

# REVALIDAÇÃO DE MÉTODO DE DETECÇÃO DE DROGAS DE ABUSO EM FLUIDO ORAL ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM SÉRIE

**NOVAIS, Flávio; POLETTI, Erick**

flaviiodsn@gmail.com

Centro de Pós-Graduação Oswaldo Cruz

**Resumo:** *O Exame Toxicológico é uma obrigatoriedade exigida pelo DENATRAN para quem possui Carteira Nacional de Habilitação (CNH) nas categorias C, D e E. Ele identifica hábitos e costumes em relação ao consumo de drogas. Entre elas podem ser utilizadas como matriz de análise: cabelo, urina, sangue e fluido oral. O teste de fluido oral para drogas de abuso oferece vantagens significativas por ser realizada de forma direta sob observação sem risco de adulteração. Portanto o fluido oral surge como matriz ideal para este tipo de análise, uma vez que permite uma coleta simples, fácil e bem aceita para os pacientes. A técnica de detecção LC-MS/MS - vem se destacando por ser uma técnica capaz de detectar, identificar e quantificar moléculas de diversos tamanhos, composições em diferentes matrizes. No presente trabalho foram realizados diversos ensaios buscando os melhores indicadores com o objetivo de revalidar o método de substâncias psicoativas utilizando a saliva como matriz biológica principal através da técnica de detecção LC – MS/MS. Foram utilizados para a revalidação os ensaios de precisão, exatidão e linearidade.*

**Palavras chaves:** Validação. Fluido oral. Drogas de abuso. Matriz biológica. Cromatografia líquida acoplada ao espectro de massas. LC-MS/MS.

**Abstract:** *The Toxicological Exam is a requirement required by DENATRAN for those who have a National Driver's License (CNH) in categories C, D and E. It identifies habits and customs regarding drug use. Among them, the following can be used as analysis matrix: hair, urine, blood and oral fluid. The oral fluid test for drugs abuse offers significant advantages since it is performed directly under observation with no risk of adulteration. Therefore, oral fluid appears as an ideal matrix for this type of analysis, since it allows a simple and easy collection well accepted for patients. The LC-MS / MS detection technique has stood out for being capable of detecting, identifying and quantifying molecules of different sizes, compositions in different matrices. In the present work, several tests were carried out seeking the best indicators in order to revalidate the method of psychoactive substances using saliva as the main biological matrix through the LC - MS / MS detection technique. Precision, accuracy and linearity tests were used for revalidation.*

**Key words:** Validation. Oral fluid. Drugs abuse. Biological matrix. Liquid chromatography–mass spectrometry. LC-MS / MS.

## 1 INTRODUÇÃO

Os primeiros contatos entre seres humanos e substâncias psicoativas ocorreram através do consumo de plantas. A partir de então, foram isolados alguns metabólitos secundários de origem botânica, como: morfina, cocaína e efedrina. Porém, foi com o aparecimento das anfetaminas que se deu início às primeiras sínteses de substâncias psicoativas inspiradas em produtos naturais. (MACIEL; CARVALHO; PEREIRA ; VAZ, 2019)

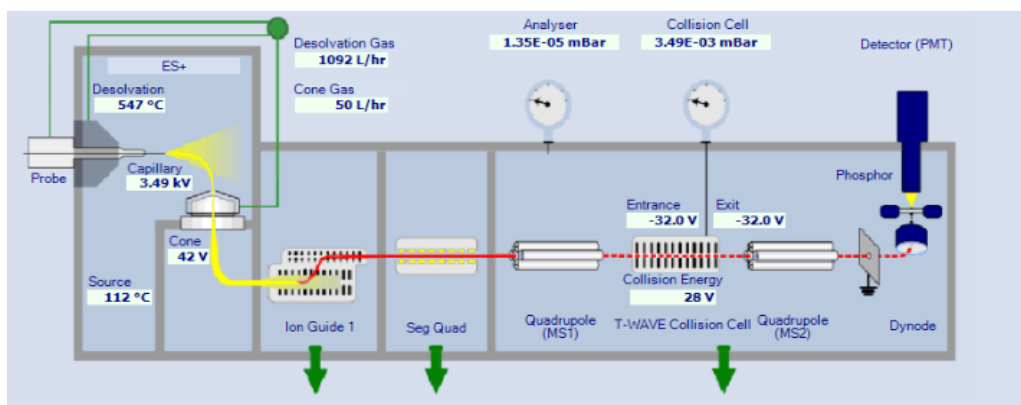
A correta identificação desta classe de drogas em matrizes biológicas tem sido um grande desafio analítico devido à versatilidade e rapidez pela qual estas moléculas são modificadas. Portanto, faz-se necessárias abordagens analíticas diretas e rápidas para a identificação inequívoca das dessas drogas.

A Cromatografia Líquida (LC) é um método essencial na mensuração de concentrações na análise de drogas. Trata-se de uma técnica da química analítica que identifica, separa e quantifica cada componente de uma mistura de solventes (água, metanol ou outros) com a amostra a ser analisada – denominada fase móvel. Baseia-se em bombas que ejetam um líquido solvente, contendo a amostra sob pressão (50 a 350 bar), por uma coluna de metal (de 30 a 250mm de comprimento),preenchida por um material sólido estacionário e particulado (geralmente sílica ou um polímero de 2 a 50 micrômetros de diâmetro). Cada componente da amostra interage de forma diferente com a fase sólida (adsorção, troca iônica ou partição), causando diferentes velocidades de fluxo, determinando a separação dos componentes ao transitar pela coluna.( PORTELA 2017)

A Espectrometria de Massas é uma técnica analítica que ioniza espécies químicas separa os íons, baseado em sua relação massas/carga, podendo medir quantitativamente as massas em uma amostra. O resultado é uma curva do sinal do íon como uma função da sua razão massa/carga, fornecendo a estrutura da amostra pela identificação e fragmentações diferentes.

Inicialmente, a amostra (que pode ser um gás, líquido ou sólido) é ionizado, usualmente, por um bombardeamento de elétrons. Algumas moléculas da amostra são fragmentadas carregadas negativamente. Estes íons são acelerados e submetidos à um campo eletromagnético que os separa de acordo com sua razão massa/carga. Os resultados são mostrados por um programa de computador de forma espectral.

**Fig 1** - Diagrama de um Espectrômetro de Massas.



Fonte: Sistema MassLinx V4.1 software do equipamento.(2020)

No Brasil, em 2016, entrou em vigor a lei que exige que todo o motorista profissional, que possua habilitação “C”, “D” e “E”, que deseja tirar, renovar ou mudar de categoria, tenha que realizar o exame toxicológico de larga janela de detecção. Com o crescimento da busca dessa análise, os métodos para detecção de drogas de abuso foram aprimorados e novas metodologias foram criadas. Entre elas, a pode ser utilizado como matriz de análise o cabelo, urina , sangue e fluido oral.Sua demanda no mundo tem sido especialmente para testes em estradas. Os testes de fluido oral estão presentes na Bélgica, França, Espanha e Austrália. Na Austrália, o teste de fluido oral em estradas foi usado direcionado ao uso de cannabis, metanfetamina e ecstasy para vários anos . Outras possíveis áreas de aplicação são testes de drogas no local de trabalho, testes de pronto-socorro em pacientes, em clínicas de tratamento e para casos de justiça criminal em que o uso de drogas ilícitas deva ser monitorado. (OIESTAD 2016 )

O teste de fluido oral para drogas de abuso oferece vantagens significativas sobre a urina como matriz de teste. A coleta pode ser realizada sob observação direta com risco reduzido de adulteração. Os medicamentos geralmente aparecem no fluido oral por difusão passiva do sangue, mas também podem ser depositados na cavidade oral durante a administração oral, defumada e intranasal.

Uma vez que o método bioanalítico é desenvolvido, vários testes são conduzidos para provar que um método pode ser utilizado para a aplicação pretendida. Esse conjunto de testes é chamado de validação do método. Além da comprovação da precisão, exatidão e estabilidade do método, uma investigação de efeitos da matriz deve ser realizada. A recuperação da extração do analito e potencial carryover também devem ser cuidadosamente avaliados. A indústria farmacêutica e agências regulatórias geralmente reconhecem e aceitam que a validação de um método seja realizada utilizando padrões e amostras de controle de qualidade nas quais a matriz biológica “branco” é fortificada com o analito .No Brasil a resolução RDC Nº 27, DE 17 DE MAIO DE 2012 regulamenta os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalítico, sendo prioritários os ensaios de precisão, exatidão, curva de calibração, efeito residual, efeito matriz, seletividade e estabilidade.(AMORIM 2014)

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

Para a pesquisa foram utilizados os materiais abaixo descritos, como também detalhou-se o preparo das Amostras.

### **2.1 Materiais**

Ácido Fórmico 98-100% adquirido da marca Scharlau, Acetonitrila , Metanol e 2 – Propanol grau HPLC adquiridos da marca J.T Backer. Os padrões das substâncias psicoativas: foram produzidos pela LGC, Sigma e Australian Government.

### **2.2 Amostra**

A amostra de fluido oral foi doada por voluntários saudáveis do projeto. A coleta foi realizada em tubos falcon, nos quais os voluntários expectoraram aproximadamente 5 mL de saliva. Os voluntários não ingeriram nenhuma comida ou líquido nos 20 minutos antecedentes a coleta.

## 2.3 Preparo da amostra

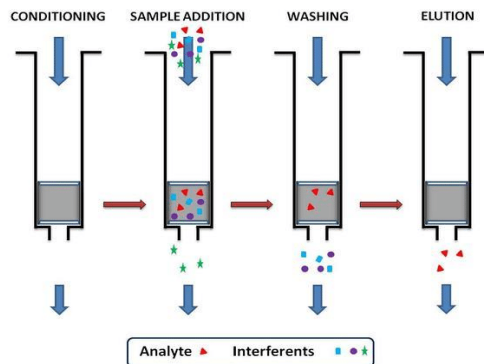
A solução de fluido oral foi preparada na proporção saliva/tampão (1:3), ou seja, para cada 1mL de saliva adicionou-se 3mL de tampão. Esse preparo foi realizado para os controles , curva de calibração e para o branco.

Foi disposto em uma estante os tubos de vidro de 5 ml para Cal0 (Branco + PI), Cal 1 a 6, 4 replicatas de QCL ( controle baixo ), QCM( controle médio ), e QCH ( controle alto ), todos devidamente etiquetados. Adicionou-se 1200 µl da solução de branco de saliva/tampão (1:3) em cada tubo de vidro , para os controles de qualidade e curva de calibração. Adicionou-se 25 µl de padrão interno em cada tubo e homogeneizou-se. Após essa etapa adicionou-se 25 µl de calibradores para a curva em cada tubo e homogeneizou-se logo e após essa etapa foram adicionados 25 µl de QCs em cada tubo de controle de qualidade e agitou-se em vortex durante 1 minuto.

Em uma placa WCX adicionar 500 µl da solução WCX 1 em todos os poços para o condicionamento da placa , após esse passo foi adicionado todo o volume das amostras dos tubos de vidro em cada poço, ligou-se o vácuo e eluiu-se lentamente. Esperou-se passar todo o conteúdo e desligou-se o vácuo. Para a lavagem foram adicionados 300 µl da WCX 2 nas amostras e ligou-se o vácuo. Então aguardou-se a lavagem passar pela placa e desligou-se o vácuo.

Para a eluição final colocou-se a placa coletora de eluição e foram adicionados 200 µl da solução WCX 3 nas amostras. Ligou-se o vácuo até eluição , foi repetido esse processo mais uma vez , então colocou-se a placa coletora para secar sob fluxo de ar nitrogênio em um termobloco a 40 °C e após a secagem a amostra foi retomada com 50 µl da solução de acetonitrila + 0,1% ácido fórmico e 50 µl de água ultrapura, agitou-se em vortex e passou-se as amostras para microvials para injeção.

**Fig 2** – Processo de carregamento em fase sólida



Fonte: <https://separationmethods.com/product-category/sample-preparation/spe-cartridges/>  
Acesso em 02/03/2020

## 2.4 Condições cromatográficas

A LC foi realizada usando uma separação Waters Acquity UPLC Class. Todos os aspectos da operação e dados do sistema aquisição foram controladas usando o software MassLinx . Os analitos foram separados numa coluna da marca Waters Acquity UPLC BEH C18 (2,1 x50 mm) . As fases utilizadas foram A – Fase aquosa ( Água + 0,1% de Ácido fórmico) e B – Fase orgânica ( Acetonitrila + 0,1% de Ácido fórmico) taxa de fluxo de 0,5 mL / min. Um gradiente foi realizado a partir de 99% de fase A e 0,1% de fase B como condição inicial . Aos 0.85 min as concentrações foram de 40% de fase A e 60 % de fase B, aos 1.5 até 1.75 min de corrida as concentrações foram de 10% de fase A e 90 % de fase B e a condição final até 2.2 min foi de 99% de fase A e 0,1% de fase B o que resultou em uma corrida total com tempo de 2.2 min. Foi utilizado um volume de injeção de 1 µl.

## 2.5 Espectrometria de massas

Um espectrômetro de massa em série triplo quadrupolo (Xevo TQ-S micro) equipado com uma interface de ESI. A ionização foi obtida com o uso de electropulverização em modo de ionização positiva (ES+). As seguintes condições foram consideradas para a análise: tensão capilar de 3,49 KV; temperatura do bloco fonte de 112 °C; o gás de dessolvatação (nitrogênio) aquecido a 547 °C e entregue a uma vazão de 1092 L / h. O monitoramento de reação múltipla determinados por infusão no espectrômetro de massa. A pressão do gás de colisão (argônio) foi mantida em  $3,47 \times 10^{-3}$  mbar.

## 2.6 Método de validação

O método em estudo foi revalidado parcialmente de acordo com a RDC nº 166 de 24 de julho de 2017 da Agência Nacional da Vigilância Sanitária (Anvisa) que tem por objetivo principal regular e controlar a área sanitária de serviços e produtos , incluindo a validação para métodos analíticos.

Como o método se trata de um estudo de um método já validado somente três critérios foram necessários para a revalidação : precisão , exatidão e linearidade visando somente os analitos dos grupos de opiáceos (Morfina, Codeína e Heroína), opióides (Metadona, EDDP, Propoxifeno e Norpropoxifeno) e para o todo o grupo de benzodiazepínicos.

### *Definição dos critérios de validação*

Linearidade é a capacidade do método em fornecer resultados proporcionais à concentração do analíto em um intervalo determinado. A forma comum de identificar a linearidade é analisar o coeficiente de correlação (R) das curvas analíticas e, de acordo coma Anvisa, o valor do R deve ser maior que 0,990. Para a construção das curvas, foram utilizados os valores orientativos da tabela de cut-offs da EWDTS para fluido oral.

A exatidão é o quão próximo o valor dos resultados obtidos pelo método se aproxima dos valores verdadeiros.

$$Exatidão = \left( \frac{Xi - Xv}{Xv} \right) * 100$$

A precisão é a proximidade dos resultados em várias medidas de uma mesma amostra. A exatidão e precisão foram realizadas intra (n = 4) e inter-dia (n = 4) , usando os controles de qualidade de concentrações baixa, média e alta da curva de calibração. A exatidão foi obtida pela

seguinte equação, em que Xi é a concentração analisada e Xv é a concentração nominal. A precisão foi determinada através da seguinte equação, sendo S o desvio padrão.

$$Precisão = \left( \frac{S}{X_i} \right) * 100$$

Os critérios revalidados deverão atender os seguintes requisitos:

**Linearidade:** devem ser analisadas cinco replicatas, de cinco concentrações diferentes (incluindo valores acima e abaixo do cut off). Os valores do coeficiente de correlação r2 devem ser iguais ou superiores a 0,99.

**Exatidão:** deve ser calculada a partir de dois controles diferentes, ao longo do intervalo de linearidade. A inexatidão aceita será menor que 20%. Esse parâmetro também poderá ser avaliado com ensaios de proficiência.

**Repetibilidade:** serão aceitos desvios padrões relativos inferiores a 20%;

A validação seguiu o seguinte cronograma:

**Fig 3** – Cronograma de validação

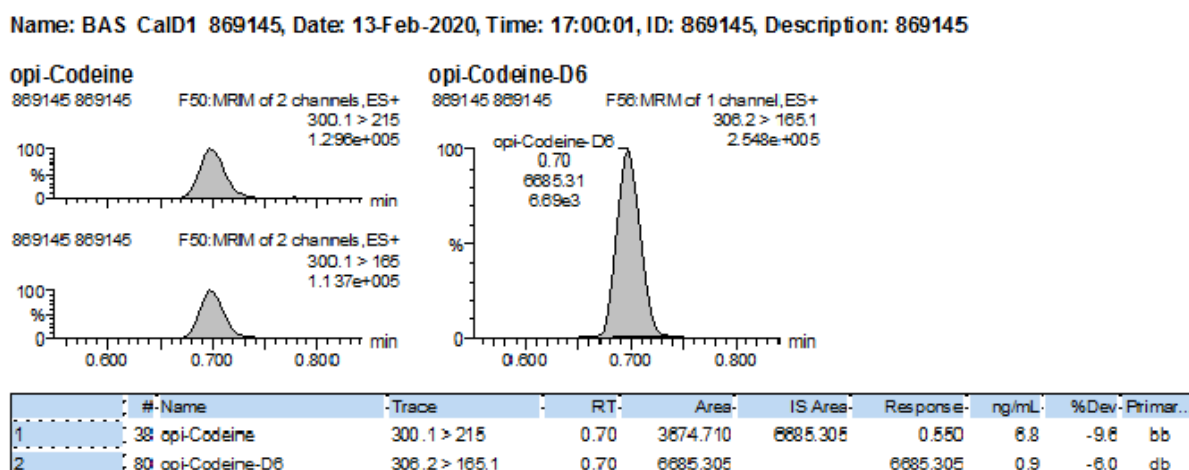
Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Wash	Wash	Wash	Wash	Wash
Wash	Wash	Wash	Wash	Wash
CAL 6	CAL 6	CAL 6	CAL 6	CAL 6
CAL 6	CAL 6	CAL 6	CAL 6	CAL 6
CAL 6	CAL 6	CAL 6	CAL 6	CAL 6
Wash	Wash	Wash	Wash	Wash
Wash	Wash	Wash	Wash	Wash
Precisão Exatidão Linearidade	Precisão Exatidão Linearidade	Precisão Exatidão Linearidade	Precisão Exatidão Linearidade	Precisão Exatidão Linearidade
Cal00 (No IS)	Cal 00 (no IS)	Cal 00 (no IS)	Cal 00 (no IS)	Cal 00 (no IS)
Cal0	Cal0	Cal0	Cal0	Cal0
Cal1	Cal1	Cal1	Cal1	Cal1
Cal2	Cal2	Cal2	Cal2	Cal2
Cal3	Cal3	Cal3	Cal3	Cal3
Cal4	Cal4	Cal4	Cal4	Cal4
Cal5	Cal5	Cal5	Cal5	Cal5
Cal6	Cal6	Cal6	Cal6	Cal6
QCL (x4)	QCL (x4)	QCL (x4)	QCL (x4)	QCL (x2)
QCM (x4)	QCM (x4)	QCM (x4)	QCM (x4)	QCM (x2)
QCH (x4)	QCH (x4)	QCH (x4)	QCH (x4)	QCH (x2)
				Ensaio de Proficiência

Fonte: Autoria própria, 2020

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para verificar a desempenho analítico da técnica, curvas analíticas foram construídas com diferentes concentrações, como exemplo (Figuras 4 e 5) o composto Codeína em fluido oral através do monitoramento das transições  $m/z$  215  $\rightarrow$  300.1 (Codeína) e  $m/z$  165  $\rightarrow$  300.1 (Codeína). O método LC-MS/MS em fluido oral apresentou linearidades com o  $R > 0,99$  para todas os analitos avaliados, em conformidade com as diretrizes da Anvisa.

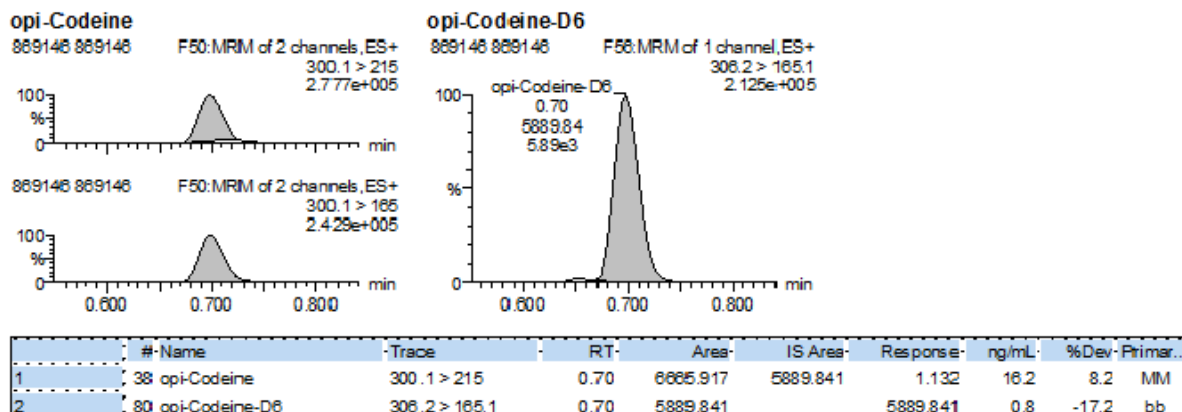
**Fig 4** – Cromatograma do analito Codeína para o ponto 1 da curva de calibração pela técnica LC-MS/MS em fluido oral



Fonte: Sistema MassLinx V4.1 software do equipamento.(2020)

**Fig 5** – Cromatograma do analito Codeína para o ponto 2 da curva de calibração pela técnica LC-MS/MS em fluido oral

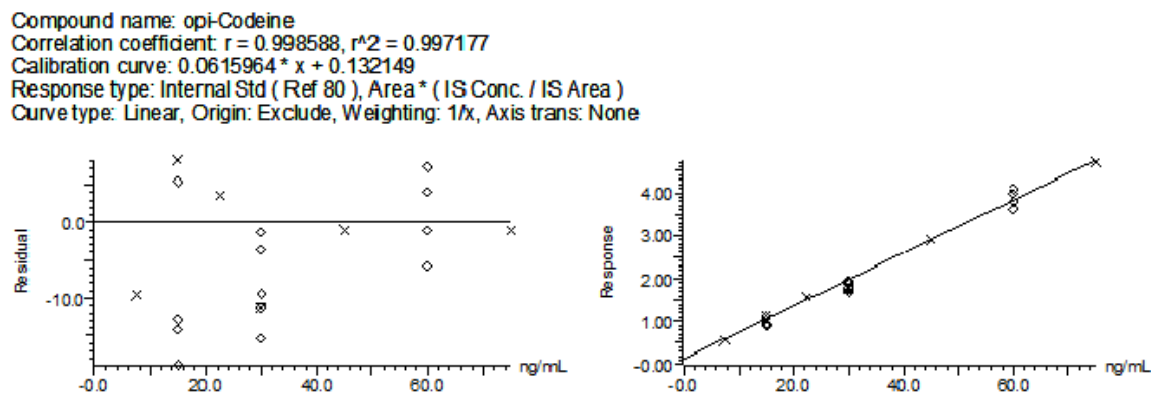
Name: BAS CalD2 869146, Date: 13-Feb-2020, Time: 17:02:43, ID: 869146, Description: 869146



Fonte: Sistema MassLinx V4.1 software do equipamento.(2020)

As figuras 6 e 7 demonstram curvas analíticas que correlacionam concentrações reais (quantidades das drogas concentradas na saliva) com concentrações obtidas por LC-MS/MS em fluido oral para as drogas Codeína e Diazepam . Esse teste demonstra a capacidade da técnica em quantificar compostos em valores próximos aos reais. De acordo as imagens 5 (Codeína) e imagem 6 (Diazepam), é possível notar correlações entre as concentrações reais e medidas para ambas as drogas, apresentando valores de R maiores que 0,99. Desse modo, o método LC-MS/MS em fluido oral apresenta um alto grau de confiabilidade para determinação das drogas em concentrações próximas do valor existente na amostra, com um potencial uso para quantificação de drogas de abuso em amostras reais.

**Fig 6** – Curva de calibração do analito Codeína para técnica LC-MS/MS em fluido oral

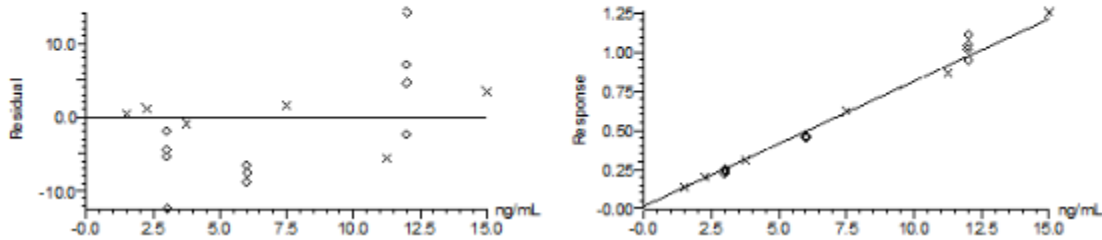


Fonte: Sistema MassLinx V4.1 software do equipamento.(2020)

**Fig 7** – Curva de calibração do Diazepam para técnica LC-MS/MS em fluido oral



Compound name: ben-Diazepam  
Correlation coefficient:  $r = 0.998581$ ,  $r^2 = 0.997164$   
Calibration curve:  $0.0799121 * x + 0.0150677$   
Response type: Internal Std ( Ref 66 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting:  $1/x$ , Axis trans: None



Fonte: Sistema MassLinx V4.1 software do equipamento.(2020)

O “Quadro : Fig 8” retrata todos os resultados de precisão, exatidão e recuperação da revalidação dos grupos de opiáceos (Morfina, Codeína e Heroína), opióides (Metadona, EDDP, Propoxifeno e Norpropoxifeno) e para o todo o grupo de benzodiazepínicos. Os valores de precisão variaram entre 5,2 e 12,6%. Já os valores de exatidão variaram entre 97% e 109%. O método apresentou valores de recuperação próximos de 100%. De acordo com a RDC nº166 de 24 de julho de 2017 da ANVISA, 15 valores de precisão e exatidão até 20% são aceitos para amostras biológicas. Os valores de precisão e exatidão já estão calculados como resultado de inter-ensaios.

Os valores de recuperação próximos de 100%, como mostrado aqui, evidencia uma eficiência do método LC-MS. O método proposto apresenta a vantagem de fornecer resultados de forma rápida, uma vez que uma análise instrumental por esse método pode ser produzido em aproximadamente 2,2 min por amostra. Além disso, a preparação de amostra de fluido oral não requer etapas laboriosas de preparo de amostras para fornecer resultados analíticos adequados. Estas características fazem da técnica LC-MS/MS em fluido oral um método com potencial aplicação em laboratórios de perícia, devido à necessidade de detecção e quantificação de drogas de abuso de forma rápida e precisa. O desempenho analítico da técnica LC-MS/MS foi avaliada através da análise das drogas em fluido oral já tamponado na solução de kit de coleta.. A linearidade das curvas analíticas foi determinada com  $R > 0,99$ .

**Fig 8** – Resumo dos resultados de precisão, exatidão e linearidade.

Analitos	Precisão %			Exatidão %			Linearidade R2				
	QcI	QcM	QcH	QcI	QcM	QcH	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Ben-Alprazolam	12,4	10,2	9,9	97	100	99	0,9962	0,9910	0,9943	0,9907	0,9908
Ben-Chlordiazepoxide	12,1	9,4	8,5	100	98	97	0,9924	0,9986	0,9925	0,9959	0,9995
Ben-Clonazepam	11,5	11,1	11,3	101	100	101	0,9953	0,9977	0,9944	0,9908	0,9994
Ben-Diazepam	5,7	5,3	6,8	101	98	102	0,9906	0,9982	0,9994	0,9972	0,9995
Ben-Nordiazepam	7,8	7,9	9,5	101	98	102	0,9915	0,9974	0,9991	0,9920	0,9995
Ben-Flurazepam	7,7	9,7	7,8	107	101	107	0,9976	0,9915	0,9929	0,9949	0,9911
Ben-Flunitrazepam	7,3	8,1	6,6	107	107	103	0,9964	0,9910	0,9953	0,9925	0,9907
Ben-Lorazepam	12,6	12,2	8,9	99	102	102	0,9962	0,9959	0,9929	0,9910	0,9917
Ben-Midazolam	7,6	7,2	8,1	101	102	100	0,9919	0,9951	0,9991	0,9967	0,9917
Ben-Nitrazepam	9,1	7,2	5,8	107	109	103	0,9936	0,9948	0,9929	0,9964	0,9990
Ben-Oxazepam	6,5	5,6	5,5	101	102	101	0,9964	0,9990	0,9946	0,9975	0,9984
Ben-Temazepam	9	7,8	10,6	100	99	99	0,9963	0,9950	0,9988	0,9996	0,9909
opi-Heroin	10,4	10,2	8,9	102	100	105	0,9934	0,9928	0,9940	0,9982	0,9986
opi-Morphine	7,4	5,9	5,7	100	102	99	0,9980	0,9946	0,9949	0,9995	0,9966
opi-Codeine	11,9	9,5	7,6	101	104	104	0,9921	0,9931	0,9957	0,9972	0,9903
opi-Methadone	8,4	5,4	7,1	99	103	103	0,9963	0,9967	0,9952	0,9976	0,9976
opi-EDDP	5,3	7,1	5,7	98	102	100	0,9950	0,9992	0,9984	0,9980	0,9976
ran-propoxifeno	7,5	6,4	5,2	98	104	102	0,9901	0,9994	0,9978	0,9996	0,9908
ran-norpropoxifeno	6,8	7,4	5,9	97	100	101	0,9984	0,9980	0,9988	0,9990	0,9973

Fonte: Autoria própria, 2020.

Os valores de precisão foram determinados abaixo de 13% e os valores de exatidão foram determinados abaixo de 4% .O parâmetro da recuperação encontra-se dentro do intervalo estimado pela Anvisa, de 80-120%, que é o indicado desde que o método seja preciso e exato. Estes resultados se encontram dentro dos parâmetros de validação de métodos analíticos descritos pela RDC nº166 de 24 de julho de 2017 da Anvisa.

#### 4 CONCLUSÃO

Os resultados mostram que o método em questão para revalidação de detecção de drogas de abuso em fluido oral através de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas atendem os critérios de aceitação e podem ser colocados em uso na rotina do laboratório.

#### REFERÊNCIAS

ANVISA: - **Validação de métodos analíticos.** RDC Nº 166, de 24/jul/2017.

CONE, Edward ; HUESTIS, Marylin **Interpretação de testes de drogas de abuso em fluido oral** . 2007. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/public-access-info/> Acesso EM: 05.Set.2018.

EWDTs. *Guidelines Oral Fluid* 2015-11-01 Version 2.0

KINTZ P, SAMYN N. **Use of alternative specimens: drugs of abuse in saliva and doping agents in hair.** *Ther Drug Monit.* 2002;24:239–46

MACIEL, Lanaia ; CARVALHO, Thays ; PEREIRA, Igor ; VAZ , Boneiek **Determinação de designer drugs em saliva por paper spray mass spectrometry.** 2019. Disponível em <<http://quimicanova.sbq.org.br>>/Acesso EM: 22.Ago.2019.

OLAF H **Drug Testing in Oral Fluid,** *Clin Biochem Rev.* 2006 Aug; 27(3): 147–159.

OIESTAD, Elisabeth ; OIESTAD , Aese ; GELSTALD , Astrid ; KARINEN , Ritva **Oral fluid drug analysis in the age of new psychoactive substances.** 2016. Disponível em <<https://www.fhi.no/en/>> Acesso EM: 05.Set.2018.

PORTELA, Lucas **Quantificação das 3 $\alpha$ -hidroxitibolona no plasma humano por cromatografia líquida de alta performance acoplada por espectrometria de massas com ionização por (HPLC-ESI-MS/MS): Aplicação em um estudo de bioequivalência em voluntárias sadias pós menopausa** 2017. Disponível em <<http://repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/332417>>/Acesso EM: 22.Ago.2019.

ZANCANARO I, LIMBERGER RP, BOHEL PO, DOS SANTOS MK, DE BONI RB, PECHANASKY F, CALDAS ED. **Prescription and illicit psychoactive drugs in oral fluid--LC-MS/MS method development and analysis of samples from Brazilian drivers.** *Forensic Sci Int.* 2012 Nov 30;223(1-3):208-16. doi: 10.1016/j.forsciint.2012.08.048. Epub 2012 Sep 20.