refere àquelas modificações celulares e teciduais que ocorrem durante o processo de putrefação do corpo, entre elas podemos citar: morte celular, hipóstase e coagulação sanguínea, movimentação sanguínea e degradação ou síntese de substâncias por bactérias. A primeira leva a liberação de xenobióticos básicos dos tecidos para o sangue, sendo que drogas neutras ou ácidas são menos afetadas por esse processo; a segunda, leva a um

aumento do número de glóbulos vermelhos e, conseqüentemente, a modificação da razão soro/sangue das drogas; e, na terceira, ocorre redistribuição física dos xenobióticos e mistura de sangue proveniente de diversas regiões do corpo (67).

A absorção de uma droga depende do gradiente de concentração, pH do meio e tamanho, lipossolubilidade e ionização da substância. Ou seja, alterações do pH intracelular e perda da integridade da membrana que ocorrem durante às mudanças cadavéricas, influenciam na absorção no trato gastrointestinal. Além disso, o transporte ativo de ácidos e bases orgânicas fracas é interrompido devido à diminuição da produção de adenosina trifosfato (ATP).

Um estudo mostrou que há diminuição progressiva da atividade hepática nas primeiras 48h, ou seja, o metabolismo das substâncias continua mesmo várias horas após a morte do indivíduo. A reabsorção pelo néfron também persiste nas primeiras horas, levando à diminuição do pH plasmático e aumento da quantidade de ácidos fracos fora da célula. Porém, outros processos cessam no momento da morte: filtração glomerular e secreção tubular, influenciando diretamente na produção de urina e eliminação das drogas (67,68).

Além da redistribuição, a obtenção de soro ou plasma para amostras *postmortem* não é viável, portanto os métodos utilizados nessas análises são desenvolvidos para amostras de sangue total. A viscosidade dessas amostras, principalmente de corpos em decomposição, pode gerar dificuldade na etapas de extração, como por exemplo, bloqueio em cartuchos de extração em fase-sólida (69,70).

### **1.3. Métodos de preparo de amostras**

O preparo de amostras visa separar os analitos de interesse dos demais compostos presentes, reduzindo interferentes e, conseqüentemente, melhorando a seletividade e sensibilidade do método. Essa etapa das análises toxicológicas também pode ser utilizada para concentração das substâncias a serem analisadas presentes em baixas concentrações (71). A precipitação de proteínas, extração líquido-líquido (ELL) e extração em fase sólida (SPE), são exemplos de preparo de amostras comumente utilizados.

A precipitação de proteínas é uma técnica simples e rápida que consiste na adição de agentes precipitantes (solventes orgânicos como acetonitrila ou metanol, por exemplo), o objetivo é quebrar a ligação entre o analito de interesse e as proteínas

presentes na matriz. Em seguida, a mistura é submetida a agitação e centrifugação, permitindo a separação entre o precipitado e o sobrenadante contendo as substâncias. As maiores desvantagens são ausência de extração ou pré-concentração e ausência de automatização.

A ELL é baseada no processo físico-químico de partição (figura 10), onde os analitos são removidos da amostra dissolvendo-se em um solvente adequado, resultando em duas fases imiscíveis: orgânica e aquosa. O solvente extrator é adicionado à amostra, seguido de agitação mecânica para promover o contato entre o solvente e a amostra, além de centrifugação para separação entre as fases. Devido a sua rapidez e simplicidades, a ELL ainda é amplamente utilizada, mesmo diante do surgimento de métodos mais eficientes para extração e concentração dos analitos.

As principais desvantagens desta técnica estão no tempo consumido para o preparo das amostras, necessidade da utilização de grandes volumes de solventes orgânicos, além de envolver várias etapas de difícil automação, podendo ocorrer perda de analito e contaminação (72,73).

Em 1976 surge a SPE, uma técnica baseada nos processos físico-químicos de partição e adsorção, nesse último os analitos são coletados na superfície de um sólido com alto poder adsortivo. A SPE é mais atrativa quando se trata da eficiência de extração (recuperação) dos analitos devido a sua habilidade de reter de maneira eficiente e mais seletiva os compostos com diferentes grupos funcionais de amostras aquosas e, então, de liberá-los no solvente orgânico na eluição. Além disso, utiliza volumes consideravelmente menores de solvente que a ELL (74,75).

Tradicionalmente a SPE é usada na forma de cartuchos disponíveis nos modos de fase normal, de fase reversa e de troca iônica. Geralmente, a escolha da fase sólida segue as mesmas regras utilizadas em CL, levando em conta as propriedades físico-químicas dos analitos de interesse, da fase estacionária (FE) e da fase móvel (FM), além da força cromatográfica e seletividade desta último (75–77). O Quadro 5 descreve as principais fases extratoras, bem como exemplos de grupos funcionais que as compõe e os compostos que podem ser extraídos.

Quadro 5 – Fases extratoras tradicionalmente utilizadas para extração em fase sólida (SPE).

Fase extratora	Grupo funcional da fase extratora	Compostos extraídos
Fase normal	Sílica, ciano, amino	Compostos polares
Fase reversa	Octil (C8), octadecil (C18), fenil cianopropil	Compostos apolares
Troca iônica	Ácido sulfônico ou carboxílico	Compostos catiônicos
	Amino ou amina quaternária	Compostos aniônicos

Fonte: adaptado de (75).

As vantagens da SPE incluem utilização de menores volumes de solventes, não formação de emulsões, possibilidade de concentração dos analitos, alta recuperação e possibilidade de automação. Porém, também apresenta algumas limitações, como a etapa de dessorção dos analitos que requer o uso de solventes tóxicos e a ocorrência de efeitos de matriz. As desvantagens estão no tempo, alto custo dos cartuchos e possibilidade de obstrução (75,76,78,79).

A microextração em fase sólida (SPME) surge na década de 90 como solução para algumas das limitações apresentadas pela SPE. A técnica utiliza uma fibra de sílica revestida com a fase estacionária e permite o preparo da amostra em uma única etapa, ocorrendo redução do tempo e do uso de solventes orgânicos (80). Existem três tipos de modos de extração: imersão direta (DI) da fibra SPME na matriz de amostra líquida (DI-SPME); extração por headspace (HS), na qual a matriz é aquecida em um frasco com o objetivo de volatilizar os analitos e, então, a fibra é colocada logo acima da amostra, coletando-se o gás formado (HS-SPME); e, extração por membrana (ME), onde os analitos polares são separados da amostra por uma membrana hidrofóbica. Os parâmetros que afetam a recuperação do analito nessa técnica incluem: tipo de revestimento da fibra, temperaturas de extração e dessorção, tempo de extração e pH (80,81).

Apesar da SPME englobar amostragem, extração e pré-concentração das amostras em uma única etapa, é uma técnica mais adequada para a extração de compostos voláteis ou semivoláteis para análise por GC, sendo necessária uma etapa de derivatização para a análise de compostos não voláteis ou termicamente lábeis (82,83). Outras desvantagens incluem: competição entre os analitos de interesse e os

compostos da matriz pela fibra, além da fragilidade das fibras onde, infelizmente, a quebra é relativamente comum (84).

Diversos estudos buscam novas técnicas de preparo de amostras que sejam rápidas, eficientes, automatizáveis e ecologicamente mais corretos. Um exemplo é o QuEChERS (acrônimo para *quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe*, do inglês) técnica de preparo de amostras que vem se tornando muito popular em diversas áreas, sendo também conhecida como extração SPE dispersiva. Essa técnica foi proposta em 2003 por Anastassiades e colaboradores (85) para extração multirresíduos de praguicidas em amostras de alimentos. O preparo da amostra é realizado em três etapas (79,81,86):

1. *Extração*: através da adição de acetonitrila, um solvente menos tóxico do que os tradicionalmente utilizados na ELL. A acetonitrila promove a precipitação de proteínas presentes na matriz e proporciona a extração de uma ampla faixa de substâncias com diferentes polaridades. Além disso, ela é mais adequada para injeção direta em sistemas CL do que outros solventes (como clorofórmio, hexano, acetona ou acetato de etila) e pode ser utilizada sem problemas na análise por cromatografia em fase gasosa (CG);
2. *Partição*: promovida pela adição de sais para aumento da força iônica ou efeito *salting out*, diminuindo a solubilidade dos compostos na fase aquosa e a quantidade de água na fase orgânica. Para uma melhor recuperação de substâncias polares, utiliza-se sais secantes, como sulfato de sódio ou magnésio;
3. *Limpeza*: ao utilizar uma SPE dispersiva nesta etapa, é realizada a limpeza e remoção de água residual simultaneamente. A utilização de PSA (do inglês, *primary secondary amine*) favorece a retenção de interferentes da matriz, garantindo menor manutenção do equipamento e maior vida útil da coluna cromatográfica.

Modificações no método original foram feitas com o objetivo de melhorar a recuperação do QuEChERS. A primeira foi a adição de uma etapa de tamponamento utilizando acetato de sódio na partição, método que ficou conhecido como AOAC por ter sido adotado como oficial pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) em 2007. Posteriormente, Anastassiades e colaboradores propuseram o chamado

"método citrato" ao utilizarem uma mistura de citrato de sódio diidratado e hidrogenocitrato sesquihidratado para promover o efeito tamponante. Este último foi adotado como o método de referência na União Européia (86).

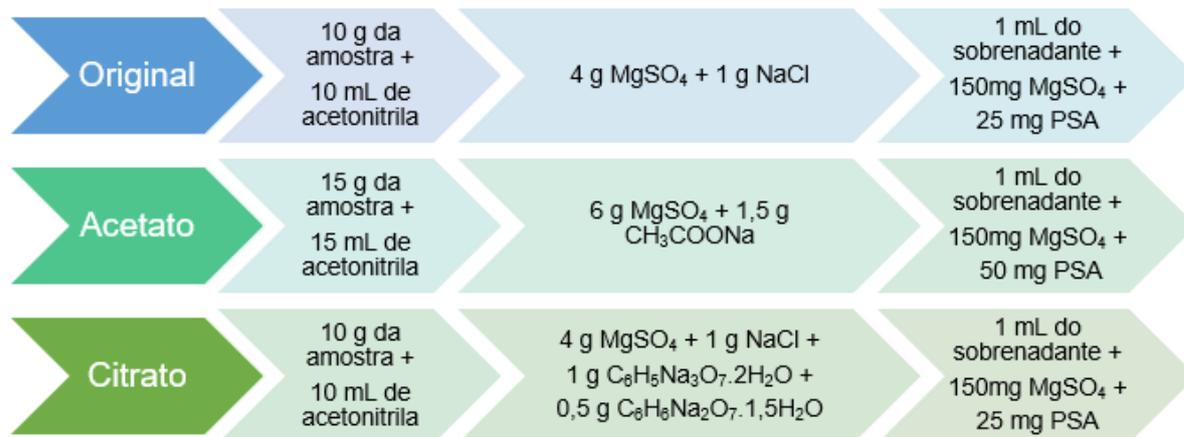


Figura 10 - Solventes e sais utilizados nas etapas das três versões do método de QuEChERS. Ilustração baseada em Prestes et al (2011) (86).

Atualmente, métodos baseados em processos de microextração vêm sendo desenvolvidos como alternativas aos métodos clássicos (precipitação de proteínas, ELL e SPE). A miniaturização do QuEChERS utilizada neste trabalho permite uma extração de fácil execução, utilizando pequeno volume de amostra, ambientalmente mais correta devido ao baixo consumo de solvente e é adequado para compostos com diferentes propriedades físico-químicas, mesmo em caso de análises de amostras de sangue *postmortem* (87–89).

## 2. OBJETIVO

### 2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi a realização de análise crítica e avaliação da viabilidade do uso de técnicas emergentes de preparo de amostras nas análises toxicológicas realizadas em amostras biológicas *postmortem*.

### 2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver e validar métodos analíticos quantitativos baseados na técnica de micro-QuEChERS para análise de antidepressivos, antipsicóticos, benzodiazepínicos e sedativo-hipnóticos e em amostras de sangue *postmortem*;
- Desenvolver e validar método analítico quantitativo com preparo de amostras baseado em precipitação de proteínas para análise fentanil e seus análogos em amostras de sangue *postmortem*;
- Comparar os resultados obtidos utilizando técnicas emergentes de preparo de amostras contra os obtidos por técnicas tradicionais, além de sua aplicabilidade na rotina de laboratórios de toxicologia forense.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Materiais e reagentes

A acetonitrila e metanol grau HPLC, ácido fórmico (98-100%) e formiato de amônio foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha) ou Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA), todos os solventes utilizados no preparo das amostras são grau HPLC. A água utilizada será ultrapurificada em sistema Milli-Q (Milford, EUA).

Os sais de QuEChERS Q110 (sulfato de magnésio, cloreto de sódio, citrato trissódico di-hidratado e hidrogencitrato dissódico sesqui-hidratado;4:1:1:0,5 m/m) e Q150 (sulfato de magnésio e acetato de sódio,4:1 m/m) foram adquiridos da Restek (Bellefonte, EUA).

#### 3.2. Padrões analíticos e soluções

Os materiais de referência do acetilfentanil, acetil norfentanil, acrilfentanil, alprazolam, amitriptilina, bromazepam, bupropiona, carfentanil, citalopram, clomipramina, clonazepam, clozapina, desipramina, desmetilcitalopram, diazepam, doxepina, duloxetina, etizolam, fentanil, flunitrazepam, fluoxetina, furanilfentanil, haloperidol, hidroxibupropiona, imipramina, levomepromazine, lorazepam, midazolam, mirtazapina, nitrazepam, nordiazepam, norfluoxetina, norsertralina, nortriptilina, o-desmetilvenlafaxina, olanzapina, oxazepam, paroxetina, quetiapina, risperidona, sertralina, temazepam, tiofentanil, trazodona, trimipramina, valerilfentanil, venlafaxina, ziprasidona e zolpidem, bem como os isótopos deuterados (amitriptilina-d<sub>3</sub>, citalopram-d<sub>6</sub>, cocaína-d<sub>3</sub>, desipramina-d<sub>3</sub>, desmetilcitalopra-d<sub>6</sub>, diazepam-d<sub>5</sub>, doxepina-d<sub>3</sub>, duloxetina-d<sub>3</sub>, imipramina-d<sub>3</sub>, paroxetina-d<sub>6</sub>, risperidona-d<sub>4</sub>) foram adquiridos das empresas Cayman Chemical (Ann Arbor, EUA), Cerilliant (Round Rock, EUA), LoGiCal (Teddington, Reino Unido), Toronto Research Chemicals (North York, Canadá) ou USP (Rockville, EUA).

Soluções estoque na concentração de 100 µg/mL ou 10 µg/mL foram obtidas por meio da diluição dos respectivos padrões certificados em metanol. Para as soluções trabalho, os antidepressivos, antipsicóticos e seus produtos de biotransformação foram separados em 3 grupos de soluções de trabalho (Quadro 6); os benzodiazepínicos, sedativo-hipnóticos e seus metabolitos foram divididos em 3 grupos (Quadro 7); somente uma solução trabalho foi preparada contendo o fentanil e todos os seus análogos.

Quadro 6 – Grupos de soluções de trabalho utilizados na validação do método quantitativo para antidepressivos e antipsicóticos.

<b>Grupo</b>	<b>Analitos de interesse</b>
A	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Antidepressivos</i>: clomipramina, doxepina, duloxetine, mirtazapina, paroxetina e trazodona</li> <li>• <i>Antipsicóticos</i>: clozapina, haloperidol, olanzapina, quetiapina, risperidona, levomepromazina e ziprasidona</li> </ul>
B	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Antidepressivos</i>: amitriptilina, bupropiona, citalopram, desipramina, fluoxetina, imipramina, sertralina, trimipramina e venlafaxina</li> <li>• <i>Produtos de biotransformação</i>: desmetilcitalopram, hidroxibupropiona, norfluoxetina e nortriptilina</li> </ul>
C	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Produtos de biotransformação</i>: o-desmetilvenlafaxina e norsesertralina</li> </ul>

Quadro 7 – Grupos de soluções de trabalho utilizados na validação do método quantitativo para benzodiazepínicos e sedativo-hipnótico.

<b>Grupo</b>	<b>Analitos de interesse</b>
A	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Benzodiazepínicos</i>: clonazepam, diazepam, flunitrazepam, midazolam e nitrazepam</li> <li>• <i>Produtos de biotransformação</i>: nordiazepam</li> </ul>
B	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Benzodiazepínicos</i>: alprazolam, etizolam, lorazepam e zolpidem</li> <li>• <i>Produtos de biotransformação</i>: oxazepam e temazepam</li> </ul>
C	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Benzodiazepínico</i>: bromazepam</li> </ul>

As soluções de trabalho foram obtidas através da diluição da solução estoque com metanol, conforme necessário. Todas as soluções dos padrões analíticos utilizados nesse estudo foram armazenadas em frasco de vidro âmbar e em freezer a -20°C.

### 3.3. Instrumentação analítica

Para análise de fentanil e seus análogos em amostras de sangue *postmortem*, as análises foram realizadas CL-EM/EM modelo LCMS8050 (Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com coluna cromatográfica Atlantis-T3 column (150 mm x 3 mm, 3 µm, Waters, Irlanda), mantida a 40°C. As fases móveis foram compostas por (A) água ultrapura e (B) metanol grau HPLC, ambos contendo 2 mmol/L de formiato de amônio e 0,1% de ácido fórmico. A vazão foi de 350 µL/min e gradiente de eluição linear variando de 5% a 95% de fase móvel B, mantendo-se por 2,5 minutos a 95% e

retornando para 5% em 0,1 minuto, com um total de 15,5 minutos de corrida cromatográfica. O espectrômetro de massas foi programado para aquisição em modo *multiple reaction monitoring* (MRM), sendo selecionadas pelo menos duas transições por analito, sendo a mais intensa utilizada para quantificação, e as demais utilizadas como qualificadoras. A ionização foi realizada por *electrospray*, em modo positivo. Os parâmetros de fonte otimizados foram temperatura do bloco de aquecimento 400°C; voltagem do *electrospray* a 4,0 kV; fluxo do gás de nebulização da fonte (N<sub>2</sub>) a 3 L/min; temperatura da linha de dessolvatação 526°C; fluxo de gás de secagem e aquecimento (ar) a 10 L/min; e pressão do gás de dissociação induzida por colisão (Ar) a 270 kPa.

As amostras de sangue submetidas ao preparo por QuEChERS foram analisados em CL-EM/EM modelo LCMS8060 (Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com coluna cromatográfica Raptor Biphenyl (100 mm x 3,1 mm, 2,7 µm, Restek, EUA) mantida a 40°C. As fases móveis foram compostas por (A) água ultrapura e (B) metanol grau HPLC, ambos contendo 2 mmol/L de formiato de amônio e 0,1% de ácido fórmico. A vazão foi de 400 µL/min e gradiente de eluição linear:

- Para a análise de antidepressivos e antipsicóticos, variando de 10% a 95% de fase móvel B, mantendo-se por 1 minuto a 95% e retornando para 10% em 0,1 minuto, com um total de 8,5 minutos de corrida cromatográfica;
- Para a análise de benzodiazepínicos e sedativo-hipnótico, variando de 10% a 95% de fase móvel B, mantendo-se por 2 minutos a 95% e retornando para 10% em 0,1 minuto, com um total de 10 minutos de corrida cromatográfica.

O espectrômetro de massas foi programado para aquisição em modo de monitoramento de reações múltiplas (*multiple reaction monitoring*, MRM), sendo selecionadas duas transições por analito. A ionização foi realizada por *electrospray*, em modo positivo. Os parâmetros de fonte otimizados foram:

- Para a análise de antidepressivos e antipsicóticos, a temperatura do bloco de aquecimento a 400°C; voltagem do *electrospray* a 4,0 kV; fluxo do gás de nebulização da fonte (N<sub>2</sub>) a 3 L/min; temperatura da linha de dessolvatação 250°C; fluxo de gás de secagem e aquecimento (ar) a 10 L/min; e pressão de gás de dissociação induzida por colisão (Ar) a 270 kPa.

- Para a análise de benzodiazepínicos e sedativo-hipnótico, a temperatura do bloco de aquecimento a 400°C; voltagem do *electrospray* a 4,0 kV; fluxo do gás de nebulização da fonte (N<sub>2</sub>) a 3 L/min; temperatura da linha de dessolvatação 250°C; fluxo de gás de secagem e aquecimento (ar) a 5 L/min e 15 L/min, respectivamente; e pressão de gás de dissociação induzida por colisão (Ar) a 270 kPa.

A identificação dos analitos foi realizada pelo tempo de retenção relativo ao padrão (valor aceitável de  $\pm 2\%$ ) e pela razão entre as transições MRM de acordo com as recomendações da *Society of Toxicological and Forensic Chemistry* (GTFCh) (90). O controle do instrumento, aquisição e tratamento dos dados obtidos foi realizado através do software LabSolution (Shimadzu, Kyoto, Japão).

### 3.4. Amostras

O método quantitativo para a análise de fentanil e seus análogos em amostras de sangue *postmortem* foi aplicado à rotina do Núcleo Toxicologia Forense do Instituto Médico-Legal, Superintendência da Polícia Técnico-Científica de São Paulo (NTF/IML/SPTC). Os métodos baseados na extração por micro-QuEChERS foram aplicados na análise de amostras cedidas pelo NTF/IML/SPTC ou pelo Instituto de Análises e Pesquisas Forenses da Polícia Técnica de Sergipe (IAPF). Não foram utilizados dados de identificação de pacientes, número de boletim de ocorrência ou processo judicial, dessa forma o estudo foi realizado com garantia de sigilo e anonimato das amostras analisadas.

### 3.5. Preparo das amostras

#### 3.5.1. Extração por micro-QuEChERS

O preparo de amostras foi iniciado com a pesagem de 100 mg de sal de QuEChERS (Q150, método AOAC; Restek, EUA) em um tubo de polipropileno (2 mL). O sal utilizado neste trabalho foi constituído de uma mistura de sulfato de magnésio e acetato de sódio (4:1, m/m). Em seguida, transferiu-se 300  $\mu$ L de acetonitrila, 200  $\mu$ L de água ultrapura, 100  $\mu$ L de amostra sangue *postmortem* e 10  $\mu$ L de uma solução de padrão interno (citalopram-d<sub>6</sub>, desipramina-d<sub>3</sub>, desmetilcitalopram-d<sub>3</sub>, duloxetina-d<sub>3</sub>, imipramina-d<sub>3</sub>, paroxetina-d<sub>6</sub>, amitriptilina-d<sub>3</sub>, bupropiona-d<sub>9</sub>, doxepina-d<sub>3</sub> e

risperidone-d<sub>4</sub>, a 1 µg/mL). O tubo foi fechado, homogeneizado em 3 ciclos a 7 m/s por 20 segundos (Bead Blaster D2400, Benchmark, EUA) e centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos. Para os antidepressivos e antipsicóticos, a fase orgânica (100 µL) foi diluída em fase móvel aquosa (100 µL) em vials de vidro âmbar (1,5 mL), enquanto para os benzodiazepínicos e sedativo-hipnótico foram 50 µL de extrato em 200 µL de fase móvel aquosa. Após essa etapa, 2 µL foram injetados no sistema cromatográfico.

### **3.5.2. Extração por precipitação de proteínas**

Para o preparo de amostras, 250 µL de amostra de sangue *postmortem* foram transferidos para tubo de polipropileno (2 mL), onde foram então adicionados 25 µL de solução de padrão interno (cocaína-d<sub>3</sub> a 200 ng/mL em acetonitrila) e 1,0 mL de acetonitrila gelada (armazenada a -20°C). Os tubos foram fechados, agitados em vórtex por 5 min, seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos. Após esta etapa, 600 µL do sobrenadante foram transferidos para um vial de vidro (1,5 mL), o qual foi fechado por tampa plástica com septo de silicone, sendo 5 µL injetados no sistema CL-EM/EM.

## **3.6. Validação do método analítico**

### **3.6.1. Limites de detecção e quantificação**

Os critérios de identificação empregados neste trabalho foram: eluição de pico simétrico dentro de  $\pm 2\%$  do tempo de retenção do calibrador, uma razão sinal/ruído (S/N) de pelo menos 3 e uma razão entre os íons quantificador e o qualificador dentro de  $\pm 20\%$  daquele estabelecido pelos calibradores.

O limite de detecção (LD) é uma estimativa da menor concentração do analito em uma amostra que pode ser diferenciado de uma matriz branca e identificado pelo método analítico de maneira confiável. O LD foi definido como a menor concentração do analito que atendia a todos os critérios de identificação.

O limite de quantificação (LQ) é a estimativa da menor concentração de um analito em uma amostra que pode ser medido de maneira confiável, com exatidão e precisão aceitáveis. O LD foi definido como a menor concentração do analito que atendia a todos os critérios de identificação, além de uma razão S/N de pelo menos 10 e quantificação dentro de  $\pm 20\%$  da concentração nominal.

### 3.6.2. Linearidade

A linearidade é determinada pela janela de concentrações do analito sobre as quais o método deve ser usado. Este parâmetro é um modelo matemático que descreve a correlação entre o sinal da resposta (razão entre a área do analito e padrão interno) e a concentração do analito na amostra. Foram utilizadas 06 (seis) concentrações para elaboração da curva de calibração. Um mínimo de 05 (cinco) replicatas por concentração foram realizadas, ou seja, 01 (uma) corrida por dia ao longo de 05 (cinco) dias.

A escolha de um modelo apropriado, isto é, linear ou quadrático, é necessário para resultados quantitativos precisos e confiáveis. Foram avaliados 06 (seis) fatores de ponderação:  $1/x$ ,  $1/x^2$ ,  $1/x^{0.5}$ ,  $1/y$ ,  $1/y^2$  e  $1/y^{0.5}$ . Para cada uma das condições, o coeficiente de correlação ( $r$ ) e o somatório dos erros residuais da regressão ( $\sum RE\%$ ), sendo escolhido àquele com menor  $\sum RE\%$ .

### 3.6.3. Exatidão e precisão

A precisão e exatidão do método foram determinadas em 03 (três) níveis de concentração: controle baixo, médio e alto. A exatidão pode ser descrita como o grau de concordância entre a média dos resultados das medições e a concentração nominal, sendo reportado como uma porcentagem da diferença. Um total de pelo menos 03 (três) replicatas de cada concentração, preparadas em amostras fortificadas de sangue *postmortem*, foram extraídas e analisadas em cinco dias diferentes. O parâmetro foi calculado para cada concentração usando a seguinte fórmula:

$$Exatidão (\%) = \left( \frac{\bar{X}_{concentração\ calculada} - Concentração\ real}{Concentração\ real} \right) \times 100$$

A precisão corresponde a medida da proximidade de concordância entre uma série de medidas obtidas a partir de múltiplas amostragens da mesma amostra homogênea, sendo expresso como imprecisão.

As imprecisões intradia e interdia foram avaliadas através do coeficiente de variação (%CV) dos resultados obtidos de pelo menos 03 (três) replicatas de cada concentração em um dia ( $n=3$ ) e ao longo de 5 dias ( $n=15$ ), respectivamente. A análise

de variância (ANOVA) unilateral foi realizada em cada concentração para avaliar a variabilidade interdia ( $p < 0,05$ ).

O guia de validação utilizado recomenda uma variação de no máximo 20% como critério de aceitação para esses dois parâmetros.

#### **3.6.4. Contaminação cruzada**

A contaminação cruzada (ou *carryover*) é o aparecimento de sinal do analito não intencional em amostras subsequentes após a análise de uma amostra positiva, a ocorrência deste pode levar a um resultado qualitativo e/ou quantitativo impreciso.

Nesta etapa da validação, amostras de sangue *postmortem* isentas dos analitos de interesse ou possíveis interferentes foram analisadas imediatamente após o limite superior de quantificação (LSQ). Se nenhum analito for observado (acima do LD do método) na amostra de matriz branca, esta concentração é determinada como a concentração na qual o método está livre de *carryover*.

#### **3.6.5. Estudos de interferentes**

Os parâmetros avaliados neste tópico foram o efeito matriz e a recuperação, através da análise de matrizes brancas de 06 (seis) fontes diferentes sem a adição de um padrão interno a fim de demonstrar a ausência de interferentes comumente presentes na matriz.

Para avaliação da recuperação foram preparadas 02 (dois) conjuntos de 06 (seis) replicatas:

1. Amostras fortificadas antes do preparo de amostra (*spike pré*): amostras de sangue *postmortem* fortificadas em 02 (duas) concentrações (controles baixo e alto). Neste grupo, os padrões contendo os analitos de interesse foram adicionados de acordo com o descrito para o preparo da amostra.
2. Amostras fortificadas após o preparo de amostra (*spike pós*): amostras de sangue *postmortem* fortificadas em 02 (duas) concentrações (controles baixo e alto). Neste grupo, os padrões contendo os analitos de interesse foram adicionados após a realização do preparo da amostra.

A recuperação foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left( \frac{\bar{X}_{\text{área spike pré}}}{\bar{X}_{\text{área spike pós}}} \right) \times 100$$

Para avaliação do efeito matriz foram preparadas 02 (dois) conjuntos de 06 (seis) replicatas:

1. Amostras de água ultrapura fortificadas em 02 (dois) níveis (controles baixo e alto): A adição dos padrões contendo os analitos de interesse foi realizado de acordo com o descrito para o preparo da amostra.
2. Amostras de sangue *postmortem* fortificadas em 02 (dois) níveis (controles baixo e alto): A adição dos padrões contendo os analitos de interesse foi realizado de acordo com o descrito para o preparo da amostra.

### **3.6.6. Estabilidade**

Estabilidade é a resistência de um analito a uma modificação em uma matriz sobre condições específicas em intervalos de tempo determinados. Este parâmetro pode ser afetado por diversas variáveis, incluindo condições de armazenamento e de processamento da amostra. Experimentos de estabilidade devem ser desenhados e desenvolvidos para determinar situações normalmente encontradas nas operações do laboratório.

As amostras foram, inicialmente, avaliadas em 04 (quatro) replicatas a fim de estabelecer as respostas no tempo inicial, ou seja, no tempo zero. A média da resposta no tempo zero para cada um dos grupos de amostras foi comparada com a média de sinais para cada um dos estudos de estabilidade.

As estabilidades foram calculadas de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Estabilidade de } N \text{ dias (\%)} = \left( \frac{\bar{X}_{\text{áreas dos analitos após período de } N \text{ dias}}}{\bar{X}_{\text{áreas dos analitos no tempo zero}}} \right) \times 100$$

Para os antidepressivos e antipsicóticos foi avaliada a estabilidade em amostrador automático (24h) e após 7, 15 e 30 dias em geladeira (4°C) ou freezer (-20°C). Enquanto para os benzodiazepínicos, sedativo-hipnótico, fentanil e seus análogos, foi avaliada a estabilidade em amostrador automático por 24h e 72h, respectivamente.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Artigo publicado

Os resultados obtidos no desenvolvimento e validação de método para quantificação de 28 substâncias psicoativas em amostras de sangue *postmortem* por micro-QuEChERS modificado e CL-EM/EM foram publicados na revista *Journal of Analytical Toxicology* [V. 45 (7), pg. 644–656, 2021], <https://doi.org/10.1093/jat/bkaa138>. O texto do manuscrito publicado será apresentado a seguir.

*Journal of Analytical Toxicology*, 2021;45:644–656  
doi:<https://doi.org/10.1093/jat/bkaa138>  
Advance Access Publication Date: 30 September 2020  
Article



---

Article

## Development and Validation of a Method for Quantification of 28 Psychotropic Drugs in Postmortem Blood Samples by Modified Micro-QuEChERS and LC–MS–MS

Taís B. Rodrigues<sup>1</sup>, Damila R. Morais<sup>2</sup>, Victor A.P. Gianvecchio<sup>3</sup>,  
Elvis M. Aquino<sup>3</sup>, Ricardo L. Cunha<sup>4</sup>, Marilyn A. Huestis<sup>5</sup> and  
Jose Luiz Costa<sup>1,6,\*</sup>

<sup>1</sup>Campinas Poison Control Center, University of Campinas, Campinas, São Paulo 13083-859, Brazil; <sup>2</sup>Analytical division, Shimadzu Brazil, Barueri, São Paulo, 06460-000, Brazil; <sup>3</sup>Forensic Toxicology Laboratory, Institute of Legal Medicine, São Paulo State Police, São Paulo, São Paulo, 05507-060, Brazil; <sup>4</sup>Forensic Toxicology Laboratory, Institute of Analysis and Forensic Research, São Cristóvão, Sergipe, 49100-000, Brazil; <sup>5</sup>The Lambert Center for the Study of Medicinal Cannabis and Hemp, Institute of Emerging Health Professions, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA, 19107, USA and <sup>6</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Campinas, Campinas, São Paulo 13083-859, Brazil

\*Author to whom correspondence should be addressed E-mail: [jose.jlc@fcf.unicamp.br](mailto:jose.jlc@fcf.unicamp.br)

**Development and validation of a method for quantification of 28 psychotropic drugs in *postmortem* blood samples by modified micro-QuEChERS and LC-MS/MS**

Taís B. Rodrigues<sup>1</sup>, Damila R. Morais<sup>2</sup>, Victor A.P. Gianvecchio<sup>3</sup>, Elvis M. Aquino<sup>3</sup>, Ricardo L. Cunha<sup>4</sup>; Marilyn A. Huestis<sup>5</sup>, Jose Luiz Costa<sup>1,6\*</sup>

<sup>1</sup>Campinas Poison Control Center, University of Campinas, Campinas, São Paulo 13083-859, Brazil

<sup>2</sup>Shimadzu Brazil, Barueri, São Paulo, 06460-000, Brazil

<sup>3</sup>Forensic Toxicology Laboratory, Institute of Legal Medicine, São Paulo State Police, São Paulo, São Paulo, 05507-060, Brazil

<sup>4</sup>Institute of Analysis and Forensic Research, São Cristóvão, Sergipe, 49100-000, Brazil

<sup>5</sup>Institute of Emerging Health Professions, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA, 19107, USA

<sup>6</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Campinas, Campinas, São Paulo 13083-859, Brazil

\*Corresponding author:

Prof. Dr. Jose Luiz Costa

Phone: +55 19 3521 7232

Fax: +55 19 3521 7592

E-mail address: jose.jlc@fcf.unicamp.br

## Abstract

The development of new sample preparation alternatives in analytical toxicology leading to quick, effective, automated and environmentally friendly procedures is growing in importance. One of these alternatives is the QuEChERS, originally developed for the analysis of pesticide residues, producing cleaner extracts than liquid-liquid extraction, and easier separation of aqueous and organic phases. However, there are few published studies on the miniaturization of this technique for forensic toxicology, especially in *postmortem* analysis. We developed and validated a modified micro-QuEChERS and LC-MS/MS assay to quantify 16 antidepressants, seven antipsychotics and three metabolites, and semi-quantify norfluoxetine and nortriptyline in *postmortem* blood. The calibration curve was linear from 1–500 ng/mL, achieved a  $r > 0.99$ , with all standards quantifying within  $\pm 15\%$  of target except  $\pm 20\%$  at the limit of quantification (LOQ) of 1 ng/mL for 26 substances. The F test was applied to evaluate if the variance between replicates remained constant for all calibrators. Six weighting factors were analyzed ( $1/x$ ,  $1/x^2$ ,  $1/x^{0.5}$ ,  $1/y$ ,  $1/y^2$ ,  $1/y^{0.5}$ ), with the weighting factor with the lowest sum of residual regression errors ( $1/x^2$ ) selected. No endogenous or exogenous interferences were observed. Method imprecision and bias were less than 19.0% and 19.7%, respectively. Advantages of this method include a low sample volume of 100  $\mu\text{L}$ , simple but effective sample preparation and a rapid 8.5 min run time. The validated analytical method was successfully applied to the analysis of 100 authentic *postmortem* samples.

**Keywords:** micro-QuEChERS; Antidepressants; Antipsychotics; *Postmortem*; Forensic toxicology; LC-MS/MS

## Introduction

Psychoactive substances (PAS) identification and quantification is crucial for *postmortem* forensic toxicology because these compounds are frequently involved in overdoses and deaths, and drug-facilitated crimes. However, many PAS are also pharmacotherapies to treat depression and other mental disorders, such as antidepressants and mood stabilizers. Acute intoxication by antidepressants leads to excitement and delirium, seizures, dryness of the mouth and skin, inhibition of bowel and bladder activity, respiratory depression, cardiac dysrhythmias and coma. When used in association, monoamine oxidase inhibitors (MAOI) and selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI) may cause serotonergic syndrome, characterized by hyperthermia, muscle stiffness, myoclonus and rapid changes in mental state and vital signs (1). Antipsychotics are another class of drugs prescribed for the treatment of depression, anxiety and personality disorders, with the atypical antipsychotics most commonly prescribed.

The choice of the biological matrix to perform toxicological analysis depends on the purpose of the analysis, and the route, dose, frequency of use and pharmacokinetics of the xenobiotic of interest. Blood (whole blood, serum or plasma) is the main matrix of choice for the quantification of toxicants because it best correlates with a drug's pharmacodynamic effects (2, 3). Sample pretreatment is necessary to separate and concentrate analytes of interest from the matrix, and for preparing an extract compatible with the instrument selected for identification and quantification of analytes (4). Currently, methods based on microextraction processes are available as alternatives to classic liquid-liquid (LLE) and solid phase (SPE) extraction techniques. LLE is simple and inexpensive, but matrix interferences may lead to poor extraction efficiencies and contamination of equipment. SPE has outstanding selectivity and eliminates interfering substances; however, it is time consuming and more expensive than LLE (5). There is an ongoing search for new sample preparation techniques that are rapid, effective, automatable and environmentally friendly. QuEChERS, the acronym for quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe, also known as dispersive SPE extraction, achieves these sample preparation goals.

Anastassiades et al (6) proposed the original QuEChERS technique in 2003 to extract pesticide residues in food samples. The method utilized acetonitrile for the extraction, which is less toxic than those used traditionally in LLE, followed by partition

of analytes enhanced by the addition of salts to increase ionic strength (salting out effect). Finally, there was a clean-up step employing dispersive SPE extraction. This technique produced cleaner extracts than LLE, facilitated the isolation of the organic phase, and the acetonitrile solvent enabled direct injection into a liquid chromatography (LC) - or gas chromatography (GC) mass spectrometry (MS) instrument. Other solvents, such as chloroform, hexane, acetone and ethyl acetate, are not as readily amenable for direct injection (7). The QuEChERS technique was applied for the identification and quantification of pesticides, environmental contaminants and pharmaceuticals in urine and blood samples (8–13). Thus, QuEChERS is easy, reproducible, rapid, less expensive and environmentally friendly than traditional extraction techniques, including for *postmortem* samples (13–17).

The aim of this research was to develop and validate a modified QuEChERS method for sample preparation of *postmortem* blood to identify and quantify 28 PAS. The micro-QuEChERS approach for drug extraction is rapid, requires a low sample volume, is suitable for compounds with different physicochemical properties, and is environmentally friendly due to low solvent consumption. To the best of our knowledge, there are few published studies on the miniaturization of this technique in forensic toxicology, especially in *postmortem* analysis.

## Experimental

### Standards and chemicals

Reference standards of bupropion, citalopram, sertraline, desipramine, desmethylcitalopram, duloxetine, fluoxetine, imipramine, mirtazapine, nortriptyline, nortriptyline, o-desmethylvenlafaxine, paroxetine, trazodone, venlafaxine, amitriptyline, amitriptyline- $d_3$  and imipramine- $d_3$ , olanzapine, risperidone- $d_4$  and levomepromazine were purchased from LogiCal Group (Teddington, Middlesex, UK). Haloperidol, hydroxybupropion, norfluoxetine, doxepin, clomipramine, trimipramine, desipramine- $d_3$ , duloxetine- $d_3$ , citalopram- $d_6$ , doxepin- $d_3$ , paroxetine- $d_6$  and desmethylcitalopram- $d_3$  standards were acquired from Cerilliant (Round Rock, Texas, USA). Clozapine, duloxetine and ziprasidone standards were obtained from USP (Rockville, Maryland, USA) and bupropion- $d_9$  and quetiapine standards were from Toronto Research Chemicals (North York, Ontario, Canada). The certified plasma bi-level controls for tricyclic antidepressants were purchased from Chromsystems

(Gräfelfing, Bavaria, Germany). Acetonitrile, ammonium formate, methanol and formic acid (98-100%) were acquired from Merck (Darmstadt, Hesse, Germany), and all extraction solvents were HPLC grade. Ultra-pure deionized water was supplied by a Milli-Q RG unit from Millipore (Milford, Massachusetts, USA).

### **Calibrators, quality controls and internal standards**

Individual stock solutions were prepared by dilution of reference standards in methanol. Analytes were separated into three groups and combined working stock solutions formulated. Calibrators at 1, 50, 100, 200, 300 and 500 ng/mL were prepared by fortifying 100  $\mu$ L blank human *postmortem* blood, previously documented to be negative by laboratory testing, with 10  $\mu$ L of the appropriate combined working stock solution.

Quality control (QC) solutions were prepared by a different analyst from the individual preparing the calibrators. Mixed analyte QC solutions were prepared in methanol. QC samples were created at 3, 150 and 400 ng/mL by fortifying 100  $\mu$ L blank human *postmortem* blood with 10  $\mu$ L of the appropriate QC solution.

The internal standard mixture (citalopram- $d_6$ , desipramine- $d_3$ , desmethylcitalopram- $d_3$ , duloxetine- $d_3$ , imipramine- $d_3$ , paroxetine- $d_6$ , amitriptyline- $d_3$ , bupropion- $d_9$ , doxepin- $d_3$  and risperidone- $d_4$ ) was prepared by appropriate dilution in methanol, to reach a final concentration of 1  $\mu$ g/mL. All solutions were stored at -20°C in amber glass vials.

### **Sample preparation**

For sample preparation, 300  $\mu$ L acetonitrile was transferred to a polypropylene tube containing 100 mg Q150 AOAC QuEChERS salt (mixture of magnesium sulphate and sodium acetate, 4:1 m/m, Restek, Bellefonte, USA), followed by 200  $\mu$ L ultrapure water, 100  $\mu$ L *postmortem* blood and 10  $\mu$ L IS solution. The tube was capped, homogenized in a multi-bead shaker (Bead Blaster D2400, Benchmark, Sayreville, USA) at 7 m/s for 20 s (3 cycles) and centrifuged at 9,400 g for 10 min. The organic phase (100  $\mu$ L) was diluted in mobile phase A (100  $\mu$ L) and transferred to LC vials, with 2  $\mu$ L injected into the liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) instrument.

## Instrumentation

The analysis was performed on a Nexera X2 UFLC chromatographic system coupled to a LCMS8060 triple quadrupole mass spectrometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). The chromatographic separation was performed on a Raptor Biphenyl column (100 mm x 2.1 mm ID, 2.7  $\mu$ m, Restek, Bellefonte, Pennsylvania, USA) maintained at 40°C. The mobile phase consisted of ultra-pure water (A) and methanol (B), both containing 0.1% formic acid and 2 mmol/L ammonium formate. The flow rate was 0.4 mL/min and the gradient elution consisted of a linear change in %B, from 10 to 95%, holding at 95% B for 1 min and returning to 10% over 0.1 min, for a 8.5 min total run time.

The mass spectrometer was equipped with an electrospray ionization source (ESI), operated in positive mode. The optimized source parameters were: heat block temperature 400°C; ion spray voltage 4.0 kV; nebulizer gas (N<sub>2</sub>) flow 3 L/min; desolvation line temperature 250°C; drying gas (N<sub>2</sub>) flow 10 L/min; heating gas (N<sub>2</sub>) flow 10 L/min; and collision induced dissociation gas pressure (Ar) 270 kPa. The analyses were performed in multiple reaction monitoring mode (MRM). For each compound, two MRM transitions were selected, one for quantification and one qualifier for confirmation/identification (Table 1), using the MRM ratio as an identification criteria with a  $\pm$ 20% maximum acceptance criteria. Data were acquired and analyzed with the LabSolutions software (version 5.96, Shimadzu, Kyoto, Japan).

## Validation of the method

The method was validated according to guidelines published by the Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) and the Society of Toxicological and Forensic Chemistry (GTFCh) (18, 19). Blank human *postmortem* blood for preparation of fortified matrix samples for validation were collected in blood collection tubes containing sodium fluoride and EDTA K<sub>3</sub> (ethylenediaminetetraacetic tripotassium salt), and confirmed negative for analytes of interest prior to use.

**Table 1.** Mass spectrometer parameters and retention times of psychotropic drugs and internal standards, limit of quantification (LOQ) and linearity for the analysis in *postmortem* blood by micro-QuEChERS liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS).

Analyte	MRM transitions (m/z)	EP (V)	CE (V)	CCEP (V)	Retention time (min)	IS	LOQ (ng/mL)	Linearity (ng/mL)																																																																																																																																																							
Olanzapine	<u>313.0 &gt; 256.1</u>	-15	-24	-17	2.41	Bupropion- <i>d</i> <sub>9</sub>	1	1 - 500																																																																																																																																																							
	313.0 > 198.0	-16	-41	-20					o-desmethylvenlafaxine	<u>264.1 &gt; 58.1</u>	-14	-22	-21	2.86	Desmethylcitalopram- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500	264.1 > 246.2	-14	-13	-25	Hydroxybupropion	<u>256.0 &gt; 238.2</u>	-13	-14	-15	3.21	Bupropion- <i>d</i> <sub>9</sub>	1	1 - 500	256.0 > 139.0	-28	-28	-25	Bupropion- <i>d</i> <sub>9</sub>	<u>249.0 &gt; 185.1</u>	-16	-13	-21	3.47	-	1	1 - 500	249.0 > 131.1	-16	-29	-28	Bupropion	<u>240.1 &gt; 184.1</u>	-11	-11	-20	3.49	Bupropion- <i>d</i> <sub>9</sub>	1	1 - 500	240.1 > 131.1	-11	-27	-25	Venlafaxine	<u>278.0 &gt; 58.1</u>	-19	-22	-24	3.68	Desmethylcitalopram- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500	278.0 > 260.1	-19	-11	-29	Mirtazapine	<u>266.1 &gt; 195.1</u>	-45	-24	-21	3.76	Desmethylcitalopram- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500	266.1 > 72.1	-29	-22	-29	Clozapine	<u>326.9 &gt; 270.2</u>	-16	-24	-18	3.92	Citalopram- <i>d</i> <sub>6</sub>	1	1 - 500	326.9 > 192.2	-16	-47	-19	Desmethylcitalopram- <i>d</i> <sub>3</sub>	<u>314.2 &gt; 109.0</u>	-25	-26	-19	3.97	-	1	1 - 500	314.2 > 262.1	-16	-18	-17	Citalopram- <i>d</i> <sub>6</sub>	<u>331.2 &gt; 109.2</u>	-13	-30	-20	3.98	-	1	1 - 500	331.2 > 262.0	-13	-22	-17	Desmethylcitalopram	<u>311.0 &gt; 109.1</u>	-16	-25	-10	3.98	Desmethylcitalopram- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500	311.0 > 262.1	-16	-18	-17	Citalopram	<u>325.5 &gt; 109.1</u>	-15	-27	-21	3.99	Citalopram- <i>d</i> <sub>6</sub>	1	1 - 500	325.5 > 262.1	-15	-19	-19	Haloperidol	<u>375.9 &gt; 123.0</u>	-26	-41	-24	4.09	Doxepin- <i>d</i> <sub>3</sub>	1
o-desmethylvenlafaxine	<u>264.1 &gt; 58.1</u>	-14	-22	-21	2.86	Desmethylcitalopram- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500																																																																																																																																																							
	264.1 > 246.2	-14	-13	-25					Hydroxybupropion	<u>256.0 &gt; 238.2</u>	-13	-14	-15	3.21	Bupropion- <i>d</i> <sub>9</sub>	1	1 - 500	256.0 > 139.0	-28	-28	-25	Bupropion- <i>d</i> <sub>9</sub>	<u>249.0 &gt; 185.1</u>	-16	-13	-21	3.47	-	1	1 - 500	249.0 > 131.1	-16	-29	-28	Bupropion	<u>240.1 &gt; 184.1</u>	-11	-11	-20	3.49	Bupropion- <i>d</i> <sub>9</sub>	1	1 - 500	240.1 > 131.1	-11	-27	-25	Venlafaxine	<u>278.0 &gt; 58.1</u>	-19	-22	-24	3.68	Desmethylcitalopram- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500	278.0 > 260.1	-19	-11	-29	Mirtazapine	<u>266.1 &gt; 195.1</u>	-45	-24	-21	3.76	Desmethylcitalopram- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500	266.1 > 72.1	-29	-22	-29	Clozapine	<u>326.9 &gt; 270.2</u>	-16	-24	-18	3.92	Citalopram- <i>d</i> <sub>6</sub>	1	1 - 500	326.9 > 192.2	-16	-47	-19	Desmethylcitalopram- <i>d</i> <sub>3</sub>	<u>314.2 &gt; 109.0</u>	-25	-26	-19	3.97	-	1	1 - 500	314.2 > 262.1	-16	-18	-17	Citalopram- <i>d</i> <sub>6</sub>	<u>331.2 &gt; 109.2</u>	-13	-30	-20	3.98	-	1	1 - 500	331.2 > 262.0	-13	-22	-17	Desmethylcitalopram	<u>311.0 &gt; 109.1</u>	-16	-25	-10	3.98	Desmethylcitalopram- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500	311.0 > 262.1	-16	-18	-17	Citalopram	<u>325.5 &gt; 109.1</u>	-15	-27	-21	3.99	Citalopram- <i>d</i> <sub>6</sub>	1	1 - 500	325.5 > 262.1	-15	-19	-19	Haloperidol	<u>375.9 &gt; 123.0</u>	-26	-41	-24	4.09	Doxepin- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500	375.9 > 165.0	-26	-25	-18								
Hydroxybupropion	<u>256.0 &gt; 238.2</u>	-13	-14	-15	3.21	Bupropion- <i>d</i> <sub>9</sub>	1	1 - 500																																																																																																																																																							
	256.0 > 139.0	-28	-28	-25					Bupropion- <i>d</i> <sub>9</sub>	<u>249.0 &gt; 185.1</u>	-16	-13	-21	3.47	-	1	1 - 500	249.0 > 131.1	-16	-29	-28	Bupropion	<u>240.1 &gt; 184.1</u>	-11	-11	-20	3.49	Bupropion- <i>d</i> <sub>9</sub>	1	1 - 500	240.1 > 131.1	-11	-27	-25	Venlafaxine	<u>278.0 &gt; 58.1</u>	-19	-22	-24	3.68	Desmethylcitalopram- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500	278.0 > 260.1	-19	-11	-29	Mirtazapine	<u>266.1 &gt; 195.1</u>	-45	-24	-21	3.76	Desmethylcitalopram- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500	266.1 > 72.1	-29	-22	-29	Clozapine	<u>326.9 &gt; 270.2</u>	-16	-24	-18	3.92	Citalopram- <i>d</i> <sub>6</sub>	1	1 - 500	326.9 > 192.2	-16	-47	-19	Desmethylcitalopram- <i>d</i> <sub>3</sub>	<u>314.2 &gt; 109.0</u>	-25	-26	-19	3.97	-	1	1 - 500	314.2 > 262.1	-16	-18	-17	Citalopram- <i>d</i> <sub>6</sub>	<u>331.2 &gt; 109.2</u>	-13	-30	-20	3.98	-	1	1 - 500	331.2 > 262.0	-13	-22	-17	Desmethylcitalopram	<u>311.0 &gt; 109.1</u>	-16	-25	-10	3.98	Desmethylcitalopram- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500	311.0 > 262.1	-16	-18	-17	Citalopram	<u>325.5 &gt; 109.1</u>	-15	-27	-21	3.99	Citalopram- <i>d</i> <sub>6</sub>	1	1 - 500	325.5 > 262.1	-15	-19	-19	Haloperidol	<u>375.9 &gt; 123.0</u>	-26	-41	-24	4.09	Doxepin- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500	375.9 > 165.0	-26	-25	-18																					
Bupropion- <i>d</i> <sub>9</sub>	<u>249.0 &gt; 185.1</u>	-16	-13	-21	3.47	-	1	1 - 500																																																																																																																																																							
	249.0 > 131.1	-16	-29	-28					Bupropion	<u>240.1 &gt; 184.1</u>	-11	-11	-20	3.49	Bupropion- <i>d</i> <sub>9</sub>	1	1 - 500	240.1 > 131.1	-11	-27	-25	Venlafaxine	<u>278.0 &gt; 58.1</u>	-19	-22	-24	3.68	Desmethylcitalopram- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500	278.0 > 260.1	-19	-11	-29	Mirtazapine	<u>266.1 &gt; 195.1</u>	-45	-24	-21	3.76	Desmethylcitalopram- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500	266.1 > 72.1	-29	-22	-29	Clozapine	<u>326.9 &gt; 270.2</u>	-16	-24	-18	3.92	Citalopram- <i>d</i> <sub>6</sub>	1	1 - 500	326.9 > 192.2	-16	-47	-19	Desmethylcitalopram- <i>d</i> <sub>3</sub>	<u>314.2 &gt; 109.0</u>	-25	-26	-19	3.97	-	1	1 - 500	314.2 > 262.1	-16	-18	-17	Citalopram- <i>d</i> <sub>6</sub>	<u>331.2 &gt; 109.2</u>	-13	-30	-20	3.98	-	1	1 - 500	331.2 > 262.0	-13	-22	-17	Desmethylcitalopram	<u>311.0 &gt; 109.1</u>	-16	-25	-10	3.98	Desmethylcitalopram- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500	311.0 > 262.1	-16	-18	-17	Citalopram	<u>325.5 &gt; 109.1</u>	-15	-27	-21	3.99	Citalopram- <i>d</i> <sub>6</sub>	1	1 - 500	325.5 > 262.1	-15	-19	-19	Haloperidol	<u>375.9 &gt; 123.0</u>	-26	-41	-24	4.09	Doxepin- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500	375.9 > 165.0	-26	-25	-18																																		
Bupropion	<u>240.1 &gt; 184.1</u>	-11	-11	-20	3.49	Bupropion- <i>d</i> <sub>9</sub>	1	1 - 500																																																																																																																																																							
	240.1 > 131.1	-11	-27	-25					Venlafaxine	<u>278.0 &gt; 58.1</u>	-19	-22	-24	3.68	Desmethylcitalopram- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500	278.0 > 260.1	-19	-11	-29	Mirtazapine	<u>266.1 &gt; 195.1</u>	-45	-24	-21	3.76	Desmethylcitalopram- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500	266.1 > 72.1	-29	-22	-29	Clozapine	<u>326.9 &gt; 270.2</u>	-16	-24	-18	3.92	Citalopram- <i>d</i> <sub>6</sub>	1	1 - 500	326.9 > 192.2	-16	-47	-19	Desmethylcitalopram- <i>d</i> <sub>3</sub>	<u>314.2 &gt; 109.0</u>	-25	-26	-19	3.97	-	1	1 - 500	314.2 > 262.1	-16	-18	-17	Citalopram- <i>d</i> <sub>6</sub>	<u>331.2 &gt; 109.2</u>	-13	-30	-20	3.98	-	1	1 - 500	331.2 > 262.0	-13	-22	-17	Desmethylcitalopram	<u>311.0 &gt; 109.1</u>	-16	-25	-10	3.98	Desmethylcitalopram- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500	311.0 > 262.1	-16	-18	-17	Citalopram	<u>325.5 &gt; 109.1</u>	-15	-27	-21	3.99	Citalopram- <i>d</i> <sub>6</sub>	1	1 - 500	325.5 > 262.1	-15	-19	-19	Haloperidol	<u>375.9 &gt; 123.0</u>	-26	-41	-24	4.09	Doxepin- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500	375.9 > 165.0	-26	-25	-18																																															
Venlafaxine	<u>278.0 &gt; 58.1</u>	-19	-22	-24	3.68	Desmethylcitalopram- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500																																																																																																																																																							
	278.0 > 260.1	-19	-11	-29					Mirtazapine	<u>266.1 &gt; 195.1</u>	-45	-24	-21	3.76	Desmethylcitalopram- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500	266.1 > 72.1	-29	-22	-29	Clozapine	<u>326.9 &gt; 270.2</u>	-16	-24	-18	3.92	Citalopram- <i>d</i> <sub>6</sub>	1	1 - 500	326.9 > 192.2	-16	-47	-19	Desmethylcitalopram- <i>d</i> <sub>3</sub>	<u>314.2 &gt; 109.0</u>	-25	-26	-19	3.97	-	1	1 - 500	314.2 > 262.1	-16	-18	-17	Citalopram- <i>d</i> <sub>6</sub>	<u>331.2 &gt; 109.2</u>	-13	-30	-20	3.98	-	1	1 - 500	331.2 > 262.0	-13	-22	-17	Desmethylcitalopram	<u>311.0 &gt; 109.1</u>	-16	-25	-10	3.98	Desmethylcitalopram- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500	311.0 > 262.1	-16	-18	-17	Citalopram	<u>325.5 &gt; 109.1</u>	-15	-27	-21	3.99	Citalopram- <i>d</i> <sub>6</sub>	1	1 - 500	325.5 > 262.1	-15	-19	-19	Haloperidol	<u>375.9 &gt; 123.0</u>	-26	-41	-24	4.09	Doxepin- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500	375.9 > 165.0	-26	-25	-18																																																												
Mirtazapine	<u>266.1 &gt; 195.1</u>	-45	-24	-21	3.76	Desmethylcitalopram- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500																																																																																																																																																							
	266.1 > 72.1	-29	-22	-29					Clozapine	<u>326.9 &gt; 270.2</u>	-16	-24	-18	3.92	Citalopram- <i>d</i> <sub>6</sub>	1	1 - 500	326.9 > 192.2	-16	-47	-19	Desmethylcitalopram- <i>d</i> <sub>3</sub>	<u>314.2 &gt; 109.0</u>	-25	-26	-19	3.97	-	1	1 - 500	314.2 > 262.1	-16	-18	-17	Citalopram- <i>d</i> <sub>6</sub>	<u>331.2 &gt; 109.2</u>	-13	-30	-20	3.98	-	1	1 - 500	331.2 > 262.0	-13	-22	-17	Desmethylcitalopram	<u>311.0 &gt; 109.1</u>	-16	-25	-10	3.98	Desmethylcitalopram- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500	311.0 > 262.1	-16	-18	-17	Citalopram	<u>325.5 &gt; 109.1</u>	-15	-27	-21	3.99	Citalopram- <i>d</i> <sub>6</sub>	1	1 - 500	325.5 > 262.1	-15	-19	-19	Haloperidol	<u>375.9 &gt; 123.0</u>	-26	-41	-24	4.09	Doxepin- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500	375.9 > 165.0	-26	-25	-18																																																																									
Clozapine	<u>326.9 &gt; 270.2</u>	-16	-24	-18	3.92	Citalopram- <i>d</i> <sub>6</sub>	1	1 - 500																																																																																																																																																							
	326.9 > 192.2	-16	-47	-19					Desmethylcitalopram- <i>d</i> <sub>3</sub>	<u>314.2 &gt; 109.0</u>	-25	-26	-19	3.97	-	1	1 - 500	314.2 > 262.1	-16	-18	-17	Citalopram- <i>d</i> <sub>6</sub>	<u>331.2 &gt; 109.2</u>	-13	-30	-20	3.98	-	1	1 - 500	331.2 > 262.0	-13	-22	-17	Desmethylcitalopram	<u>311.0 &gt; 109.1</u>	-16	-25	-10	3.98	Desmethylcitalopram- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500	311.0 > 262.1	-16	-18	-17	Citalopram	<u>325.5 &gt; 109.1</u>	-15	-27	-21	3.99	Citalopram- <i>d</i> <sub>6</sub>	1	1 - 500	325.5 > 262.1	-15	-19	-19	Haloperidol	<u>375.9 &gt; 123.0</u>	-26	-41	-24	4.09	Doxepin- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500	375.9 > 165.0	-26	-25	-18																																																																																						
Desmethylcitalopram- <i>d</i> <sub>3</sub>	<u>314.2 &gt; 109.0</u>	-25	-26	-19	3.97	-	1	1 - 500																																																																																																																																																							
	314.2 > 262.1	-16	-18	-17					Citalopram- <i>d</i> <sub>6</sub>	<u>331.2 &gt; 109.2</u>	-13	-30	-20	3.98	-	1	1 - 500	331.2 > 262.0	-13	-22	-17	Desmethylcitalopram	<u>311.0 &gt; 109.1</u>	-16	-25	-10	3.98	Desmethylcitalopram- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500	311.0 > 262.1	-16	-18	-17	Citalopram	<u>325.5 &gt; 109.1</u>	-15	-27	-21	3.99	Citalopram- <i>d</i> <sub>6</sub>	1	1 - 500	325.5 > 262.1	-15	-19	-19	Haloperidol	<u>375.9 &gt; 123.0</u>	-26	-41	-24	4.09	Doxepin- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500	375.9 > 165.0	-26	-25	-18																																																																																																			
Citalopram- <i>d</i> <sub>6</sub>	<u>331.2 &gt; 109.2</u>	-13	-30	-20	3.98	-	1	1 - 500																																																																																																																																																							
	331.2 > 262.0	-13	-22	-17					Desmethylcitalopram	<u>311.0 &gt; 109.1</u>	-16	-25	-10	3.98	Desmethylcitalopram- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500	311.0 > 262.1	-16	-18	-17	Citalopram	<u>325.5 &gt; 109.1</u>	-15	-27	-21	3.99	Citalopram- <i>d</i> <sub>6</sub>	1	1 - 500	325.5 > 262.1	-15	-19	-19	Haloperidol	<u>375.9 &gt; 123.0</u>	-26	-41	-24	4.09	Doxepin- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500	375.9 > 165.0	-26	-25	-18																																																																																																																
Desmethylcitalopram	<u>311.0 &gt; 109.1</u>	-16	-25	-10	3.98	Desmethylcitalopram- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500																																																																																																																																																							
	311.0 > 262.1	-16	-18	-17					Citalopram	<u>325.5 &gt; 109.1</u>	-15	-27	-21	3.99	Citalopram- <i>d</i> <sub>6</sub>	1	1 - 500	325.5 > 262.1	-15	-19	-19	Haloperidol	<u>375.9 &gt; 123.0</u>	-26	-41	-24	4.09	Doxepin- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500	375.9 > 165.0	-26	-25	-18																																																																																																																													
Citalopram	<u>325.5 &gt; 109.1</u>	-15	-27	-21	3.99	Citalopram- <i>d</i> <sub>6</sub>	1	1 - 500																																																																																																																																																							
	325.5 > 262.1	-15	-19	-19					Haloperidol	<u>375.9 &gt; 123.0</u>	-26	-41	-24	4.09	Doxepin- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500	375.9 > 165.0	-26	-25	-18																																																																																																																																										
Haloperidol	<u>375.9 &gt; 123.0</u>	-26	-41	-24	4.09	Doxepin- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500																																																																																																																																																							
	375.9 > 165.0	-26	-25	-18																																																																																																																																																											

Trazodone	<u>372.2 &gt; 176.0</u>	-17	-25	-17	4.11	Citalopram- <i>d</i> <sub>6</sub>	1	1 - 500
	372.2 > 148.0	-17	-39	-27				
Doxepin- <i>d</i> <sub>3</sub>	<u>283.2 &gt; 107.2</u>	-22	-23	-10	4.12	-	1	1 - 500
	283.2 > 235.0	-14	-18	-24				
Risperidone- <i>d</i> <sub>4</sub>	<u>415.2 &gt; 195.0</u>	-20	-35	-20	4.14	-	1	1 - 500
	415.2 > 114.2	-10	-49	-22				
Norfluoxetine	<u>296.3 &gt; 134.1</u>	-15	-7	-25	4.15	Risperidone- <i>d</i> <sub>4</sub>	50	50 - 500
	296.3 > 30.1	-15	-14	-30				
Risperidone	<u>411.0 &gt; 191.1</u>	-40	-29	-12	4.15	Risperidone- <i>d</i> <sub>4</sub>	1	1 - 500
	411.0 > 110.1	-20	-50	-21				
Fluoxetine	<u>310.1 &gt; 44.1</u>	-21	-13	-17	4.17	Risperidone- <i>d</i> <sub>4</sub>	1	1 - 500
	310.1 > 148.1	-15	-8	-11				
Doxepin	<u>280.2 &gt; 107.1</u>	-11	-23	-19	4.20	Doxepin- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500
	280.2 > 115.2	-14	-47	-24				
Quetiapine	<u>348.0 &gt; 253.0</u>	-10	-22	-14	4.35	Desipramine- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500
	348.0 > 221.0	-10	-35	-24				
Ziprasidone	<u>413.3 &gt; 194.0</u>	-13	-30	-20	4.36	Paroxetine- <i>d</i> <sub>6</sub>	1	1 - 500
	413.3 > 159.0	-13	-44	-15				
Desipramine- <i>d</i> <sub>3</sub>	<u>270.4 &gt; 75.0</u>	-14	-17	-13	4.42	-	1	1 - 500
	270.4 > 193.1	-14	-39	-19				
Desipramine	<u>267.1 &gt; 72.1</u>	-28	-18	-30	4.43	Desipramine- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500
	267.1 > 208.1	-28	-22	-24				
Paroxetine- <i>d</i> <sub>6</sub>	<u>336.2 &gt; 76.1</u>	-13	-30	-13	4.43	-	1	1 - 500
	336.2 > 198.3	-13	-22	-13				
Paroxetine	<u>330.1 &gt; 70.1</u>	-15	-33	-27	4.44	Paroxetine- <i>d</i> <sub>6</sub>	1	1 - 500
	330.1 > 192.1	-15	-20	-20				
Duloxetine	<u>297.9 &gt; 44.2</u>	-15	-13	-17	4.47	Duloxetine- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500
	297.9 > 154.1	-18	-6	-28				
Imipramine	<u>284.1 &gt; 86.0</u>	-28	-18	-17	4.47	Imipramine- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500
	284.1 > 58.0	-28	-36	-25				
Imipramine- <i>d</i> <sub>3</sub>	<u>284.1 &gt; 89.0</u>	-15	-19	-15	4.47	-	1	1 - 500
	284.1 > 61.0	-15	-40	-24				

Duloxetine- <i>d</i> <sub>3</sub>	<u>301.2 &gt; 47.1</u>	-12	-26	-17	4.49	-	1	1 - 500
	301.2 > 155.2	-15	-13	-17				
Nortriptyline	<u>264.1 &gt; 233.1</u>	-12	-14	-26	4.52	Amitriptyline- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500
	264.1 > 91.1	-12	-24	-18				
Amitriptyline	<u>278.1 &gt; 91.0</u>	-29	-27	-18	4.55	Amitriptyline- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500
	278.1 > 233.1	-29	-16	-26				
Amitriptyline- <i>d</i> <sub>3</sub>	<u>281.4 &gt; 233.1</u>	-15	-19	-15	4.55	-	1	1 - 500
	281.4 > 105.1	-15	-25	-21				
Trimipramine	<u>295.2 &gt; 100.1</u>	-40	-21	-16	4.62	Imipramine- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500
	295.2 > 58.0	-15	-39	-22				
Levomepromazine	<u>329.1 &gt; 100.1</u>	-36	-22	-19	4.69	Duloxetine- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500
	329.1 > 58.1	-16	-40	-22				
Clomipramine	<u>315.1 &gt; 86.0</u>	-12	-21	-16	4.75	Imipramine- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500
	315.1 > 58.0	-12	-37	-24				
Norsertaline	<u>274.9 &gt; 158.9</u>	-14	-23	-16	4.75	Amitriptyline- <i>d</i> <sub>3</sub>	50	50 - 500
	274.9 > 88.9	-14	-70	-15				
Sertraline	<u>306.0 &gt; 159.0</u>	-15	-27	-29	4.75	Amitriptyline- <i>d</i> <sub>3</sub>	1	1 - 500
	306.0 > 275.0	-15	-12	-30				

Quantifier transitions are underlined; MRM = multiple reaction monitoring; EP = entrance potential; CE = collision energy; CCEP = collision cell exit potential; IS = internal standard

### **Limit of detection, quantification and linearity**

Identification criteria included a symmetrical peak eluting within  $\pm 2\%$  of the average calibrator retention time, a signal-to-noise ratio of at least 3 and an ion ratio between the quantifying and qualifier MRM within  $\pm 20\%$  of that established by the calibrators. The limit of detection (LOD) was defined as the lowest concentration that met all identification criteria, with the limit of quantification (LOQ) being the lowest concentration fulfilling the identification criteria, a signal-to-noise ratio of at least 10 and quantifying within  $\pm 20\%$  of each target concentration (19).

Linearity of the calibration curve was assessed in five batches over 5 days, with six point calibration curves (1, 50, 100, 200, 300 and 500 ng/mL). Calibrators were required to quantify within  $\pm 20\%$  coefficient of variation of each target concentration. For the construction of the calibration curve, the F test was applied to evaluate if the variance between the replicates remained constant for the different concentrations of the calibration curve. Thus, six weighting factors were analyzed:  $1/x$ ,  $1/x^2$ ,  $1/x^{0.5}$ ,  $1/y$ ,  $1/y^2$ ,  $1/y^{0.5}$ . For each of the six conditions, the correlation coefficient ( $r$ ) and sum of residual regression errors ( $\Sigma RE\%$ ) were calculated. The weighting factor with the lowest  $\Sigma RE\%$  was selected (20).

### **Bias**

Bias was evaluated at three different concentrations (low, medium and high control) in *postmortem* blood samples over five different batches. Four replicates of each QC concentration were run in each batch with fresh calibrators. The highest average acceptable bias from the target concentration was  $\pm 20\%$ . Results are presented in percentages.

### **Imprecision**

Intraday and interday imprecision were evaluated as the percent relative standard deviation (%RSD) of results from replicate samples (low, medium and high QC) within a day ( $n=4$ ) and over 5 days ( $n=20$ ), respectively. Imprecision values with %RSD less than 20% were considered acceptable. One-way analysis of variance (ANOVA) was performed on each QC concentration to assess potentially significant interday variability at  $p < 0.05$ .

### **Interference studies**

Fifty-eight possible exogenous interferences (drugs of abuse and pharmaceuticals) were fortified (50 ng/mL) into the LOQ and negative *postmortem* blood samples and analyzed (Supplementary Table 1). In the fortified negative samples, no peak can satisfy LOD criteria for the target analytes, and when fortified into LOQ samples, the target analytes were required to quantify within  $\pm 20\%$  RSD of the expected concentration. No interference was noted if all analytes in the low QC quantified within  $\pm 20\%$  of target with acceptable qualifier/quantifier MRM ratios and no peak in the negative sample satisfied LOD criteria.

### **Matrix effect**

Matrix effects were evaluated by comparison of target analyte peak areas in six blank *postmortem* blood samples fortified with analytes after extraction compared to the average target peak areas of a set of fortified ultra-pure water samples. These twelve samples were extracted according to the method described above. Results were expressed as percentages and a negative result is indicative of matrix suppression, and a positive result of matrix enhancement.

### **Recovery**

Recovery (extraction efficiency) was performed in two batches: the first using six replicates of blank *postmortem* blood samples fortified with all analytes and internal standards at the low and high QC concentrations, extracted with the proposed procedure and injected into the LC-MS/MS; the second, using six replicates of blank *postmortem* blood samples extracted by the proposed procedure and, the final extract was fortified with all analytes and internal standards at the low and high QC concentrations and injected into the LC-MS/MS. The average peak area of the samples fortified prior to extraction divided by the average peak area of the samples fortified after extraction is multiplied by 100 to give the extraction efficiency.

### **Carryover**

Carryover is the appearance of unintended analyte signal in subsequent samples after the analysis of a highly positive sample. Carryover can produce inaccurate qualitative or quantitative results. To evaluate carryover, blank matrix samples were analyzed immediately after a fortified blood extract with all analytes at

the highest calibrator concentration (500 ng/mL). If no analyte is observed (above the method's LOD) in the blank matrix, this concentration is determined to be the concentration at which the method is free from carryover (18).

### **Dilution integrity**

Dilution integrity was studied by diluting one portion of fortified *postmortem* blood samples (at 1 µg/mL) with three portions of blank *postmortem* blood (1:4). A 1:10 dilution was similarly challenged. If the measured concentration times the dilution factor is within  $\pm 20\%$  of the target concentration, the integrity of the dilution is established.

### **Stability**

All the stability studies were conducted on low and high QC samples (n=6) in triplicate. *Postmortem* blood samples were fortified with working solutions on day zero, aliquoted in 2 mL polypropylene tubes and stored at 4°C (refrigerator) and -20°C (freezer). At 7, 15 and 30 days, aliquots at each QCs were fortified with internal standard and quantified using freshly prepared calibration curves.

For evaluation of autosampler stability, QC and calibrator samples were extracted, analyzed, stored on the autosampler at 10°C and re-injected after 24 hours comparing peak areas of the values obtained against the original QCs peak areas.

Stability after three freeze-thaw cycles at -20°C was evaluated by fortifying *postmortem* blood samples on day zero, and after each concentration was quantified, the other triplicates were stored at -20°C. After three freeze-thaw cycles (one cycle = 24 hours), these triplicates samples were also quantified against a newly prepared calibration curve. In all stability studies, analytes were considered stable if the concentration was within  $\pm 20\%$  of the initial concentration.

## **Results and Discussion**

For optimization of sample preparation, two QueChERS salts were tested: Q110 (mixture of magnesium sulphate, sodium chloride, trisodium citrate dihydrate and disodium hydrogencitrate sesquihydrate; 4:1:1:0.5 m/m, Restek, Bellefonte, USA) and Q150 AOAC (mixture of magnesium sulphate and sodium acetate, 4:1 m/m, Restek, Bellefonte, USA). The Q150 AOAC QuEChERS salt was

selected as the best reagent for sample preparation, because it showed cleaner extracts and higher peaks intensity (evaluated by peak areas) than Q110 QuEChERS salt.

Unfortunately, reference materials are very expensive and difficult to obtain with the ordering requirements for laboratories in developing countries, beside that we followed the SWGTOX Guidelines and prepared different stock solutions for the reference standard and QC solutions by different analysts and different weighing.

The developed method identified and quantified 26 PAS and semi-quantified two PAS metabolites of diverse structure and chemistry in 8.5 minutes, reducing the cost and time of analysis. LOD and LOQ were 1 ng/mL for all analytes, except for nortriptyline and norfluoxetine. Figure 1 is the LC-MS/MS chromatogram of twenty-eight PAS at the LOQ including 16 antidepressants, 7 antipsychotics and 5 metabolites. Although the gradient elution generates a well-defined peak for the 28 analytes, norfluoxetine and nortriptyline did not achieve our predefined acceptance criteria for LOQ, therefore, were classified as semi-quantitative.

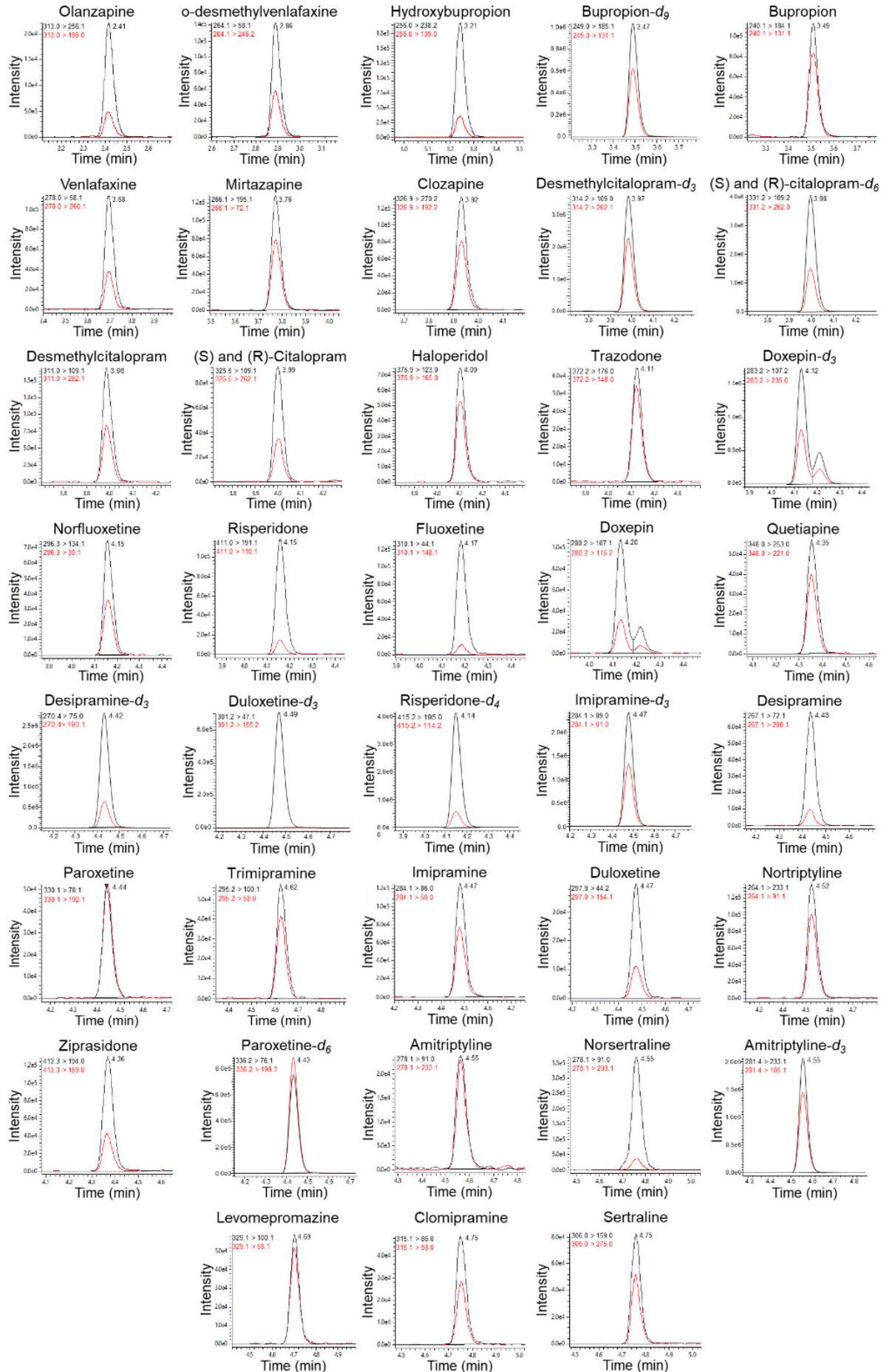
The most effective weighting factor for the calibration curve from 1 to 500 ng/mL with the lowest  $\Sigma RE\%$  was  $1/x^2$  for most analytes. Excellent performance was achieved with  $r > 0.99$  and calculated concentrations of calibrators within  $\pm 20\%$  of target. During method optimization, water transitions were used as quantitative transition for hydroxibupropion and as qualifier transitions for venlafaxine and o-desmethylvenlafaxine. These MRM transitions were selected because they were the most abundant when compared to the abundance of other transitions. These same MRM transitions were usefully employed by other authors in seven other antidepressants methods (13, 21–26). Besides the lower selectivity of water loss, the method did not showed endogenous or exogenous interferences.

The results for imprecision and bias for each analyte are shown in Table 2. The highest imprecision in this validation was 19.0% for the low olanzapine QC (3.0 ng/mL). For evaluation of imprecision, an ANOVA was performed yielding the highest intra-day imprecision of 10.8% for duloxetine, and 19.0% for the inter-day imprecision of olanzapine, both at low QC (3.0 ng/mL). Bias was less than 19.7%, 14.8% and 11.4% for the low, medium and high QC, respectively. Bias was also evaluated by analysis of the certified tricyclic antidepressant controls, with deviation from

established concentrations less than 17.3%. For all analytes, results were in good agreement with the SWGTOX guideline that set  $\pm 20\%$  as the acceptance criteria. Therefore, it was concluded that the method has good repeatability and reproducibility.

No carryover was observed in blank samples after analysis of a 500 ng/mL sample (highest calibrator), and neither endogenous (analysis of 10 different *postmortem* blood samples) or exogenous interferences (Supplementary Table 1) were documented. The method's selectivity was evaluated with fifty-eight other pharmaceuticals and drugs of abuse, with no interference meeting the established validation acceptance criteria. Unfortunately, because the analytical column is not for chiral separation, there is no separation of enantiomers, as in the case of citalopram, nor separate completely the isomers of doxepin. This antidepressant is commercially available as a mixture of trans and cis isomers in a ratio of approximately 85:15 with cis-doxepin as a relatively minor constituent. In addition, doxepin's mixture of isomers in this ratio are presented in reference material commercially available, which was used in our method validation. Even with changes in the elution gradient, the baseline separation of the two isomers was not possible. Thus, quantification of doxepin was performed by the highest intensity peak. Additional analysis can be performed, if necessary, to separate the enantiomers.

The results of recovery and matrix effects are described in Table 2. Recovery was greater than 85.9% (sertraline low QC) for all analytes. For most analytes, observed matrix effects were less than 25%, considered acceptable by SWGTOX guidelines if bias and imprecision are less than 20%. The highest matrix effects were for olanzapine at the high QC (37.3%) and levomepromazine 28.6% and 27.5% for the low and high QC, respectively. Both analytes achieved acceptable imprecision and bias.



**Figure 1.** Multiple reaction monitoring (MRM) chromatograms for *postmortem* blood samples containing 16 antidepressants (amitriptyline, bupropion, citalopram, clomipramine, desipramine, doxepin, duloxetine, fluoxetine, imipramine, mirtazapine, o-desmethylvenlafaxine, paroxetine, sertraline, trazodone, trimipramine and venlafaxine), 7 antipsychotics (clozapine, haloperidol, levomepromazine, olanzapine, quetiapine, risperidone and ziprasidone), 3 metabolites (hydroxybupropion, desmethylcitalopram, and nortriptyline) at LOQ (1.0 ng/mL), except for norfluoxetine and norsertraline (50 ng/mL).

**Table 2.** Validation results for imprecision, bias and matrix effects for psychotropic drugs in *postmortem* blood by micro-QuEChERS and LC-MS/MS.

Analyte	Intraday imprecision (%RSD) (n=4)			Interday imprecision (%RSD) (n=20)			Matrix effect (%) (n = 10)		Bias (%) (n=20)			Recovery (%) (n=6)	
	Low	Medium	High	Low	Medium	High	Low	High	Low	Medium	High	Low	High
Amitriptyline	9.2	6.5	5.3	15.1	12.1	9.8	-4.0	0.6	-9.2	-4.6	-4.9	89.6	116
Bupropion	9.0	5.6	3.8	8.0	8.4	6.3	2.2	4.3	-1.3	-1.7	-1.7	93.2	114
Citalopram	8.3	5.8	4.2	8.7	8.0	6.4	-5.2	-4.3	-1.0	-2.8	-1.8	97.8	116
Clomipramine	6.8	7.5	6.9	11.3	13.6	9.4	3.2	9.0	-12.2	-8.7	-7.3	92.6	109
Clozapine	6.5	7.7	7.0	15.0	10.2	8.0	6.1	5.8	-7.2	-2.5	-2.0	99.3	106
Desipramine	7.5	6.1	6.2	11.3	12.9	11.4	2.5	3.3	-3.3	-5.7	-5.7	95.2	115
Desmethylcitalopram	7.7	6.2	3.7	7.3	7.9	5.1	-3.9	-3.2	3.0	0.3	-1.4	101	114
Doxepin	7.4	7.8	6.7	6.6	9.4	6.6	-10.7	1.5	-10.3	-2.4	-1.2	105	109
Duloxetine	10.8	6.2	5.0	14.0	13.9	7.7	5.1	7.8	-6.8	-9.7	-7.0	92.2	107
Fluoxetine	9.8	5.6	5.2	9.7	6.4	6.2	2.0	4.0	3.2	0.1	-0.1	92.1	114
Haloperidol	7.0	8.0	6.5	5.9	8.0	7.6	-8.7	1.8	-5.8	-4.1	-2.6	102	108
Hydroxybupropion	9.5	6.0	3.7	9.7	8.1	4.6	9.4	5.6	10.2	7.3	7.7	96.9	105
Imipramine	7.9	6.9	3.7	11.4	10.6	6.0	-1.6	0.1	-6.2	-4.1	-4.6	89.5	116
Levomepromazine	6.6	8.7	8.7	7.5	8.6	10.9	28.6	27.5	-18.0	-14.2	-3.9	102	109
Mirtazapine	6.1	6.9	5.5	8.3	15.3	7.9	3.4	3.8	-14.3	-10.7	-8.8	99.9	108
Norfluoxetine	*	8.0	4.9	*	16.5	12.5	*	6.6	*	-2.7	-6.3	*	112
Norserttraline	*	7.5	5.0	*	13.6	11.1	*	17.6	*	-4.6	-5.7	*	114
Nortriptyline	9.3	7.0	3.8	12.3	11.8	8.1	2.7	4.3	-5.0	-4.0	-5.3	90.8	116

o-desmethylvenlafaxine	4.1	1.4	4.2	4.5	10.3	7.6	3.1	5.7	4.8	6.6	0.4	102	111
Olanzapine	8.4	7.3	9.7	19.0	16.1	15.0	24.0	37.3	-6.7	-7.2	4.0	103	106
Paroxetine	9.4	7.5	6.6	11.7	13.5	10.1	3.4	9.0	-12.5	-9.0	-7.0	102	106
Quetiapine	5.4	7.4	7.1	6.3	10.1	7.3	-4.5	0.6	-8.3	-4.4	-2.6	100	106
Risperidone	6.4	7.1	5.6	12.9	11.7	10.8	0.7	-1.9	1.0	3.6	5.2	97.0	107
Sertraline	7.4	7.5	5.2	6.4	11.6	8.8	20.0	18.2	2.7	-1.7	-4.1	85.9	114
Trazodone	6.4	7.5	6.6	7.0	9.9	7.8	0.3	-0.8	-10.3	-6.7	-5.0	105	109
Trimipramine	9.3	6.1	5.6	9.9	11.0	10.3	2.0	1.7	-6.3	-4.8	-2.4	88.8	116
Venlafaxine	9.8	5.6	6.3	11.5	13.7	14.0	-6.7	-6.0	-15.8	-12.2	-10.5	90.8	114
Ziprasidone	7.5	7.0	6.3	9.6	16.9	17.4	6.5	7.4	-19.7	-14.8	-11.4	106	104

\* Norfluoxetine and norsertaline did not achieve the acceptance criteria for the LOQ and low QC, and were classified as semi-quantitative.

All analytes were stable for 15 days at 4°C, except for olanzapine, ziprasidone and bupropion. Hydroxybupropion, mirtazapine, trazodone and quetiapine were stable for 30 days at 4°C. Of all the analytes, olanzapine, o-desmethylvenlafaxine, bupropion and venlafaxine were not stable for at least 30 days at -20°C, and levomepromazine was stable for only 7 days frozen. Stability studies on the auto-sampler for 24 hours indicated that most analytes were stable for 24 hours, except for sertraline at the low QC. All analytes were stable for 3 freeze/thaw cycles (1 cycle = 24 hours at -20°C). The results for the stability studies are shown in Supplementary Table 2.

The instabilities of olanzapine and bupropion are well known. According to Bishop-Freeman et al. (27), after 30 days bupropion severely degraded at room temperature, but samples stored in a freezer were the most stable. Olanzapine stability varies according to sample matrix and physical storage conditions. Andreassen et al. (28) noted that UV exposure caused significant degradation, recommending that samples be protected from light. Unfortunately, sample preparation is conducted on the bench top with direct light exposure. An alternative would be to analyze active metabolites that have greater stability, as a good indicator for exposure to the parent drug.

### **Analysis of authentic forensic toxicology cases**

One hundred *postmortem* blood samples suspected to contain PAS were donated by law enforcement and evaluated by this newly validated analytical method. The samples were collected between 2015 and 2019, from the states of Sao Paulo (Southeast Brazil) and Sergipe (Northeast Brazil), samples were anonymized, sent to our laboratory for this method validation and stored frozen until analysis. The most common antidepressants and antipsychotics found in these *postmortem* blood samples were citalopram and risperidone. Citalopram was detected in 17 of 52 positive samples, in concentrations between 1–789 ng/mL. Concentrations above the therapeutic level were observed in 14 samples, and in 12 samples more than one PAS was identified. These results and the analytes' therapeutic ranges are found in Table 4. Supplementary Figure 1 depicts the LC-MS/MS results of an authentic *postmortem* blood sample analyzed by the new method with 225 ng/mL olanzapine, 103 ng/mL desmethylcitalopram and 789 ng/mL citalopram. Despite the described instability of

olanzapine and bupropion and the age of the available cases, positive results for these two analytes or their metabolites were obtained. Dilution integrity was studied for analytes that showed results above 500 ng/mL (amitriptyline, bupropion, citalopram, fluoxetine, hydroxybupropion, norfluoxetine, nortriptyline, nortriptyline, and sertraline), in addition to the carryover assessment in subsequent analyzes. Results for these nine analytes are the measured concentration times the dilution factor. No carryover was observed, and dilution integrity was documented at the specified dilutions within  $\pm 20\%$  of the target concentration during method validation.

**Table 3.** Authentic *postmortem* blood sample results (ng/mL) with the new LC-MS/MS analytical method for psychoactive substances.

Sample	Analyte	Therapeutic concentration	Sample Concentration
#2	Citalopram	50 - 110	3.4
	o-desmethylvenlafaxine	100 - 400	1.5
#3	Citalopram	50 - 110	10.8
#4	Citalopram	50 - 110	2.4
	Mirtazapine	30 - 80	3.1
#5	Citalopram	50 - 110	1.2
	Desmethylcitalopram	-	1.8
	Haloperidol	5 - 17	1.6
	Hydroxybupropion	-	1.4
	Risperidone	2 - 20	2.1
	Trazodone	0.7 - 1.0	1.1
#6	Citalopram	50 - 110	3.0
#12	Citalopram	50 - 110	1.9
#13	Citalopram	50 - 110	1.4
	Desmethylcitalopram	-	1.1
	Risperidone	2 - 20	1.3
#14	Citalopram	50 - 110	16.7
#15	Citalopram	50 - 110	1.7
#19	Citalopram	50 - 110	1.9
#20	Citalopram	50 - 110	7.0
#38	Citalopram	50 - 110	1.0
#49	Amitriptyline	50 - 300	7.6
#54	Ziprasidone	50 - 200	29.5

#60	Norsertaline	-	454
	Sertraline	10 - 250	396
#61	Norsertaline	-	57.3
	Sertraline	10 - 250	27.0
#62	Norsertaline	-	66.3
	Sertraline	10 - 250	74.2
#63	Norsertaline	-	7.6
	Sertraline	10 - 250	2.3
#64	Hydroxybupropion	-	262
	Quetiapine	100 - 500	339
#65	Fluoxetine	120 - 500	94.9
	Norfluoxetine	-	910
#66	Amitriptyline	50 - 300	7.1
	Nortriptyline	20 - 200	5.3
#67	Amitriptyline	50 - 300	7.5
	Nortriptyline	20 - 200	12.5
#68	Fluoxetine	120 - 500	162
	Norfluoxetine	-	45.6
#69	Norsertaline	-	173
	Nortriptyline	20 - 200	21.9
	Sertraline	10 - 250	130
#70	Paroxetine	10 - 120	76.4
	Amitriptyline	50 - 300	1130
#71	Nortriptyline	20 - 200	718
	Quetiapine	100 - 500	457

#72	Fluoxetine	120 - 500	1131
	Norfluoxetine	-	981
#73	Amitriptyline	50 - 300	68.8
	Nortriptyline	20 - 200	121
#74	Desipramine	10 - 500	63.1
	Olanzapine	20 - 80	45.9
#75	Fluoxetine	120 - 500	731
	Norfluoxetine	-	622
#76	Citalopram	50 - 110	63.5
	Desmethylcitalopram	-	19.2
#77	Amitriptyline	50 - 300	4503
	Nortriptyline	-	2072
#78	Haloperidol	5 - 17	8.7
#79	Bupropion	10 - 20	2918
	Hydroxybupropion	-	2118
#80	Citalopram	50 - 110	455
	Desmethylcitalopram	-	57.8
#81	Fluoxetine	120 - 500	499
	Norfluoxetine	-	2093
#82	Levomepromazine	5 - 200	389
#83	Citalopram	50 - 110	176
	Desmethylcitalopram	-	167
#84	Amitriptyline	50 - 300	4475
	Nortriptyline	20 - 200	2057
#85	Norsertaline	-	2412
	Sertaline	10 - 250	1800
#86	Nortriptyline	20 - 200	28.9
	Quetiapine	100 - 500	14.9
#87	o-desmethylvenlafaxine	100 - 400	152
	Venlafaxine	100 - 400	79.0
#88	Fluoxetine	120 - 500	1037
	Norfluoxetine	-	673
	Quetiapine	100 - 500	6.6
#89	Haloperidol	5 - 17	40.1
	Norsertaline	-	196

	Sertraline	10 - 250	164
#90	Haloperidol	5 - 17	7.4
#91	Nortriptyline	20 - 200	10.3
#92	Norsertaline	-	233
	Sertraline	10 - 250	71.1
	Citalopram	50 - 110	789
#93	Desmethylcitalopram	-	103
	Olanzapine	20 – 80	225
#94	Norsertaline	-	70.4
	Sertraline	10 - 250	60.6
#95	Amitriptyline	50 - 300	95.6
	Nortriptyline	20 - 200	54.7
#96	Citalopram	50 - 110	366
	Desmethylcitalopram	-	150
#97	Amitriptyline	50 - 300	54.0
	Nortriptyline	20 - 200	177

The micro-QuEChERS procedure requires a low 100  $\mu$ L sample volume and made our laboratory more efficient due to the 15 min sample preparation time that is more rapid than LLE and SPE techniques. Moreover, this sample preparation requires less frequent instrument maintenance due to cleaner extracts as compared to simple protein precipitation. This is especially true for *postmortem* blood samples that may be clotted or putrefied. The current method provides fast and reliable determinations of multiple drugs in a single analysis and is fit for purpose for a forensic toxicology laboratory workload.

## Conclusions

A sensitive method based on micro-QuEChERS and LC-MS/MS was developed to quantify 16 antidepressants, 7 antipsychotics and 3 metabolites, and semi-quantify two additional metabolites. The method was fully validated, requires a low 100  $\mu$ L sample volume and combines a single sample preparation step and fast instrumental analysis. When applied to authentic *postmortem* samples, the efficiency of the protocol was demonstrated.

## Funding

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Process Number 2018/00432-1), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Process Number 425814/2018-1), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Process Number 88882.435302/2019-01).

## Acknowledgements

The authors thank Institute of Legal Medicine-Sao Paulo State Police and the Institute of Analysis and Forensic Research of Sergipe State Police for kind donation of authentic samples.

## Ethical approval

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the University of Campinas committee (Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP - CEP, CAAE 87316318.0.0000.5404) and Superintendence of the Technical-Scientific of Sao Paulo State Police (No. 766/2015/ATS/SPTC-SSP).

## References

1. Stanley, J.L., Mogford, D. V., Lawrence, R.J. and Lawrie, S.M. (2016) Use of novel psychoactive substances by inpatients on general adult psychiatric wards. *BMJ Open*, **6**, 1–7.
2. Flanagan, R.J. (2018) *Fundamentals of Analytical Toxicology*. WileyBlackwell (ed), London.
3. World Health Organization International Programme on Chemical Safety: Analytical toxicology.  
[https://www.who.int/ipcs/publications/training\\_poisons/analytical\\_toxicology/en/](https://www.who.int/ipcs/publications/training_poisons/analytical_toxicology/en/)  
(17 September 2019).
4. Burckhardt, B.B. and Laeer, S. (2015) Sample Preparation and Extraction in Small Sample Volumes Suitable for Pediatric Clinical Studies : Challenges , Advances ,

and Experiences of a Bioanalytical HPLC-MS / MS Method Validation Using Enalapril and Enalaprilat. **2015**.

5. Kim, H.K.J. (2014) General unknown screening for pesticides in whole blood and Korean gastric contents by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. 2014: 10.1007/s12272-014-0440-3.
6. Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, S.F. (2003) Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and 'dispersive solid-phase extraction' for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC international*, **86**, 412–31.
7. Nemečkalová, A., Bursová, M., David, S., Kuchař, M., Cabala, R. and Hložek, T. (2019) Salting out assisted liquid-liquid extraction for liquid chromatography tandem-mass spectrometry determination of amphetamine-like stimulants in meconium. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **172**, 42–49.
8. Westland, J.L. and Dorman, F.L. (2013) QuEChERS extraction of benzodiazepines in biological matrices. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, **3**, 509–517. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2013.04.004>.
9. Usui, K., Hayashizaki, Y., Minagawa, T., Hashiyada, M., Nakano, A. and Funayama, M. (2012) Rapid determination of disulfoton and its oxidative metabolites in human whole blood and urine using QuEChERS extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Legal Medicine*, **14**, 309–316. <http://dx.doi.org/10.1016/j.legalmed.2012.06.005>.
10. Roca, M., Leon, N., Pastor, A. and Yusà, V. (2014) Comprehensive analytical strategy for biomonitoring of pesticides in urine by liquid chromatography-orbitrap high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1374**, 66–76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.11.010>.
11. Plassmann, M.M., Brack, W. and Krauss, M. (2015) Extending analysis of environmental pollutants in human urine towards screening for suspected compounds. *Journal of Chromatography A*, **1394**, 18–25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.03.040>.
12. López, A., Dualde, P., Yusà, V. and Coscollà, C. (2016) Retrospective analysis of pesticide metabolites in urine using liquid chromatography coupled to high-

- resolution mass spectrometry. *Talanta*, **160**, 547–555.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.07.065>.
13. Pouliopoulos, A., Tsakelidou, E., Krokos, A., Gika, H.G., Theodoridis, G. and Raikos, N. (2018) Quantification of 15 Psychotropic Drugs in Serum and Postmortem Blood Samples after a Modified Mini-QuEChERS by UHPLC-MS-MS. *Journal of analytical toxicology*, **42**, 337–345.
  14. Anzillotti, L., Odoardi, S. and Strano-Rossi, S. (2014) Cleaning up blood samples using a modified “QuEChERS” procedure for the determination of drugs of abuse and benzodiazepines by UPLC-MSMS. *Forensic Science International*, **243**, 99–106.
  15. Wurita, A., Hasegawa, K., Minakata, K., Gonmori, K., Nozawa, H., Yamagishi, I., et al. (2014) Postmortem distribution of  $\alpha$ -pyrrolidinobutiophenone in body fluids and solid tissues of a human cadaver. *Legal Medicine*, 2014: 10.1016/j.legalmed.2014.05.001.
  16. Lehmann, S., Sczyslo, A., Froch-Cortis, J., Rothschild, M.A., Thevis, M., Andresen-Streichert, H., et al. (2019) Organ distribution of diclazepam, pyrazolam and 3-fluorophenmetrazine. *Forensic Science International*, 2019: 10.1016/j.forsciint.2019.109959.
  17. Peres, M.D., Nascimento, S. and Pelição, F.S. (2019) A new clean-up approach for stomach content toxicological analysis. *Forensic Science International*, 2019: 10.1016/j.forsciint.2019.109936.
  18. Scientific Working Group for Forensic Toxicology (2013) Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. *Journal of Analytical Toxicology*, **37**, 452–474.  
<https://academic.oup.com/jat/article-lookup/doi/10.1093/jat/bkt054>.
  19. Society of Toxicological and Forensic Chemistry (2018) Guideline for quality control in forensic-toxicological analyses. pp. 12–13.
  20. Almeida, A.M., Castel-Branco, M.M. and Falcão, A.C. (2002) Linear regression for calibration lines revisited: Weighting schemes for bioanalytical methods. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **774**, 215–222.

21. Amundsen, I., Øiestad, Å.M.L., Ekeberg, D. and Kristoffersen, L. (2013) Quantitative determination of fifteen basic pharmaceuticals in ante- and post-mortem whole blood by high pH mobile phase reversed phase ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **927**, 112–123. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.12.039>.
22. Ramírez Fernández, M.D.M., Wille, S.M.R. and Samyn, N. (2012) Quantitative method validation for the analysis of 27 antidepressants and metabolites in plasma with ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Therapeutic Drug Monitoring*, **34**, 11–24.
23. Degreef, M., van Nuijs, A.L.N. and Maudens, K.E. (2018) Validation of a simple, fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of 40 antidepressant drugs or their metabolites in plasma. *Clinica Chimica Acta*, **485**, 243–257. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.06.047>.
24. De Boeck, M., Dubrulle, L., Dehaen, W., Tytgat, J. and Cuypers, E. (2018) Fast and easy extraction of antidepressants from whole blood using ionic liquids as extraction solvent. *Talanta*, **180**, 292–299. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.12.044>.
25. Coles, R. and Kharasch, E.D. (2007) Stereoselective analysis of bupropion and hydroxybupropion in human plasma and urine by LC/MS/MS. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **857**, 67–75.
26. Teitelbaum, A.M., Flaker, A.M. and Kharasch, E.D. (2016) Development and validation of a high-throughput stereoselective LC-MS/MS assay for bupropion, hydroxybupropion, erythrohydrobupropion, and threo hydrobupropion in human plasma. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **1017–1018**, 101–113. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.02.032>.
27. Bishop-freeman, S.C., Hensel, E.M., Feaster, M.S. and Winecker, R.E. (2018) Degradation of Bupropion: Implications for Interpretation of Postmortem Case

Data. *Journal of Analytical Toxicology*, 2018: 10.1093/jat/bky058.

28. Andreassen, T.N., Falch, B.M.H. and Spigset, O. (2015) A UPLC – MSMS method for the analysis of olanzapine in serum — with particular emphasis on drug stability testing. *Journal of Chromatography B*, **1006**, 112–120.

## Supplementary data

**Supplementary Table 1.** Fifty-eight possible exogenous interferences (drugs of abuse and pharmaceuticals) were evaluated during method validation.

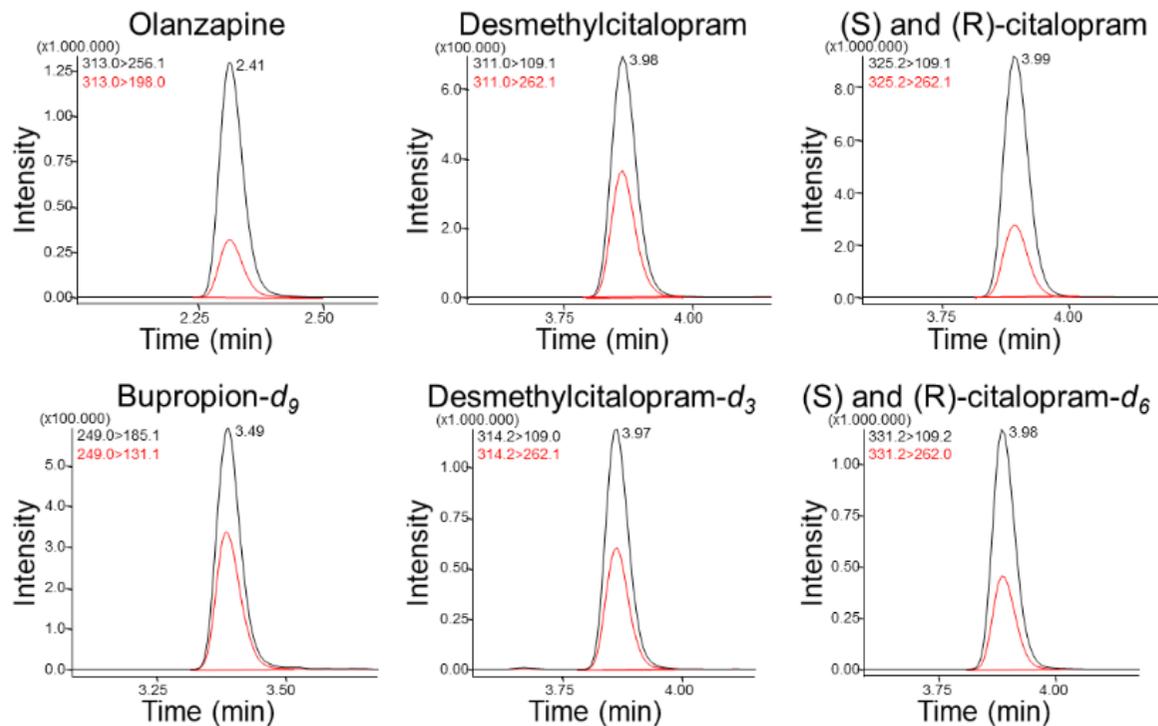
OPIATES	STIMULANTS	BENZODIAZEPINES	HYPNOTICS & SEDATIVES	ANALGESICS	OTHERS	
Heroin	Amphetamine	Oxazepam	Zolpidem	Paracetamol	Desloratadine	Naphazoline
Codeine	Methamphetamine	Nitrazepam	Midazolam	Meloxicam	Loratadine	Ranitidine
Oxycodone	MDA	Clonazepam		Prednisone	Hydroxyzine	Metoclopramide
Hydrocodone	MDMA	Flunitrazepam		Prednisolone	Promethazine	Domperidone
Meperidine	MDEA	Alprazolam		Celecoxib	Hydrochlorothiazide	Ondansetron
Methadone		Diazepam		Betamethasone	Furosemide	Glibenclamide
Cocaine		Temazepam		Dexamethasone	Chlorthalidone	Atorvastatin
Tramadol		Lorazepam			Carbamazepine	Atenolol
N-desmethyltramadol		Bromazepam			Phenobarbital	Propranolol
		Nordiazepam			Phenytoin	Diltiazem
		7-aminoclonazepam			Valproic acid	Captopril
		7-aminoflunitrazepam			Salbutamol	

**Supplementary table 2.** Stabilities for psychoactive compounds at 4°C and -20°C for 7, 15 and 30 days, on the auto-sampler and following up to three freeze/thaw cycles.

Analyte	Auto-sampler				Freeze/Thaw 3 cycles (1 cycle = 24h)				Refrigerator (4 °C)												Freezer (-20 °C)														
	24 hours								7 days				15 days				30 days				7 days				15 days				30 days						
	Low	SD	High	SD	Low	SD	High	SD	Low	SD	High	SD	Low	SD	High	SD	Low	SD	High	SD	Low	SD	High	SD	Low	SD	High	SD	Low	SD	High	SD	Low	SD	High
Amitriptyline	0.8	1.3	0.2	2.0	83.1	0.2	98.3	7.3	92.8	12.7	89.6	1.4	94.0	6.3	95.6	2.9	20.5	35.5	90.3	10.0	83.1	6.3	86.1	2.0	96.4	4.2	97.7	2.1	12.0	17.8	92.6	10.3			
Bupropion	0.4	13.3	2.4	9.1	87.6	0.1	103	3.3	58.3	4.1	61.1	0.5	40.5	5.5	38.6	0.8	3.6	3.6	12.8	0.7	84.5	4.1	87.0	4.4	88.1	2.1	93.1	2.7	79.8	8.2	80.1	4.6			
Citalopram	1.0	2.7	0.5	9.0	91.4	0.4	99.9	5.0	100	29.6	87.7	2.6	72.0	9.2	93.6	2.7	68.3	9.2	85.7	5.3	123	5.6	85.0	4.5	76.8	3.7	96.5	2.8	93.9	8.4	97.0	5.0			
Clomipramine	14.1	2.2	9.9	3.9	96.1	8.1	83.4	2.7	81.8	6.7	85.2	2.6	90.9	8.1	90.5	1.8	61.0	18.4	90.9	9.6	80.5	2.2	86.5	7.5	88.3	4.5	91.6	3.0	98.7	6.0	90.8	7.0			
Clozapine	1.2	7.8	1.4	12.6	93.2	0.3	92.7	9.8	89.6	3.9	85.0	0.4	97.4	10.3	93.6	4.9	63.6	11.2	92.2	7.6	97.4	0.0	92.8	10.0	98.7	2.2	96.4	2.9	97.4	2.8	91.8	5.4			
Desipramine	3.4	4.3	2.6	2.8	89.1	0.1	99.2	15.0	94.0	7.2	97.7	5.4	96.4	7.5	93.6	2.6	63.9	5.5	88.4	9.7	100	2.1	98.0	5.3	95.2	2.1	98.0	2.0	91.6	5.5	89.2	11.0			
Desmethylcitalopram	0.7	2.2	1.3	7.0	94.1	0.2	98.1	5.9	90.2	5.6	82.0	2.4	82.9	5.6	90.0	2.3	68.3	9.2	85.7	5.3	95.1	3.7	84.5	6.1	90.2	2.1	96.5	2.4	98.8	3.7	87.5	8.9			
Doxepin	1.7	9.1	0.4	14.0	96.5	0.1	102	7.4	84.8	4.4	86.6	5.1	75.9	3.8	84.1	2.0	50.6	4.4	94.1	6.6	86.1	2.2	89.9	7.8	82.3	2.2	86.5	3.8	82.3	2.2	94.7	10.0			
Duloxetine	5.4	2.3	2.4	3.2	95.5	0.1	98.2	22.1	91.7	7.2	81.3	1.3	93.1	6.4	87.6	2.8	61.1	8.7	83.0	5.7	94.4	12.0	84.4	4.1	100	0.0	94.5	1.0	107	2.4	85.0	11.1			
Fluoxetine	8.9	2.8	2.2	0.9	106	5.5	93.9	2.1	86.1	2.2	88.6	4.2	89.9	7.9	91.2	3.6	30.4	6.6	87.1	6.8	94.9	3.8	85.3	4.4	96.2	4.4	98.5	4.0	97.5	2.2	98.8	9.2			
Haloperidol	0.0	4.7	0.3	2.3	84.4	0.1	88.1	10.9	85.9	4.9	84.1	7.7	91.5	9.8	82.5	2.4	32.4	6.5	95.1	9.7	94.4	6.5	91.1	9.0	91.5	6.5	84.6	2.6	117	28.1	94.5	10.6			
Hydroxybupropion	5.2	13.1	0.2	17.0	106	0.0	111	4.7	91.6	5.5	88.8	2.4	97.6	7.2	98.6	0.9	83.1	3.6	88.6	4.7	92.8	2.1	90.2	4.6	101	0.0	106	3.2	90.4	3.6	91.0	6.3			
Imipramine	3.6	3.7	5.0	2.5	100	0.0	98.6	6.9	86.6	5.6	92.1	4.1	90.2	9.2	96.2	0.8	68.3	5.6	84.6	5.9	84.1	3.7	89.4	2.4	91.5	3.7	97.4	2.3	89.0	5.6	96.4	10.0			
Levomepromazine	1.4	3.9	1.4	3.0	104	0.1	107	12.2	81.9	4.8	83.5	2.9	83.3	18.2	80.9	1.7	83.3	18.2	81.7	9.2	83.3	4.2	84.2	7.7	79.2	4.2	80.4	2.3	77.8	2.4	84.9	12.4			
Mirtazapine	2.4	10.4	1.2	15.8	103	0.3	102	9.2	103	8.4	89.3	2.8	89.2	8.1	87.0	1.0	85.1	4.1	81.1	3.0	97.3	7.0	85.0	3.9	93.2	0.0	89.8	2.4	90.5	2.3	87.3	7.3			
Norfluoxetine	ND	ND	2.4	4.3	ND	ND	69.7	13.0	ND	ND	81.0	4.3	ND	ND	72.7	2.0	ND	ND	72.7	7.9	ND	ND	94.8	9.6	ND	ND	92.4	5.0	ND	ND	90.0	7.4			
Norserttraline	18.7	19.5	18.7	18.9	96.4	10.4	96.1	1.2	105	3.6	90.6	3.3	86.7	9.6	92.2	1.9	54.2	18.8	83.2	7.9	113	4.2	94.1	7.4	91.6	2.1	91.7	4.7	106	12.7	86.9	9.7			
Nortriptyline	8.5	3.4	1.9	0.4	77.5	0.1	96.5	6.4	81.2	6.1	91.4	2.7	87.1	8.9	97.0	2.2	67.1	18.7	89.5	9.2	87.1	5.4	95.2	6.1	84.7	0.0	95.6	4.8	94.1	8.9	92.8	10.7			
o-desmethylvenlafaxine	4.6	12.1	1.6	11.1	97.0	0.2	96.5	13.9	94.5	5.0	95.9	1.6	96.7	5.0	96.6	0.4	84.6	33.0	80.6	4.0	97.8	1.9	97.8	4.4	83.5	1.9	98.8	2.3	75.8	8.7	81.0	6.6			

Olanzapine	0.3	1.4	1.1	10	97.8	0.2	102	8.8	62.2	3.7	61.4	2.3	63.4	5.6	64.4	2.6	41.5	11.8	53.7	3.7	82.9	4.2	80.9	4.8	85.4	8.4	91.0	0.6	70.7	7.6	82.8	5.4
Paroxetine	10.6	1.2	3.5	2.1	97.3	0.1	95.8	3.5	90.0	7.4	86.5	4.5	88.6	6.5	86.3	3.4	75.7	31.6	89.8	9.6	97.1	2.5	85.9	3.2	98.6	7.4	90.3	2.6	110	6.5	94.8	7.8
Quetiapine	0.8	0.6	2.4	16.6	118	0.1	116	14.3	95.8	4.2	83.5	2.3	90.3	8.7	91.5	2.4	88.9	4.8	90.6	7.4	98.6	2.4	92.8	10.0	93.1	2.4	93.2	2.0	100	4.2	89.8	6.8
Risperidone	0.8	16.3	1.8	17.7	101	0.1	100	19.2	87.2	4.4	81.2	0.7	96.2	6.7	65.4	1.7	71.8	9.7	101	8.3	94.9	2.2	92.2	10.3	104	0.0	98.6	3.4	103	2.2	103	8.6
Sertraline	25.4	16.2	18.2	17.0	51.6	0.1	64.4	5.8	94.0	7.4	96.8	4.0	91.7	5.5	96.5	3.6	44.0	4.1	87.5	8.5	95.2	2.1	92.9	5.3	94.0	2.1	96.4	5.6	91.7	2.1	89.4	10.6
Trazodone	1.8	16.1	0.3	13.8	103	0.1	99.8	10.4	89.2	4.1	88.0	2.7	95.9	10.2	89.5	2.5	82.4	2.3	91.2	6.4	94.6	6.2	89.7	7.7	91.9	4.7	91.6	3.2	110	8.1	92.4	7.9
Trimipramine	1.0	4.4	0.2	2.4	95.4	0.2	100	8.2	87.6	2.2	87.9	3.4	80.0	8.7	94.5	2.2	58.8	2.2	84.1	5.3	88.8	2.2	84.5	3.4	83.8	2.2	96.4	3.5	96.3	2.2	96.3	9.1
Venlafaxine	2.1	11.4	0.2	7.6	87.5	9.4	98.0	2.7	91.3	7.8	90.4	2.1	80.0	9.4	85.5	0.6	55.0	11.5	84.6	3.6	85.0	5.7	87.9	5.2	83.8	2.2	88.9	1.2	71.3	9.9	83.6	7.0
Ziprasidone	2.7	1.5	0.1	3.9	94.6	0.4	106	18.9	70.5	2.2	68.6	4.3	53.8	3.8	53.0	2.4	37.2	11.8	53.4	5.3	87.2	8.9	85.4	3.7	69.2	6.7	78.2	2.3	89.7	2.2	91.5	7.9

ND = Not detected



**Supplementary Figure 1.** Multiple reaction monitoring (MRM) chromatograms for *postmortem* blood sample (#93, see Table 4) analyzed by the proposed method.

## 4.2. Desenvolvimento e validação de método analítico determinação de benzodiazepínicos e sedativo-hipnóticos em amostras de sangue *postmortem* por micro-QuEChERS e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

### 4.2.1. Otimização e validação do método analítico

As condições instrumentais do espectrômetro de massas foram otimizadas para os quatorze analitos de interesse (9 benzodiazepínicos, 3 produtos de biotransformação, 1 sedativo-hipnótico e um padrão interno deuterado), através da injeção de soluções padrão na concentração de 5 ng/mL de cada analito diretamente na fonte ESI. As voltagens do Q1 *pre bias*, CE e Q2 *pre bias* foram otimizadas através de ferramentas do software LabSolutions. Posteriormente, a coluna cromatográfica foi colocada no equipamento e os mesmos padrões foram injetados, a fim de verificar o tempo de retenção de cada substância. A Tabela 1 mostra as condições otimizadas do espectrômetro de massas e o tempo de retenção para cada um dos analitos de interesse e padrão interno.

Tabela 1 - Condições otimizadas de MRM e tempos de retenção dos analitos de interesse para o método quantitativo para benzodiazepínicos e sedativo-hipnótico.

Analito	MRM ( <i>m/z</i> )	Q1 Pre bias (V)	CE (V)	Q3 Pre bias (V)	Tempo de retenção (min)
Zolpidem	<u>308,1 &gt; 235,0</u>	-10	-25	-24	4,80
	308,1 > 92,0	-10	-42	-16	
Midazolam	<u>326,0 &gt; 291,1</u>	-17	-28	-19	5,37
	326,0 > 249,1	-16	-38	-16	
Bromazepam	<u>318,0 &gt; 182,1</u>	-12	-33	-18	5,49
	318,0 > 209,0	-16	-28	-20	
Lorazepam	<u>321,0 &gt; 275,0</u>	-23	-23	-12	5,55
	321,0 > 229,0	-24	-29	-15	
Oxazepam	<u>287,0 &gt; 241,0</u>	-30	-24	-26	5,64
	287,0 > 104,1	-29	-36	-20	
Clonazepam	<u>316,0 &gt; 270,0</u>	-24	-26	-12	5,66
	316,0 > 214,1	-23	-40	-22	
Nitrazepam	<u>282,2 &gt; 236,2</u>	-14	-25	-15	5,68
	282,2 > 180,2	-14	-41	-17	
Nordiazepam	<u>271,2 &gt; 140,2</u>	-14	-29	-13	5,94
	271,2 > 208,2	-30	-29	-23	
Flunitrazepam	<u>314,2 &gt; 268,1</u>	-12	-26	-17	6,05
	314,2 > 239,1	-23	-35	-24	
Temazepam	<u>301,2 &gt; 255,0</u>	-15	-23	-11	6,10
	301,2 > 177,1	-15	-40	-18	
Alprazolam	<u>309,2 &gt; 281,0</u>	-15	-27	-18	6,17

	309,2 > 205,1	-23	-45	-20	
Diazepam- <i>d</i> <sub>5</sub>	<u>290,0 &gt; 198,0</u>	-22	-34	-19	6,40
	290,0 > 154,0	-21	-28	-30	
Diazepam	<u>285,0 &gt; 193,1</u>	-11	-27	-15	6,41
	285,0 > 154,0	-21	-33	-19	
Etizolam	<u>343,0 &gt; 314,0</u>	-16	-26	-21	6,43
	343,0 > 259,0	-26	-36	-27	

Ion quantificador está sublinhado; MRM = *multiple reaction monitoring*; CE = *collision energy*

A imagem abaixo (Figura 11) exibe os cromatogramas de íons extraídos de cada analitos no limite de quantificação, após extração pelo método citado e análise por CL-EM/EM.

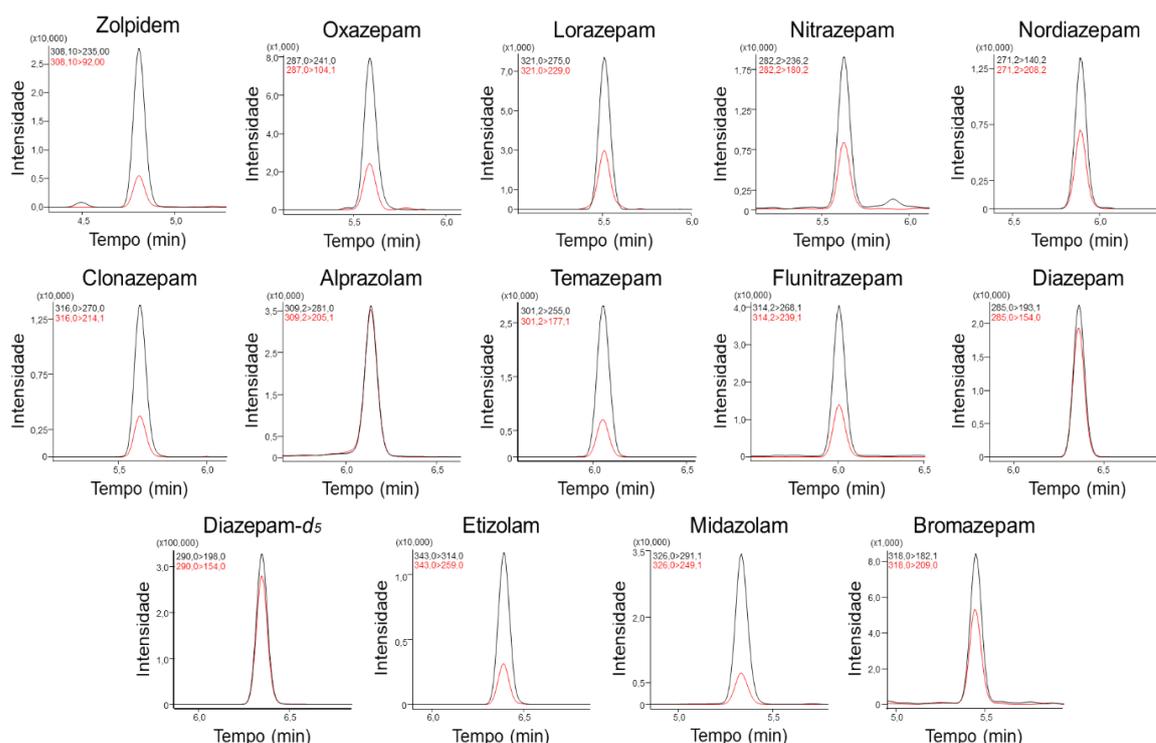


Figura 11 – Cromatogramas de íons extraídos de amostra de sangue *postmortem* adicionada dos analitos no limite de quantificação (10 ng/mL) e submetida ao preparo de amostras pelo método citado e análise por CL-EM/EM. **Créditos à autora.**

O método validado foi capaz de quantificar 9 benzodiazepínicos, 3 produtos de biotransformação e 1 sedativo-hipnótico com limites de detecção e quantificação de 10 ng/mL. Os pontos da curva de calibração, controles e solução de padrão interno foram preparados através da adição de 10 µL de solução trabalho a 100 µL de sangue *postmortem* branco, previamente analisado para diversos medicamentos e drogas de abuso. A curva de calibração foi construída de 10 a 2000 ng/mL (10, 50, 100, 500, 1000 e 2000 ng/mL). Por apresentar comportamento heteroscedástico, as curvas de calibração foram realizadas utilizando ponderação 1/x, que apresentou menor

somatório dos erros residuais da regressão ( $\Sigma RE\%$ ) e obteve coeficientes de determinação de correlação ( $r$ ) > 0,99.

Não foram observados nenhum interferente endógeno ou exógeno, nem contaminação cruzada (*carryover*). A especificidade do método foi determinada avaliando cinquenta e oito fármacos e drogas de abuso, nenhuma interferência foi observada. A imagem abaixo (Figura 12) exibe os resultados de amostra de sangue *postmortem* negativa, após extração pelo método citado e análise por CL-EM/EM.

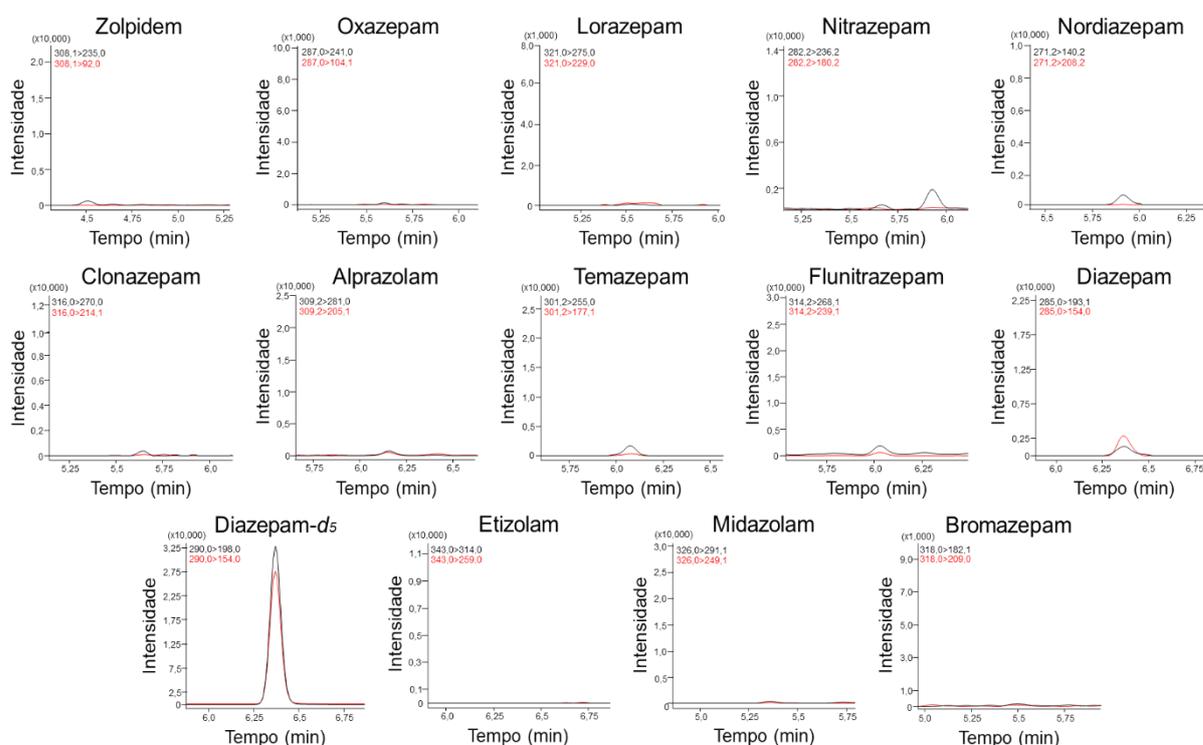


Figura 12 - Cromatogramas de íons extraídos de uma amostra negativa de sangue *postmortem*, após extração pelo método citado e análise por CL-EM/EM. **Créditos à autora.**

A imprecisão intra-dia e inter-dia do método foi melhor que 11,1% e 18,2%, respectivamente, sendo os dois valores foram obtidos para o controle alto (1500 ng/mL) do bromazepam. A inexactidão foi melhor do que 12,1%, 11,7% e 17,4% para os controles baixo (30 ng/mL), médio (750 ng/mL) e alto (1500 ng/mL), respectivamente, para todos os analitos. A recuperação foi maior que 86,5% (controle alto do zolpidem) e o efeito da matriz melhor que -11,9% (controle baixo do etizolam). Os resultados de imprecisão, inexactidão, efeito de matriz e recuperação para cada analito são descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultados obtidos para os parâmetros de imprecisão, inexatidão, efeito de matriz e recuperação para o método quantitativo para benzodiazepínicos e sedativo-hipnótico.

Analito	Imprecisão intra-dia (%CV) (n=3)			Imprecisão inter-dia (%CV) (n=15)			Bias (%) (n=15)			Efeito matriz (%) (n=6)		Recuperação (%) (n=6)	
	CB	CM	CA	CB	CM	CA	CB	CM	CA	CB	CA	CB	CA
Alprazolam	4,2	4,1	3,2	4,3	5,0	6,0	4,3	5,7	5,7	-1,8	0,1	95,6	87,0
Bromazepam	8,9	10,4	11,1	12,6	12,0	18,2	12,1	11,7	17,4	1,9	15,5	88,0	98,1
Clonazepam	6,4	7,1	5,6	7,6	11,4	10,8	7,4	10,9	10,2	-2,7	-0,4	92,2	89,5
Diazepam	3,6	4,3	3,7	3,3	7,6	5,2	3,3	7,3	5,0	-1,6	-4,6	95,0	90,0
Etizolam	4,5	8,0	7,0	6,3	8,0	6,8	6,1	8,0	6,8	-11,9	-4,8	89,2	86,5
Flunitrazepam	3,1	6,0	4,1	3,6	8,3	8,0	3,6	8,0	7,6	2,9	0,0	93,0	89,3
Lorazepam	6,2	7,4	4,9	5,4	10,3	9,3	5,5	9,9	8,8	-9,1	0,5	91,4	88,9
Midazolam	2,7	3,8	5,6	6,8	6,2	9,7	6,4	5,9	9,3	1,9	0,2	91,0	86,7
Nitrazepam	6,3	7,0	5,5	5,6	10,3	8,0	6,2	9,9	7,7	-3,6	-0,3	97,2	92,7
Nordiazepam	3,8	5,5	5,5	5,2	11,0	10,3	5,0	10,4	9,8	-1,0	-1,5	89,8	87,9
Oxazepam	6,6	8,1	4,6	6,2	11,7	9,5	6,2	11,3	9,0	-1,6	-0,8	91,8	88,8
Temazepam	3,3	7,6	3,9	3,9	9,2	7,8	3,8	9,0	7,3	-3,4	-1,9	90,4	88,4
Zolpidem	2,5	4,1	5,8	4,3	8,2	9,9	4,1	7,8	9,5	-7,0	-1,0	88,8	86,5

CB = Controle baixo (30 ng/mL); CM = Controle médio (750 ng/mL); CA = Controle alto (1500 ng/mL)

Todos os analitos foram estáveis por pelo menos 24h em amostrador automático (10°C) após a extração, com exceção do nitrazepam. A Tabela 3 exhibe os resultados obtidos para a estabilidade pós processamento:

Tabela 3 - Resultados obtidos no estudo de estabilidade pós processamento, quando os extratos foram armazenados no amostrador automático a 10°C por 24h.

Analito	Autosampler 24 h (10°C)	
	Baixo	Alto
Alprazolam	99,0	101
Bromazepam	97,1	99,9
Clonazepam	93,2	89,0
Diazepam	80,3	100
Etizolam	95,0	97,1
Flunitrazepam	98,1	97,2
Lorazepam	99,0	100
Midazolam	96,0	101
Nitrazepam	58,7	60,7
Nordiazepam	81,4	83,8
Oxazepam	96,1	97,3
Temazepam	85,1	89,1
Zolpidem	96,2	99,6

#### 4.2.2. Aplicação do método na análise de amostras reais

Após a validação do método, foram analisadas 16 amostras reais cedidas pelo NTF/IML/SPTC. Dentre todas, apenas 09 foram positivas para 1 ou mais analitos deste método, sendo 02 substâncias encontradas acima da concentração terapêutica em uma amostra: alprazolam e zolpidem (amostra #112). A tabela a seguir (Tabela 4) exhibe os resultados obtidos nas amostras positivas, enquanto a figura (Figura 13) corresponde aos MRM obtidos para a amostra identificada como 114.

Tabela 4 - Resultados obtidos das análises de amostras reais, além da concentração terapêutica e tóxica de cada substância (26,91).

Amostra	Analito	Concentração (ng/mL)		
		Terapêutica	Tóxica	Calculada
102	Clonazepam	20 – 70	> 80	27,2
	Nordiazepam	170 – 1840	> 1000	60,9
105	Clonazepam	20 – 70	> 80	20,6
	Diazepam	100 – 2500	> 1500	15,6
108	Nordiazepam	170 – 1840	> 1000	111,9
	Diazepam	100 – 2500	> 1500	198,4
109	Midazolam	40 - 250	> 1000	90,3
110	Diazepam	100 – 2500	> 1500	30,6
	Midazolam	40 - 250	> 2400	93,7
112	Alprazolam	5 – 102	> 100	84,2
	Zolpidem	80 – 200	> 500	401,5
114	Oxazepam	500 – 2000	> 2000	11,3
	Nordiazepam	170 – 1840	> 1000	336,9
	Temazepam	300 – 900	> 1000	18,0
	Diazepam	100 – 2500	> 1500	113,6
115	Clonazepam	20 – 70	> 80	12,8
116	Nordiazepam	170 – 1840	> 1000	21,1

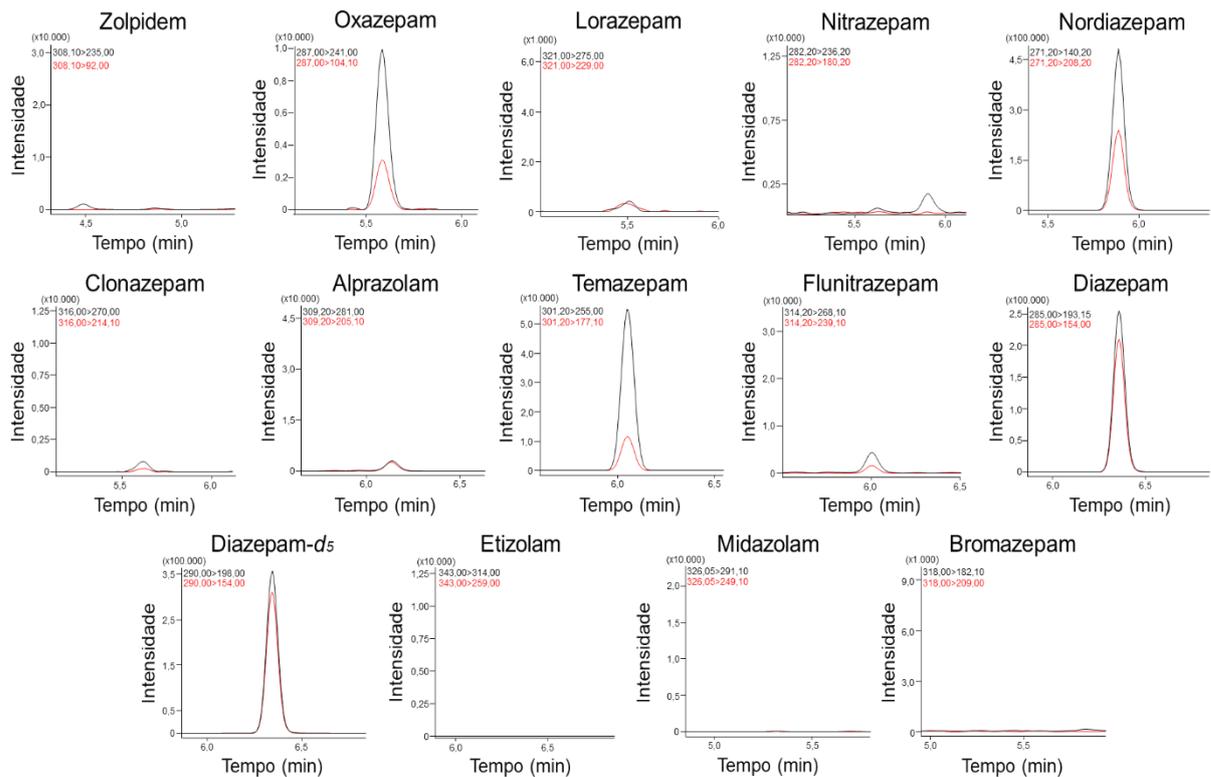


Figura 13 – Cromatograma de íons extraídos de uma amostra real de sangue *postmortem* (amostra 114, após extração pelo método citado e análise por CL-EM/EM, onde foram detectados oxazepam (11,3 ng/mL), nordiazepam (336,9 ng/mL), temazepam (18,0 ng/mL) e diazepam (113,6 ng/mL). **Créditos à autora.**

A presença de mais de um analito em uma amostra (Tabela 4 e Figura 13) pode ser devido à presença de produtos de biotransformação do benzodiazepínicos usado pelo indivíduo. O diazepam é metabolizado em nordiazepam por uma reação de desmetilação ou em temazepam por hidroxilação e, posteriormente em oxazepam por desmetilação do temazepam ou hidroxilação do nordiazepam (Figura 14) (14,26,92,93).

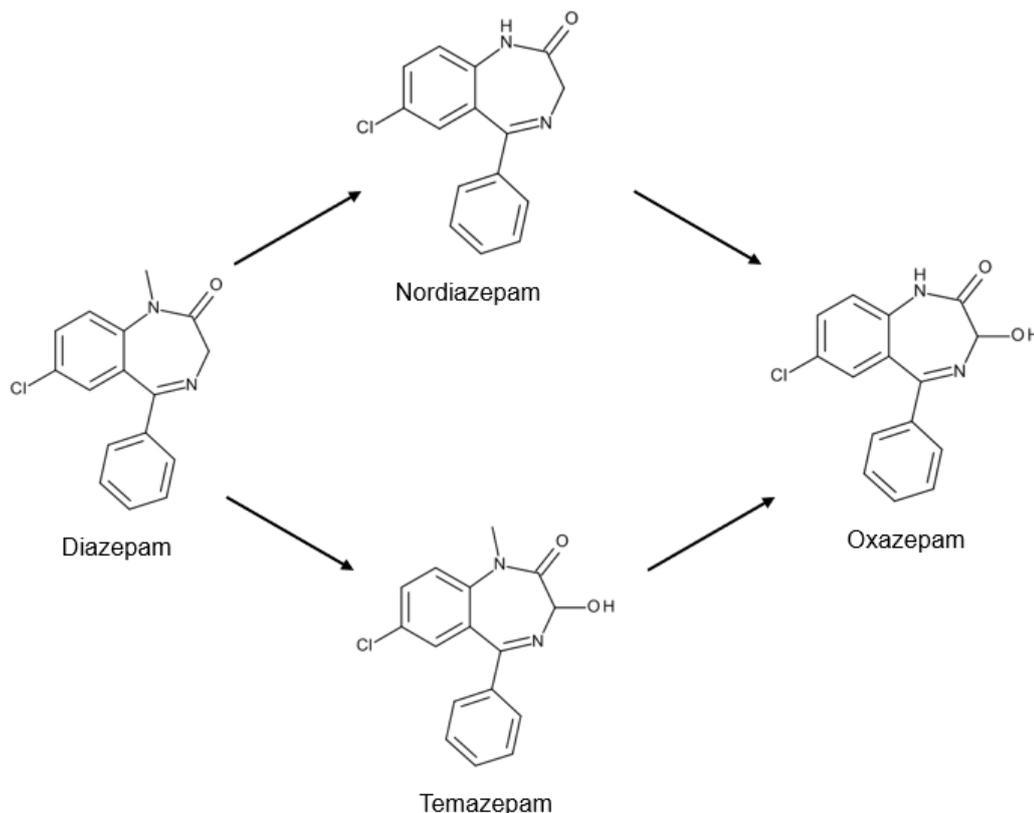


Figura 14 – Biotransformação do diazepam, originando o nordiazepam, temazepam e oxazepam. Ilustração baseada em Dorta et al (2018) (26) e Luk et al (2014) (93).

### 4.3. Desenvolvimento e validação de método analítico quantitativo baseado em extração por precipitação de proteínas para análise fentanil e seus análogos em amostras de sangue *postmortem*

#### 4.3.1. Otimização e validação do método analítico

Os parâmetros do espectrômetro de massas foram otimizados para os nove analitos de interesse (fentanil, sete análogos e um padrão interno deuterado), de modo a oferecer a melhor seletividade e sensibilidade.

Baseando-se na literatura e através injeção de padrões certificados de cada analito diretamente na fonte ESI, foram determinados os íons precursores e íons produtos (um íon qualificador e pelo menos um íon quantificador). As voltagens do Q1

*pre bias*, CE e Q2 *pre bias* foram otimizadas através de ferramentas do software LabSolutions. Posteriormente, a coluna cromatográfica foi colocada no equipamento e os mesmos padrões foram injetados, a fim de verificar o tempo de retenção de cada substância. A Tabela 5 mostra as condições otimizadas de MRM, voltagens e tempo de retenção para cada um dos analitos de interesse e padrão interno.

Tabela 5 - Condições otimizadas de MRM e tempos de retenção do fentanil, seus análogos e padrão interno para o método quantitativo por CL-EM/EM.

Analito	MRM ( <i>m/z</i> )	Q1 Pre bias (V)	CE (V)	Q3 Pre bias (V)	Tempo de retenção (min)
Acetil norfentanil	<u>219,1 &gt; 84,1</u>	-16	-19	-15	6,17
	219,1 > 55,1	-16	-34	-21	
Cocaína- <i>d</i> <sub>3</sub>	<u>307,0 &gt; 185,0</u>	-15	-20	-19	7,19
	307,0 > 85,0	-15	-33	-16	
Acetilfentanil	<u>323,3 &gt; 105,2</u>	-17	-40	-19	7,51
	323,3 > 188,2	-10	-24	-12	
Tiofentanil	<u>343,1 &gt; 111,0</u>	-13	-35	-19	7,82
	343,1 > 194,1	-25	-22	-19	
Acrilfentanil	<u>335,3 &gt; 188,2</u>	-17	-39	-18	7,87
	335,3 > 105,1	-17	-23	-20	
Furanil fentanil	<u>375,3 &gt; 105,1</u>	-19	-40	-20	7,92
	375,3 > 188,2	-11	-24	-12	
Fentanil	<u>337,3 &gt; 188,1</u>	-10	-25	-19	8,01
	337,3 > 105,1	-10	-42	-10	
Carfentanil	<u>395,3 &gt; 335,1</u>	-20	-19	-22	8,19
	395,3 > 113,2	-11	-30	-11	
Valerilfentanil	<u>365,2 &gt; 188,2</u>	-14	-43	-20	8,85
	365,2 > 105,1	-18	-25	-18	

Íon quantificador está sublinhado; MRM = *multiple reaction monitoring*; CE = *collision energy*

O método validado foi capaz de quantificar o fentanil e 7 análogos com limites de detecção e quantificação de 1 ng/mL. Os pontos da curva de calibração, controles e solução de padrão interno foram preparados através da adição de 25 µL de solução trabalho a 250 µL de sangue *postmortem* branco, previamente analisado para diversos medicamentos e drogas de abuso. A curva de calibração foi de 1 a 100 ng/mL (1, 5, 10, 30, 50 e 100 ng/mL), o fator de ponderação com menor somatório dos erros residuais da regressão ( $\Sigma RE\%$ ) foi 1/x para a maioria dos analitos, obtendo

coeficientes de correlação ( $r$ ) > 0,99 e exatidão para todos os pontos melhor do que  $\pm 20\%$ .

Nenhuma contaminação cruzada (*carryover*) foi observada nas amostras brancas de sangue *postmortem* analisadas após o limite superior de quantificação 100 ng / mL. Também não foram observados nenhum interferente endógeno ou exógeno. A especificidade do método foi determinada avaliando quarenta e seis fármacos e drogas de abuso, nenhuma interferência foi observada. As Figuras 15 e 16 mostram os cromatogramas com precursor e íons obtidos para cada analito do método no LQ e uma amostra negativa, respectivamente.

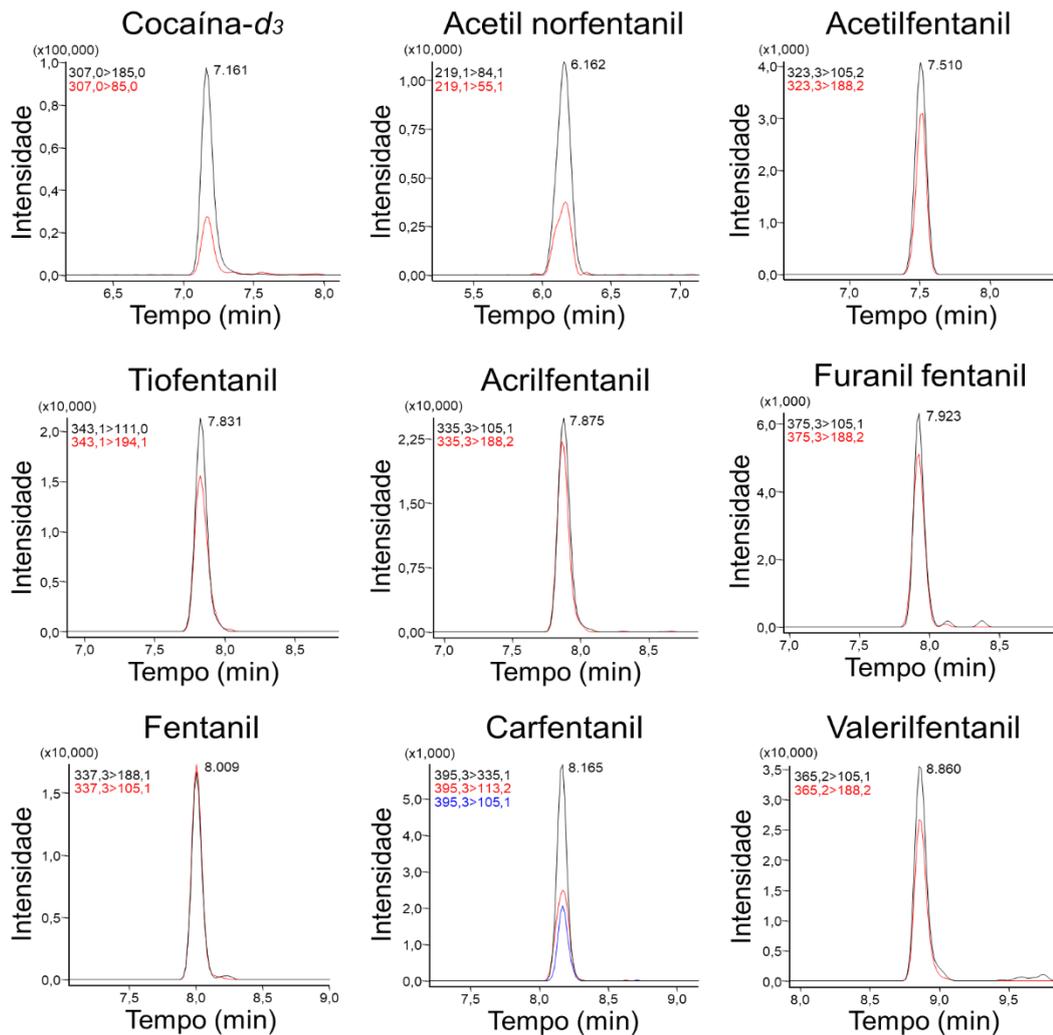


Figura 15 - Cromatogramas de íons extraídos de amostra de sangue *postmortem* negativa adicionada dos analitos no limite de quantificação (1 ng/mL), e submetida ao preparo de amostras do método citado e análise por CL-EM/EM. **Créditos à autora.**

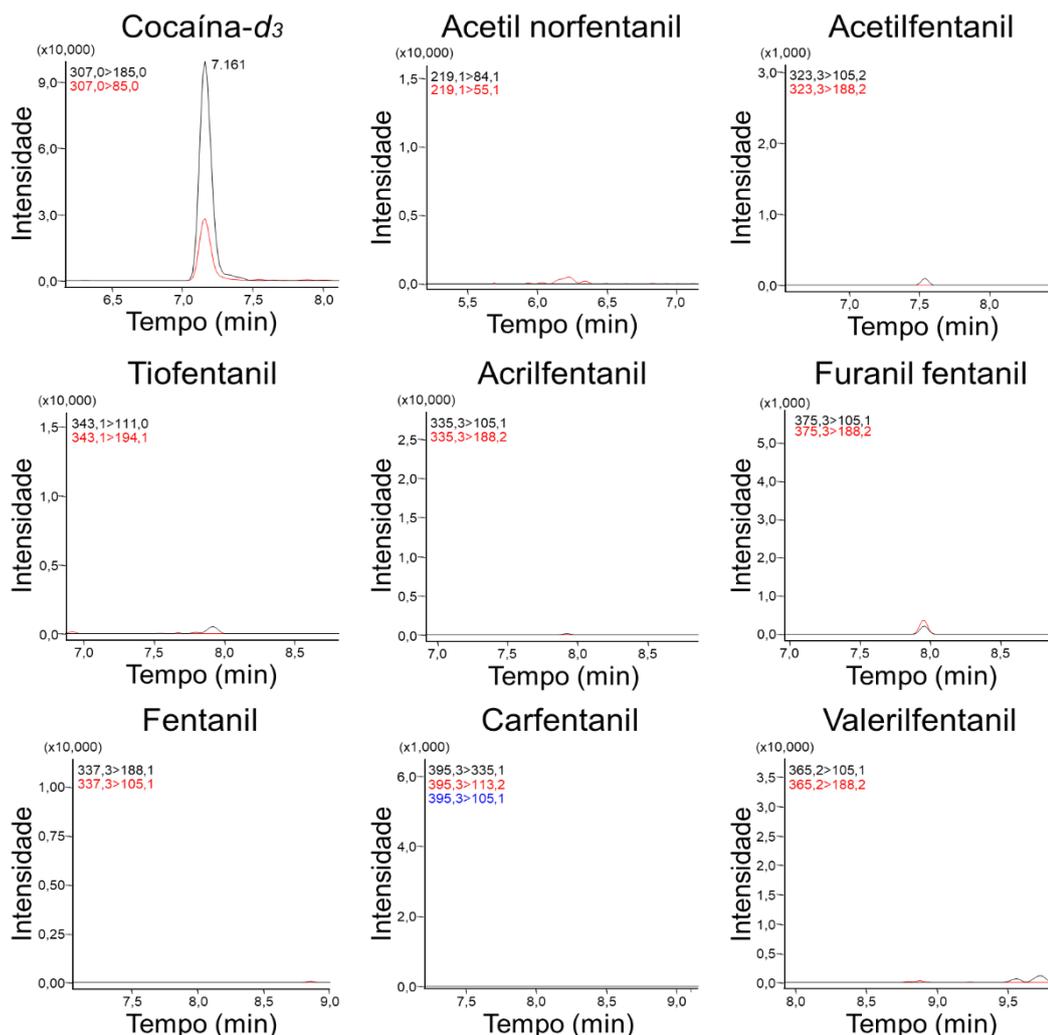


Figura 16 – Cromatogramas de íons extraídos obtidos de uma amostra negativa de sangue *postmortem*, após extração pelo método citado e análise por CL-EM/EM. **Créditos à autora.**

As imprecisões intra-dia e inter-dia foram melhores que 13,8% e 10,7%, respectivamente, sendo ambos obtidos para o controle baixo (3 ng/mL) do acetil fentanil. A inexactidão foi inferior a -10,7%, 7,9% e 7,5% para os controles baixo (3 ng/mL), médio (25 ng/mL) e alto (75 ng/mL) do acetil norfentanil, respectivamente. A recuperação foi superior a 58% (controle alto do fentanil) e o efeito da matriz, 11,1% (controle alto do acetil fentanil). Os resultados de imprecisão, inexactidão, efeito de matriz e recuperação para cada analito são descritos na Tabela 6.

Tabela 6 - Resultados de imprecisão, inexatidão, efeito de matriz e recuperação para o fentanil e 7 análogos.

Analito	Imprecisão intra-dia (%CV) (n=3)			Imprecisão inter-dia (%CV) (n=15)			Inexatidão (%) (n=15)			Efeito matriz (%) (n=6)		Recuperação (%) (n=6)	
	CB	CM	CA	CB	CM	CA	CB	CM	CA	CB	CA	CB	CA
Acetil norfentanil	10,3	6,9	6,7	8,9	5,3	6,7	-10,7	-7,9	-7,5	-1,73	3,86	62,4	58,9
Acetilfentanil	13,8	8,1	6,8	10,7	8,6	9,0	4,95	2,24	2,94	1,41	11,14	58,9	60,2
Tiofentanil	12,1	7,3	7,8	9,4	5,1	5,9	2,82	-0,83	-1,66	3,04	7,17	61,4	58,3
Acrilfentanil	11,0	9,0	9,5	10,5	7,1	8,9	0,85	5,22	3,38	8,43	7,25	63,5	60,6
Furanil fentanil	11,7	9,7	6,6	9,3	7,4	7,9	0,6	5,3	3,9	6,06	7,30	61,0	60,1
Fentanil	10,8	8,7	7,3	10,5	5,9	6,5	2,48	3,77	4,40	6,78	9,99	61,3	58,0
Carfentanil	11,2	8,5	10,9	11,1	7,0	8,2	4,47	2,31	1,53	5,73	9,10	63,8	61,8
Valerilfentanil	9,6	6,2	8,5	8,3	6,4	8,0	1,00	3,17	0,24	7,99	7,38	57,7	58,5

CB = Controle baixo (3 ng/mL); CM = Controle médio (25 ng/mL); CA = controle alto (75 ng/mL)

A estabilidade foi avaliada após armazenamento por 24h e 72h em amostrador automático (estabilidade pós processamento), pois dependendo da demanda do laboratório, as amostras extraídas podem permanecer no instrumento por até 3 dias antes de serem injetadas. Sendo assim, optou-se por avaliar a estabilidade em um período maior do que o previsto pelo laboratório. A Tabela 7 exibe os resultados obtidos para a estabilidade:

Tabela 7 - Resultados obtidos para o parâmetro de estabilidade após armazenamento por 24h e 72h no amostrador automático do CL-EM/EM.

Analito	Autosampler 24 h		Autosampler 72 h	
	CB	CA	CB	CA
Acetil norfentanil	100,4	93,9	102,5	98,2
Acetil fentanil	91,9	97,4	104,2	109,4
Tiofentanil	95,3	92,0	103,7	95,8
Acrilfentanil	101,1	97,9	109,9	109,9
Furanil fentanil	102,3	99,8	111,2	112,3
Fentanil	103,0	99,3	88,9	98,5
Carfentanil	112,2	103,9	123,9	98,4
Valerilfentanil	93,1	95,4	97,7	100,6

CB = Controle baixo (3 ng/mL); CM = Controle médio (25 ng/mL); CA = controle alto (75 ng/mL)

#### 4.3.2. Aplicação do método na análise de amostras reais

O método foi aplicado por quatro meses na rotina do Núcleo de Toxicologia Forense do Instituto Médico Legal, Superintendência da Polícia Técnico-científica de São Paulo, sendo o fentanil o opioide mais encontrado nas amostras de sangue *postmortem*. Essa substância foi detectada em 79 amostras (45,4% das identificações positivas entre os opioides), em concentrações entre 1,0 e 18,7 ng/mL. Apenas 1 caso de acetil norfentanil foi identificado (11,8 ng/mL), e nenhuma amostra estava acima da concentração terapêutica para esses analitos. A Figura 15 mostra os cromatogramas de monitoramento de reação múltipla (MRM) de uma amostra positiva para fentanil.

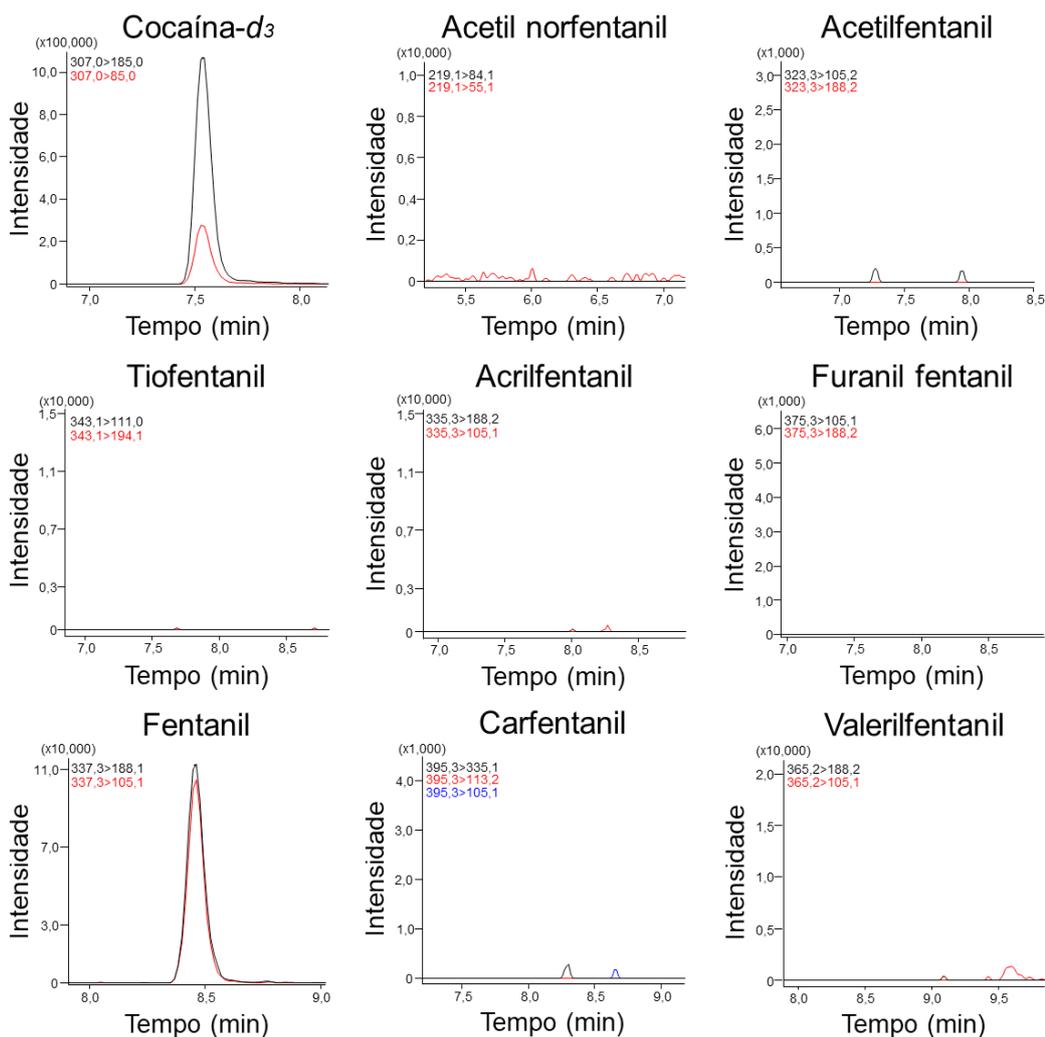


Figura 17 - Cromatograma de íons extraídos de uma amostra real de sangue *postmortem* (amostra 79) analisada com o método proposto, onde foi detectada a presença de fentanil (4,4 ng/mL). **Créditos à autora.**

O fentanil é usado como anestésico em cirurgias hospitalares, e a maioria das amostras também é positiva para midazolam, uma combinação comumente utilizada para sedações em ambiente hospitalar. Como observamos apenas concentrações dentro da faixa terapêutica, acreditamos não poder classificar as 79 amostras positivas como abuso dessa substância. Além disso, as drogas mais consumidas na América do Sul são a cannabis, seguida da cocaína, enquanto os opioides e opiáceos ocupam o quinto e o sexto lugar, respectivamente, em prevalência de consumo (2).

## 5. DISCUSSÃO GERAL

Devido a crescente necessidade de métodos sensíveis, seletivos, que utilizem reduzido volume de solventes orgânicos e que permitam a automação para a toxicologia analítica, foram desenvolvidos e validados três métodos analíticos capazes de quantificar um total de 49 (quarenta e nove) SPA, com o objetivo de realizar uma análise crítica e avaliar a viabilidade do uso de técnicas emergentes de preparo de amostras nas análises toxicológicas realizadas em amostras biológicas *postmortem*. As substâncias de interesse foram escolhidas quanto à casuística relatada pelo CIATox de Campinas, NTF/IML/SPTC e IAPF.

Todos os analitos obtiveram valores aceitos para os parâmetros avaliados durante as validações dos métodos, com exceção do efeito de matriz da olanzapina no controle alto (37,3%) e levomepromazina (28,6% e 27,5% para os controles baixo e alto, respectivamente). Apesar dos resultados obtidos acima dos 25% previsto pelo SWGTOX, os valores foram considerados aceitos pois apresentaram imprecisão e inexatidão abaixo  $\pm 20\%$  (vide item 4.3 – *Results and Discussion, table II*).

Quanto à baixa estabilidade de alguns analitos, a literatura descreve os fármacos olanzapina e bupropiona como instáveis. De acordo com Bishop-Freeman e colaboradores (94), após 30 dias, a bupropiona degradou à temperatura ambiente, mas amostras armazenadas em freezer apresentaram maior estabilidade. A degradação da olanzapina varia de acordo com a matriz de escolha e condições físicas de armazenamento. Andreassen e colaboradores (95) observaram que a exposição aos raios ultravioleta causa degradação significativa, recomendando que as amostras fossem protegidas da luz. Infelizmente, durante a realização deste trabalho, a extração das amostras foi realizada na bancada com exposição direta à luz. Uma alternativa é a análise de produtos de biotransformação que apresentam maior estabilidade.

Em comparação com estudos publicados (96–99) que utilizaram uma modificação ou miniaturização do QuEChERS para extração de amostras de sangue total ou *postmortem*, a técnica utilizada nesse trabalho obteve melhor recuperação, porém foi menos exato, mais impreciso para análises interdita e obteve valores aproximados de imprecisão intradia. As diferenças na exatidão e precisão podem ter ocorrido por variações no equipamento ou por influência na pipetagem do analista de um dia para outro. O efeito matriz foi superior do que na maioria dos estudos

comparados: Usui e colaboradores (96) também analisaram levomepromazina e olanzapina e, apesar de valores abaixo de  $\pm 25\%$ , esses analitos também foram responsáveis pelos maiores valores para esse parâmetro. Orfanidis e colaboradores (99) obtiveram valores menores para de efeito matriz em relação à olanzapina, porém outros analitos como bupropiona, citalopram e zolpidem, resultaram em valores acima de  $\pm 25\%$ . As diferenças nas etapas de extração entre esse trabalho e os demais foram: adição do sal após a transferência do sangue para o tubo de polipropileno (97–99), proporção entre amostra e solvente utilizado para precipitação de proteínas (96–98), utilização combinação diferente de sal de QuEChERS (98,99), execução da etapa de limpeza (96,97) e secagem da amostra com posterior ressuspensão antes da injeção (98). Outra característica importante apresentada pelo micro-QuEChERS é a utilização de menores volumes de amostra - o que é particularmente importante em casos de amostras de casos forenses que possuam baixo volume de sangue disponível, como corpos carbonizados, por exemplo – e de solventes, mostrando ser uma técnica que gera menos resíduos tóxicos e, portanto, ambientalmente mais correta.

A miniaturização do QuEChERS se mostrou uma técnica eficiente para a análise quantitativa de 42 SPA em amostras de sangue *postmortem*. A comparação entre os diferentes preparos de amostras utilizados, mostrou que o micro-QuEChERS obteve melhores valores de recuperação, acima de 85,9% contra 58% da precipitação de proteínas; extratos mais limpos, refletindo em menor necessidade de manutenção do aparelho e maior vida útil da coluna cromatográfica; utilização de menor volume de solvente extrator; e, utilização de menor volume de amostra. O tempo dispendido nas duas técnicas de preparo são similares, quando da aquisição de sais para o micro-QuEChERS já separados em tubos de polipropileno, do contrário, a miniaturização se mostra mais demorada devido ao preparo da mistura dos sais e posterior pesagem.

Ademais, o protocolo de preparo por micro-QuEChERS obteve boa correlação e inexatidão ( $<17,3\%$ ) na análise de controles certificados de antidepressivos tricíclicos em plasma, mostrando que essa técnica também pode ser aplicada em amostras de *in vivo*.

## 6. CONCLUSÃO

Foi desenvolvido um método analítico quantitativo com preparo de amostras baseado em precipitação de proteínas para análise de fentanil e seus análogos em amostras de sangue *postmortem* por CL-EM/EM. Quando aplicado a amostras reais, o método se mostrou eficiente para a análise das 8 substâncias. Ademais, dois métodos analíticos quantitativos baseados na técnica de extração por micro-QuEChERS para análise de 1) antidepressivos, antipsicóticos e seus produtos de biotransformação e 2) benzodiazepínicos, sedativo-hipnótico e seus produtos de biotransformação em amostras de sangue *postmortem* por CL-EM/EM também foram desenvolvidos e validados. Os métodos baseados na técnica de micro-QuEChERS foram aplicados à análise de amostras reais doadas pelo NTF/IML/SPTC e/ou IAPF, comprovando a eficiência para a análise das diferentes classes de SPA e sua possível aplicabilidade à rotina desses laboratórios de toxicologia forense.

Quando comparado à precipitação de proteínas, o micro-QuEChERS utiliza menores volumes de amostra e solventes extratores e, por isso, é uma técnica mais ambientalmente correta por produzir menos resíduos. O método de micro-QuEChERS obteve melhores valores de recuperação (eficiência de extração) do que outros estudos que utilizem o QuEChERS para amostras de sangue total ou do que a precipitação de proteínas, além de fornecer extratos mais limpos quando comparado à esta última. Também há maior facilidade de transferência do extrato para o frasco de vidro âmbar e posterior análise, uma vez que resulta em uma melhor separação entre as fases orgânica e aquosa.

## 7. REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. WHO.pdf [Internet]. Management of substance abuse, terminology and classification. 2017. Available from: [http://www.who.int/substance\\_abuse/terminology/psychoactive\\_substances/en/](http://www.who.int/substance_abuse/terminology/psychoactive_substances/en/)
2. UNODC. World drug report 2020 [Internet]. Vienna; 2020 [cited 2021 Apr 19]. Available from: <https://wdr.unodc.org/wdr2020>
3. United Nations. Prevention of suicide guidelines for the formulation and implementation of national strategies. New York; 1996.
4. Moeller FG, Barratt ES, Dougherty DM, Schmitz JM SA. Psychiatric aspects of impulsivity. *Am J Psychiatry*. 2001;11:1783–93.
5. Oga S.; Camargo M. M. A.; Batistuzzo J. A. O. Fundamentos da toxicologia. 4th ed. São Paulo: Atheneu; 2014.
6. Institute for Health Metrics and Evaluation. Global Health Data Exchange [Internet]. [cited 2022 Jan 5]. Available from: <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool>
7. Organização Pan-Americana da Saúde. Depressão [Internet]. [cited 2022 Jan 3]. Available from: <https://www.paho.org/pt/topicos/depressao>
8. World Health Organization. Global Health Estimates: Life expectancy and leading causes of death and disability [Internet]. 2019 [cited 2022 Jan 4]. Available from: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates>
9. Henriksson S, Boëthius G, Isacson G. Suicides are seldom prescribed antidepressants: findings from a prospective prescription database in Jämtland county, Sweden, 1985–95. *Acta Psychiatrica Scandinavica*. 2001;103:301–6.
10. Truta L, Castro AL, Tarelho S, Costa P, Sales MGF, Teixeira HM. Antidepressants detection and quantification in whole blood samples by GC–MS/MS, for forensic purposes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2016 Sep 5;128:496–503.
11. Manousi N, Samanidou VF. Recent Advances in the HPLC Analysis of Tricyclic Antidepressants in Bio-Samples. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2019 Jun 27;20(1):24–38.
12. Winecker RE. Quantification of Antidepressants Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. In: Garg U, Hammett-Stabler CA, editors. *Methods in Molecular Biology - Clinical Applications of Mass Spectrometry Methods and Protocols*. New York: Humana Press; 2010.
13. Secretária de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde. Portaria N° 344 - Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial [Internet]. Brasil; May 12, 1998. Available from: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/1998/prt0344\\_12\\_05\\_1998\\_rep.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/1998/prt0344_12_05_1998_rep.html)
14. Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC. *As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman*. 12ª. AMGH; 2012.

15. Marasine NR, Sankhi S, Lamichhane R, Marasini NR, Dangi NB. Use of Antidepressants among Patients Diagnosed with Depression: A Scoping Review. Vol. 2021, BioMed Research International. Hindawi Limited; 2021.
16. Boyce P, Ma C. Choosing an antidepressant. *Australian Prescriber*. 2021 Feb 1;44(1):12–5.
17. Huang C-H, Chen C-M, Hsu K-Y, Wang LC, Chen S-Y, Lee C-F. The Prescription Pattern and Analyses of Antidepressants under the National Health Insurance Policy in Taiwan [Internet]. Vol. 25, • 76 • *Taiwanese Journal of Psychiatry (Taipei)*. 2011. Available from: <http://www.nhri.org.tw/nhird/en>
18. Milea D, Verpillat P, Guelfucci F, Toumi M, Lamure M. Prescription patterns of antidepressants: Findings from a US claims database. *Current Medical Research and Opinion*. 2010 Jun;26(6):1343–53.
19. Fernández P, Taboada V, Regenjo M, Morales L, Alvarez I, Carro AM, et al. Optimization of ultrasound assisted dispersive liquid-liquid microextraction of six antidepressants in human plasma using experimental design. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2016 May 30;124:189–97.
20. Ito R, Ushiro M, Takahashi Y, Saito K, Ookubo T, Iwasaki Y, et al. Improvement and validation the method using dispersive liquid-liquid microextraction with in situ derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometry for determination of tricyclic antidepressants in human urine samples. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2011 Dec 1;879(31):3714–20.
21. Harbell MW, Dumitrascu C, Bettini L, Yu S, Thiele CM, Koyyalamudi V. Anesthetic Considerations for Patients on Psychotropic Drug Therapies. *Neurology International*. 2021 Nov 29;13(4):640–58.
22. Rang H, Dale M, Ritter J, Flower R. *Pharmacology*. 6th ed. London: Elsevier; 2008.
23. Abernethy DR, Greenblatt DJ, Shader RI. Trimipramine is a tricyclic antidepressant with efficacy in. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 1983;35(5):348–53.
24. European Medicines Agency. ANEXO III - RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO. Amsterdam; 2003.
25. Canadian Institutes of Health Research, Alberta Innovates, The Metabolomics Innovation Centre. Drugbank online [Internet]. [cited 2022 Mar 31]. Available from: <https://go.drugbank.com/>
26. Miranda HF, Noriega V, Sierralta F, Sotomayor-Zárate R, Prieto JC. Risperidone in analgesia induced by paracetamol and meloxicam in experimental pain. *Fundamental & Clinical Pharmacology* [Internet]. 2022 Jan 6; Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/fcp.12754>
27. Dietz I, Schmitz A, Lampey I, Schulz C. Evidence for the use of Levomepromazine for symptom control in the palliative care setting: A systematic review. Vol. 12, *BMC Palliative Care*. 2013.
28. Fragou D, Dotsika S, Sarafidou P, Samanidou V, Njau S, Kovatsi L. Atypical antipsychotics: Trends in analysis and sample preparation of various biological samples. Vol. 4, *Bioanalysis*. 2012. p. 961–80.

29. Chen X, van Gerven J, Cohen A, Jacobs G. Human pharmacology of positive GABA-A subtype-selective receptor modulators for the treatment of anxiety. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2019 May 1;40(5):571–82.
30. Degreef M, Viets L, Berry EM, Maudens KEK, van Nuijs ALN. Quantification of 54 Benzodiazepines and Z-Drugs, Including 20 Designer Ones, in Plasma. *J Anal Toxicol*. 2021 Feb 13;45(2):141–53.
31. Gunn J, Kriger S, Terrell AR. Simultaneous Determination and Quantification of 12 Benzodiazepines in Serum or Whole Blood Using UPLC/MS/MS. In: Garg U, Hammett-Stabler CA, editors. *Methods in Molecular Biology - Clinical Applications of Mass Spectrometry Methods and Protocols*. New York: Humana Press; 2010.
32. Rohrig TP, Harryman LA, Norton MC. Identification and Quantitation of Zolpidem in Biological Matrices Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). In: Garg U, Hammett-Stabler CA, editors. *Methods in Molecular Biology - Clinical Applications of Mass Spectrometry Methods and Protocols*. New York: Humana Press; 2010.
33. Sonne J, Dossing M, Vollmer-Larsen A, Olesen KL, Victor M, Andreasen F, et al. Bioavailability and Pharmacokinetics of Oxazepam. Vol. 35, *Eur J Clin Pharmacol*. 1988.
34. Schwarz HJ. PHARMACOKINETICS AND METABOLISM OF TEMAZEPAM IN MAN AND SEVERAL ANIMAL SPECIES. Vol. 8, *J. clin. Pharmacol*. 1979.
35. Erhorn S. Nordazepam.
36. Martinotti G, Lupi M, Acciavatti T, Cinosi E, Santacroce R, Signorelli MS, et al. Research article: Novel psychoactive substances in young adults with and without psychiatric comorbidities. *BioMed Research International*. 2014;2014.
37. UNODC. UNODC early warning advisory on new psychoactive substances [Internet]. 2020 [cited 2020 Feb 11]. Available from: <https://www.unodc.org/LSS/Page/NPS>
38. Instituto Nacional de Criminalística da Polícia Federal. Relatório 2020 - Drogas sintéticas. 2021.
39. Rodda LN, Pilgrim JL, Rago M di, Crump K, Gerostamoulos D, Drummer OH. A cluster of fentanyl-laced heroin deaths in 2015 in Melbourne, Australia. *Journal of Analytical Toxicology*. 2017;41(4):318–24.
40. Wu F, Slawson MH, Johnson-Davis KL. Metabolic patterns of fentanyl, meperidine, methylphenidate, tapentadol and tramadol observed in urine, serum or plasma. *Journal of Analytical Toxicology*. 2017;41(4):289–99.
41. Goldberger BA, Chronister CW, Merves ML. Quantitation of Fentanyl in Blood and Urine Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). In: Garg U, Hammett-Stabler CA, editors. *Methods in Molecular Biology - Clinical Applications of Mass Spectrometry Methods and Protocols*. New York: Humana Press; 2010.
42. Bakovic M, Nestic M, Mayer D. Death by band-aid\_ fatal misuse of transdermal fentanyl patch. *International Journal of Legal Medicine*. 2015;129(6):1247–52.
43. Ruzycki S, Yarema M, Dunham M, Sadrzadeh H, Tremblay A. Intranasal Fentanyl Intoxication Leading to Diffuse Alveolar Hemorrhage. *Journal of Medical Toxicology*. 2016;12(2):185–8.

44. Yamanaka T, Sadikot RT. Opioid effect on lungs. *Respirology*. 2013;18(2):255–62.
45. Gillis A, Kliewer A, Kelly E, Henderson G, Christie MJ, Schulz S, et al. Critical Assessment of G Protein-Biased Agonism at the  $\mu$ -Opioid Receptor. Vol. 41, *Trends in Pharmacological Sciences*. Elsevier Ltd; 2020. p. 947–59.
46. Biedrzycki OJ, Bevan D, Lucas S. Fatal overdose due to prescription fentanyl patches in a patient with sickle cell/ $\beta$ -thalassemia and acute chest syndrome: A case report and review of the literature. *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*. 2009;30(2):188–90.
47. Swanson DM, Hair LS, Rivers SRS, Smyth BC, Brogan SC, Ventoso AD, et al. Fatalities involving carfentanil and furanyl fentanyl: Two case reports. *Journal of Analytical Toxicology*. 2017;41(6):498–502.
48. Ruan X, Chiravuri S, Kaye AD. Fentanyl–Norfentanyl Concentrations During Transdermal Patch Application: LC–MS–MS Urine Analysis. *Journal of Analytical Toxicology*. 2016;2–3.
49. Ruan X, Chiravuri S, Kaye AD. Toxicological testing when evaluating fatal cases suspected of acute fentanyl toxicity. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*. 2016;12(3):363–5.
50. Poklis J, Poklis A, Wolf C, Hathaway C, Arbefeville E, Chrostowski L, et al. Two fatal intoxications involving butyryl fentanyl. *Journal of Analytical Toxicology*. 2016;40(8):703–8.
51. McIntyre IM, Trochta A, Gary RD, Wright J, Mena O. An acute butyr-fentanyl fatality: A case report with postmortem concentrations. *Journal of Analytical Toxicology*. 2016;40(2):162–6.
52. Fort C, Curtis B, Nichols C, Niblo C. Acetyl fentanyl toxicity: Two case reports. *Journal of Analytical Toxicology*. 2016;40(9):754–7.
53. Cunningham SM, Haikal NA, Kraner JC. Fatal Intoxication with Acetyl Fentanyl. *Journal of Forensic Sciences*. 2016;61(January):276–80.
54. UNODC. Global Smart Update: Fentanyl and its analogues-50 years on [Internet]. Vienna; 2017. Available from: [https://www.unodc.org/documents/scientific/Global\\_SMART\\_Update\\_17\\_web.pdf](https://www.unodc.org/documents/scientific/Global_SMART_Update_17_web.pdf)
55. Sofalvi S, Schueler HE, Lavins ES, Kaspar CK, Brooker IT, Mazzola CD, et al. An LC-MS-MS method for the analysis of carfentanil, 3-methylfentanyl, 2-furanyl fentanyl, acetyl fentanyl, fentanyl and norfentanyl in postmortem and impaired-driving cases. *Journal of Analytical Toxicology*. 2017;41(6):473–83.
56. Shanks KG, Behonick GS. Detection of carfentanil by LC-MS-MS and reports of associated fatalities in the USA. *Journal of Analytical Toxicology*. 2017;41(6):466–72.
57. Seither J, Reidy L. Confirmation of carfentanil, U-47700 and other synthetic opioids in a human performance case by LC-MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology*. 2017;41(6):493–7.
58. Globo - g1. Cocaína “envenenada” que causou mortes na Argentina tinha anestésico para elefantes. 2022 Feb 10 [cited 2022 Apr 2]; Available from: <https://g1.globo.com/mundo/noticia/2022/02/10/cocaina-envenenada-que-causou-mortes-na-argentina-tinha-anestesico-para-elefantes.ghtml>

59. BBC News. O que é carfentanil, anestésico para elefantes encontrado na cocaína adulterada que matou 24 na Argentina. 2022 Feb 11 [cited 2022 Apr 2]; Available from: <https://www.bbc.com/portuguese/internacional-60346713>
60. Moreau R. L. M. SMEPB. Toxicologia analítica - Ciências Farmacêuticas. 1st ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011.
61. Dorta DJ, Yonamine M, Costa JL, de Martinis BS. Toxicologia Forense. 5ª ed. São Paulo: Blucher; 2018.
62. Costa JL. Eletroforese capilar como ferramenta analítica para toxicologia forense. [São Paulo]; 2008.
63. Bévalot F, Cartiser N, Bottinelli C, Fanton L, Guitton J. Vitreous humor analysis for the detection of xenobiotics in forensic toxicology: a review. *Forensic Toxicology*. 2016;34(1):12–40.
64. de Campos EG, da Costa BRB, dos Santos FS, Monedeiro F, Alves MNR, Santos Junior WJR, et al. Alternative matrices in forensic toxicology: a critical review. *Forensic Toxicology*. Springer Japan; 2021.
65. Elmongy H, Abdel-Rehim M. Saliva as an alternative specimen to plasma for drug bioanalysis. A review. Vol. 83, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier B.V.; 2016. p. 70–9.
66. J. FR. *Fundamentals of Analytical Toxicology*. WileyBlackwell, editor. London; 2018.
67. Laure Pélissier-Alicot A-L, Gaulier J-M, Champsaur P, Marquet P. Mechanisms Underlying Postmortem Redistribution of Drugs: A Review. *Journal of Analytical Toxicology* [Internet]. 2003;27. Available from: <https://academic.oup.com/jat/article/27/8/533/872210>
68. Yamazaki M, Wakasugi C. Postmortem changes in drug-metabolizing enzymes of rat liver microsome. *Forensic Science International*. 1994;67:155–68.
69. Tsoukali H, Raikos N, Theodoridis G, Psaroulis D. Headspace solid phase microextraction for the gas chromatographic analysis of methyl-parathion in post-mortem human samples: Application in a suicide case by intravenous injection. *Forensic Science International*. 2004;143(2–3):127–32.
70. Saar E, Gerostamoulos D, Drummer OH, Beyer J. Comparison of extraction efficiencies and LC-MS-MS matrix effects using LLE and SPE methods for 19 antipsychotics in human blood. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2009;393(2):727–34.
71. Queiroz SCN, Collins CH, Jardim ICSF. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Química Nova*. 2001;24(1):68–76.
72. Rezaee M, Assadi Y, Milani Hosseini MR, Aghaee E, Ahmadi F, Berijani S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*. 2006;1116(1–2):1–9.
73. Martins ML, Primel EG, Caldas SS, Prestes OD, Adaime MB, Zanella R. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): Fundamentos e aplicações. *Scientia Chromatographica*. 2012;4(1):29–45.

74. Moein MM, Said R, Abdel-Rehim M. Microextraction by packed sorbent. *Bioanalysis*. 2015;7(17):2155–61.
75. Jardim ICSF. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas Resumo. Vol. 2, *Scientia Chromatographica*. 2010 p. 13–25.
76. Bordin DCM, Monedeiro FF da SS, Campos EG de, Alves MNR, Bueno LHP, Martinis BS de. Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. *Scientia Chromatographica*. 2015;7(2):125–43.
77. Collins CH, Braga GL, Bonato PS. Fundamentos em cromatografia. 6th ed. Campinas: Editora Unicamp; 2017.
78. Santos-Neto AJ, Siqueira MEPB. Análise de praguicidas organofosforados em água por extração em fase sólida (SPE) utilizando discos C18 e cromatografia em fase gasosa: avaliação da contaminação do reservatório de furnas (MG-Brasil). *Quim Nova*. 2005;28(5):747–50.
79. Kole PL, Venkatesh G, Kotecha J, Sheshala R. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. Vol. 25, *Biomedical Chromatography*. 2011. p. 199–217.
80. Kole PL, Venkatesh G, Kotecha J, Sheshala R. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. Vol. 25, *Biomedical Chromatography*. 2011. p. 199–217.
81. Samanidou V, Kovatsi L, Fragou D, Rentifis K. Novel strategies for sample preparation in forensic toxicology. Vol. 3, *Bioanalysis*. 2011. p. 2019–46.
82. He Y, Concheiro-Guisan M. Microextraction sample preparation techniques in forensic analytical toxicology. *Biomedical Chromatography*. 2019;33(1):1–12.
83. Tsoukali H, Raikos N, Theodoridis G, Psaroulis D. Headspace solid phase microextraction for the gas chromatographic analysis of methyl-parathion in post-mortem human samples: Application in a suicide case by intravenous injection. *Forensic Science International*. 2004;143(2–3):127–32.
84. Barroso M, Moreno I, da Fonseca B, Queiroz JA, Gallardo E. Role of microextraction sampling procedures in forensic toxicology. Vol. 4, *Bioanalysis*. 2012. p. 1805–26.
85. Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D SFJ. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC international*. 2003;86(2):412–31.
86. Prestes OD, Adaime MB, Zanella R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. *Scientia Chromatographica*. 2011;3(1):51–64.
87. Anzillotti L, Odoardi S, Strano-Rossi S. Cleaning up blood samples using a modified “QuEChERS” procedure for the determination of drugs of abuse and benzodiazepines by UPLC-MSMS. *Forensic Science International*. 2014;243:99–106.
88. Rodrigues TB, Morais DR, Gianvecchio VAP, Aquino EM, Cunha RL, Huestis MA, et al. Development and Validation of a Method for Quantification of 28 Psychotropic

- Drugs in Postmortem Blood Samples by Modified Micro-QuEChERS and LC-MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology*. 2021 Sep 1;45(7):644–56.
89. Pouliopoulos A, Tsakelidou E, Krokos A, Gika HG, Theodoridis G, Raikos N. Quantification of 15 Psychotropic Drugs in Serum and Postmortem Blood Samples after a Modified Mini-QuEChERS by UHPLC-MS-MS. *J Anal Toxicol*. 2018;42(5):337–45.
  90. Society of Toxicological and Forensic Chemistry. Guideline for quality control in forensic-toxicological analyses. In 2018. p. 12–3.
  91. Schulz M, Iwersen-Bergmann S, Andresen H, Schmoldt A. Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1,000 drugs and other xenobiotics. *Critical Care*. 2012;16(4):R136.
  92. Springer Protocols. *Methods in Molecular Biology - Clinical Applications of Mass Spectrometry Methods and Protocols* [Internet]. Garg U, Hammett-Stabler CA, editors. Vol. 603, *Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press; 2010. Available from: [www.springer.com/series/7651](http://www.springer.com/series/7651)
  93. Luk S, Atayee RS, Ma JD, Best BM. Urinary diazepam metabolite distribution in a chronic pain population. *Journal of Analytical Toxicology*. 2014;38(3):135–42.
  94. Bishop-freeman SC, Hensel EM, Feaster MS, Winecker RE. Degradation of Bupropion : Implications for Interpretation of Postmortem Case Data. *Journal of Analytical Toxicology*. 2018;(Figure 1):525–36.
  95. Andreassen TN, Falch BMH, Spigset O. A UPLC – MSMS method for the analysis of olanzapine in serum — with particular emphasis on drug stability testing. *Journal of Chromatography B*. 2015;1006:112–20.
  96. Usui K, Hayashizaki Y, Hashiyada M, Funayama M. Rapid drug extraction from human whole blood using a modified QuEChERS extraction method. *Legal Medicine*. 2012 Nov;14(6):286–96.
  97. Campêlo J de M, Rodrigues TB, Costa JL, Santos JM. Optimization of QuEChERS extraction for detection and quantification of 20 antidepressants in postmortem blood samples by LC-MS/MS. *Forensic Science International*. 2021 Feb 1;319.
  98. da Silva CP, Dal Piaz LPP, Gerbase FE, Müller VV, Lizot L de LF, Antunes MV, et al. Simple extraction of toxicologically relevant psychotropic compounds and metabolites from whole blood using mini-QuEChERS followed by UPLC–MS/MS analysis. *Biomedical Chromatography*. 2021 Sep 1;35(9).
  99. Orfanidis A, Gika HG, Theodoridis G, Mastrogrianni O, Raikos N. A UHPLC-MS-MS Method for the Determination of 84 Drugs of Abuse and Pharmaceuticals in Blood. *Journal of Analytical Toxicology*. 2021 Jan 1;45(1):28–43.

## 8. APÊNDICES

### 8.1. Artigo publicado

Além do projeto apresentado à Comissão do Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciência Médicas, Universidade Estadual de Campinas (FCM/Unicamp), durante o doutorado também foi desenvolvido um trabalho em parceria com a Polícia Federal (PF) e com a SPTC, a fim de avaliar o perfil de agonistas sintéticos de receptores canabinoides (SCRAs) em papéis apreendidos em prisões brasileiras. Cinquenta e seis amostras apreendidas entre 2016 e 2020 foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier utilizando um sensor de reflectância total atenuada (FTIR-ATR), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (LC-QTOF) ou ressonância magnética nuclear (RMN). A maioria das apreensões ocorreram entre 2019-2020, sendo identificados 6 diferentes SCRAs com prevalência de indazol-3-carboxamidas (MDMB-4en-PINACA) e indol-3-carboxamidas (5F-MDMB-PICA), assim como observados na Europa e EUA. Acreditamos que os dados sobre a prevalência dos SCRAs em prisões podem ajudar na determinação dos riscos de segurança, proteção e saúde levando a efeitos positivos tanto para os presos, quanto funcionários e o próprio ambiente prisional.

Os resultados deste trabalho foram publicados na revista *Forensic Toxicology* [V. 40, pg. 119–124, 2022], <https://doi.org/10.1007/s11419-021-00586-7>. Essa foi a primeira publicação Latino-americana a discutir o perfil de SCRAs em apreensões do sistema penitenciário. O texto do manuscrito publicado será apresentado a seguir.

Forensic Toxicology (2022) 40:119–124  
<https://doi.org/10.1007/s11419-021-00586-7>



SHORT COMMUNICATION



### Synthetic cannabinoid receptor agonists profile in infused papers seized in Brazilian prisons

Taís B. Rodrigues<sup>1</sup> · Mônica P. Souza<sup>2</sup> · Lilian de Melo Barbosa<sup>3</sup> · Júlio de Carvalho Ponce<sup>3</sup> · Luiz F. Neves Júnior<sup>3</sup> · Maurício Yonamine<sup>4</sup> · Jose Luiz Costa<sup>1,5</sup> 

Received: 9 May 2021 / Accepted: 12 June 2021 / Published online: 29 June 2021  
© Japanese Association of Forensic Toxicology 2021

## **Synthetic cannabinoid receptor agonists profile in infused papers seized in Brazilian prisons**

Taís B. Rodrigues<sup>1</sup>, Mônica P. Souza<sup>2</sup>, Lilian de Melo Barbosa<sup>3</sup>, Júlio de Carvalho Ponce<sup>3</sup>, Luiz F. Neves Júnior<sup>3</sup>, Maurício Yonamine<sup>4</sup>, Jose Luiz Costa<sup>1,5\*</sup>

<sup>1</sup>Campinas Poison Control Center, University of Campinas, Campinas, SP 13083 859, Brazil

<sup>2</sup>National Institute of Criminalistics, Brazilian Federal Police, Brasília, DF 70610-200, Brazil

<sup>3</sup>Superintendence of the Technical-Scientific Police, Institute of Criminalistics, São Paulo, SP 05507-060, Brazil

<sup>4</sup>School of Pharmaceutical Sciences, University São Paulo, São Paulo, SP 05508-000, Brazil

<sup>5</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Campinas, Campinas, SP 13083 871, Brazil

\*Corresponding author:

Prof. Dr. Jose Luiz Costa

Phone: +55 19 3521 7232

Fax: +55 19 3521 7592

E-mail address: [jose.jlc@fcf.unicamp.br](mailto:jose.jlc@fcf.unicamp.br)

## Abstract

*Purpose* Synthetic cannabinoid receptor agonists (SCRAs) are a class of varied compounds that mimic the effects of natural cannabinoids found in cannabis. Because they have a wide range of diverse structures, they vary widely in their potency. The abuse of new psychoactive substances (NPS) in prisons was reported in many European countries and in the USA. In the present study, we have described the identification of SCRAs in 56 infused paper sheet samples, seized in Brazilian prisons between 2016 to 2020.

*Method* The materials were seized by local or federal law enforcement and analyzed by São Paulo State Scientific Police or Brazilian Federal Police using gas chromatography–mass spectrometry, attenuated total reflection–Fourier-transform infrared spectroscopy, liquid chromatography–high resolution mass spectrometry (LC-QTOF) or nuclear magnetic resonance spectrometry.

*Results* Most of these samples (87.5%) were seized in 2019-2020; seven different SCRAs were identified in samples, and the most frequently identified substances were MDMB-4en-PINACA (23.6%) and 5F-MDMB-PICA (36.4%), the newest SCRAs emerging recently.

*Conclusions* As observed in Europe and the USA, Brazil also shows the prevalence of indazole-3-carboxamides and indole-3-carboxamides among SCRAs seizures in the prison system. This phenomenon is spreading all over the world at this moment. These data on the prevalence could help to alert judicial authorities to shutting down the introduction of NPS, including SCRAs, into prisons to ensure safety and security for avoiding health risks of prisoners and staff, leading to positive effects in this population.

**Keywords:** Synthetic cannabinoids receptor agonists; New psychoactive substances (NPS); 5F-MDMB-PICA; MDMB-4en-PINACA; Prison

## Introduction

New psychoactive substances (NPS) are illicit substances not controlled by the 1961 Single Convention on Narcotic Drugs or the 1971 Convention on Psychotropic Substances, and they are designed to mimic the effects of traditional drugs such as cannabis, cocaine, and amphetamine, which may pose a public health threat. Typically, NPS are more potent than the drugs that they mimic and include a wide and diverse range of chemical structures, even within the same effect group. Therefore, their pharmacodynamics, pharmacokinetics, and intensity of effects remain unpredictable and they sometimes have severe adverse health consequences, mostly neurological symptoms, including death [1–3].

Up to August 2020, over 1000 individual NPS have been reported, and since 2015 more than 500 NPS were reported per year to the United Nations Office for Drugs and Crime (UNODC) Early Warning Advisory. The main groups of NPS reported are stimulants and synthetic cannabinoid receptor agonists (SCRAs); these two groups correspond to 64% of the reports [4].

The growth in the number of substances seems to be stabilizing since 2013, due to efforts by several countries to curb the advance of the NPS through new legislation or updates to existing ones, mainly with the aim of making the production, possession, and supply of a large number of structural analogues illegal [5, 6]. Over the last ten years, Brazil reported the identification of 116 NPS, being the country that most reported substances among the region of South America, Central America and Caribbean [7].

SCRAs are a class of structurally varied compounds that mimic the effects of natural cannabinoids found in cannabis (mostly  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, THC). Their pharmacodynamics consists of interaction with human cannabinoid type 1 and type 2 G-protein coupled receptors, CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub>. Because they have a wide range of diverse structures, SCRAs vary widely in their potency and efficacy [5, 8]. The first synthetic analog was synthesized in 1990 with a potency 100 times the THC, while identifications of SCRAs in herbal blends sold for recreational use started almost twenty years later. Nowadays, these NPS also have been detected in powders, infused paper and e-liquids for be vaped using electronic cigarette [5, 9, 10].

Convulsions, paralysis, tachycardia, hypertension, myocardial infarction, arrhythmias, psychosis, auditory and visual hallucinations, agitation, anxiety, depression, suicidal ideation and self-harm are some of the health risks associated with SCRAs; diagnoses of bipolar disorder, personality disorders, the onset of schizophrenia and related disorders have also been associated with the use of these substances. In addition, regular users exhibit aggressive behavior and other psychotic symptoms, especially among those already affected by addiction or mental illness [2, 11]. Recently, cases of vitamin K-dependent coagulopathy and bleeding have been reported in patients who had smoked SCRAs just before the onset of symptoms, with hemoptysis, hematuria, epistaxis and mucocutaneous bleeding being the most common. Biological samples from these individuals indicated the presence of brodifacoum, a super warfarin rodenticide [12–14].

Between 2016-2018, half of all NPS cases reported to the UNODC Early Warning Advisory on NPS – Toxicology Portal (Tox-Portal) involved synthetic opioids or SCRAs. According to UNODC, 5F-MDMB-PINACA (5F-ADB), 5F-MDMB-PICA and AMB-FUBINACA (FUB-AMB) were the most frequently reported SCRAs and featured in fatalities as well as clinical admissions in 2019 as the second most commonly identified substance in fatal cases (28%) and assessed to have contributed to death in the majority of cases [6]. 5F-MDMB-PICA was also the most seized SCRAs in EU, Norway and Turkey in 2017 and the most reported in the first quarter of 2020 by USA [15, 16]. In Florida - the third-most populous state of the USA - over 56 and 36 kg of SCRAs were seized in 2016 and 2017, respectively [17].

Most NPS tend to be transient, however, patterns in use of SCRAs among marginalized, vulnerable and socially disadvantaged groups have been observed, including homeless people and those in prisons or on probation, especially because of the low cost, easy availability and high potency of these substances [17]. NPS use in prisons was reported by USA and 22 countries in Europe, and it features as an important challenge. It has been classified as the new “drug of choice” among European prisoners probably due its lack of odor, allowing it to be smoked undetected, besides avoiding detection by traditional drug screening. Due to its higher potency, small doses can cause the effects expected by the user, facilitating the smuggling of these substances into prisons, once the dosage unit can be a piece of 1 cm<sup>2</sup> (LSD-like blotter paper), allowing the administration of the drug by other routes such as

sublingual and in the eye [19]. In Brazil, the Penitentiary Administration Secretariat of São Paulo State reported several attempts of smuggling infused papers containing SCRA, usually made by the prisoner's relatives who, in some cases, hide the drug in their underwear and genitals [20–22]. Moreover, admission of patients from nearby prisons suffering the effects of NPS misuse has become frequent. This pattern of use associated with unpredictable pharmacodynamics, high potency and health risks could lead to serious negative consequences, such as unintentional overdose events and casualties [1, 3, 16, 23].

The number of cases of self-harm, suicide attempts, aggression, and ambulance call-outs reached alarming levels, as well as the use of drugs in prisons, also associated with organized crime, bullying, debt and suicides. Furthermore, family members and friends of prisoners who are addicted or in debt are coerced to send money or smuggle more drugs into prisons. Incidents involving NPS also carry a higher risk of hospitalization as compared with traditional drugs, being associated with a high prevalence of fatalities [2]. In addition, psychotic events resulting from the use of SCRA also affect the prison staff, because users can present hallucinations and depression, leading to fear, self-harm, suicidal ideations, paranoia, inability to be with others, and other risky behaviors. Moreover, a study conducted in UK applied a questionnaire among professionals working in prisons or related sectors; episodes involving outbreak of anger, hallucinations and psychosis were the main reasons for 67% of individuals to believe NPS had a significant impact on their work [2].

In the present study, we described the identification of SCRA in 56 infused paper sheet samples, seized in Brazilian prisons between 2016 and 2020.

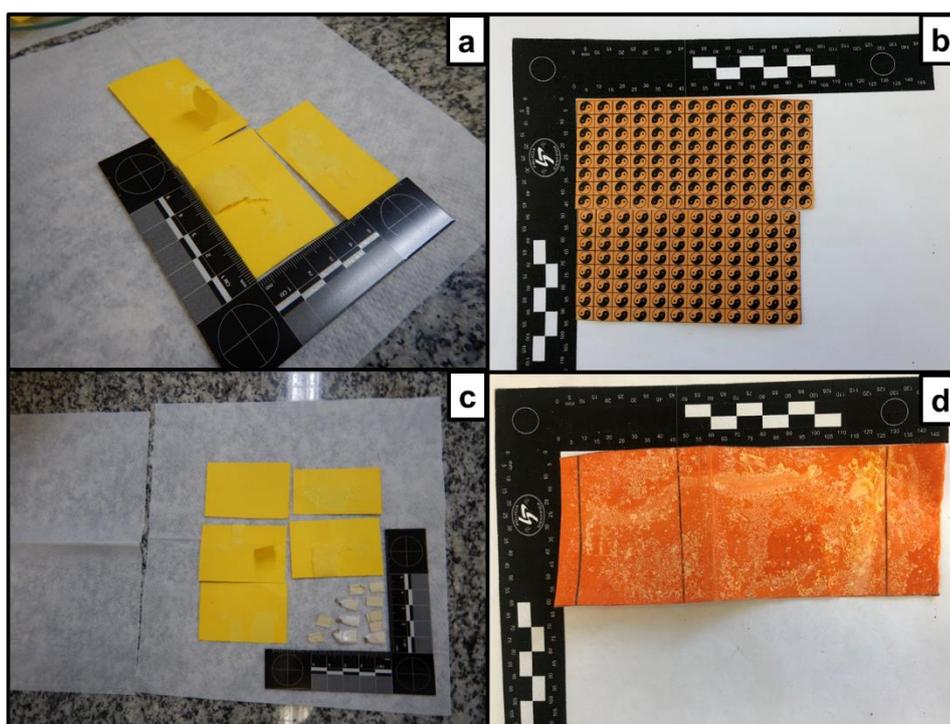
## **Materials and methods**

Fifty-six infused paper sheet samples were seized, between 2016 and 2020, by the São Paulo State Police or Brazilian Federal Police, mainly in the prisons located in São Paulo state. SCRA were identified in forensic chemistry laboratory by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS), attenuated total reflection Fourier-transform-infrared spectroscopy (ATR-FTIR), liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC–QTOF-MS) or nuclear magnetic resonance (NMR), according to laboratories standard operational procedures and the Scientific Working Group for

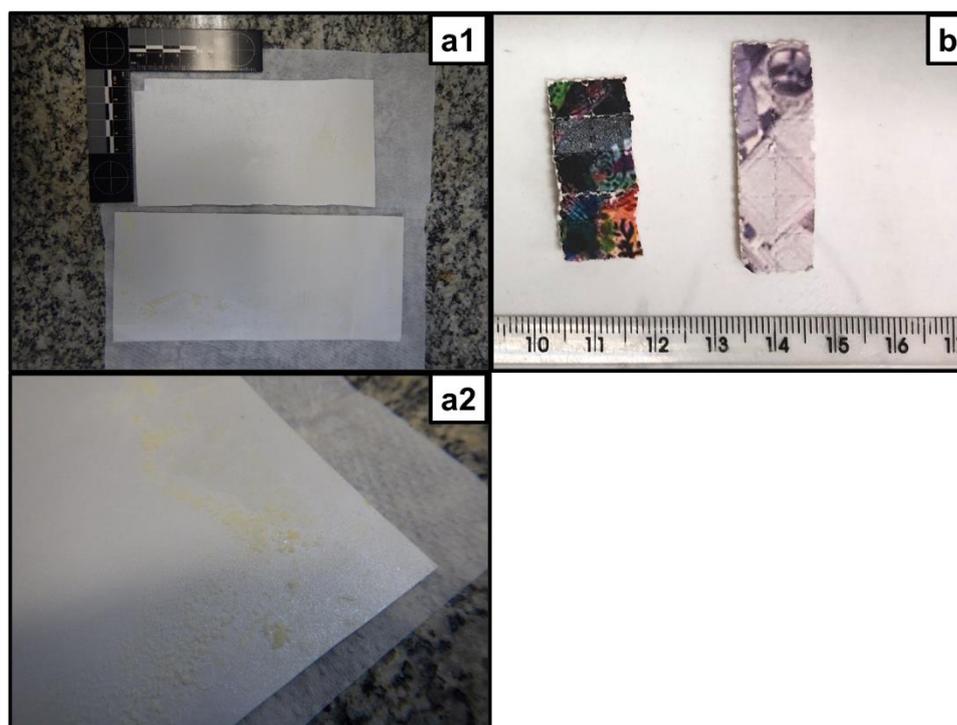
the Analysis of Seized Drugs (SWGDRUG) recommendations. Figures 1 and 2 depict examples of infused paper sheets seized in the Brazilian prison system and submitted to forensic chemistry analysis.

## Results

Several seizures of SCRA are being carried out in Brazilian prisons over the years. Since 2016, at least 48 seizures were made in the prisons of São Paulo state, all of them in infused paper form. During the same period, the Brazilian Federal Police seized other 6 infused paper samples containing SCRA. Most of these samples (87.5%) were seized between 2019 and 2020. Seven different SCRA were identified in samples (Table 1), and the most frequently identified substances were MDMB-4en-PINACA (23.6%) and 5F-MDMB-PICA (36.4%). In seized samples, more than one NPS was detected, combining 4F-MDMB-BINACA and 5F-MDMB-PICA; MDMB-4en-PINACA and 5F-MDMB-PICA; and, ADB-FUBINACA and 25I-NBOH (hallucinogenic phenylethylamine).



**Fig. 1** Infused paper samples seized in Brazilian prison containing 5F-MDMB-PICA (**a1**) analyzed by Brazilian Federal Police and measuring between 21 to 24 cm<sup>2</sup>; (**a2**) two sizes of infused paper seized; (**b**) in blotter paper “LSD-like” analyzed by Technical Scientific Police of the State of Sao Paulo, each square of approximately 2.5 cm<sup>2</sup> represents a typical single dose; (**c**) samples analyzed by the Technical Scientific Police of the State of Sao Paulo measuring approximately 9 cm<sup>2</sup>. Samples had their size measured with the black scales present in the figure.



**Fig. 2** Infused paper samples seized in Brazilian prison containing (a1) MDMB-4en-PINACA measuring more than 36 cm<sup>2</sup> (measured with the black ruler present in the figure), (a2) with material crystallized on the surface of the paper sheet; (b) blotter paper “LSD-like” analyzed by Brazilian Federal Police containing AMB-FUBINACA.

**Table 1** Synthetic cannabinoid receptor agonists (SCRAs) detected in infused paper samples seized by Sao Paulo State Police and Brazilian Federal Police (2016-2020).

Substance	Number of seizures	%
4F-MDMB-BINACA	2	3.4
ADB-BUTINACA	2	3.4
AMB-FUBINACA	2	3.4
4F-MDMB-BUTINACA	7	12.1
ADB-FUBINACA	11	19.0
MDMB-4en-PINACA	14	24.1
5F-MDMB-PICA	20	34.5

## Discussion

In 2018, approximately 10.7 million people worldwide were held in prisons, corresponding to almost 0.14% of the global population [1]. Although prisons often rely on security systems to detect contraband, NPS are usually colorless and odorless, and are thus able to evade standard detection methods. Moreover, there have been reports of SCRAs sprayed onto clothing, letters and even children’s drawings sent into prisons, likely to facilitate contraband and in response to the implementation of prison smoking

bans in some countries [2, 5]. According to UNODC, in 2019, 53 different NPS were reported to UNODC by countries of South America, Brazil being responsible for approximately 62.2%: SCRA were the third most reported NPS between 2015-2017 [7].

Norman et al [5, 19] analyzed samples seized by the Scottish Prison Service in 2018-2019 and urine samples from Pennsylvania (US) prisoners in March and July 2019, being 5F-MDMB-PICA also the most prevalent SCRA. According to EMCDDA [24], between June 2019 and July 2020, almost 15% of police seizures in prisons and correctional houses from six European countries contained MDMB-4en-PINACA. Moreover, by September of 2020, this SCRA was mostly commonly detected in seizure data from UK and urine samples from German prisoners [19].

Indole and indazole SCRA have greater potency than THC on activation of both CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors, being high efficacy agonists. Activation of CB<sub>1</sub> receptors leads to the psychoactive effects of cannabinoids, and most of these SCRA show a preference for CB<sub>1</sub> over CB<sub>2</sub> receptors (1.3 to 20 times) [25]. The 5F-MDMB-PICA is the most cited SCRA in UNODC Early Warning Advisory - Tox-Portal, being related to 128-intoxication cases between 2017 and 2020, from 10 different countries. The MDMB-4en-PINACA was related to 36 intoxication cases reported to the Tox-Portal, from 4 different countries (16 cases in the USA), all of them reported in 2020 [26].

Herbal mixtures containing SCRA are not unusual in Brazilian forensic reports. However, the detection of these substances in blotter papers or infused papers, since 2016, has shown a new trend in the use of these NPS [27]. In Brazil, NPS sold as blotter papers were mostly related to phenethylamine (NBOMe and NBOH families) [28–30] and few cases of fentanyl analogues (mostly furanylfentanyl) [31]. However, in Brazilian prisons, SCRA represent a vast majority of NPS found in infused and blotter paper drugs.

## Conclusions

In recent years, the number of SCRA that have been smuggled into prisons as infused papers [5, 8, 17, 19] is increasing in Europe (Scotland, England, Wales and Germany) and USA (Florida), and close monitoring of these seizures could serve as an early warning for law enforcement, once studies show an alignment between

SCRAs detected in prisons and the local market. As observed in Europe and the USA, Brazil also shows the prevalence of indazole-3-carboxamides and indole-3-carboxamides among SCRAs seizures in the prison system. This data on the prevalence could help to determine safety, security and health risks for prisoners, staff, and the prison environment, leading to positive effects in this population. To our knowledge, this is the first demonstration of SCRAs smuggling into prisons in Latin America.

### **Acknowledgements**

The authors thank the National Institute of Criminalistics of Brazilian Federal Police and the Superintendence of the Technical Scientific Police of the State of Sao Paulo for kind donation of data, and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Projeto INSPEQT, Edital Nº 16/2020) by the financial support.

### **Declarations**

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest associated with this manuscript.

**Ethical approval** This article does not contain studies with human participants or animals performed by any of the authors.

### **References**

1. UNODC (2020) World drug report 2020. Vienna. <https://wdr.unodc.org/wdr2020>. Accessed 20 Apr 2021
2. Corazza O, Coloccini S, Marrinan S, Vigar M, Watkins C, Zene C, Negri A, Aresti A, Darke S, Rinaldi R, Metastasio A, Bersani G (2020) Novel psychoactive substances in custodial settings: a mixed method investigation on the experiences of people in prison and professionals working with them. *Front Psychiatry* 11:1–11. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00460> (open access

- article)
3. Ford LT, Berg JD (2018) Analytical evidence to show letters impregnated with novel psychoactive substances are a means of getting drugs to inmates within the UK prison service. *Ann Clin Biochem* 55:673–678. <https://doi.org/10.1177/0004563218767462> (open access article)
  4. UNODC (2020) Global synthetic drugs assessment 2020. Vienna. [https://www.unodc.org/documents/scientific/Global\\_Synthetic\\_Drugs\\_Assessment\\_2020.pdf](https://www.unodc.org/documents/scientific/Global_Synthetic_Drugs_Assessment_2020.pdf). Accessed 20 Apr 2021
  5. Norman C, Walker G, McKirdy B, McDonald C, Fletcher D, Antonides LH, Sutcliffe OB, Nic Daéid N, McKenzie C (2020) Detection and quantitation of synthetic cannabinoid receptor agonists in infused papers from prisons in a constantly evolving illicit market. *Drug Test Anal* 12:538–554. <https://doi.org/10.1002/dta.2767>
  6. UNODC (2020) Current NPS threats: Volume II. Vienna. [https://www.unodc.org/documents/scientific/Current\\_NPS\\_Threats\\_Volume\\_II\\_Web.pdf](https://www.unodc.org/documents/scientific/Current_NPS_Threats_Volume_II_Web.pdf). Accessed 20 Apr 2021
  7. UNODC United Nations Office on Drugs and Crime (2020) Global synthetic drugs assessment 2020: regional overview - Americas. Vienna. [https://www.unodc.org/documents/scientific/Regional\\_Overview\\_Americas.pdf](https://www.unodc.org/documents/scientific/Regional_Overview_Americas.pdf). Accessed 20 Apr 2021
  8. Ralphs R, Williams L, Askew R, Norton A (2017) Adding spice to the porridge: the development of a synthetic cannabinoid market in an English prison. *Int J Drug Policy* 40:57–69. <https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2016.10.003> (open access article)
  9. Mechoulam R, Lander N, Breuer A, Zahalka J (1990) Synthesis of the individual, pharmacologically distinct, enantiomers of a tetrahydrocannabinol derivative. *Tetrahedron Asymmetry* 1:315–318. [https://doi.org/10.1016/S0957-4166\(00\)86322-3](https://doi.org/10.1016/S0957-4166(00)86322-3)
  10. EMCDDA (2018) New psychoactive substances in prison. Luxembourg. <https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/8869/nps-in-prison.pdf>. Accessed 28 May 2021

11. Kleis J, Germerott T, Halter S, Héroux V, Roehrich J, Schwarz CS, Hess C (2020) The synthetic cannabinoid 5F-MDMB-PICA : A case series. *Forensic Sci Int* 314:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110410>
12. Moritz E, Austin C, Wahl M, DesLauriers C, Navon L, Walblay K, Hendrickson M, Phillips A, Kerins J, Pennington AF, Lavery AM, El Zahran T, Kauerauf J, Yip L, Thomas J, Layden J (2018) Notes from the field: outbreak of severe illness linked to the vitamin K antagonist brodifacoum and use of synthetic cannabinoids — Illinois, March–April 2018. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 67:607–608. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6721a4> (open access article)
13. Shahid Z, Kalayanamitra R, Hanafi M, Anwar K, Jain R (2019) Sugar, spice, and bleeding. *Cureus* 11:e4437. <https://doi.org/10.7759/cureus.4437>
14. Godwin PO, Unterman S, Elfessi ZZ, Bhagat JD, Kolman K (2019) Management of rodenticide poisoning associated with synthetic cannabinoids. *Fed Pract* 36:237–241 (open access article)
15. Drug Enforcement Administration (2020) Emerging threat report first quarter. <https://cesar.umd.edu/sites/cesar.umd.edu/files/pubs/DEA-Emerging-Threat-Report-2020-Quarter-1.pdf>. Accessed 21 Apr 2021
16. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction and Europol (2019) EU drug markets report. Luxembourg. <http://doi.org/10.2810/796253>. Accessed 21 Apr 2021
17. Hvozdoovich JA, Chronister CW, Logan BK, Goldberger BA (2020) Synthetic cannabinoid deaths in state of florida prisoners. *J Anal Toxicol* 44:298–300. <https://doi.org/10.1093/jat/bkz092>
18. Evans-Brown M, Sedefov R (2017) New psychoactive substances: driving greater complexity into the drug problem. *Addiction* 112:36–38. <https://doi.org/10.1111/add.13528> (open access article)
19. Norman C, Halter S, Haschimi B, Acreman D, Smith J, Krotulski AJ, Mohr ALA, Logan BK, NicDaéid N, Auwärter V, McKenzie C (2021) A transnational perspective on the evolution of the synthetic cannabinoid receptor agonists market: Comparing prison and general populations. *Drug Test Anal* 13:841–852. <https://doi.org/10.1002/dta.3002> (open access article)

20. Penitentiary Administration Secretariat (2019) Pai de sentenciado tenta entrar em presídio com 855 micropontos de k4 na cueca - apreensões em unidades do estado – 2 e 3 / 11. [www.sap.sp.gov.br/noticias/pauta-05-11-19.html](http://www.sap.sp.gov.br/noticias/pauta-05-11-19.html). Accessed 21 Apr 2021
21. Penitentiary Administration Secretariat (2020) Agentes impedem entrada de irmão de preso que enrolou droga sintética na panturrilha usando papel filme - Apreensões em unidades do Estado: 29/02 e 1º/03. [www.sap.sp.gov.br/noticias/pauta-03-03-20.html](http://www.sap.sp.gov.br/noticias/pauta-03-03-20.html). Accessed 21 Apr 2021
22. Penitentiary Administration Secretariat (2019) Visitantes tentam entrar em presídios com a droga sintética " k4 " dentro de sutiã e na roupa - apreensões em unidades do estado - 30/11 e 01/12. <http://www.sap.sp.gov.br/noticias/pauta-04-12-19.html>. Accessed 21 Apr 2021
23. EMCDDA (2020) European drug report 2020: trends and developments. Luxembourg. <https://doi.org/10.2810/420678>. Accessed 23 Apr 2021
24. EMCDDA (2020) EMCDDA initial report on the new psychoactive substance methyl 3,3-dimethyl-2-(1-(pent-4-en-1-yl)-1H-indazole-3-carboxamido)butanoate (MDMB-4en-PINACA). Luxembourg. <https://doi.org/10.2810/135998>
25. Banister SD, Longworth M, Kevin R, Sachdev S, Santiago M, Stuart J, Mack JBC, Glass M, McGregor IS, Connor M, Kassiou M (2016) Pharmacology of valinate and tert-leucinate synthetic cannabinoids 5F-AMBICA, 5F-AMB, 5F-ADB, AMB- FUBINACA, MDMB-FUBINACA, MDMB-CHMICA, and their analogues. *ACS Chem Neurosci* 7:1241–1254. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.6b00137>
26. United Nations Office on Drug and Crime (2021) UNODC early warning advisory - [Tox-Portal. https://www.unodc.org/tox/#/admin/search/detailed/%7B%22textQuery%22:%22%22,%22selected%22:%7B%7D,%22page%22:1,%22itemsPerPage%22:10,%22showMyOnly%22:false%7D](https://www.unodc.org/tox/#/admin/search/detailed/%7B%22textQuery%22:%22%22,%22selected%22:%7B%7D,%22page%22:1,%22itemsPerPage%22:10,%22showMyOnly%22:false%7D). Accessed 23 Apr 2021
27. Synthetic Drugs Group of Brazilian Federal Police (2018) Synthetic Drugs 2018 Report. Brasília. [http://www.pf.gov.br/institucional/acessoainformacao/acoes-e-](http://www.pf.gov.br/institucional/acessoainformacao/acoes-e)

- programas/relatorio-de-drogas-sinteticas-2018/drogas\_sinteticas\_2018\_eng.pdf/view. Accessed 28 May 2021
28. de Moraes DR, Barbosa IL, Cunha KF, Tripodi GL, Angolini CFF, Franco MF, de Aquino EM, Eberlin MN, Costa JL (2017) EASI-IMS an expedite and secure technique to screen for 25I-NBOH in blotter papers. *J Mass Spectrom* 52:701–706. <https://doi.org/10.1002/jms.3977>
  29. de Moraes DR, da Cunha KF, Rodrigues TB, Lanaro R, Barbosa L de M, Zacca JJ, Eberlin MN, Costa JL (2020) Triple quadrupole–mass spectrometry protocols for the analysis of NBOMes and NBOHs in blotter papers. *Forensic Sci Int* 309:13–15. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110184>
  30. Arantes LC, Júnior EF, de Souza LF, Cardoso AC, Alcântara TLF, Lião LM, Machado Y, Lordeiro RA, Neto JC, Andrade AFB (2017) 25I-NBOH: a new potent serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor agonist identified in blotter paper seizures in Brazil. *Forensic Toxicol* 35:408–414. <https://doi.org/10.1007/s11419-017-0357-x> (open access article)
  31. Barbosa L de M, Santos JM, de Moraes DR, Nimtz AV, Eberlin MN, de Oliveira MF, Costa JL (2019) Fast UHPLC–MS/MS method for analysis of furanylfentanyl in different seized blotter papers. *Drug Test Anal* 11:178–183. <https://doi.org/10.1002/dta.2472>

## 9. ANEXOS

### ANEXO 1: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Determinação de fentanil e seus derivados em amostras coletadas post mortem, por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial

**Pesquisador:** TAIS BETONI RODRIGUES

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 87316318.0.0000.5404

**Instituição Proponente:** FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS - CEP/CHS

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.852.584

##### Apresentação do Projeto:

Trata-se de solicitação de emenda ao protocolo originalmente aprovado em 12/06/2018 sob número 2.707.360. Introdução: O uso de substâncias psicoativas (SPA) com finalidade recreacional é hábito que acompanha o homem desde o início dos tempos, mas foi a partir da segunda metade século XX que este uso abusivo passou a aumentar vertiginosamente. De acordo com mais recente relatório do Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (em inglês, United Nations Office for Drug and Crime, UNODC), 246 milhões de pessoas, ou 5% da população com idade entre 15 e 64 anos, utilizou alguma SPA ilícita durante o ano de 2013. Dentre as diversas classes que são enquadradas como SPA, pode-se citar os antidepressivos (tricíclicos, inibidores seletivos de recaptção de serotonina), sedativos e hipnóticos (benzodiazepínicos, barbitúricos), anestésicos, analgésicos (opioides), entre outros. Também fazem parte das SPA, as substâncias de abuso classificadas como lícitas ou ilícitas, popularmente conhecidas por "drogas de abuso". Estas podem ser classificadas em estimulantes do SNC (cocaína, anfetamina, cafeína, nicotina), depressoras do SNC (álcool etílico, heroína, solventes), alucinógenas (LSD, mescalina), perturbadoras do SNC (canabinóides), drogas de ação mista ou entactógenas (MDMA). As SPA possuem ação neurobiológica, cujo principal mecanismo da dependência envolve o lobo frontal e o sistema límbico, as alterações nos circuitos dessa região estabelece uma priorização dos estímulos relacionados ao uso de SPA frente aos demais. A partir disso, o indivíduo não identifica nenhuma

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
**Bairro:** Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887  
**UF:** SP **Município:** CAMPINAS  
**Telefone:** (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS  
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 3.852.584

atividade ou estímulo como tão prazerosa quanto o uso da SPA. As novas substâncias psicoativas (em inglês, new psychoactive substances, NPS), são substâncias ou misturas de substâncias psicoativas produzidas em laboratórios clandestinos, por síntese química a partir de substâncias precursoras encontradas ou não na natureza. Podem ser sintetizadas ainda por pequenas modificações na estrutura de moléculas que possuam atividade biológica conhecida. As NPS são conhecidas popularmente como legal highs, termo que delinea uma característica importante deste grupo de drogas: proporcionar ao usuário efeitos semelhantes aos produzidos pelas drogas de abuso "tradicionais", porém sem a classificação de substância ilícita ou controladas internacionalmente, como a cocaína, metanfetamina, MDMA, LSD, etc. O termo "novas" não se refere necessariamente a substâncias recém inventadas, uma vez que muitas delas foram sintetizadas pela primeira vez há mais de 40 anos. De acordo com a UNODC, são consideradas NPS aquelas substâncias narcóticas ou psicotrópicas, em sua forma pura ou preparada com outras substâncias e excipientes, e que não eram controladas pela Convenção Única de Entorpecentes (1961) ou pela Convenção de Substâncias Psicotrópicas (1971). Desde 1997, mais de 200 novos compostos psicoativos foram relatados, e a cada ano cresce o número de NPS no mercado ilegal. Estimativas atuais sugerem que, em média, uma nova NPS está disponível on-line na União Européia todas as semanas. Hipótese: Espera-se encontrar casos de morte relacionadas ao uso abusivo de antidepressivos, antipsicóticos e fentanil ou de seus derivados no estado de São Paulo, como observado em outros países. Além de criar um método eficaz para verificação das concentrações sanguíneas destas substâncias. Metodologia Proposta: Realizaremos o desenvolvimento e validação de método analítico, seguindo as recomendações do Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX), utilizaremos 20 amostras de sangue brancos (amostras que apresentaram resultados negativo para opióides), nas quais serão adicionados os analitos de interesse em concentrações conhecidas, sendo estas fornecidas pelo Núcleo de Toxicologia Forense (NTF) do Instituto Médico-Legal, Superintendência da Polícia Técnico-Científica de São Paulo. Após esta etapa de desenvolvimento e validação, o método passará a monitorar estes toxicantes na rotina do NTF. O preparo de amostras foi previamente testado, e será baseado remoção de proteínas por precipitação com acetonitrila gelada antes da análise cromatográfica. Os extratos no procedimento descrito acima serão analisados em cromatógrafo líquido acoplado a espectrômetro de massas sequencial (LC-MS/MS) modelo LCMS8040 (Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com coluna cromatográfica Atlantis-T3 column. O espectrômetro de massas será programado para aquisição em modo multiple reaction monitoring (MRM), sendo selecionadas pelo menos duas transições por analito. A ionização será realizada por

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887  
 UF: SP Município: CAMPINAS  
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.852.584

electrospray, em modo positivo.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:** O objetivo deste projeto é desenvolver um método baseado em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) para determinação de antidepressivos, antipsicóticos estabilizadores de humor e fentanil e seus análogos em amostras de sangue total coletadas durante sessões de necropsia realizadas no Instituto Médico-Legal de São Paulo. Metodologia Proposta: Realizaremos o desenvolvimento e validação de método analítico, seguindo as recomendações do Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX), utilizaremos 20 amostras de sangue brancos (amostras que apresentaram resultados negativo para opióides), nas quais serão adicionados os analitos de interesse em concentrações conhecidas, sendo estas fornecidas pelo Núcleo de Toxicologia Forense (NTF) do Instituto Médico-Legal, Superintendência da Polícia Técnico-Científica de São Paulo. Após esta etapa de desenvolvimento e validação, o método passará a monitorar estes toxicantes na rotina do NTF. O preparo de amostras foi previamente testado, e será baseado remoção de proteínas por precipitação com acetonitrila gelada antes da análise cromatográfica. Os extratos no procedimento descrito acima serão analisados em cromatógrafo líquido acoplado a espectrômetro de massas sequencial (LC-MS/MS) modelo LCMS8040 (Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com coluna cromatográfica Atlantis-T3 column. O espectrômetro de massas será programado para aquisição em modo multiple reaction monitoring (MRM), sendo selecionadas pelo menos duas transições por analito. A ionização será realizada por electrospray, em modo positivo.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Mantidos em relação ao projeto original.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Esta versão é uma emenda ao protocolo aprovado em 12/08/2018 via parecer nº 2.707.360 com a seguinte justificativa: "Inclusão de 2 (dois) pesquisadores à equipe de pesquisa: Prof. Dr. Jandyson Machado Santos e a doutoranda Jacqueline de Moraes Campelo."

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Para a elaboração deste parecer foi analisado o seguinte documento: "PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_1498526\_E2.pdf".

**Recomendações:**

--

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887  
 UF: SP Município: CAMPINAS  
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.852.584

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

A solicitação de emenda foi apresentada e justificada de forma adequada.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável). - O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável). - O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes. - O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento. - Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. - Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial. - Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo. - Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento". - O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_149852	04/02/2020		Aceito

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887  
 UF: SP Município: CAMPINAS  
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.852.584

Básicas do Projeto	_E2.pdf	15:44:36		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Mestrado_Tais_JLC_v4.pdf	09/08/2019 13:49:45	TAIS BETONI RODRIGUES	Aceito
Outros	Declaracao_Aprovacao_SPTC.pdf	11/08/2018 10:31:53	Renata Maria dos Santos Celeghini	Aceito
Outros	Carta_resposta_CEP.pdf	08/08/2018 18:19:12	TAIS BETONI RODRIGUES	Aceito
Outros	Declaracao_anuencia_pesquisa_NTF_DrVictor.pdf	08/08/2018 17:55:48	TAIS BETONI RODRIGUES	Aceito
Outros	Carta_CCETP_SPTC.pdf	10/04/2018 10:34:57	TAIS BETONI RODRIGUES	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto_CEP.pdf	10/04/2018 10:25:33	TAIS BETONI RODRIGUES	Aceito
Outros	AtestadoMatricula.pdf	10/04/2018 10:21:49	TAIS BETONI RODRIGUES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Mestrado_Tais_JLC_v3.pdf	10/04/2018 10:19:49	TAIS BETONI RODRIGUES	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

CAMPINAS, 21 de Fevereiro de 2020

Assinado por:

**Renata Maria dos Santos Celeghini  
(Coordenador(a))**

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887  
 UF: SP Município: CAMPINAS  
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

## **ANEXO 2: Autorização da Editora (*Journal of Analytical Toxicology*) para a inclusão do artigo na tese**

### **After publication**

After publication you may reuse the following portions of your content without obtaining formal permission for the activities expressly listed below:

- one chapter or up to 10% of the total of your single author or co-authored book,
- a maximum of one chapter/article from your contribution to an edited book or collection (e.g. Oxford Handbooks),
- a maximum of one chapter/article of your contribution to an online only, or digital original publication, or
- three figures/illustrations/tables of your own original work

OUP is pleased to grant this permission for the following uses:

- posting on your own personal website or in an institutional or subject based repository after a **12 month** period for **Science and Medical** titles and a **24 month** period for **Academic, Trade and Reference** titles;
- inclusion in scholarly, not-for-profit derivative reuses, (these can include the extension of your contribution to a book-length work, or inclusion in an edited collection of your own work, or any work of which you are an author or editor);
- reproduction within coursepacks or e-coursepacks for your own teaching purposes, (with the proviso that the coursepacks are not sold for more than the cost of reproduction);
- inclusion within your thesis or dissertation.

**Fonte:** <https://global.oup.com/academic/rights/permissions/autperm/?cc=br&lang=en&>

### **ANEXO 3: Autorização da Editora (*Forensic Toxicology*) para a inclusão do artigo na tese**

#### Author reuse

Please check the Copyright Transfer Statement (CTS) or Licence to Publish (LTP) that you have signed with Springer Nature to find further information about the reuse of your content.

Authors have the right to reuse their article's Version of Record, in whole or in part, in their own thesis. Additionally, they may reproduce and make available their thesis, including Springer Nature content, as required by their awarding academic institution. Authors must properly cite the published article in their thesis according to current citation standards.

Material from: 'AUTHOR, TITLE, JOURNAL TITLE, published [YEAR], [publisher - as it appears on our copyright page]'

If you are any doubt about whether your intended re-use is covered, please contact [journalpermissions@springernature.com](mailto:journalpermissions@springernature.com) for confirmation.

**Fonte:** <https://www.springer.com/gp/rights-permissions/obtaining-permissions/882>